

**ECOLOGIA, COMPORTAMENTO E BIONOMIA****Avaliação da Toxicidade Aguda (DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>) de Inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de Contato**SIMONE S. MORAES<sup>1</sup>, ANA RITA L. BAUTISTA<sup>1</sup> E BLANDINA F. VIANA<sup>2</sup><sup>1</sup>Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S. A.-EBDA, Laboratório de Toxicologia, Av. Ademar de Barros, 967, Ondina, 40170-110, Salvador, BA.<sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia. Inst. de Biologia, Dept<sup>o</sup> de Zoologia, Campus Ondina, 40170-280 Salvador, BA. simonesm@pppg.ufba.br.

---

An. Soc. Entomol. Brasil 29(1): 31-37 (2000)Acute Toxicity Studies of Insecticides (DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>) to *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): by Contact Route

**ABSTRACT** - The acute toxicity of some insecticides to *Scaptotrigona tubiba* (Smith) was studied and the applicability of contact tests by topical application route and sprayed paper was discussed. Worker bees were captured in the beehive's entrance and divided by groups of four replicates with five bees each one and kept in plates of Petri covered with filter paper for 48h, with food *ad libitum*. The insecticides were diluted with distilled water with increasing concentrations of active ingredients. In the test of sprayed paper, deltamethrin, trichlorfon and malathion showed a LC<sub>50</sub> of 0,70; 0,26 and 0,015 ppm, respectively. *B. thuringiensis* had a LC<sub>50</sub> higher than 336 ppm. For the topical application, deltamethrin, *B. thuringiensis* and trichlorfon showed the respective LD<sub>50</sub> of 0,73; 115,29 and 0,08 mg/bee. A LD<sub>50</sub> higher than 0,04 mg/bee was inferred for malathion. The importance of the sprayed paper method as a preliminary test for determining doses was evidenced, moreover to avoid the unnecessary bee contention and to reduce the experiment time. All the insecticides were considered highly toxic by topical application route except *B. thuringiensis* that was relatively nontoxic.

**KEY WORDS:** Insecta, stingless bees, acute toxicity, deltamethrin, organophosphorus insecticides, *Bacillus thuringiensis*.

**RESUMO** - Visando avaliar a toxicidade aguda de alguns inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) e discutir a aplicabilidade de testes de contato por aplicação tópica e filme seco, foram realizados testes com operárias capturadas na entrada da colméia e divididas em grupos de quatro repetições de cinco abelhas cada, sendo mantidas em placas de Petri forradas com papel de filtro por 48 h, com alimentação constante. Os produtos testados foram: deltametrina, *Bacillus thuringiensis*, triclorfom e malatiom diluídos em água destilada em concentrações crescentes de seus ingredientes ativos. No teste de filme seco, foram obtidas para o deltametrina, triclorfom e malatiom as CL<sub>50</sub> de

0,70; 0,26 e 0,015 ppm, respectivamente. Para *B. thuringiensis* estimou-se uma  $CL_{50}$  superior a 336 ppm. Na aplicação tópica, foram encontradas para deltametrina, *B. thuringiensis* e triclorfom as respectivas  $DL_{50}$  de 0,73; 115,29 e 0,08 mg/abelha. Para o malatiom inferiu-se uma  $DL_{50}$  superior a 0,04 mg/abelha. Evidenciou-se a importância do método de filme seco como teste preliminar para o estabelecimento das doses, pois além de evitar a contenção desnecessária de abelhas, reduz o tempo de instalação dos experimentos. Na aplicação tópica, todos os inseticidas foram considerados altamente tóxicos exceto *B. thuringiensis* que foi relativamente não tóxico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Insecta, abelhas sem ferrão, toxicidade aguda, deltametrina, inseticidas organofosforados, *Bacillus thuringiensis*.

Os meliponíneos constituem um grupo isolado e especializado que é altamente dependente das características climáticas e florísticas de suas regiões de origem. No Brasil, estas abelhas são responsáveis, conforme o ecossistema, por cerca de 40 a 90% da polinização das árvores nativas e, conseqüentemente pela produção de sementes e frutos (Kerr et al. 1996).

Existem mais de 300 espécies de meliponíneos classificadas, sendo que espécies do gênero *Scaptotrigona* podem ser encontradas em um vasto território de clima tropical e subtropical que se estende do Rio Grande do Sul ao México, ocorrendo representantes em todo o Estado da Bahia. *Scaptotrigona tubiba* (Smith 1863), popularmente conhecida como tubiba ou tubi, é uma espécie de porte médio que apresenta indivíduos com tórax e abdôme pretos e colônias normalmente muito populosas chegando a possuir de 2000 a 50000 indivíduos. É mais comum na região da caatinga (Nogueira-Neto 1970).

Devido à importância econômica de *Apis mellifera* L. na produção de mel e na polinização, a determinação da toxicidade de inseticidas para estas abelhas começou a ser estudada mesmo antes da introdução do DDT em 1942 (Macieira & Hebling-Beraldo 1989). Contudo, estudos sobre a toxicidade de agentes químicos para meliponíneos são ainda

relativamente escassos, já que estas espécies não ocorrem em países de clima temperado, os quais são os principais realizadores deste tipo de estudo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda de alguns inseticidas para *S. tubiba*, utilizando-se de testes de contato por aplicação tópica e filme seco e discuti-los quanto à sua aplicabilidade prática.

### Material e Métodos

Os testes foram realizados nos Laboratórios de Toxicologia e de Pesquisa Apícola da Unidade de Execução de Pesquisa de Salvador (UEP-Salvador) da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S. A. (EBDA).

**Coleta de *S. tubiba*.** Nos experimentos, foram utilizadas abelhas adultas (peso médio de 12,3 mg) capturadas na entrada de uma colméia de *S. tubiba* (Smith, 1863) localizada no meliponário da UEP-Salvador. As coletas foram feitas com o auxílio de um frasco grande, de boca larga, posicionado em frente a entrada da colméia de modo que as operárias que saíram da colônia passaram diretamente para o referido frasco.

**Testes para a avaliação da toxicidade aguda por contato.** Para o preparo das soluções

foram utilizadas formulações dos inseticidas abaixo relacionados, diluídas em água destilada e em concentrações crescentes de seus ingredientes ativos, expressas em ppm (filme seco) ou mg/abelha (aplicação tópica) de acordo com o método de aplicação empregado:

· Decis (deltametrina): 25 g/l. Concentrações nominais empregadas: 0,56; 0,61; 0,68; 0,74; 0,82 e 0,90 ppm.

· Dipel (*Bacillus thuringiensis* var. kurstaki): 33,6 g/l. Concentrações nominais empregadas: 33,6; 84; 168 e 336 ppm.

· Dipterex (triclorfom): 500 g/l. Concentrações nominais empregadas: 0,03; 0,05; 0,11; 0,21 e 0,43 ppm.

· Malathion (malatiom): 500 g/l. Concentrações nominais empregadas: 0,0025; 0,005; 0,01; 0,02 e 0,04 ppm.

Foram utilizados os métodos de testes de exposição por contato para abelhas conforme os protocolos estabelecidos pela "International Commission for Bee Botany's Working Group on Bee Protection" (Felton *et al.* 1986) e pela "European and Mediterranean Plant Protection Organization" (1992).

Foram utilizadas quatro repetições com cinco abelhas por concentração. As abelhas foram anestesiadas com gás carbônico (CO<sub>2</sub>), suficiente apenas para que fossem manipuladas e, posteriormente, colocadas em placas de Petri de 100x20 mm, forradas com um círculo de papel de filtro quantitativo de 8,2 cm de diâmetro, a uma temperatura e umidade relativa médias de 27,1°C e 78,3%, respectivamente. Dentro de cada placa foi colocado um alimentador, o qual consistiu de um chumaço de algodão hidrófilo embebido com solução de sacarose a 30% e envolto em gaze, que foi mantido dentro de um recipiente de metal (diâmetro médio de 2,8 cm) de fácil acesso às abelhas.

As concentrações dos inseticidas foram determinadas em testes preliminares de filme seco com concentrações aleatoriamente escolhidas ou, no caso de *B. thuringiensis*, selecionadas com base na concentração do princípio ativo indicada no rótulo do produto, obedecendo apenas a um intervalo loga-

rítmico.

Nos testes com filme seco, a exposição se deu por meio do contato das abelhas com o círculo de papel de filtro, previamente embebido com a solução teste e seco ao ar livre, o qual forrava o fundo da placa de Petri onde as mesmas se mantinham caminhando.

O segundo grupo de testes consistiu na aplicação tópica de aproximadamente 1 ml (1,202 ml) da solução teste, na face ventral do abdôme de cada abelha, com o auxílio de uma pinça e de um microaplicador manual devidamente adaptado a uma seringa de vidro (capacidade de 1 ml) com agulha de metal. As abelhas foram, em seguida, mantidas dentro de placas de Petri forradas com papel de filtro limpo.

Os testes tiveram duração de 48 h e, ao final destes, foi anotada a taxa de mortalidade a cada concentração, tendo sido consideradas mortas as abelhas que não se moveram durante a leitura do teste. As abelhas vivas foram liberadas em um local distante da colméia ou eliminadas (no caso de *B. thuringiensis*), para evitar eventuais contaminações desta.

**Análise dos dados.** Foi utilizada a análise de Probit (Finney 1971) para a estimativa da CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub> dos inseticidas testados. Quando a análise por este método não se mostrou eficiente, optou-se pela utilização do método Binomial (Berquó *et al.* 1981) e de Spearman-Kärber (Hamilton *et al.* 1978), nessa ordem.

## Resultados e Discussão

A deltametrina apresentou índices de mortalidade muito parecidos em ambos os métodos de testes de exposição por contato sendo obtidos valores de CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub>, também, muito próximos (0,70 ppm e 0,73 mg/abelha, respectivamente) (Tabelas 1-4).

Devido a baixa letalidade de *B. thuringiensis*, mesmo a 336 ppm (Tabela 1), decidiu-se encerrar o experimento de filme seco com o referido produto, estimando-se para ele uma CL<sub>50</sub> superior a esta concentração (Tabela 3). Contudo, o método de aplicação tópica apresentou mortalidade superior,

Tabela 1. Inseticidas empregados, suas doses (ppm) e respectivas mortalidades observadas em operárias de *S. tubiba* (Smith) expostas através de filme seco (temperatura de 28°C; UR a 79%; fotoperíodo de 12/12 h).

Deltametrina		<i>B. thuringiensis</i>		Triclorfom		Malatiom	
Doses	Mortalidade	Doses	Mortalidade	Doses	Mortalidade	Doses	Mortalidade
Cont.	0/20	Cont.	0/20	Cont.	0/20	Cont.	0/20
0,56	0/20	33,6	5/20	0,03	0/20	0,0025	0/20
0,61	3/20	84	1/20	0,05	0/20	0,005	0/20
0,68	12/20	168	2/20	0,11	0/20	0,01	2/20
0,74	10/20	336	4/20	0,21	4/20	0,02	17/20
0,82	18/20			0,43	20/20	0,04	20/20
0,90	20/20						

permitindo determinar a  $DL_{50}$  de 115,29 mg/abelha (Tabelas 2 e 4).

O teste de contato por aplicação tópica de

obtida foi de 0,26 ppm (Tabelas 1 e 3).

O malatiom teve a sua  $DL_{50}$  inferida como sendo superior a 0,04 mg/abelha, porque nesta

Tabela 2. Inseticidas empregados, suas doses (mg/abelha) e respectivas mortalidades observadas em operárias de *S. tubiba* (Smith, 1863) expostas por aplicação tópica (temperatura de 28°C; UR a 79%; fotoperíodo de 12/12 h).

Deltametrina		<i>B. thuringiensis</i>		Triclorfom		Malatiom	
Doses	Mortalidade	Doses	Mortalidade	Doses	Mortalidade	Doses	Mortalidade
Cont.	0/20	Cont.	0/20	Cont.	0/20	Cont.	0/20
0,56	2/20	33,6	7/20	0,03	2/20	0,0025	1/20
0,61	4/20	84	9/20	0,05	5/20	0,005	2/20
0,68	7/20	168	10/20	0,11	14/20	0,01	4/20
0,74	13/20	336	17/20	0,21	1/20	0,02	1/20
0,82	14/20			0,43	9/20	0,04	6/20
0,90	18/20						

triclorfom não apresentou resultados lineares nas duas últimas concentrações (0,21 e 0,43 mg/abelha), mas a linearidade nas concentrações inferiores (0,03 e 0,05 mg/abelha) e o percentual de mortalidade superior a 50%, obtido na concentração intermediária (0,11 mg/abelha), permitiram a interpretação do teste obtendo-se, assim, a  $DL_{50}$  de 0,08 mg/abelha (Tabelas 2 e 4). Tal fato não foi observado no teste com filme seco e a  $CL_{50}$

concentração apenas 30% dos indivíduos foram a óbito, no filme seco, entretanto a  $CL_{50}$  encontrada foi de 0,015 ppm (Tabelas 1-4).

O tamanho da abelha utilizada neste estudo dificultou a aplicação tópica de 1 ml da solução-teste no pronoto como foi estabelecido pelo protocolo da "European and Mediterranean Plant Protection Organization" (1992) para testes de toxicidade de inseticidas por contato em abelhas. Contudo, estudos

Tabela 3. Inseticidas empregados, número de indivíduos testados (n), teste estatístico utilizado, coeficiente angular (B), desvio padrão (s), teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), número de graus de liberdade (gl) e as  $CL_{50}$  com seus respectivos intervalos de confiança obtidos para as operárias de *S. tubiba* (Smith) pela exposição por contato através de filme seco (ppm).

Produto	n	Teste Estat.	B	s	$\chi^2$	gl	$CL_{50}$	Filme Seco	
								Int. de Conf. Inf.	Sup.
Deltametrina	140	Probit	18,3889	2,61	8,404	139	0,70	0,68	0,73
<i>B. thuringiensis</i>	100	-	-	-	-	99	>336	-	-
Triclorfom	120	Binomial	-	-	-	119	0,26	0,21	0,43
Malatiom	120	Probit	7,7492	2,39	0,012	119	0,015	0,012	0,017

realizados por Graves & Mackensen (1965) revelaram que o único fator que não interfere na toxicidade é o local da aplicação (tórax ou abdôme), deste modo optou-se pela aplicação tópica no abdôme das abelhas.

Stevenson (1968) observou diferenças na toxicidade de 21 inseticidas para *A. mellifera* conforme o modo de aplicação (oral ou por contato) e concluiu que estas deveriam estar relacionadas com o modo de ação do produto. No presente trabalho a aplicação tópica do malatiom apresentou toxicidade inferior à aplicação por contato (filme seco). Para deltametrina, a toxicidade no teste de aplicação tópica foi semelhante à observada no teste de filme seco, enquanto que para *B.*

*thuringiensis* e triclorfom, foi encontrada uma toxicidade superior na aplicação tópica. Portanto, diferentes vias de aplicação e também formas diversas em uma mesma via podem apresentar, dependendo do produto, toxicidades diferentes (Tabelas 1-4).

Em comparações interespecíficas, *S. tubiba* (peso médio de 12,3 mg) apresentou-se mais susceptível ao malatiom ( $DL_{50} > 0,04$  mg/abelha) do que *Trigona spinipes* (Fabr.) ( $DL_{50}$  de 0,26 mg/abelha com 99% do princípio ativo e peso médio aproximado de 14 mg) (Macieira & Hebling-Beraldo 1989) e *A. mellifera* (0,18 mg/abelha e 128 mg) (Batista *et al.* 1975), mas foi mais tolerante do que *Nannotrigona testaceicornis*

Tabela 4. Inseticidas empregados, número de indivíduos testados (n), teste estatístico utilizado, coeficiente angular (B), desvio padrão (s), teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), número de graus de liberdade (gl) e as  $CL_{50}$  com seus respectivos intervalos de confiança obtidos para as operárias de *S. tubiba* (Smith) pela exposição por aplicação tópica (mg/abelha).

Produto	n	Teste Estat.	B	S	$\chi^2$	gl	Aplicação Tópica		
							$DL_{50}$	Int. de Conf. Inf.	Sup.
Deltametrina	140	Probit	12,6619	2,29	3,230	139	0,73	0,69	0,76
<i>B. thuringiensis</i>	100	Spearman-Karber	-	-	-	99	115,29	51,94	255,87
Triclorfom	120	Probit	3,3698	1,33	0,433	119	0,08	0,06	0,12
Malatiom	120	-	-	-	-	119	>0,04	-	-

*testaceicornis* (Lepeletier) (0,03 mg/abelha com 99% do princípio ativo e 7,3 mg) e *Tetragonisca angustula angustula* (Latreille) (0,02 mg/abelha com 99% do princípio ativo e 4,1 mg) (Balestieri 1989) o que ratifica a relação superfície / volume defendida por Johansen (1977, id. 1979). Em relação aos demais produtos utilizados neste estudo, não foi possível elaborar tais comparações devido a ausência de dados disponíveis na literatura.

Considerando-se que o método de filme seco não permite calcular a dose (mg/abelha), sendo por isso os resultados expressos em concentração (ppm), não foi possível classificar os inseticidas estudados de acordo com os parâmetros de Anderson & Atkins (1968) para toxicidade de inseticidas em abelhas. Entretanto, com os resultados obtidos nos testes de aplicação tópica, *B. thuringiensis* foi incluído no grupo dos relativamente não tóxicos para *S. tubiba* enquanto que triclorfom, deltametrina e malatim foram considerados altamente tóxicos (Tabela 4). A baixa toxicidade de *B. thuringiensis* está provavelmente relacionada ao seu modo de ação (ingestão).

Uma abelha tem mais chance de ser exposta a um inseticida em um ambiente natural através do abdôme, já que a probabilidade de este entrar em contato com uma folha contaminada é maior que a do pronoto. Deste modo, a aplicação de inseticidas por meio de filme seco teoricamente simula melhor as condições de campo às quais as abelhas estão expostas, considerando-se que este funcione como uma folha contaminada, ao passo que a aplicação tópica, a qual é dependente de um microaplicador, tem menor possibilidade de simular um meio natural de exposição, exceto naquela situação em que a abelha esteja presente no momento da pulverização.

Comparações de resultados entre ambas as técnicas podem não fornecer informações confiáveis, já que não se pode inferir a toxicidade de uma técnica com base em outra, mas os resultados em filme seco, embora não apresentem condições classificatórias, mostraram-se eficazes em estudos preliminares para o estabelecimento das doses além

de evitar a contenção das abelhas e reduzir o tempo de instalação dos experimentos.

Segundo Kerr et al. (1996), pelo menos 100 das mais de 300 espécies de meliponíneos conhecidas estão em perigo de extinção devido à destruição de seu habitat pelo homem. Tendo em vista a importância ecológica deste grupo, principalmente como polinizadores, e suas relações com o ambiente, o risco de extinção faz ressaltar a necessidade urgente de uma avaliação dos efeitos de inseticidas sobre estas abelhas. As informações obtidas neste trabalho podem contribuir para o conhecimento do potencial tóxico de alguns desses produtos para estes animais, além de apresentar uma adaptação da metodologia normalmente empregada em estudos com *A. mellifera*.

Considerando que o modo de ação enfocado no estudo foi o tóxico, seja por contato ou aplicação, será necessário avaliar a toxicidade por via oral dos inseticidas, em estudos futuros, a fim de que possam ser comparados os diferentes modos de ação.

### Agradecimentos

À Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S. A.-EBDA, seus pesquisadores e funcionários, pela concessão do espaço e equipamentos. Ao PIBIC/CNPq pela concessão da bolsa iniciação científica. E ao Dr. Gilberto Casadei de Baptista (ESALQ) pelo treinamento oferecido a primeira autora e pela presteza e interesse expresso nas inúmeras contribuições que forneceu durante a execução deste trabalho.

### Literatura Citada

- Anderson, I.D. & E.F. Atkins. 1968.** Pesticide usage in relation to beekeeping. Ann. Rev. of Entomol. 13: 213-238.
- Batista, G.C., E. Amaral & A. Passarela Neto. 1975.** Toxicidade de alguns inseticidas e acaricida para operárias híbridas de *Apis mellifera ligustica* L. e *Apis mellifera adansonii* L. (Hyme-

- noptera: Apidae). An. Soc. Entomol. Brasil 4: 73-77.
- Balestieri, J.B.P. 1989.** Toxicidade de inseticidas e efeitos respiratórios em duas espécies de meliponíneos *Tetragonisca angustula angustula* (Latreille, 1807) e *Nannotrigona testaceicornis testaceicornis* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae). Dissertação de Mestrado. Rio Claro, Inst. Bioc., Univ. Est. Paulista Júlio de Mesquita Filho, 116p.
- Berquó, E.S., J.M.P. Souza & S.L D. Gotlieb. 1981.** Bioestatística. 1ª ed. Ver, São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária, 350p.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. 1992.** Guideline on test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honeybees. EPPO Bulletin 22: 203-215.
- Felton, J.C., P.A. Oomen & J.H. Stevenson. 1986.** Toxicity and hazard of pesticides to honeybees: harmonization of test methods. Bee World 67: 114-124.
- Finney, D. J. 1971.** Probit analysis. 3. Ed, London, Cambridge University Press, 583p.
- Graves, J.B. & O. Mackensen. 1965.** Topical application and insecticides resistance studies on the honeybee. J. Econ. Entomol. 58: 990-993.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo & R.V. Thurston. 1978.** Trimmed spearman-kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 12: 714-719.
- Johansen, C.A. 1977.** Pesticides and pollinators. Ann. Rev. Entomol. 22: 177-192.
- Johansen, C.A. 1979.** Honeybee poisoning by chemicals: signs, contributing factors, current problems and prevention. Bee World 60: 109-127.
- Kerr, W.E., G.A. Carvalho & V.A. Nascimento. 1996.** Abelha urucu: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte, Littera Maciel, 144 p.
- Macieira, O.J.D. & M.J.A. Hebling-Beraldo. 1989.** Laboratory toxicity of insecticides to workers of *Trigona spinipes* (F., 1793) (Hymenoptera - Apidae). J. Apic. Res., 28: 3-6.
- Nogueira-Neto, P. 1970.** A criação de abelhas indígenas sem ferrão. 2 ed. São Paulo, Chácaras e Quintais, 365p.
- Stevenson, J.H. 1968.** Laboratory studies on the acute contact and oral toxicities of insecticides to honeybees. Ann. Appl. Biol. 61: 467-472.

Recebido em 16/12/98. Aceito em 05/01/2000.

---