

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS SÃO GABRIEL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DE DOSES SUBLETAIS DE FIPRONIL SOBRE O COMPORTAMENTO
EXPLORATÓRIO E A MEMÓRIA OLFATIVA DE BARATAS DA ESPÉCIE
*Nauphoeta cinerea***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIA EDUARDA ROSA

SÃO GABRIEL

2021

MARIA EDUARDA ROSA

**EFEITO DE DOSES SUBLETAIS DE FIPRONIL SOBRE O COMPORTAMENTO
EXPLORATÓRIO E A MEMÓRIA OLFATIVA DE BARATAS DA ESPÉCIE
*Nauphoeta cinerea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Senso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: professor Dr. Cháriston André Dal Belo

SÃO GABRIEL

2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais)

Dedico essa dissertação a minha
família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cháriston, todo meu agradecimento pela orientação, disponibilidade e amizade. Agradeço por ter me acolhido há 5 anos atrás, me dado a oportunidade de aprender e crescer como pessoa e profissional. Serei sempre grata!

À Prof.^a Dr.^a Lúcia Vinadé, por igualmente me receber no laboratório, pelos ensinamentos que ofereceu a mim desde a época de Graduação e pela disponibilidade. Muito obrigada!

RESUMO

Agroquímicos são substâncias utilizadas para prevenir, destruir e controlar qualquer praga ou para proteger a commodity da deterioração durante a colheita, armazenamento e transporte (FAO, 2002). O Fipronil é um inseticida, formicida e cupinicida pertencente a classe dos fenilpirazóis (MOFFAT, 1993). Seu mecanismo de ação baseia-se no bloqueio não competitivo pré e pós-sináptico da passagem dos íons de cloro pelo neurotransmissor GABA (ácido γ -aminobutírico) (ZHAO, 2004). O pesticida Fipronil tem sido apontado como responsável pela mortandade em massa de abelhas nos últimos anos no mundo. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos de doses subletais de Fipronil sobre o comportamento, sistema nervoso periférico e memória olfativa de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* e associar os resultados com os prováveis efeitos do Fipronil em abelhas. Os resultados obtidos demonstraram que doses subletais de Fipronil induziram: aumento significativo no tempo de *grooming* de perna, porém, não houve alteração significativa no *grooming* de antena, déficit locomotor dose-dependente, bloqueio neuromuscular, atividade cronotrópica negativa irreversível na frequência cardíaca e alterações na aprendizagem e formação da memória olfativa de *N. cinerea*. Com base na literatura é possível correlacionar os resultados obtidos com os efeitos do Fipronil em doses residuais no ambiente sobre o comportamento e memória de abelhas.

Palavras-chave: Abelhas, *Grooming*, Memória olfativa; Aprendizagem.

ABSTRACT

Agrochemicals are substances used to prevent, destroy and control any pest or to protect a commodity from deterioration during collection, storage and transport (FAO, 2002). Fipronil is an insecticide, anticide and termiteicide belonging to the class of phenylpyrazoles (MOFFAT, 1993). Its mechanism of action is based on the non-applicable pre- and postsynaptic blocking of the passage of chlorine ions by the neurotransmitter GABA (γ -aminobutyric acid) (ZHAO, 2004). The pesticide Fipronil has been pointed out as responsible for the mass mortality of bees in the last years in the world. The objective of this work was to evaluate the effects of sublethal doses of Fipronil on the behavior, peripheral nervous system and olfactory memory of cockroaches of the species *Nauphoeta cinerea* and to associate the results with the probable effects of Fipronil on bees. The results obtained showed that the sublethal doses of Fipronil induced: significant increase in leg grooming time, however, there was no significant change in antenna grooming, dose-dependent locomotor deficit, neuromuscular block, irreversible negative chronotropic activity in frequency and changes in learning and formation of the olfactory memory of *N. cinerea*. Based on the literature, it is possible to correlate the results obtained with the effects of Fipronil in residual doses in the environment on the behavior and memory of bees.

Keywords: Bees, Grooming, Olfactory Memory; Learning.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agroquímicos

Fatores como o aumento na expectativa de vida e diminuição na taxa de mortalidade infantil, foram responsáveis pela impulsionamento no crescimento exponencial da população mundial após o período pós-guerra e no aumento do consumo *per capita* e expansão das cidades (SAATH, 2018). Segundo informações da Organização das Nações Unidas (ONU), em 2024 a população mundial será de aproximadamente 8 bilhões de pessoas e em 2050 superior a 9,6 bilhões, um crescimento de 34,90% entre 2012 e 2050 (ONU, 2013). Em 1950 o uso de agroquímicos e fertilizantes começou a ser defendido e difundido no mundo com o objetivo de melhorar e aumentar a produção de alimentos para suprir a demanda mundial em virtude das projeções sobre o crescimento acelerado e contínuo da população, o que ficou conhecido como “Revolução Verde” (KHUSH, 2001).

O uso de pesticidas no Brasil cresceu a partir dos anos 1990 proporcionalmente ao dos demais países do Mercosul, mas superior ao de outros grandes produtores agrícolas (tabela 1) (MORAES, 2019).

TABELA 1: Quantidade de pesticidas utilizados pelas dez maiores economias do mundo, além dos demais países do Mercosul, BRICS e Tratado Norte-Americano de Livre Comércio entre 1991-2015.

Uso de pesticidas: quantidade total (em 1 mil toneladas) – médias móveis centradas (três anos)									
	1991	1995	1999	2003	2007	2011	2015	2015 (1991=100)	Percentual sobre total mundial (2015)
Argentina	26	41	63	63	77	112	208	794	5,1%
Brasil	58	93	129	181	285	345	375	643	9,2%
Paraguai	3	11	7	15	25	35	27	806	0,7%
Uruguai	2	3	4	7	12	19	17	901	0,4%
África do Sul	17	18	26	27	27	27	27	162	0,7%
China	787	1.079	1.287	1.351	1.620	1.792	1.787	227	43,6%
Índia	73	60	47	40	26	50	56	77	1,4%
Canadá	29	32	42	35	45	66	76	257	1,8%
Estados Unidos	396	427	429	420	391	391	408	103	9,9%
México	27	27	27	16	47	52	46	171	1,1%
Japão	80	80	80	68	62	54	53	66	1,3%
Alemanha	31	29	33	35	41	43	47	152	1,1%
França	95	90	107	78	76	62	71	75	1,7%
Itália	93	80	82	88	78	68	61	66	1,5%
Reino Unido	30	34	35	31	22	17	19	62	0,5%
Mundo	2.290	2.675	3.034	3.150	3.583	3.953	4.098	179	-

Fonte: IPEA, 2019.

Em 2008 o Brasil alcançou a liderança mundial no consumo de agroquímicos após consumir 733,9 milhões de toneladas de ingredientes ativos, o grande consumo de

agroquímicos pelo Brasil tem relação com a área de plantio de grãos, fibras, entre outros (SOARES, 2010). Atualmente o Brasil é considerado uma das maiores potências no setor agropecuário do mundo, segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) em 2020 o agronegócio alcançou a participação de 26,6% no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, o que corresponde a R\$ 2 trilhões (CNA, 2021). No mundo o Brasil movimentava cerca de US\$ 10 bilhões por ano, o que corresponde a 20% do mercado global, estimado em US\$ 50 bilhões (VASCONCELOS, 2018). Em 2017 havia 517 registros de ingredientes ativos (agroquímicos) no Brasil, já no início de 2019 existiam cerca de 13.300 registros (MORAES, 2019).

De acordo com a FAO, agroquímicos são substâncias utilizadas para prevenir, destruir e controlar qualquer praga ou para proteger a commodity da deterioração durante a colheita, armazenamento e transporte (FAO, 2002). No Brasil a lei federal nº 7.802 de 11/07/89, regulamentada pelo Decreto nº 4.074 no artigo 1, Inciso IV, define “agrotóxico” como:

“Considera-se os agrotóxicos e afins como produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danos de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores do crescimento (BRASIL, 1989)”.

Os agroquímicos podem ser classificados de acordo com a sua função (inseticidas, acaricidas, larvicidas, nematicidas, moluscicidas, bacteriostáticos, bactericidas, fungicidas, herbicidas, pediculicidas e rodenticidas), classe química (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, fenilpirazóis, neonicotinóides, triazinas etc.) e pelo nível de periculosidade ambiental no meio ambiente, no qual são utilizados os parâmetros: bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico (WEISS et al., 2004). Em agosto de 2019 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou no Diário Oficial da União a reclassificação toxicológica dos agroquímicos já registrados no Brasil (Figura 1) (ANVISA, 2019).

CATEGORIA 1	CATEGORIA 2	CATEGORIA 3	CATEGORIA 4	CATEGORIA 5	NÃO CLASSIFICADO
EXTREMAMENTE TÓXICO	ALTAMENTE TÓXICO	MODERADAMENTE TÓXICO	POUCO TÓXICO	IMPROVÁVEL DE CAUSAR DANO	NÃO CLASSIFICADO
				SEM SÍMBOLO	
PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	SEM ADVERTÊNCIA

Figura 1. Reclassificação toxicológica dos agrotóxicos registrados no Brasil pela ANVISA em 2019. Fonte: ANVISA, 2019.

1.2 Fipronil

O Fipronil é um inseticida, formicida e cupinicida de 2ª geração desenvolvido entre 1985 e 1987 e lançado em 1993 pela companhia Rhône-Poulenc Agro, comercialmente registrado como Regente®, com o objetivo de reduzir danos ao meio ambiente e como alternativa à resistência de alguns insetos a outros compostos inseticidas (TINGLE et al., 2003). Fipronil pertencente a classe dos fenilpirazóis e é largamente utilizado na agricultura brasileira (Figura 2) (MOFFAT, 1993). Seu mecanismo de ação baseia-se no bloqueio não competitivo pré e pós-sináptico da passagem dos íons de cloro pelo neurotransmissor GABA (ácido γ -aminobutírico) matando os insetos por hiperexcitação neuronal e paralisia (Figura 2) (ZHAO, 2004). O Fipronil sofre degradação lenta no solo, através da oxidação, hidrólise ou redução, (GRANZOTO, 2018).

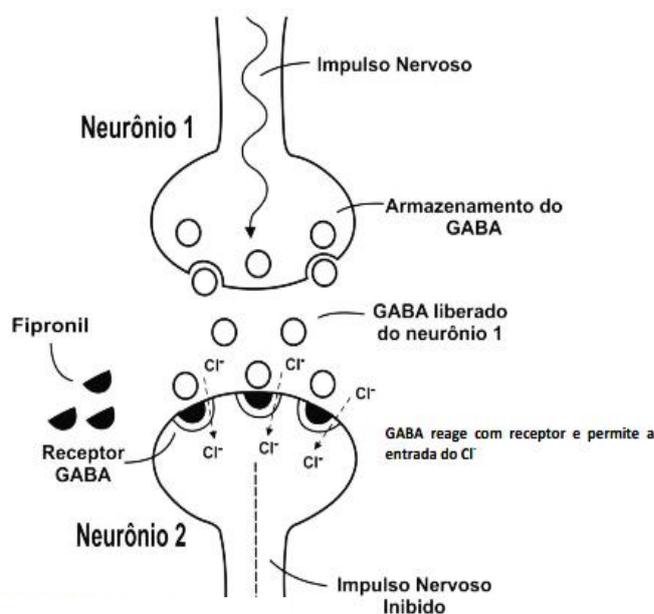


Figura 2. Representação da ação do fipronil no receptor GABA. Fipronil bloqueia a ativação do receptor e a ausência de inibição sináptica leva à hiperexcitação do sistema nervoso central. Fonte: Adaptado de Bloomquist (2015).

1.3 Mortandade das abelhas

A classe Insecta pertence ao filo Arthropoda e é dividida em várias ordens. As abelhas fazem parte da ordem Hymenoptera (himenópteros) e pertencem à superfamília Apoidea (grupo Apiformes) (RUTTNER, 1988). No Brasil foram descritas 1.678 espécies de abelhas, porém os cientistas calculam que existam mais de 2.500 espécies, uma das maiores diversidades do planeta (FRANCESCHINELLI et al., 2003).

Cerca de 75% das espécies de vegetais existentes no planeta são dependentes da polinização (transporte do pólen para a fecundação e reprodução das espécies de plantas) (NABHAN; BUCHMANN, 1997). As abelhas são os maiores polinizadores do mundo e responsáveis pela reprodução e sobrevivência de cerca de 73% das espécies de vegetais cultivadas (RICKETTS et al., 2008). O uso de agrotóxicos vem aumentando mundialmente, trazendo prejuízos a biodiversidade (CONNOLLY, 2013). Em fevereiro de 2021, mais de 600 mil abelhas morreram no sul de Queensland e o fipronil foi encontrado em suas colmeias, fazendo com que toda a produção fosse descartada (ROBINSON & SANDERS, 2021).

1.3 Baratas como modelo biológico e estudo

Baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* são insetos-praga primitivos. Esses animais possuem corpo de cor acinzentada e dividido em metâmeros (segmentos agrupados em cabeça, tórax e abdome). Os órgãos internos estão dispostos na cavidade corporal (hemocele) com a presença da hemolinfa (responsável por diversas funções como dispersão de nutrientes e remoção de metabólitos) e são revestidos por uma fina camada de tecido conjuntivo (GULLAN e CRANSTON, 2014). Nos últimos anos baratas têm sido utilizadas em estudos de neurotoxicidade por possuírem mais de 200 neurotransmissores idênticos aos presentes em outros seres vivos, além disso, alguns neurotransmissores encontrados em baratas apresentam homologia com os encontrados em mamíferos, incluindo humanos (HUBER, MASLER e RAO, 1990).. Os resultados obtidos em pesquisas recentes demonstram a importância do uso desse inseto para a identificação e compreensão do mecanismo de ação de diversas toxinas de origem animal, vegetal e sintéticas sobre o sistema nervoso de invertebrados (ADEDARA et al., 2015; CARRAZONI et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

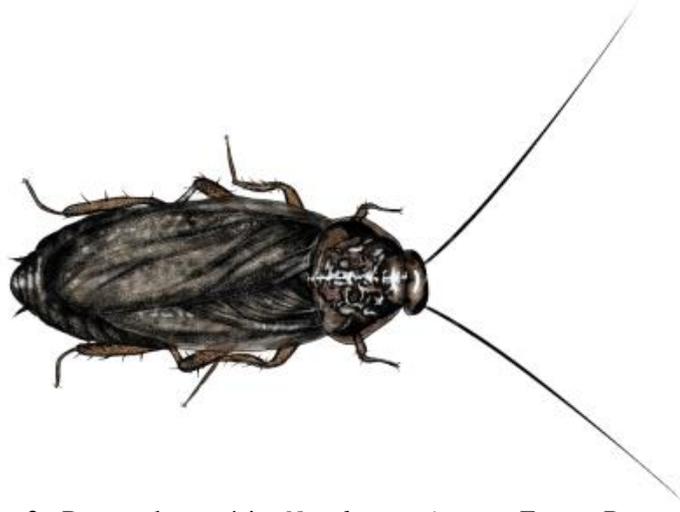


Figura 2. Barata da espécie *Nauphoeta cinerea*. Fonte: Bruna Borges (Unipampa).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos de doses subletais de Fipronil sobre o comportamento, sistema nervoso periférico e memória olfativa de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* e associar os resultados com os prováveis efeitos induzidos pelo Fipronil responsáveis na mortandade das abelhas.

2.2 Específicos

- Avaliar os efeitos de doses subletais de Fipronil sobre o comportamento de limpeza (*grooming*) de perna e antena de baratas da espécie *N. cinerea*;
- Avaliar os efeitos de doses subletais de Fipronil sobre o comportamento de locomoção exploratória de baratas da espécie *N. cinerea*;
- Avaliar os efeitos de doses subletais de Fipronil sobre a junção neuromuscular do 3º par de pernas *in vivo* de baratas da espécie *N. cinerea*;
- Avaliar os efeitos de doses subletais de Fipronil frequência cardíaca de baratas da espécie *N. cinerea*;
- Avaliar os efeitos de doses subletais de Fipronil sobre memória olfativa de baratas da espécie *N. cinerea*.

3. METODOLOGIA

3.1 Animal modelo

Neste trabalho foram utilizadas baratas adultas de ambos os sexos mantidas em caixas de poliestireno no biotério da UNIPAMPA (SG-RS), com água e ração *ad libitum*, temperatura e iluminação controladas ($\pm 25^{\circ}\text{C}$ e ciclos: claro/ escuro de 12 horas).

3.3 Fipronil

O Fipronil utilizado neste trabalho foi Regent® 800 WG fabricado pela BASF Agri-Production SAS e adquirido no comércio da cidade de Borborema – SP.

3.4 Tratamentos

Os tratamentos com Fipronil (FIP) foram realizados através de injeção no 3º segmento abdominal do inseto com auxílio de seringa do tipo Hamilton, utilizando para todos os tratamentos volume final de 10 μl , assim como, com o grupo controle (solução salina 0,9%).

3.5 Protocolo para avaliação do comportamento de *grooming* (n=30)

O comportamento de higienização das baratas foi avaliado após o tratamento com FIP (0,1; 0,01 e 0,001 μg / g animal) conforme descrito por Sturmer et al. (2014). A atividade de *grooming* foi registrada em segundos (contínuos) durante 30 minutos. Todos os experimentos foram realizados em ambiente controlado com temperatura mantida a 24-25°C.



Figura 3. Atividade de *grooming* de *Nauphoeta cinerea*. Em (A) *grooming* de antena e (B) *grooming* de perna. Fonte: Bruna Borges (Unipampa).

3.6 Protocolo para avaliação do comportamento de locomoção exploratória (n=30)

A atividade locomotora exploratória dos insetos foi avaliada conforme descrito por Adedara et al. (2015) com algumas modificações. Após o tratamento com FIP (0,1; 0,01 e 0,001 μg / g animal) os animais foram inseridos em uma caixa de poliestireno branca (15 cm em largura \times 25 cm de comprimento \times 7 cm de altura), uma webcam (Philips, Brasil)

posicionada acima da caixa fez o registro visual do comportamento do inseto durante 10 minutos. Os vídeos foram posteriormente analisados utilizando os softwares IDtracker® e Matlab®. Os padrões analisados nesse protocolo foram: distância total percorrida, número de episódios de imobilidade e % do tempo em que o animal se manteve imóvel. Todos os experimentos foram realizados em ambiente controlado com temperatura mantida a 24-25°C.

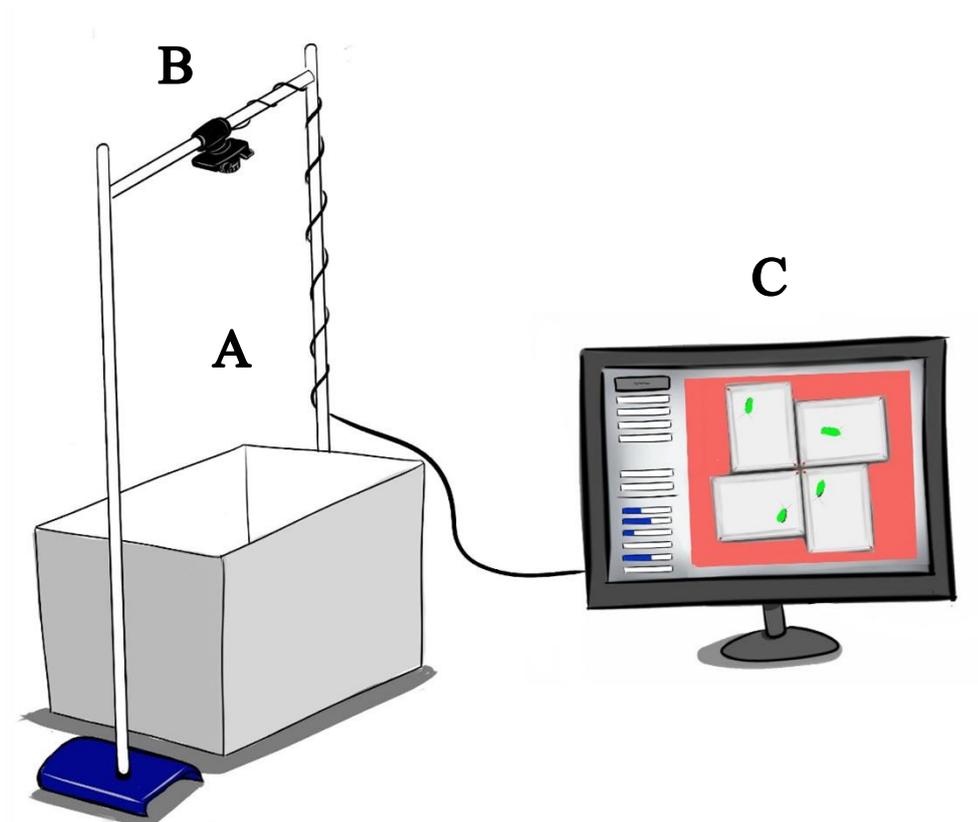


Figura 4. Representação do protocolo de locomoção exploratória. Em (A) caixa de poliestireno onde o animal será inserido, (B) aparato para o registro do comportamento do animal com webcam e (C) registro e análise do comportamento de *N. cinerea* através de softwares. Fonte: Bruna Borges (Unipampa-SG).

3.7 Protocolo para preparação do nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico (n=9)

Os registros eletromiográficos da perna de *N. cinerea* foram realizados conforme descrito por Martinelli et al. (2014). Após o arrefecimento (-5°C por 5 min) o inseto foi fixado em decúbito dorsal em uma placa de dissecação com alfinetes. Uma perna do 3º par de pernas do inseto foi conectada a um transdutor isométrico de força de 1,0 g (AVS Instruments, São Carlos, SP, Brasil) com linha de sutura. Em seguida, um eletrodo foi inserido no nervo 5 com estímulo elétrico a 0,5 Hz / 5ms. A resposta da força de contração da perna do inseto foi registrada durante 120 minutos utilizando o software AQCAD (AVS Instruments, São Carlos, SP, Brasil) e posteriormente os dados obtidos foram analisados utilizando o software ANCAD

(AVS Instruments, São Carlos, SP, Brasil). Todos os experimentos foram realizados em ambiente controlado com temperatura mantida a 24-25°C.

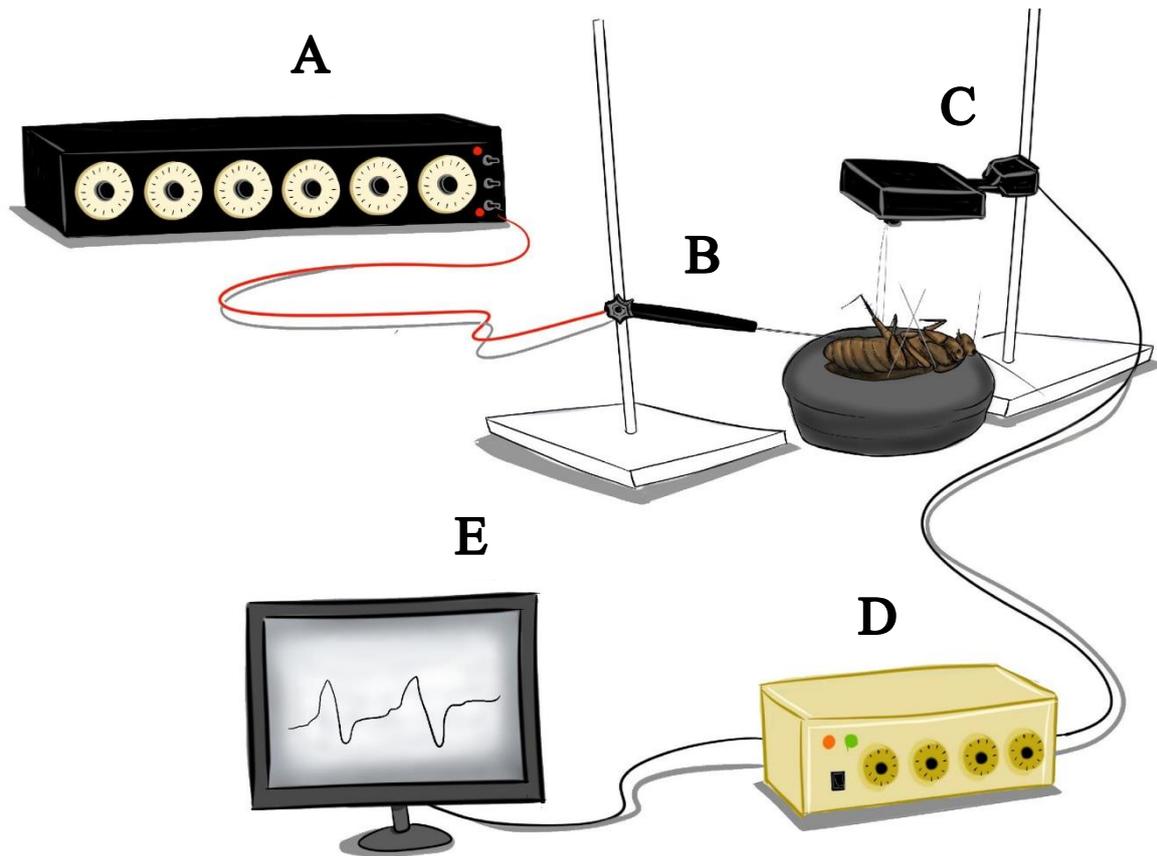


Figura 5. Representação do protocolo para preparação do nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico. Em (A) estimulador elétrico, (B) eletrodo inserido no nervo 5 do inseto, (C) perna do animal conectada ao transdutor isométrico, (D) amplificador de sinais e (E) registro e análise realizados pelos softwares AQCAD e ANCAD respectivamente.

3.8 Protocolo para preparação coração semi-isolado (n=9)

A avaliação da frequência cardíaca de *N. cinerea* foi realizada conforme descrito por Carrazoni et al. (2016). O inseto após ser arrefecido (-5°C por 5 min) foi fixado em decúbito dorsal sobre uma placa de dissecação, em seguida, foi removida a cutícula abdominal do animal e os órgãos foram afastados de forma que as câmaras cardíacas ficassem expostas. Com auxílio de pipeta foi inserido sobre o coração 200µL de solução salina à temperatura ambiente para a manutenção das condições viáveis para o funcionamento e após a estabilização realizou-se o registro dos batimentos cardíacos por 5 minutos com microscópio estereoscópico (Olympus,

Damstat, Alemão), em seguida, foi inserido 190 μ L de solução salina + 10 μ L de tratamento nas concentrações (0,1; 0,01; e 0,001 μ g / g animal) e realizado o registro da frequência cardíaca durante 30 minutos. O coração foi “lavado” com solução salina e novamente foi inserido 200 μ L de solução salina e durante 5 minutos foi avaliado se houve recobro dos batimentos cardíacos. Todos os experimentos foram realizados em ambiente controlado com temperatura mantida a 24-25°C.

3.9 Protocolo para avaliação da memória olfativa (n=30)

Os testes de memória olfativa dos insetos foram realizados conforme descrito por Matsumoto e Mizunami (2000) com algumas modificações. Primeiramente os animais foram submetidos a uma privação preliminar de alimento e água por um período de 15 dias antes dos protocolos. Os procedimentos foram realizados em aparelho apropriado, desenvolvido exclusivamente para os testes (Figura 6). Inicialmente, os insetos foram mantidos em (A) por um período de 5 minutos. Após a adaptação, o portão (B) foi levantado dando acesso à arena (C), onde um cilindro giratório (D) oferecia simultaneamente duas fontes de odor colocadas dentro de cada um dos poços (E). Assim que o inseto entrou na câmara (C), os testes começaram. Durante 10 minutos, o tempo (s) gasto pelo inseto sondando cada fonte de odor foi registrado enquanto a posição dos poços era invertida a cada minuto. O teste de memória foi dividido em duas fases: (1) teste de preferência e (2) teste de memória olfativa. Os testes de preferência foram realizados para demonstrar que as baratas naturalmente se sentem atraídas pelo odor de baunilha e são repelidas pelo odor de citronela. Na segunda fase do experimento, 100ml de solução de NaCl 40% foram disponibilizados na superfície da fonte de odor de baunilha, enquanto 100ml de solução de sacarose a 40% foram disponibilizados na fonte de

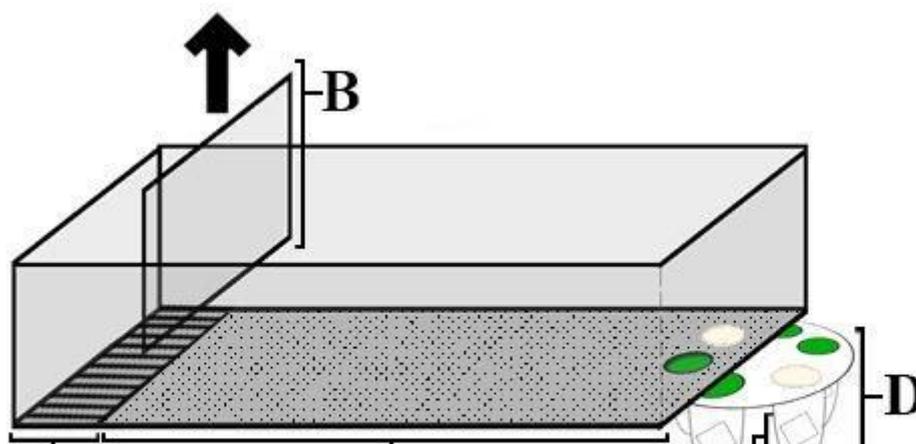


Figura 6 – Aparato utilizado para os testes de memória olfativa com *N. cinerea*. Em (A) área onde os animais foram mantidos alguns minutos antes do início do experimento, (B) portão (C) área onde o experimento foi realizado, (D) cilindro giratório contendo as fontes de odor, (E) fontes de odor. O experimento foi registrado durante 10 minutos.

odor de citronela, novamente foi realizado o registro do tempo (s) de sondagem dos insetos durante 10 minutos.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para realizar a comparação entre duas médias, foi utilizado o teste t de *Student*. Para comparar as médias de dois ou mais grupos, onde “Y” é geralmente uma variável, a ANOVA unilateral foi realizada seguida por *Tukey* (todos os grupos foram comparados entre si) ou *Dunnet* (os grupos foram comparados com uma solução salina de controle positivo). Para comparar mais de duas médias, e se o “Y” tivesse mais de uma variável, foi aplicada a ANOVA de dois fatores, seguida de *Bonferroni* como post hoc (os grupos foram comparados com um controle positivo). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 7.0. (Software, San Diego, CA, EUA). Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 05$.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do comportamento de *grooming* de *N. cinerea* (n=30)

Os ensaios para avaliação do comportamento de higienização de *N. cinerea* realizados com doses subletais de FIP (0,1; 0,01 e 0,001 μ g/ g) demonstram aumento significativo no tempo de *grooming* de perna, porém, não houve alteração significativa no *grooming* de antena (Figura 7).

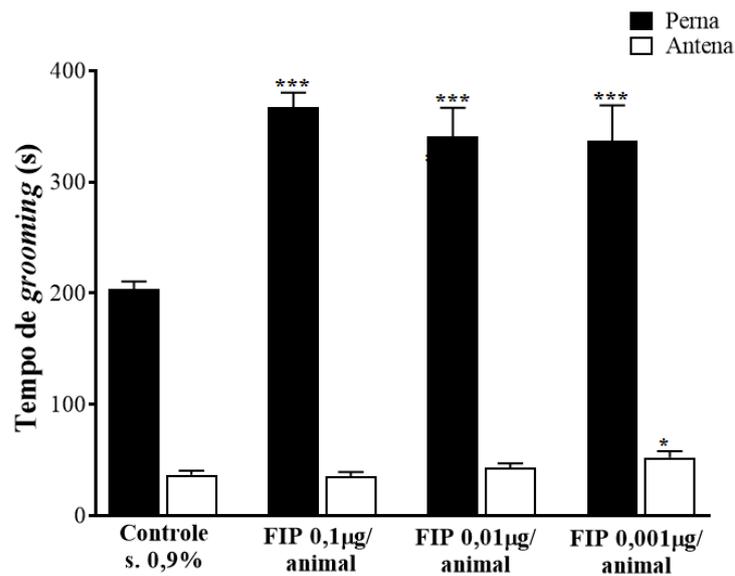


Figura 7 - Comportamento de *grooming* induzido pelo tratamento com doses subletais de FIP (0,1; 0,01 e 0,001µg/ animal). Os tratamentos com FIP induziram aumento significativo no comportamento de limpeza de pernas de *N. cinerea*. O experimento foi registrado durante 30 minutos e os resultados foram expressos como Média ± EPM através da análise One-way ANOVA, seguida pelo teste Dunnett, *** p < 0.001; n = 30.

4.2 Avaliação do comportamento de locomoção exploratória de *N. cinerea* (n=30)

Os experimentos para avaliação da locomoção exploratória de *N. cinerea* realizados com doses subletais de FPL (0,1; 0,01 e 0,001µg/ g) induziram déficit locomotor dose-dependente. A maior dose causou uma diminuição significativa na distância total percorrida pelo inseto, chegando a aproximadamente 46% (Figura 8-A). A dose mais elevada aumentou em aproximadamente 200% o número de episódios imóveis (Figura-8B) causando também cerca de 80% a mais de letargia quando comparada ao controle (Figura - 8C).

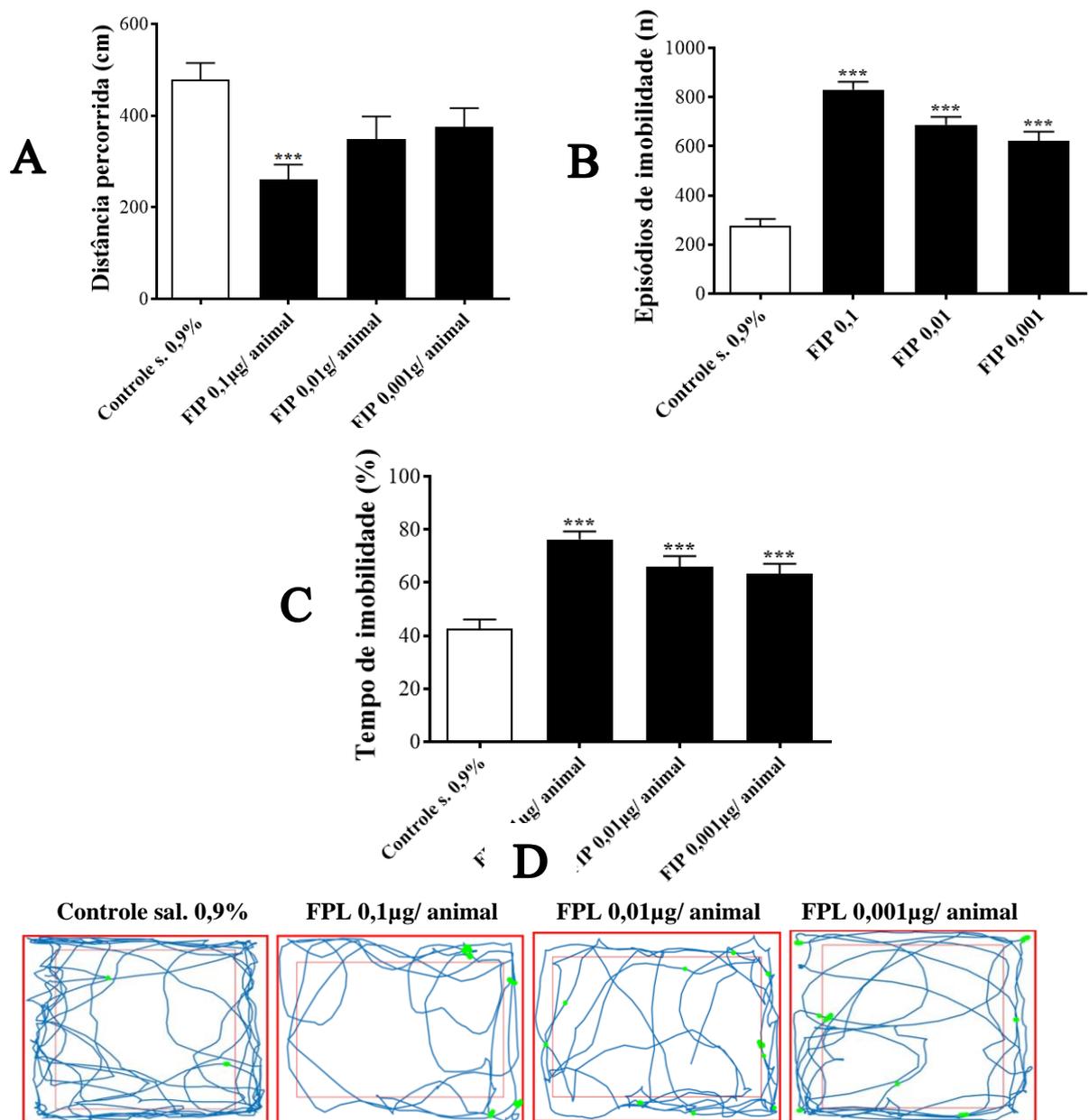


Figura 8 – Comportamento de locomoção exploratória de *N. cinerea*. Os tratamentos com FIP induziram déficit locomotor. Em (A) a distância total percorrida, (B) episódios de imobilidade, (C) tempo de imobilidade (%) e (D) análise da trajetória percorrida pelo inseto durante os 10 minutos de registro. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Dunnett como post-hoc, *** p < 0,001 (n = 30).

4.3 Preparação nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico (PNMCAM) (n=9)

As preparações nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de baratas *N. cinerea* com doses subletais de FPL (0,1, 0,01 e 0,001 µg / g) demonstraram que a maior dose induziu bloqueio neuromuscular ± 45% (Figura 9).

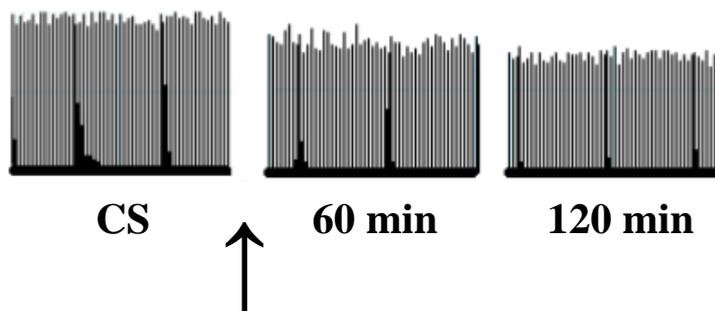
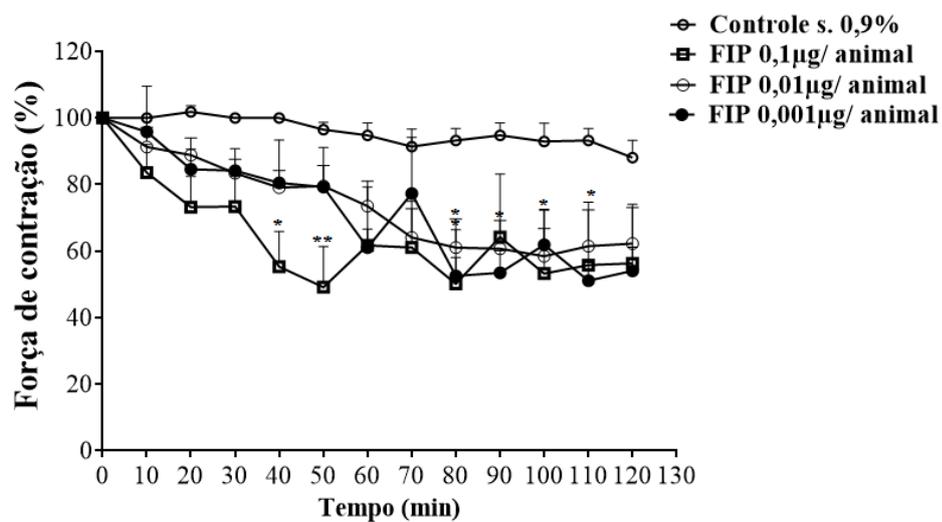


Figura 9 - Junção neuromuscular de *N. cinerea*. As PNMCM de *N. cinerea* realizadas com FIP (0,1, 0,01 e 0,001µg/ g) demonstraram que a maior dose induziu diminuição significativa na força de contração em comparação ao grupo controle. A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni como post-hoc. * p <0,05, ** p <0,0, (n=6). CS = controle salina 0,9%, ↑ administração de FIP.

4.4 Preparação coração semi-isolado de *N. cinerea* (n=9)

A avaliação da frequência cardíaca de *N. cinerea* foi realizada através da preparação coração semi-isolado *in vivo*. Os tratamentos realizados com FIP (0,1, 0,01 e 0,001µg/ g) demonstraram diminuição irreversível e dependente da dose, a maior dose induziu diminuição de $\pm 30\%$ na frequência cardíaca, juntamente com a dose intermediária (Figura 10). Mesmo após a lavagem da preparação, nenhuma recuperação da frequência cardíaca foi observada.

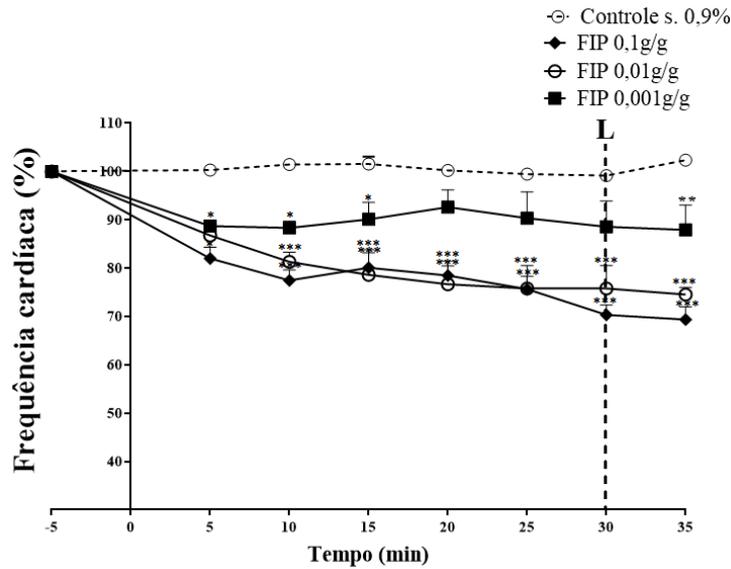


Figura 10 - Atividade cronotrópica negativa irreversível induzida por FIP em preparações de coração semi-isolado de *N. cinerea*. L: lavagem com solução salina 0,9%. A análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA seguida pelo teste de *Bonferroni* como post-hoc. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n = 9).

4.5 Avaliação da memória olfativa de *N. cinerea* (n=30)

Para a avaliação da memória olfativa de *N. cinerea* foi realizado primeiramente o teste de preferência olfativa com solução NaCl 0,9% que confirmou a preferência natural de baratas pelo odor de baunilha (Figura 11-A). Os testes de memória olfativa com solução de NaCl 0,9% demonstraram a inversão da preferência de *N. cinerea* pelo odor de citronela através do tempo (s) gasto sondando os orifícios durante 10 minutos de registro (Figura 11-B). Os testes de memória olfatória com doses subletais de FIP (0,1, 0,01 e 0,001 $\mu\text{g} / \text{g}$) demonstraram que todas as doses induziram uma diminuição significativa no tempo (s) de sondagem por ambos os poços de odor (Figura 11-C).

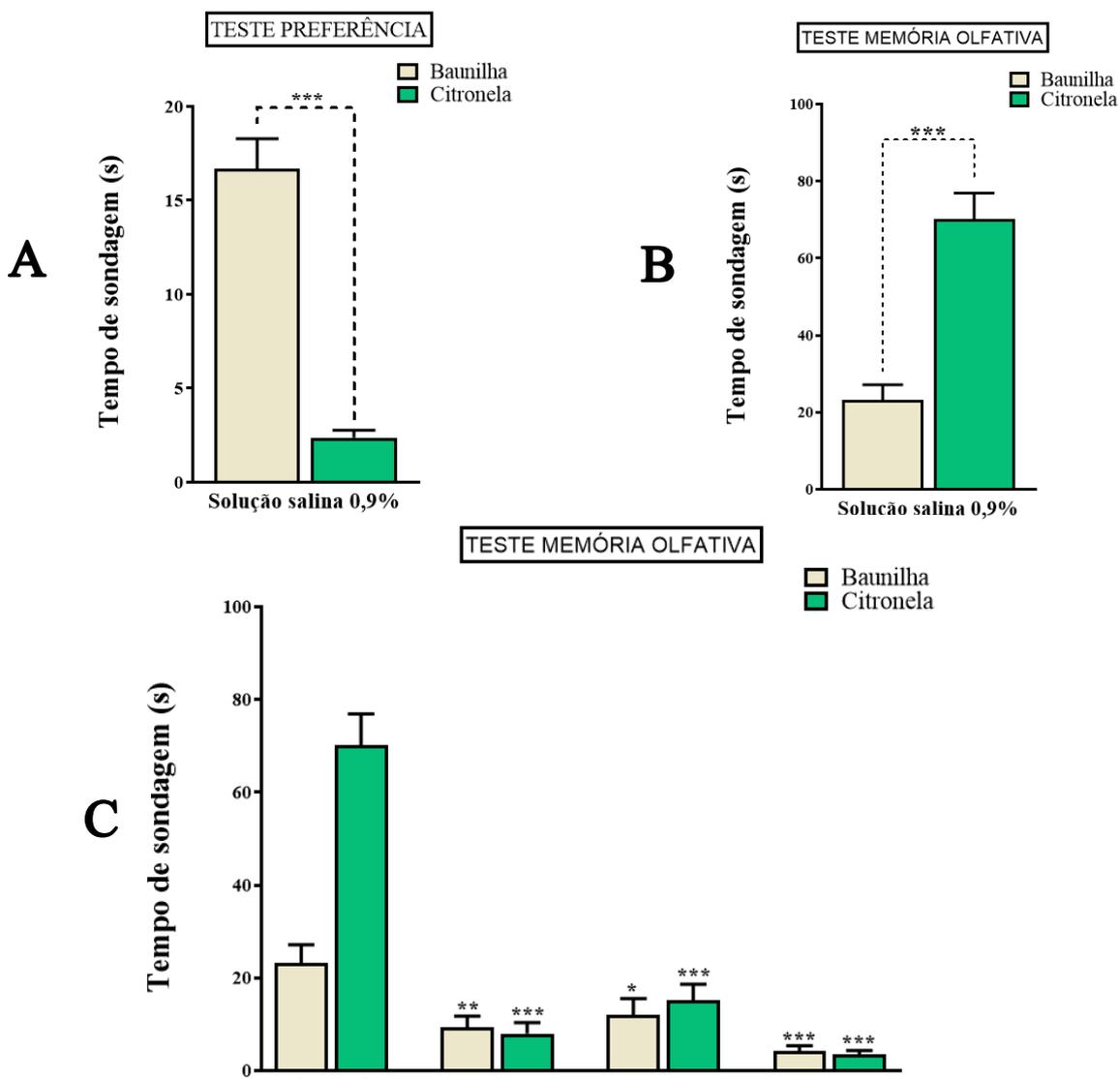


Figura 11 – Avaliação da memória olfativa de *N. cinerea*. Em (A) teste de preferência com solução salina 0,9% demonstrou que os insetos possuem preferência natural pelo odor de baunilha, (B) teste de memória olfativa com solução salina 0,9% demonstrou a inversão da preferência de *N. cinerea* para o odor de citronela e (C) tratamentos com FIP (0,1; 0,01 e 0,001 µg/ animal) induziram diminuição significativa do tempo (s) de sondagem do inseto por ambos os odores. A análise estatística utilizada foi One-Way ANOVA, seguida pelo teste de *Dunnett* como post-hoc. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (n=30).

5. DISCUSSÃO

O *grooming* é o movimento de limpeza do corpo dos insetos e está relacionado à diversas funções, como: asseio corporal, corte, sinalização social, atividade de deslocamento e de excitação corporal (SPRUIJT et al., 1992). A neurotransmissão octopaminérgica e dopaminérgica são responsáveis pelo comportamento de *grooming* em insetos (LIBERSAT e PHUEGER, 2004). Os resultados demonstraram que doses subletais de FIP induziram aumento no tempo de limpeza de pernas em *N. cinerea*, caracterizando modulação da resposta octopaminérgica (STURMER et al., 2014). Alterações no comportamento de *grooming* estão relacionadas com diversos fatores fundamentais para a sobrevivência e permanência dos insetos

no meio ambiente e podem influenciar em processos nos processos essenciais para a manutenção da espécie, como: fecundidade e longevidade (FRANÇA et al., 2017). No sistema nervoso de invertebrados o Glutamato (GLU) é o principal neurotransmissor excitatório, enquanto o ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório (OSBOURNE, 1996). Os resultados da PNMCM demonstraram que doses subletais de FIP diminuíram a força de contração muscular da perna de *N. cinerea*. A diminuição da resposta contrátil observada é resultado de alterações na liberação de GLU/ GABA nos insetos (CHAPMAN, 2013).

Doses subletais de FIP induziram alterações no comportamento de locomoção exploratória de *N. cinerea*, caracterizadas pela diminuição significativa no parâmetro distância percorrida e aumento nos parâmetros episódios de imobilidade e tempo de imobilidade (%). A modulação no comportamento de locomoção e exploração dos insetos podem aumentar a suscetibilidade desses insetos aos predadores (SPRUIJT et al., 1992), pois a locomoção é a maior estratégia defensiva utilizada para evitar e escapar de predadores no meio ambiente (ADEDARA et al., 2015). As abelhas realizam a manutenção do nível de homeostase através da mobilização de mecanismos comportamentais e feromonas (LIPINSK, 2001). A atividade de voo permite o reconhecimento do ambiente, de fatores bióticos (feromônios, doenças, stress etc.) e abióticos (chuva, alimento, temperatura etc.), esses fatores podem influenciar no mau funcionamento da colônia e estão associados com enxameação e abandono, portanto, o comportamento e a locomoção são essenciais para a manutenção e sobrevivência desses insetos (HEPBURN e RADLOFF, 1998).

As alterações induzidas pelas doses subletais de FIP na frequência cardíaca de *N. cinerea* estão relacionadas à ação do composto sobre o sistema octopaminérgico. A Octopamina é o principal neurotransmissor envolvido na aceleração cardíaca em insetos. Estudos anteriores demonstraram que altas concentrações de Octopamina influenciam na aceleração dos batimentos cardíacos, enquanto pequenas concentrações possuem efeito de diminuir o ritmo cardíaco (PAPAEFTHIMIOU E THEOPHILIDIS 2001). Existem informações controversas sobre o efeito do neurotransmissor Acetilcolina (ACh) sobre a frequência cardíaca de insetos, alguns estudos demonstraram que a ACh é responsável pelo aumento do ritmo cardíaco, enquanto outros dados sugerem que a ACh induz diminuição nos batimentos cardíacos (MILLER, 1977; RICHARDS, 1966). Portanto, é possível que os tratamentos com doses subletais de FIP estejam relacionados com (1) interação de FIP com o neurotransmissor ACh, (2) interação de FIP com receptores de ACh e (3) interação de FIP com células próximas aos receptores de ACh que levaria a modulação desses receptores, podendo desencadear diversas

alterações neurofisiológicas e comportamentais nesses insetos (ALONZO; CORRÊA, 2008). O sistema olfativo de insetos é através da conversão de sinal químico em elétrico, os impulsos gerados são conduzidos do nervo antenal para o lóbulo antenal (glomérulos), a informação captada é direcionada para o “*mushroom body*” o qual está associado aos processos de aprendizagem e memória (HILDEBRAND & SHEPHERD, 1997; DAVIS, 2005). O processo de aprendizagem está implicitamente associado com a existência da memória através da capacidade de reter e associar informações (DUDAI, 2002). Baratas adultas da espécie *Periplaneta americana* são capazes de associar odores aversivos como menta a uma recompensa como solução de sacarose e odores de preferência como baunilha a uma punição como solução salina (WANTANABE et al., 2003). Os resultados dos testes de memória olfativa com doses subletais de FIP demonstraram diminuição da sensibilidade olfativa e conseqüentemente déficit na capacidade de aprendizagem e formação da memória em *N. cinerea*. O processamento de associação de recompensas está associado com a neuromodulação octopaminérgica, enquanto, o comportamento de aversão está relacionado com a neuromodulação dopaminérgica (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012).

O olfato é uma importante ferramenta utilizada pelos insetos, como as abelhas, e está relacionado com o comportamento e fisiologia, por exemplo, os feromônios são substâncias produzidas e liberadas entre seres da mesma espécie, como mensageiros e desencadeiam respostas comportamentais previsíveis dentro da colônia (WINSTON e SLESSOR, 1992). Em abelhas a capacidade de reconhecerem odores é crucial para processar as informações do meio ambiente e transmiti-las para os demais indivíduos da colônia. Em abelhas a neurotransmissão GABAérgica é necessária para a diferenciação de odores, portanto, modulações desses receptores podem causar prejuízos nos processos de aprendizagem olfativa em insetos (STOPFER et al., 1997; SACHSE e GALIZA, 2002). Os receptores do neurotransmissor Glutamato também estão envolvidos em processos de aprendizagem, formação e recuperação da memória (LEBOULLE, 2012; GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012). Além disso, existem pelo menos dois tipos de receptores do neurotransmissor ACh envolvidos com o processo e formação e recuperação de memória de longo prazo em abelhas (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com esse trabalho demonstraram que o pesticida Fipronil em doses subletais induz alterações no comportamento, sistema nervoso periférico e memória olfativa de insetos como a barata *N. cinerea*.

Fatores como (1) falta de treinamento (capacitação) do agricultor responsável pela aplicação do agroquímicos, (2) compromisso do agricultor com as especificações de uso do produto pelo fabricante e (3) falta de fiscalização eficaz pelo ministério da agricultura, tornam o uso do Fipronil prejudicial para o meio ambiente, principalmente para insetos não-alvo como as abelhas, que são responsáveis pela manutenção e equilíbrio do ecossistema através da polinização da maior parte das espécies de plantas cultivadas no mundo.

7. REFERÊNCIAS

- ADEDARA, I. A. et al. Biochemical and behavioral deficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. *Toxicology Research*, v. 4, n. 2, p. 442-451, 2015.
- CARRAZONI, T. et al. Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. *Toxicology*, v. 368-369, p. 162-171, 2016.
- CNA (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil). PIB do Agronegócio. Marco, 2021. Disponível em:
https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletins/sut.pib_dez_2020.9mar2021.pdf
- COLLINS, C.; MILLER, T. Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart. *The Journal of Experimental Biology*, v. 67, p. 1-15, 1977.
- CONNOLLY, C.N. The risk of insecticides to pollinating insects. *Commun. Integr. Biololgy*, vol. 6, nº 5, 2013.
- DUDAI, Y. *Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond*. Oxford: Oxford Univ. Press, 2002.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS. *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*. Rome, 2002.
- FRANCESCHINELLI, E. V.; ALMEIDA, E. A. B.; ANTONINI, Y.; CABRAL, B. C.; CARMO, R. M.; DAMASCENO, A.; FONTENELLE, J. C. R.; GARCIA, V. L. A.; GUILHERME, M. S.; LAPS, R. R.; LEITÃO, G. G.; LEITÃO, S. G.; MIKICH, S. B.; MOREIRA, D. L.; NASCIMENTO, M. T.; NEMÉSIO, A.; RIBON, R.; SILVEIRA, F. A.; VIDIGAL, T. H. D. A. Fragmentação de ecossistemas: causas e efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente e Secretaria de Biodiversidade e Florestas (MMA/SBF), p. 508, 2003.
- FREE, J. B. Pheromones of Social Bees. *Bee Research Unit*. Cornell University Press, p. 12-31, 1987.
- GAUTHIER, M.; GRÜNEWALD, B. Neurotransmitter Systems in the Honey Bee Brain: Functions in Learning and Memory. Em: *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Ed. Springer, Parte III, Cap. 3.3, p. 155-169, 2012.

- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. The insects: an outline of entomology. John Wiley & Sons, 2014.
- HUBER, I.; MASLER, E. P.; RAO, B. R. Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research. Florida: CRC Press, 1990.
- KHUSH, G. S. Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics*, vol. 2, n° 10, p.815–822, 2001.
- LEBOULLE, G. Glutamate Neurotransmission in the Honey Bee Central Nervous System. Em: *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Ed. Springer, Parte III, Cap. 3.4, p. 171-184, 2012.
- LIBERSAT, F.; PFLUEGER, H.-J. Monoamines and the Orchestration of Behavior. *BioScience*, v. 54, n. 1, p. 17-25, 2004.
- MARTINELLI, A.H.S., KAPPAUN, K., LIGABUE-BRAUN, R., DEFFERRARI, M.S., PIOVESAN, A.R., STANISCUASKI, F., DEMARTINI, D.R., DAL BELO, C.A., ALMEIDA, C.G.M., FOLLMER, C., VERLI, H., CARLINI, C.R., PASQUALI, G. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochim. Biophys*, p. 935–944, 2014.
- MATSUMOTO, Y., MIZUNAMI, M. Olfactory learning in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.*, vol.203, p.2581–2588, 2000.
- MOFFAT, A.S. New chemicals seek to outwit insects pests. *Science*, vol. 261, p.550-551, 1993.
- MORAES R. F. Agrotóxicos no brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, p. 18-20, 2019.
- ONU. World Population Prospects: The 2012 Revision, Highlights and Advance Tables. Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2013. Disponível em: https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2012_HIGHLIGHTS.pdf
- OSBORNE, R. H. Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 69, n. 2, p. 117-142, 1996.
- PAPAEFTHIMIOU, C.; THEOPHILIDIS, G. Octopamine-a single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera macedonica* and *Bactrocera oleae*): Acceleration vs. inhibition. *Journal of Insect Physiology*, v. 57, n. 2, p. 316-25, 2011.
- RUTTNER, F. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. *Wid. Springer*, p. 284, 1988.
- SAATH K. C. O; FACHINELLO A. L. Crescimento da Demanda Mundial de Alimentos e Restrições do Fator Terra no Brasil. *RESR*, vol. 56, n° 02, p. 195-212, 2018.
- SACHSE, S.; GALIZIA, G. C. Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *Journal of Neurophysiology*, vol. 87, p. 1106–1117, 2002.
- SANTOS, D. S. et al. *Bothriurus bonariensis* scorpion venom activates voltage-dependent

- sodium channels in insect and mammalian nervous systems. *Chemico-biological Interactions*, v. 258, p. 1-9, 2016.
- SOARES W. L. Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura. FIOCRUZ, tese (doutorado), 22ª ed., 2010.
- SPRUIJT, B. M.; HOL, T.; ROUSSEAU, J. Approach, avoidance, and contact behavior of individually recognized animals automatically quantified with an imaging technique. *Physiology & Behavior*, v. 51, n. 4, p. 747-752, 1992.
- STOPFER, M.; BHAGAVAN, S.; SMITH, B.; LAURENT, G. Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature*, v. 990, p.70–74, 1997.
- STURMER, G. D. et al. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 109, p. 56-62, 2014.
- TINGLE, C. C. D.; ROTHER, C. F.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J.. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology and Human Health Concerns, *Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 176, p.1-66, 2003.
- VASCONCELOS, Y. Agrotóxicos. *Revista Pesquisa FAPESP*, vol. 271, p. 18-23, 2018.
- WATANABE, H. et al. Classical olfactory conditioning in cockroach *Periplaneta americana*. *Zoological Science*, Bunkyo-ku, v. 20, n. 12, p. 1447-1454, 2003.
- WEISS B, AMLER S., AMLER R. W. Pesticides. *Pediatrics*, vol. 113, p. 1030-1036, 2004.