



AÇÃO DO INSETICIDA ANÁLOGO AO HORMÔNIO JUVENIL PIRIPROXIFENO EM LARVAS DE *APIS MELLIFERA*: ESTUDOS MORFOLÓGICOS APLICADOS A ECOTOXICOLOGIA.

T. M. de Souza

B. N. Rodrigues; T. A. Dantas; O. Malaspina; E. C. M. Silva - Zacarin

1 - Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade de Federal de São Carlos-Campus Sorocaba, Rodovia João Leme dos Santos, km 110, SP - 264, Bairro do Itinga, 18052 - 780, Sorocaba/SP-Brasil. 2 - CEIS e Depto. de Biologia, UNESP, Rio Claro/SP - Brasil. Número de telefone: 55 15 3229 6000-tatisms@gmail.com

INTRODUÇÃO

As abelhas são vítimas do uso de inseticidas para combater insetos - praga nos agroecossistemas. *Apis mellifera*, a espécie mais conhecida devido ao seu valor econômico, apresenta vôos de grande alcance e, devido à sua estreita relação com a flora e o fato de possuir o corpo coberto por pêlos que coletam várias partículas presentes no ambiente, essa espécie de abelha pode ser utilizada para a detecção de resíduos de pesticidas em plantas (Mansour, 1987).

Embora haja trabalhos relatando a capacidade de tolerância das abelhas adultas a determinados inseticidas (YU *et al.*, ., 1984; Smirle e Winston, 1988; Johnson *et al.*, ., 2006), há falta de dados sobre efeitos sub - letais, os quais podem estar relacionados ao distúrbio do colapso das colônias, conhecido como CCD (COX - FOSTER & Vanengelsdorp, 2009). Dentro dos dados existentes, poucos são relacionados às larvas e pupas, indiretamente contaminadas durante a alimentação larval, no caso de *Apis mellifera*. E há discussões sobre a relação da contaminação das larvas por pesticidas com a diminuição da produtividade nos apiários comerciais localizados nos agroecossistemas (Chauzat *et al.*, ., 2006). Essas perdas levam a diminuição na produtividade agrícola e apícola, representando riscos financeiros, devido à redução da polinização das espécies de plantas comerciais e também pode prejudicar a manutenção de espécies nativas de plantas (Garófalo, 2009).

A taxa de crescimento das colônias, que ficam no entorno dos campos de cultivo, pode ser comprometida por inseticidas que interferem no crescimento larval, tais como os análogos ao Hormônio Juvenil, responsável pela regulação da metamorfose dos insetos (Hartfelder, 2000). Dentre esses inseticidas, destaca - se o piriproxifeno que é amplamente utilizado na agricultura.

Os bioensaios *in vitro* de toxicidade para larvas, em adição àqueles realizados em abelhas adultas, já está

sendo incorporado na comunidade européia como protocolo de avaliação de risco aos compostos químicos que serão lançados no meio ambiente (Aupinel *et al.*, ., 2005). No entanto, quando se analisa efeitos crônicos com baixas concentrações de inseticidas, consideradas ambientalmente seguras, somente a análise da mortalidade pode não fornecer dados conclusivos, pois tais concentrações podem não ocasionar em mortalidade significativa, mas resultar em alterações na metamorfose e na estrutura e funcionamento dos órgãos. Dessa forma, uma análise morfológica auxilia na investigação das possíveis alterações decorrentes dessa exposição crônica.

As análises morfológicas são importantes para a elucidação da ação desses compostos químicos durante a fase larval desses insetos, fornecendo subsídios para a avaliação da eventual queda de produtividade da colônia, visando melhorar o manejo dessas áreas, de forma a atender as necessidades dos apicultores e melhorar a produção, além de promover a polinização nos agroecossistemas.

OBJETIVOS

O objetivo do presente projeto é avaliar a ação de um inseticida análogo ao hormônio juvenil (piriproxifeno) na Concentração Máxima Permitida no Campo (MFRC, correspondendo a 25mg/L), segundo Mommaerts (2006), e em diferentes proporções dessa concentração (MFRC/2, MFRCx2 e MFRCx5) em glândulas salivares larvais, discos imaginas e corpo gorduroso de *Apis mellifera*, em condições laboratoriais, por meio de análises morfológicas, sendo que não há relatos na literatura sobre a ação do piriproxifeno em larvas de *Apis mellifera*.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Bioensaios de toxicidade

Os bioensaios com larvas foram realizados de acordo com a técnica descrita por Vandenberg e Shimanuki (1987) e com adaptações de Silva (1995). Larvas de 1^o instar de operárias de *A. mellifera* foram coletadas de favos de cria no apiário do Departamento de Biologia, UNESP-Rio Claro, e acondicionadas individualmente em cúpulas de polietileno (fixadas no fundo de placas de Petri com parafina) e contendo alimento previamente preparado. Essas cúpulas foram dispostas em formato quadrangular, sendo 5 cúpulas em cada lateral (25 cúpulas por placa). As larvas foram alimentadas diariamente, com auxílio de micropipetas, recebendo quantidade progressiva de alimento larval. A dieta artificial foi preparada com 10g de geléia real, 7,4ml de água destilada, 1,4g de D - glicose, 1,4g de D - frutose e 0,2g de extrato de levedo, para o grupo controle. Nos grupos experimentais submetidos ao tratamento com piriproxifeno, foi adicionado o inseticida na dieta larval de forma a conter as seguintes concentrações do composto químico: 12,5mg/L (MFRC/2), 25mg/L (MFRC), 50mg/L (MFRCx2) e 125mg/L (MFRCx5), sendo que MFRC é a sigla em inglês para a concentração máxima permitida no campo.

As larvas foram mantidas em estufa B.O.D., a $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa acima de 80%. Para as análises histológicas, realizou - se a coleta das larvas no 5^o e 6^o dia do experimento para as concentrações mais baixas. No 7^o dia as larvas tratadas com 125 mg/L de piriproxifeno foram coletadas.

2 - Análise morfológica por microscopia óptica (MO)

Foram coletadas, aleatoriamente, três larvas vivas de cada grupo experimental e dos grupos controles. As larvas foram anestesiadas em baixa temperatura (em geladeira) por cinco minutos e seccionadas transversalmente a temperatura ambiente nas extremidades anterior e posterior, em uma placa de Petri contendo fixador (paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4 ou glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2M pH 7,4). As larvas submetidas à dissecação para remoção das glândulas de seda foram pré - fixadas a temperatura ambiente durante a dissecação, realizada em uma placa de Petri, contendo fixador.

Após essa pré - fixação, os materiais foram imersos na respectiva solução fixadora e fixados overnight a 4°C . Posteriormente, as larvas foram lavadas no mesmo tampão do fixador, desidratadas em uma série crescente de álcoois (70% a 95%) e, posteriormente, os exemplares foram transferidos para a resina de embebição (*overnight*). Após a embebição, os exemplares foram incluídos em historesina.

Para a microtomia utilizou - se navalha de tungstênio, no micrótomo da Leica microsystems®. As secções histológicas, com espessura variando de 1,5 a $3,5 \mu\text{m}$, foram estendidas sobre lâmina de vidro e secas em temperatura ambiente. Posteriormente, as secções histológicas foram coradas com Hematoxilina - Eosina (H - E) para análise morfológica. Após a montagem das lâminas com Permount®, as secções histológicas foram analisadas e documentadas em fotomicroscópio óptico.

RESULTADOS

A taxa de mortalidade dos grupos experimentais foi similar ao controle, indicando que esse inseticida não ocasionou a morte das larvas nas concentrações utilizadas, mas elas cresceram mais do que as larvas do grupo controle. No entanto, não se pode afirmar que a Concentração Máxima Permitida no Campo (MFRC = 25mg/L), ou metade desta (12,5mg/L) seja completamente segura durante a exposição crônica, pelo fato da possível bioacumulação poder afetar a metamorfose, o que não foi testado no presente trabalho. Ao se utilizar larvas tratadas com o dobro da MFRC (50mg/L) e as tratadas com cinco vezes a MFRC (125mg/L), simulou - se o efeito indiscriminado desse inseticida. Sendo o piriproxifeno um análogo do Hormônio Juvenil, ele poderia retardar a entrada na metamorfose, cujos caracteres morfológicos indicativos do início desta fase, tais como morfogênese completa dos apêndices externos a partir dos discos imaginiais, degeneração da porção secretora da glândula de seda e presença de grânulos de proteína no corpo gorduroso, poderiam não ser observados caso o início da metamorfose atrasasse. Em nenhum dos grupos experimentais, no presente trabalho, houve alteração na morfogênese dos discos imaginiais, mesmo na exposição crônica na dosagem mais alta. Somente na concentração MRFCx5 houve um sutil atraso na fase final da morfogênese dos apêndices externos. Esse atraso também foi observado no processo de morte celular programada na glândula foi evidente nas larvas de 7 dias tratadas com concentração de MRFCx5 de piriproxifeno. Larva de 7 dias deve estar na fase de início de pré - pupa com os apêndices prontos para serem evertidos e com as glândulas salivares em degeneração após a síntese e liberação da seda. No entanto, as glândulas ainda estão sintetizando seda e não apresenta indícios de degeneração das células secretoras e os apêndices ainda não chegaram na fase final de morfogênese que precede a sua eversão na fase de pupa. Nas glândulas de seda, a MFRC e metade dessa concentração não apresentaram características muito destoantes das apresentadas no controle. Com o dobro da MRFC, observou - se alterações morfológicas no epitélio secretor em relação ao tamanho das células que foi intenso em resposta ao aumento da concentração de piriproxifeno, indicando alta taxa de endopoliploidia e intensificação da produção de secreção, o que explica a seda só ter sido observada nos grupos experimentais tratados com piriproxifeno, nas dosagens não permitidas.

As células do corpo gorduroso também apresentaram tamanho maior nas larvas tratadas com o dobro da MRFC. Embora no corpo gorduroso parietal não tenha ocorrido alterações morfológicas nos trofócitos em resposta à exposição crônica ao piriproxifeno, o corpo gorduroso perivisceral apresentou núcleos com morfologia alterada nos tratamentos com o inseticida, exceto no grupo experimental tratado com metade da MRFC. Os núcleos alterados podem ser um indicativo de início do processo de morte celular programada, o que possivelmente pode ter ocorrido em resposta à intensificação dos processos metabólicos envolvidos na função de desintoxicação exercida por essas células. Além disso, na concentração mais alta, foram encontrados trofócitos binucleados em grande quantidade, o que também sugere a intensificação dos processos de desintoxicação na larva.

CONCLUSÃO

Conclusão

As alterações presentes, embora possam ser sutis, podem resultar em anomalias na formação dos órgãos do adulto. Dessa forma, são necessárias mais pesquisas para obter dados adicionais como a emergência dos adultos e sua viabilidade. Bioensaios que avaliem a taxa de metamorfose e de emergência são necessários para comprovar que a exposição crônica de larvas de *Apis mellifera* às baixas concentrações de piriproxifeno sejam comprovadamente seguras para essa espécie de abelha.

(Agradecimentos: A Universidade Federal de São Carlos-campus Sorocaba, a agência de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; e a Universidade Estadual Paulista - campus Rio Claro).

REFERÊNCIAS

- Aupinel, P., *et al.*, Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology*, v.58, n.2, p.107 - 111, 2005.
- Chauzat, M. P., Martel, A. C., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M. A survey of Pesticide Residues in Pollen Loads by Honey Bees in France. *J. Econ. Entomol.* 99, p.253 - 262, 2006.
- Cox - Foster, D., Vanengelsdorp, D. Campos silenciosos. *Scientific American Brasil*. Pinheiros, edição 84, p. 40 - 47, mai 2009.
- Garófalo, C. A. Patrimônio não avaliado. *Scientific American Brasil*. Pinheiros, edição 84, p. 50 - 51, mai 2009.
- Hartfelder, K. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, 2000.
- Johnson, F. M., Wen, Z., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R. Mediation of Pyrethroid Insecticide Toxicity to Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) by Cytochrome P450 Monooxygenases. *J. Econ. Entomol.* v.99, n.4, p. 1046 - 1050. 2006.
- Malaspina, O. Silva - Zacarin, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, v. 23, p. 129 - 136, 2006.
- Mansour, S. A. Is it possible to use the honey bee adult as a bioindicator for the detection of pesticide residues in plants? *Acta Biol Hung*, v.38, p.69 - 76,1987.
- Mommaerts, *et al.*, Bumblebees can be used in combination with juvenile hormone analogues and ecdysone agonists. *Ecotoxicology*, Springer Netherlands, v.15, n.6, p. 513 - 521, 04 ago 2006.
- Silva, I. C. Avaliação de dietas para criação de operárias e zangões de *Apis mellifera* L. (Africanizadas) (Hymenoptera: Apidae) em condições de laboratório. *Dissertação (Mestrado em Entomologia)* - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 85 p., 1995.
- Smirle, M. J., Winston, M. L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: An adaptation for foraging in contaminated ecosystems. *Can. J. Zool.* V. 66, n. 9, p. 1938 - 1942. 1988.
- Vandenberg, J. D.; Shimanuki, H. Technique for rearing worker honeybees in the laboratory. *J. Apic. Res.* London, v.26, n.2, p.90 - 7, 1987.
- Yu, S.J.; Robinson, F.A., Nation, J.L. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*V. 22, n. 3, p. 360 - 368. 1984.