



BIOENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO INSETICIDA FIPRONIL NA TAXA DE MORTALIDADE DE LARVAS DE *APIS MELLIFERA* .

T. A. Dantas¹

D. A. Tavares²; B. N. Rodrigues¹; T. M. de Souza¹; O. Malaspina²; E. C. M. Silva - Zacarin¹

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. email: talita.adantas@gmail.com

INTRODUÇÃO

A polinização por *Apis mellifera* é de extrema importância tanto no cenário ecológico, quanto na agricultura. Embora *A. mellifera* seja uma espécie exótica, ela se adaptou bem às condições ambientais do Brasil e já é o principal polinizador de diversas culturas importantes para o país, como soja (Vila, 1988), eucalipto (Pacheco, 1982) e girassol (Inácio *et al.*, 003). O sucesso de *Apis mellifera* no cenário agrícola deve - se ao fato de ser uma espécie generalista e de fácil manejo (Moreti *et al.*, 996). 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, a abelha *Apis mellifera* pode ser utilizada para a detecção de resíduos de pesticidas em plantas (Mansour, 1987).

No entanto, a qualidade e a quantidade da produção agrícola exigem o emprego de agrotóxicos e pesticidas cada vez mais eficientes na inibição do desenvolvimento de insetos e ervas daninhas, impulsionando o uso indiscriminado de compostos químicos tóxicos aos insetos não - alvo, tais como as abelhas. Desse modo, os agroecossistemas submetem os polinizadores a situações de estresse crônico, fato evidenciado pela constante queda da densidade de abelhas nos arredores dos campos agrícolas em várias partes do mundo. Essa problemática afeta também a apicultura brasileira, cuja qualidade pode estar direta ou indiretamente associada aos pesticidas lançados nos campos de cultivo, uma vez que resíduos também podem ser encontrados nos produtos apícolas.

Dentre os inseticidas amplamente utilizados nas culturas agrícolas, destaca - se o Regent® da Bayer, cuja base ativa é o fipronil. Embora o uso desse inseticida tenha sido suspenso em países europeus até que sejam avaliados todos os efeitos maléficos para espécies polinizadoras (Godoy, 2006), seu uso é autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasileira - ANVISA. Este inseticida já é aplicado em larga escala em culturas importantes para o Brasil, como

soja, cana - de - açúcar, milho, arroz, feijão, batata e trigo, além de ser usado como preservante de madeira (ANVISA, 2006).

O fipronil é um neurotóxico pertencente à família dos fenilpirazóis que afeta o sistema nervoso central do inseto, resultando em superexcitação neural e subsequente morte do inseto (PAN, 2006). O fipronil tem um amplo espectro de aplicação na agricultura e, por esse meio de dispersão, pode afetar as colméias de abelhas no entorno do local onde é aplicado.

O fipronil é tóxico para abelhas, sua LD50 é de 4 ng/abelha (Rhone - Poulenc, 1995), e não deveria ser aplicado em vegetações quando abelhas estivessem forrageando. Entretanto, um estudo realizado na França, no qual durante três anos foram analisadas amostras de pólen coletado por *Apis mellifera*, apontou que cerca de 12,4% das amostras analisadas estavam contaminadas por fipronil e seus metabólitos (Chauzat *et al.*, 006).

Outros trabalhos estão sendo feitos para analisar os efeitos causados por exposição crônica do fipronil em abelhas (Decourtye, 2005; Bárbara, 2005). No entanto não há trabalhos que relatem a toxicidade do fipronil para larvas de abelhas, as quais entram em contato indiretamente com o pólen e néctar contaminado durante o período de alimentação efetuado pelas operárias nutridoras. Os bioensaios *in vitro* de toxicidade para larvas, em adição àqueles realizados em abelhas adultas, já está sendo incorporado na comunidade europeia como protocolo de avaliação de risco aos compostos químicos que serão lançados no meio ambiente (Aupinel *et al.*, 005). Os bioensaios ecotoxicológicos são de grande importância para o estudo de avaliação de risco das abelhas aos inseticidas, principalmente para a avaliação do efeito da exposição crônica às doses consideradas ambientalmente seguras.

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a taxa de mortalidade larval em resposta à exposição crônica de larvas de *Apis mellifera*, por meio de bioensaios, a uma baixa dose de fipronil (0,1 micrograma/grama de alimento larval) presente no inseticida comercial Regent®.

MATERIAL E MÉTODOS

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 1º 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). Os bioensaios foram realizados em triplicata sendo que tanto o grupo controle como o grupo tratado com fipronil foi composto por 3 placas. 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. As larvas foram mantidas em estufa B.O.D., a 34°C ± 1°C, com umidade relativa acima de 85%.

Nos grupos experimentais submetidos ao tratamento com fipronil, foi adicionado o inseticida na dieta larval de forma a conter a concentração de 0,1 micrograma/grama de alimento. Todos os dias as larvas mortas eram contadas, para o grupo controle e grupo tratado com fipronil, e as larvas vivas receberam a dieta larval (grupo controle) ou alimento larval contaminado com fipronil durante 6 dias consecutivos. O número de larvas mortas obtido do grupo controle e do grupo tratado foi comparado usando o teste "long - rank" do programa Graph - Pad Prism 3.0. Após finalizar o período de alimentação larval, avaliou-se a taxa de metamorfose das larvas sobreviventes.

RESULTADOS

Os resultados evidenciaram que do dia 1 do experimento ao dia 5, a taxa de mortalidade do grupo tratado com fipronil estava similar à do controle, mas no último dia do período de alimentação larval (dia 6) houve um significativo aumento na taxa de mortalidade no grupo tratado em relação ao grupo controle. As poucas larvas que sobreviveram não conseguiram entrar em metamorfose ou as pupas não conseguiram completar a metamorfose.

Desde que os receptores GABA são os alvos da ação do inseticida fipronil no sistema nervoso central (Buckingham *et al.*, 2005), provavelmente em alguma via o seu desenvolvimento possa ter sido alterado, assim como ocorreu com o copépodo *Amphiascus tenuiremis* cuja exposição ao fipronil alterou o seu desenvolvimento. No entanto, não há relatos na literatura sobre os receptores GABA nas larvas de *A.*

mellifera. A maioria dos estudos sobre os receptores GABA em larvas de insetos, realizados em *Drosophila sp.* (Enell *et al.*, 2007) e nas larvas que se movem independentemente (Wegerhoff, 1999). Dzitoyeva *et al.*, (2005), sugerem que os receptores GABA de *Drosophila* são necessários para o desenvolvimento larval normal, mas os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não são completamente compreendidos.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho reforçam os dados presentes na literatura, sendo que a exposição crônica ao fipronil pode alterar o desenvolvimento de *Apis mellifera*, provavelmente por interferir na mudança da fase larval para a fase pupal, uma vez que a taxa de mortalidade aumentou significativamente no final da fase larval quando as larvas geralmente sofrem grandes modificações endócrinas que sinalizam o início do processo de metamorfose.

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.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <www.anvisa.gov.br >. Acesso em 14 abr. 2006.
- Barbara, G.S. *et al.*, Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. **J. Comp. Physiol.** 191, p.823 - 836, 2005.
- Buckingham S.D., Biggin P.C., Sattelle B.M., Brown L.A., Sattelle D.B.. Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. **Mol Pharmacol.** 2005; 68(4):942 - 51.
- Chauzat, M.P. *et al.*, A survey of Pesticide Residues in Pollen Loads by Honeybees in France. **J. Econ. Entomol.** 99, p.253 - 262, 2006.
- Decourtye, A. *et al.*, Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Environmental Contamination and Toxicology.** 48, p.242 - 250, 2005.
- Dzitoyeva S, Gutnov A, Imbesi M, Dimitrijevic N, Manev H. Developmental role of GABAB(1) receptors in *Drosophila*. **Dev Brain Res.** 2005; 158(1 - 2):111 - 4.
- Enell L., Hamasaka Y., Kolodziejczyk A., Nässel D.R.. Gamma - aminobutyric acid (GABA) signaling components in *Drosophila*: Immunocytochemical localization of GABA(B) receptors in relation to the GABA(A) receptor subunit RDL and a vesicular GABA transporter. **J Comp Neurol.** 2007; 505 (1): 18 - 31.
- Godoy, J. Alarme por inseticidas assassinos de abelhas. 2006. Disponível em: <www.tierramerica.net/2004/0313/pacentos.shtml >. Acesso em 16 abr.2006

- Inacio, F. R.; *et al.*, Influência de diferentes espaçamentos de plantio na visitação de *Apis mellifera* L. e na produtividade da cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.). *Magistra*, Cruz das Almas, v. 15, n. 1, p. 93 - 10, 2003.
- 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.
- Moreti, A.C.; *et al.*, Aumento na produção de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) pela ação de insetos polinizadores. *Sci. Agric.* v. 53, n. 2 - 3, 1996.
- Pacheco, I. A. Polinização de *Eucalyptus saligna* Smith (Myrtaceae) por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). 87p. 1982. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Pan, Pesticide Action Network. Disponível em: < www.pan - international.org. >. Acesso em 25 mai.2006.
- Rhône - Poulenc. Atelier International Fipronil/lutte antiacidiennne. Lyon, France, 1995.
- 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 f., 1995.
- Tingle, C.C.; Rother, J.A.; Dewhurst, C.F.; Lauer, S.; King, W.J. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* v.176, p.1 - 66, 2003.
- 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.
- Vila, V. V. P. Efeito das abelhas africanizadas *Apis mellifera* L., na hibridação e na produtividade da soja, *Glycine max* (L.) Merrill. 1988. 58 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Wegerhoff R. GABA and serotonin immunoreactivity during postembryonic brain development in the beetle *Tenebrio molitor*. *Microsc Res Tech.* 1999; 45 (3): 154 - 64.