

TOXICIDADE E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA AZADIRACTINA EM ABELHA SEM FERRÃO *Nannotrigona* *testaceicornis* (APIDAE, MELIPONINI)

Andressa Santoro (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Adriana Aparecida Sinópolis Giglioli, Daiani Rodrigues Moreira, Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki (Orientador), e-mail: andressasantoro12@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas -
Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular – DBC /
Maringá, PR

Área e subárea: Genética / Genética Molecular e de Microorganismos

Palavras-chave: Iraí, Azadiractina, intestino médio.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade e as alterações morfológicas no intestino médio de operárias adultas de *Nannotrigona testaceicornes* por exposição oral com azadiractina durante 24 h. Os bioensaios foram realizados com as concentrações de $2,25 \times 10^{-3}$, $5,25 \times 10^{-3}$, $7,5 \times 10^{-3}$, $1,12 \times 10^{-3}$ e $0,015$ g i.a./mL (gramas de ingrediente ativo/ mililitros) de azadiractina. A toxicidade foi estimada por meio da mortalidade e as alterações morfológicas avaliadas por meio de histologia em microscopia de luz. A mortalidade abaixo de 50% em todas as concentrações testadas não permitiu estimar a CL_{50} , contudo, as análises estatísticas demonstraram forte correlação concentração-mortalidade. Na histologia de luz do intestino médio (região onde ocorre a maior parte da digestão dos insetos), foi possível verificar alterações no epitélio, células regenerativas, células digestivas, lâmina basal em relação à musculatura e membrana peritrofica. Os resultados mostraram que apesar da baixa mortalidade e em concentrações subletais a azadiractina causa danos no intestino médio das abelhas sem ferrão *N. testaceicornis*, que posteriormente pode provocar a morte das operárias e da colônia.

Introdução

Devido a utilização das abelhas *Nannotrigona testaceicornis* Lepelletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini), popularmente denominadas irai, na polinização de espécies nativas bem como cultivadas como morango e pepino, as operárias forrageiras podem entrar em contato com diferentes tipos de agroquímicos, contaminando o ninho e os seus produtos, como o mel. Uma das opções de inseticidas botânicos empregados para controle de pragas é o AzaMax® (UPL), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento -MAPA sob nº 014807. Esse produto é classificado no grupo tetranortriterpenoide, tem como princípio ativo a azadiractina, que ocorre nas

Angiospermas *Azadirachta indica*. A abelha *N. Testaceicornes* apresenta grande potencial para ser empregada na meliponicultura, contudo há poucos estudos que abordem os aspectos biológicos e comportamentais dessa espécie frente a agroquímicos como a azadiractina. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a toxicidade e as alterações morfológicas no intestino médio de operárias adultas de *N. testaceicornes* por exposição oral com azadiractina em diferentes concentrações por 24 horas.

Materiais e métodos

O inseticida AzaMax®, foi preparado de acordo com a bula para a cultura do Morango, 3,0 g i.a./100 L (gramas de ingrediente ativo/ 100 litros). Em seguida, a solução foi diluída para as concentrações de $2,25 \times 10^{-3}$, $5,25 \times 10^{-3}$, $7,5 \times 10^{-3}$, $1,12 \times 10^{-3}$ e 0,015 g i.a./mL. Cada bioensaio por exposição oral consistiu em controle, contendo a alimentação apenas com cândi (2g) e os três tratamentos, com o cândi (2g) contendo Azamax® (10mL) nas concentrações já citadas e algodão umedecido apenas em água. Em cada frasco de vidro (150mL) coberto com tecido *voil* preso por elástico, foram colocadas 15 forrageiras coletadas na entrada de colônias comerciais localizadas na Fazenda Experimental Iguatemi-UEM. 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 24 horas. Após o período de exposição, foram contabilizadas as abelhas mortas, as sobreviventes foram sacrificadas a frio, dissecadas sob estereomicroscópio Zeiss em solução salina para insetos, para posteriores análises histológicas. A normalidade e homogeneidade das variâncias foram realizadas pelos testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Como os pressupostos não foram atendidos (valor- $p < 0.05$) empregaram-se análises não paramétricas. As comparações estatísticas entre os tratamentos e o controle foram feitas pela ANOVA *one-way* por Kruskal-Wallis e pelo teste *post-hoc* de Dunn para comparações pareadas entre os tratamentos com significância de valor- $p < 0,05$. Correlação de Pearson também foi estimada. O programa utilizado foi o IBM SPSS 25.0. As análises histológicas foram realizadas fixando os intestinos em Carnoy, coloração hematoxilina e eosina (H/E) (Junqueira e Junqueira, 1983). Os cortes histológicos foram observados, analisados e fotografados em microscópio óptico Zeiss padrão (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Resultados e Discussão

A concentração letal para 50% das amostras tratadas, não foi estimada, pois, nas análises realizadas, a mortalidade foi inferior a 50%. Contudo, o teste de Kruskal-Wallis indicou diferenças significativas entre as concentrações de azadiractina e o controle em 24 horas (Kruskal-Wallis $X^2 = 14,196$, $gl = 5$, $p\text{-value} = < 0.001$). Somente a concentração de 0,015 g i.a./mL (Teste Dunn $p = 0,034$) diferiu significativamente do controle, os demais

tratamentos não apresentaram significância ao Teste de Dunn (valor- $p > 0.05$) (Figura 1A).

Após o tratamento oral verificou-se uma forte correlação entre a mortalidade e as diferentes concentrações empregadas (Figura 1B). O tratamento 0,015 g i.a./mL apresentou a maior mortalidade (15,55%), seguido da concentração de $1,12 \times 10^{-3}$ g i.a./mL que indicou 13,33% e a de $7,5 \times 10^{-3}$ g i.a./mL que obteve cerca de 8,88%. Já concentrações $2,25 \times 10^{-3}$ e $5,25 \times 10^{-3}$ g i.a./mL apresentaram mortalidade de 4,44% e o controle que não apresentou mortalidade.



Figura 1 – A= Boxplot apresentando a mortalidade de *N. testaceicornis* após exposição oral à azadiractina durante 24 horas. **B=** Correlação da mortalidade de *N. testaceicornis* após exposição oral à diferentes concentrações de azadiractina durante 24 horas. Correlação de Pearson $r = 0,888$.

Apesar das concentrações empregadas terem sido subletais, várias alterações foram detectadas na morfologia do intestino médio das operárias analisadas. O intestino médio das abelhas tem como função digerir e absorver produtos (Cruz-Landim, 2009), podendo assim, sofrer alterações devido a ação de quimicos como a azadiractina.

O intestino dessa espécie apresenta uma cavidade cilíndrica, tendo em suas extremidades células musculares circulares (mais interna) e longitudinal (parte externa) (Fig. 2C). No epitélio são observados dois tipos celulares, as células digestivas e as células regenerativas que normalmente são encontradas em conjunto formando ninhos (Fig. 2A-B), que substituem células principais que estão sendo desgastadas (Cruz-Landim, 2009). Estas células apresentam secreção apocrina e a presença do lúmen, que é delimitado pela membrana peritrófica (Fig. 2B-C).

No tratamento com exposição oral de $7,5 \times 10^{-3}$ g i.a./mL, foram observados diversos danos no intestino médio das operárias: epitélio alterado, ninho de células regenerativas reduzidos, desprendimento e perda de células digestivas para o lúmen e o descolamento da lâmina basal em relação a musculatura (Fig. 2D). As análises das concentrações mais elevadas, as estruturas apresentaram modificações mais acentuadas, ocorrendo o desaparecimento da membrana peritrófica e das células regenerativas (Fig. 2E-F).

Bauli et al. (2018) realizou estudos em relação a alterações morfológicas do intestino médio causadas pelo inseticida azadiractina com as abelhas sem ferrão da espécie *Tetragonisca angustula* LATREILLE (1811) (Hymenoptera, Trigonini), as autoras observaram muitos danos nessa região, semelhantes aos observados no presente estudo com o da *N. testaceicornis*

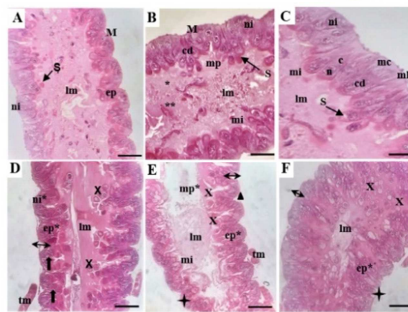


Figura 2 – Fotomicrografia do intestino médio de *N. testaceicornis*. Controle (A – C). Tratamento com $7,5 \times 10^{-3}$ g i.a./mL em 24 (D). Tratamento com $1,12 \times 10^{-3}$ g i.a./mL em 24 (E). Tratamento com 0,015 g i.a./mL em 24 (F). Musculatura (M); Musculatura longitudinal (ml); musculatura circular (mc); epitélio do intestino médio (ep); células digestivas (cd); citoplasma (c); núcleo (n); ninho células regenerativas (ni); membrana peritrófica (mp); espaço ectoperitrófico (*); espaço endoperitrófico (**); lúmen do intestino médio (lm); microvilosidades (mi); secreção (S); túbulo de Malpighi (tm); membrana peritrófica ausente (mp*); epitélio alterado (ep*); aumento de espaços intercelulares (↑); ninho células regenerativas reduzido (ni*); ninho células regenerativas ausentes (✦); rompimento da musculatura (▲); descolamento da lamina basal em relação a musculatura (↔); Desprendimento e perda de células digestivas para o lúmen (X); Escala: A, C, D, E, F (100 μ m); B (10 μ m).

Conclusões

A exposição oral com azadiractina nas concentrações $7,5 \times 10^{-3}$ g i.a./mL, $1,12 \times 10^{-3}$ g i.a./mL e 0,015 g i.a./mL por 24 horas, apresentou mortalidade subletal, contudo, no intestino médio das operárias de *N. testaceicornis* analisadas foram observadas muitas alterações que em longo prazo pode causar a morte dessas abelhas.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa PIBIC-UEM, CNPq e Fundação Araucária pelo incentivo e pela bolsa concedida para a realização da pesquisa e pela minha orientadora Dr. Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki pela oportunidade de realizar esse estudo.

Referências

BAULI, S.C.; GIGLIOLLI, A.A.S.; MOREIRA, D.R.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Alterações morfológicas no intestino médio das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* Latreille (1811) (Hymenoptera, Trigonini) expostas a azadiractina. In: Encontro Anual de Iniciação Científica e 7º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior, 27., 2018. **Anais...** Maringá: UEM, 2018.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. 1 ed. São Paulo: UNESP, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1 ed. São Paulo: Santos, 1983.