

ALTERAÇÕES DAS ESTERASES E ESTRUTURA DE CROMATINA DAS ABELHAS SEM FERRÃO *Tetragonisca angustula* LATREILLE (1811) (HYMENOPTERA, TRIGONINI) EXPOSTAS A *Azadiractina*

Samara Calvi Baulli (PIBIC/CNPq/FA/Uem); Adriana A. Sinópolis Gigliolli (Coorientadora); Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki (Orientadora); e-mail da orientadora: mcrtakasusuki@uem.br
Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular – DBC

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas: 2.00.00.00-6; Genética: 2.02.00.00-5; Genética Animal: 2.02.04.00-0

Palavras-chave: Abelha Jataí, Azamax®, Toxicidade

Resumo:

O uso de agroquímicos botânicos para controle de pragas é uma alternativa para os agrotóxicos com princípios ativos sintéticos. Entretanto o dano que esses compostos causam nos insetos polinizadores ainda estão sendo avaliados. O presente estudo teve como objetivo verificar alterações na atividade relativa das esterases e na estrutura da cromatina de *Tetragonisca angustula* contaminadas por ingestão de concentrações subletais do inseticida Azamax® (*Azadiractina*) diluído para uso na cultura de morango. Operárias de *T. angustula* foram contaminadas por ingestão com três concentrações de azamax® por um período de até 72. As abelhas sobreviventes foram analisadas por meio de isoenzimas esterases e Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC), para verificar alterações na estrutura da cromatina). As análises das esterases mostraram que não houve alteração na atividade relativa dessas isoenzimas após a contaminação quando comparadas com o controle. A estrutura da cromatina, contudo, apresentou alteração quando os valores de CEC foram comparados com o controle. Após a contaminação por até 72 horas foi observado descondensação da cromatina das células do cérebro das abelhas analisadas, indicando que houve aumento da síntese de proteínas, provavelmente para detoxificar o organismo das abelhas. Provavelmente em longo prazo, essa alteração pode causar alteração na viabilidade das operárias, levando a morte.

Introdução

Diante dos problemas causados pelos agrotóxicos no ambiente e a saúde, produtores têm buscado diferentes alternativas para o controle de pragas em várias culturas. Uma das opções são os inseticidas botânicos empregados para controle de pragas, como o Azamax® (UPL), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 014807, do grupo tetranortriterpenóide, cujo princípio ativo é a *Azadiractina*. Esse composto é proveniente da semente da árvore de nem, *Azadirachta indica* Jus, família Meliaceae. O Azamax® é usado na cultura de morango (*Fragaria ananassa*), espécie vegetal polinizada principalmente pela abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula*. Concentrações subletais de inseticida podem não interferir significativamente na viabilidade das abelhas, contudo podem causar

alterações morfológicas, fisiológicas e de expressão gênica, que em longo prazo resultam na mortalidade desses insetos. Considerando o emprego de concentrações subletais de inseticidas e a importância da abelha sem ferrão *T. angustula* para a polinização de flores de morangueiros (*F. ananassa*), o objetivo deste trabalho foi verificar alterações na atividade relativa das esterases e na estrutura da cromatina das *T. angustula* após a contaminação por ingestão de concentrações subletais do inseticida Azamax® (*Azadiractina*).

Materiais e métodos

O produto comercial Azamax® foi preparado de acordo com a bula para a cultura do Morango, 3,0 g i.a./ 100L (gramas de ingrediente ativo/ 100 litros), para controle do ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*). Essa solução foi diluída para as concentrações de $2,25 \times 10^{-3}$ g i.a./mL; $5,25 \times 10^{-3}$ g i.a./mL; e $1,12 \times 10^{-2}$ g i.a./mL, para realização do bioensaios por ingestão, desenvolvidos no laboratório de Genética Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Cada bioensaio consistiu em controle com as abelhas alimentadas apenas com pasta cãndi (2g) e, três tratamentos, alimentação com pasta cãndi (2g) contendo Azamax® (10µL) nas concentrações já citadas. Em cada frasco de vidro (150mL) coberto com tecido *voil* preso por elástico, foram colocadas 10 abelhas forrageiras coletadas na entrada dos ninhos localizados no *campus* da UEM. No interior dos frascos foi adicionado o alimento com ou sem Azamax® e algodão umedecido apenas em água. Cada bioensaio consistiu em três repetições e o controle. Os frascos foram mantidos em câmara B.O.D à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 2\%$, por períodos de 24, 48 e 72 horas. Após os diferentes períodos de exposição, as abelhas foram sacrificadas a frio, dissecadas sob estereomicroscópio Zeiss em solução salina para insetos. Alterações na atividade relativa das esterases foram observadas com extratos de cabeça/tórax, homogeneizados individualmente. A corrida eletroforética foi realizada em géis de poliacrilamida (PAGE) 10% e gel de empilhamento 5%, a 200 V por 5h a 4°C . O tampão de corrida utilizado Tris-Glicina 0,1M pH 8,3. Coloração para esterases com os substratos α e β -naftil acetato, corante Fast Blue RR Salt. A análise da Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) para verificar alterações na estrutura da cromatina, foi realizada com cérebro das abelhas, verificando a coloração dos núcleos destas células, sendo determinado o ponto de CEC quando estes apresentarem ausência da coloração ou verde. Após a extração, os cérebros foram estendidos em lâminas histológicas, fixados em ácido acético (45%) e esmagados após disposição da lamínula. As lâminas foram congeladas em nitrogênio líquido, a lamínula retirada, fixação em etanol: ácido acético (3:1 - v/v); lavagem em etanol 70%. Coloração com azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0, contendo MgCl_2 em diferentes concentrações (0,0; 0,02; 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,15 e 0,20 Mol/L). Na sequência realizada a lavagem em água destilada e armazenamento em porta-lâmina. Após secagem, as lâminas foram clareadas em Xilol durante 15 min e montadas com Entellan, para serem analisadas em microscópio óptico.

Resultados e Discussão

Os bioensaios por ingestão com Azamax® permitiram verificar que não há alteração na atividade relativa das esterases de *T. angustula* nas concentrações analisadas.

Portanto, parece que as isoenzimas esteraes analisadas não tem papel na toxificação da azadiractina no período de até 72 horas após a contaminação por ingestão. Tal fato é relevante, pois, de maneira geral as esterases são capazes de hidrolisar ligações éster para gerar um ácido e um álcool como metabolitos, compreendem um conjunto vasto de enzimas que desempenham funções variadas em um organismo, entre elas a detoxificação de xenobiótico. As análises da CEC mostraram que nas amostras controle o ponto de CEC foi 0,20M. Nos tratamentos por ingestão na concentração $2,25 \times 10^{-3}$ g i.a./mL variou de 0,12M a 0,15M nos períodos de 24, 48 e 72h (Tabela 1). No tratamento com $5,25 \times 10^{-3}$ g i.a./mL, foi observada variação entre 0,08M e 0,10M, em 24, 48 e 72h (Tabela 1). Na concentração $1,12 \times 10^{-2}$ g i.a./mL a variação foi de 0,10M e 0,12M nos mesmos tempos os anteriores (Tabela 1). Nos três tratamentos houve uma diminuição nos valores de CEC quando comparados com o controle, indicando descondensação da cromatina, devido provavelmente a um aumento na síntese de proteínas. Possivelmente para detoxificar o organismo das *T. angustula*. Em estudo com *Scaptotrigona bipunctata* contaminadas com neonicotinoide thiamethoxam foi observado condensação da cromatina, ou seja, diminuição na síntese de proteínas (MOREIRA et al., 2018). Em análises de *T. angustula* contaminadas com herbicidas paraquat e nicosulfuron não foi detectada alteração na estrutura da cromatina (FERMINO et al., 2011). O valor de CEC pode ser alterado por outros fatores como idade ou atividade exercida pela abelha (Falco, et al. 2010). No presente estudo, todas as abelhas apresentavam a mesma atividade na colônia (forrageiras), minimizando esse fator. Em longo prazo, as alterações observadas em nosso estudo podem levar a redução da viabilidade das operárias, levando a colônia a falência e morte.

Tabela 1. Respostas de basofilia nuclear da cromatina do cérebro de operárias de *T. angustula* após exposição por ingestão do inseticida Azamax® nas concentrações de $2,25 \times 10^{-3}$ g i.a./mL, $5,25 \times 10^{-3}$ g i.a./mL e $1,12 \times 10^{-2}$ g i.a./mL por 24, 48 e 72h. Coloração Azul de Toluidina (AT) 0,025% adicionado de $MgCl_2$ em diferentes concentrações

| Concentração do Corante | Controle (s. i.) | Azadiractina ($2,25 \times 10^{-3}$ g i.a./mL) | | |
|-------------------------|------------------|---|-------------|-------------|
| | | 24h | 48h | 72h |
| AT + Controle | Vi | Vi | Vi | Vi |
| AT + $MgCl_2$ 0,02M | Vi | Vi | Vi | Vi |
| AT + $MgCl_2$ 0,05M | Vi | Az | Az | Az |
| AT + $MgCl_2$ 0,08M | Vi | Az | Az | Az |
| AT + $MgCl_2$ 0,10M | Az | Az/Ve | Az | Az/Ve |
| AT + $MgCl_2$ 0,12M | Az | Ve | Az/Ve | Ve |
| AT + $MgCl_2$ 0,15M | Az/Ve | Az | Ve | Ve/Az |
| AT + $MgCl_2$ 0,20M | Ve | Az | Az | Az |
| AT + $MgCl_2$ 0,30M | Az | Az | Az | Az |
| Valor de CEC (M) | 0,20 | 0,12 | 0,15 | 0,12 |

| Concentração do Corante | Controle (s.i.) | Azadiractina ($5,25 \times 10^{-3}$ g i.a./mL) | | |
|-------------------------|-----------------|---|-----|-----|
| | | 24h | 48h | 72h |
| AT + Controle | Vi | Vi | Vi | Vi |

| | | | | |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| AT + MgCl ₂ 0,02M | Vi | Az | Az | Vi |
| AT + MgCl ₂ 0,05M | Vi | Az/Ve | Az | Az |
| AT + MgCl ₂ 0,08M | Vi | Ve | Az/Ve | Az/Ve |
| AT + MgCl ₂ 0,10M | Az | Ve | Ve | Ve |
| AT + MgCl ₂ 0,12M | Az | Ve/Az | Ve/Az | Az |
| AT + MgCl ₂ 0,15M | Az/Ve | Az | Az | Az |
| AT + MgCl ₂ 0,20M | Ve | Az | Az | Az |
| AT + MgCl ₂ 0,30M | Az | Az | Az | Az |
| Valor de CEC (M) | 0,20 | 0,08 | 0,10 | 0,10 |

| Concentração do Corante | Controle (s.i.) | Azadiractina (1,12x10 ⁻² g i.a./mL) | | |
|------------------------------|-----------------|--|-------------|-------------|
| | | 24h | 48h | 72h |
| AT + Controle | Vi | Vi | Vi | Vi |
| AT + MgCl ₂ 0,02M | Vi | Vi/Az | Vi | Vi |
| AT + MgCl ₂ 0,05M | Vi | Az | Az | Az |
| AT + MgCl ₂ 0,08M | Vi | Az | Az/Ve | Az/Ve |
| AT + MgCl ₂ 0,10M | Az | Az/Ve | Ve | Ve |
| AT + MgCl ₂ 0,12M | Az | Ve | Ve | Ve/Az |
| AT + MgCl ₂ 0,15M | Az/Ve | Ve/Az | Az | Az |
| AT + MgCl ₂ 0,20M | Ve | Az | Az | Az |
| AT + MgCl ₂ 0,30M | Az | Az | Az | Az |
| Valor de CEC (M) | 0,20 | 0,12 | 0,10 | 0,10 |

Vi: violeta.; Az: azul.; Ve: verde.; i.a: ingrediente ativo.; s. i.: sem inseticida.

Conclusões

Após contaminação de operárias *T. angustula* por ingestão com o inseticida azamax® por um período de até 72 horas, não foi observado alteração na atividade relativa das esterases. As células de cérebro de operárias *T. angustula* apresentaram descondensação da cromatina indicando que ocorreu aumento na síntese de proteínas dessas abelhas, provavelmente para detoxificação do organismo após contaminação por até 72 horas com o inseticida azamax®.

Agradecimentos

As autoras agradecem ao Programa PIBIC-UEM, CNPq e Fundação Araucária pela bolsa concedida e ao incentivo para a realização da pesquisa.

Referências

- FALCO, J.R.P. et al. Toxicity of thiamethoxam, behavioral effects and alterations in chromatin of *Apis mellifera* L, 1758 (Hymenoptera; Apidae). **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, 6 (6): 823-828, 2010.
- FERMINO, F. et al. Isoenzymes and Cytochemical Analysis in *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* After Herbicide Contamination. **Sociobiology**, v. 58, p. 353-366, 2011.
- MOREIRA, D.R. et al. Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 33, p. 463-475, 2018.