

Estudio de toxicidad aguda por contacto del análogo de Brasinoesteroide DI -31 en abejas (*Apis Mellifera*)

Angela Fraga Pérez¹, Yamilet Coll García², Alaín Vega Cárdenas³, Alberto
Morales Martínez³, Francisco Coll Manchado².

1. Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana.. Cuba

2. Centro de Estudios de Productos Naturales. Facultad de Química. Universidad de la Habana. Cuba.

3. Estación Experimental Apícola El Cano, La Lisa. Ciudad de La Habana, Ministerio de la Agricultura, Cuba.

Ave. 23 # 21425 e/214 y 222. La Coronela. CP 13600. La Lisa.Ciudad de La Habana. Cuba.

Teléfonos: 271 95 31, 271 9537, 271 95 38.

Correspondencia: angela@cieb.sld.cu; yamcoll@fq.uh.cu

Resumen

El DI-31 es un análogo de brasinoesteroides semisintético obtenido por la Facultad de Química de la Universidad de La Habana. Este producto posee la capacidad de aumentar el rendimiento y la calidad de las cosechas y preparar a las plantaciones para situaciones de estrés hídrico y salino.

El objetivo de este experimento fue la evaluación de la toxicidad por contacto del DI-31 sobre las abejas.

La sustancia en ensayo se aplicó tópicamente a dosis única de 100 µg por abeja. Se utilizaron un total de 200 abejas de la especie *Apis mellifera*. Las variables analizadas fueron la aparición de signos tóxicos y la mortalidad a las 4, 24 y 48 horas del ensayo. (OECD, 1998).

Los resultados registraron que las abejas tratadas con el análogo del DI-31 no manifestaron signos de toxicidad atribuibles al producto en ensayo.

Teniendo en cuenta los resultados de estos ensayos se puede concluir que es poco probable la ocurrencia de efectos tóxicos en *Apis mellifera* al ponerse en contacto con el DI-31.

Palabras claves: DI -31, Brasinoesteroides, abeja, *Apis mellifera*, ecotoxicología.

Abstract

Acute contact toxicity study on bees (*Apis mellifera*) of DI-31, a semi-synthetic brassinosteroid analogue.

DI-31 is a semi-synthetic brassinosteroid analogue obtained in the Faculty of Chemistry of the Havana University. This product improves crops yield and quality, as well as enhances plants tolerance to water and salt stresses.

The goal of the present work was the evaluation of the contact toxicity of DI-31 on bees.

The substance assayed was topically applied in one dose of 100 µg per bee. Two hundred bees of the *Apis mellifera* species were used. The appearance of signs of toxicity and the mortality at 4, 24 and 48 hours after administration were scored (OECD, 1998).

The results showed that bees treated did not present any sign of toxicity derived from the product assayed.

Taking into account the results from this assay, it can be concluded that toxic effects of DI-31 on *Apis mellifera* are unlikely.

Key words: DI -31, Brassinosteroids, honey bees, *Apis mellifera*, ecotoxicologicals

Introducción

La evaluación de los potenciales efectos de los plaguicidas sobre el medio ambiente, constituye una parte importante en el proceso de regulación de ellos. La valoración del riesgo define una relación entre los niveles esperados de exposición y de efectos sobre los ecosistemas, esta exposición supone la estimación cuantitativa de la concentración que puede alcanzar el plaguicida en los diferentes compartimentos por la actividad humana, siempre a partir de una liberación intencionada al ambiente. La valoración de los efectos, por tanto, es la parte que se obtiene de los conocimientos ecotoxicológicos y pretende analizar los efectos sobre la estructura y función de los ecosistemas, poniendo énfasis en la protección de los organismos vivos, protección de los elementos del medio y de las interacciones entre ambos.

En cada situación, se deben definir los elementos a proteger, que estarán en correspondencia con los componentes claves del ecosistema llamados receptores, y estudiar los parámetros de toxicidad para cada uno de ellos. Entre los parámetros y receptores seleccionados para la evaluación de riesgo ambiental de plaguicidas se encuentran las abejas, por su alta sensibilidad ante los cambios ambientales.

Las plantas poseen la capacidad de sintetizar una gran cantidad de sustancias. Sin embargo no fue hasta 1979 que se descubrieron en ellas los esteroides con actividad hormonal. Dentro de este grupo se encuentran los brasinoesteroides, que promueven la elongación y la división celular y se consideran la sexta clase de hormonas reguladoras del crecimiento. El primer brasinoesteroide (brasinólida) fue aislado a partir del polen de *Brassica napus L.* Dos años después se encontró una estructura similar en la bilis del insecto *Castanea crenata* (Belkhadir y Chory, 2006). En la actualidad se conocen más de 40 tipos de compuestos estructural y funcionalmente relacionados con los brasinoesteroides. Entre las funciones más relevantes se destacan la capacidad de aumentar el rendimiento y la calidad de las cosechas, incrementar la resistencia a plaguicidas y disminuir el estrés hídrico, salino, térmico y nutritivo al estimular la síntesis de polipéptidos (Sakurai *et al.*, 2000; Thummel y Chory, 2002).

En condiciones naturales los brasinoesteroides forman parte del alimento recolectado por las abejas en el momento de la polinización, por lo que la aplicación de un análogo sintético no debe reflejar resultados negativos en la actividad vital de la colmena, sobre todo teniendo en cuenta que esta hormona no se acumula en los productos apícolas.(L.I Boytsenyk et al 2001).

En este ensayo se estudiaron los efectos tóxicos del análogo de brasinoesteroide DI-31 a partir de su administración por contacto a dosis única en abejas *Apis mellifera*. Se tuvo en cuenta la mortalidad y la aparición de signos tóxicos, que pudieran afectar el ecosistema después de su aplicación., considerando que la función primordial que realiza la abeja es la polinización de diversos cultivos asegurando la correcta fecundación de especies vegetales necesarias para nuestra existencia.

Por lo antes expuesto, el objetivo del estudio fue la evaluación de la toxicidad por contacto del análogo de brasinoesteroide DI-31 en abejas *Apis mellifera*.

Materiales y métodos

Para conducir el ensayo se utilizaron abejas *Apis mellifera*, obreras jóvenes, de similar edad y alimentación, aparentemente sanas que no recibieron previamente ningún tratamiento con medicamentos o cualquier otra sustancia química, provenientes de una colonia "in situ" de la Estación Experimental Apícola "El Cano", La Lisa, Ciudad de La Habana, perteneciente al Ministerio de la Agricultura de Cuba.

Se utilizó para el ensayo las técnicas y metodologías de la OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Honeybee, Acute Contact Toxicity Test. Protocol 214 (1998).

La sustancia en ensayo se preparó a una concentración de 2mg de DI-31 por 1 mL de agua destilada, y no en solventes orgánicos como plantea la OECD, pues el producto en la práctica agrícola se diluye a una proporción de 1:25 000 de agua

Se realizó un ensayo límite de dosis única, donde a los insectos tratados se les aplicó 100 µg (50 µL) de la sustancia de ensayo en la región dorsal del tórax y al grupo control 50µL de agua destilada con el objetivo de someter al grupo al mismo stress que a los tratados.

Además un grupo control negativo que no fue tratado.

Posteriormente se colocaron en cajas de madera con rejillas metálicas, fáciles de limpiar y esterilizar, bien ventiladas con espacio suficiente para el desarrollo normal de la especie. Cada caja se consideró un tratamiento en el que se colocaron 30 abejas. El ensayo se realizó utilizando 6 réplicas.

Finalmente todos los tratamientos se colocaron en incubadora a temperatura de 32 ± 2 °C y humedad relativa del 60-80 % y se mantuvieron en la oscuridad. Los procedimientos de manipulación, incluyendo tratamiento y observaciones se ejecutaron bajo la luz solar.

Como alimento se proporcionó miel de panal de abeja *ad libitum*. Se determinó la mortalidad a las 4, 24 y 48 horas posteriores a la aplicación y se compararon los resultados con los valores del grupo control

El ensayo se consideró válido ya que la mortalidad en el grupo control no excedía el 10 %.

Adicionalmente se determinaron los efectos de la sustancia en ensayo sobre el comportamiento normal de la especie y la posible aparición de signos tóxicos (ataxia, diarrea, etc.).

Resultados

Al concluir el estudio los valores de mortalidad para el grupo control negativo correspondieron a un valor de 3.3 %, rango aceptable para ese tipo de ensayo, según la OECD (Tabla I).

La mortalidad en los dos grupos de abejas tratadas con el DI-31 no excede el 10 % (Tabla I).

No se observaron signos tóxicos como letargo, ataxia, que evidenciaran una toxicidad en las sobrevivientes, y en el caso de las fallecidas no se observó la lengua fuera de la cavidad bucal, signo muy característico de toxicidad en esta especie (comunicación personal).

Discusión

Los brasinoesteroides juegan un papel fundamental en la expansión, división celular, diferenciación y desarrollo reproductivo de los vegetales (Belkhadir y Chory, 2006) y han sido encontrados en todas las especies de plantas estudiadas hasta la fecha (Nemhauser y Chory, 2004). El DI-31 es un análogo funcional de brasinoesteroide que está destinado a manipular el crecimiento, la calidad de las cosechas, la resistencia al estrés biótico y abiótico en cultivos económicamente importantes para los humanos. En Cuba se ha estudiado ampliamente la utilización en cultivos terrestres y se dispone de una amplia información científica que respalda el empleo seguro (Luna *et al.*, 2001; Terry *et al.*, 2001; Davison *et al.*, 2002; Cala *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2003; Mariña *et al.*, 2003; Robaina *et al.*, 2003). Para la aplicación en la agricultura se utiliza una concentración de 10-20 mg/ha aproximadamente, una o dos veces en el ciclo vegetativo, en dependencia del tipo de cultivo.

Los resultados alcanzados en esta investigación en *Apis mellifera* mostraron porcentajes de mortalidad similares en los grupos tratados y controles, además estos valores fueron inferiores al valor establecido por la OECD. Por lo que no se le atribuye este efecto a la administración del producto de ensayo, sino a la ocurrencia normal de este evento en el modelo experimental empleado al someter a estos organismos a un drástico cambio de vida.

Se conoce que cuando las abejas están expuestas a situaciones de estrés, la acumulación de materia no digerida en el recto provoca disentería que puede causar la muerte prematura en abejas maduras (Beiro et al, 2003).

A pesar de que los parámetros ambientales de temperatura, humedad y oscuridad estipulados por la guía de la OECD se cumplieron, estos organismos sufrieron estrés al ser retirados de su medio natural, además de haber sido sometidos a tratamiento. También se debe tener en cuenta la muerte accidental al quedar pegados a la miel.

De acuerdo con los resultados, el análogo del Brasinoesteroide DI-31, a la dosis de 100 µg por abeja a una concentración de 2 mg/ mL, no produjo un valor significativo de mortalidad al ponerse en contacto con la abeja *Apis mellifera*. De igual modo, no se observaron signos tóxicos ni alteraciones en su comportamiento, por lo que concluimos que esta sustancia no es tóxica al ponerse en contacto con la especie.

Tabla 1. Observación de la mortalidad de las abejas tratadas con DI-31 y los controles negativos a las 4; 24 y 48 horas.

ABEJAS MUERTAS				
Grupos	4 Horas	24 Horas	48 Horas	% Mortalidad
I. Abejas tratadas (DI-31) (90)	3	0	1	4.4 %
II. Abejas tratadas(DI-31) (90)	2	1	1	4.4 %
III. Controles (H ₂ O Dest.) (90)	3	1	1	5.5 %
IV. Control negativo (60)	2	0	0	3.3 %

Bibliografía

1. Belkhadir, Y., Chory, L. (2006). Brassinosteroid Signaling: A Paradigm for Steroid Hormone Signaling from the Cell Surface. *Science*. **314**; 1410-11.
2. Cala, M., Blanco, A., Breff, F., Abreu, N., Ramos, O., Alvarado, K. (2003). Influencia de Biobras-16 en la producción de posturas de fresa *Fragaria Annanassa* D. Cuadernos de fitopatología: Revista técnica de fitopatología y entomología. ISSN 0213-4128. **76**; 49-52.
3. Enriquez A. Pedro. Evaluación del riesgo ambiental a la liberación de plaguicidas. Laboratorio de Ecotoxicología, Servicio Agrícola y Ganadero. Chile.1999.
4. Davison, G., Restrepo, R., Serrano, M., Martínez, G., Coll, F., León, O. (2002). Efectos Ecotoxicológicos de un Brasinoesteroide en Tres Organismos Productores. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. **21**(1); 13-20.
5. Díaz, S., Morejón, R., Núñez, M. (2003). Influencia del BIOBRAS-16 en el rendimiento y otros caracteres en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*.**24**(2);33-38.
6. Gema Pérez Davison. Estudio Ecotoxicológico del análogo de brasinoesteroide DI-31 sobre organismos acuáticos. Tesis de Doctorado. CEIEB. IFAL. 2007.
7. Jennifer L. Nemhauser and Joanne Chory. Bring it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *Journal of Experimental Botany*. U.S. A.Vol.55 No. 395. January 2004.
8. L. I. Boytsenyk, S.B. Antimirov. Epibrassinolide y el desarrollo de la colmena. Academia de la Agricultura de Moscu. Cátedra de Apicultura. Moscu 127550, Calle Paschnaya #3.2001.
9. Luna, R., Ardisana, E., Cabrera, J., Zamarrón, I. (2001). Utilización del PECTIMORF y BIOBRAS -16 en la embriogénesis somática de la papa. *Cultivos Tropicales*. **2**(1); 9-14.
10. Mariña, C., Aguilera R., Nieto, M., Pérez, B., Castillo, P., Licea, L., Alonso, E., Coll, F. (2003). Efecto de los análogos de bransinoesteroides Biobrás 6 y 16 sobre la productividad del arroz en condiciones de salinidad. *Alimentaria*. **346**; 71-6.
11. Odette Beiro Castro, María Elena Echevarría Martínez, Roxana Fraga Álvarez, Anay Martínez Suárez, Yordanka Domínguez Linares, José Trujillo Hernández, Onelio Carballo Hondal. Toxicidad Aguda por Contacto del Bioenraiz en abejas (*Apis mellifera*). Centro

<http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>.

12. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Honeybee, Acute Contact Toxicity Test. Protocol 214 (1998).
13. Robaina, C., Izquierdo, I., Alonso, E., Coll, F., Coll, D., Zullo, M. (2003). Synthesis and biological activity of three new 5-hydroxy spirostanoic brassinosteroid analogues. *J. Braz. Chem. Soc.* **14**; 66–9.
14. Sakurai, A., Yokota, G., Clause, S. (2000). *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormons*. Academic Press. California. 345-445.
15. Terry, E., Núñez, M., Pino, M., Medina, M. (2001). Efectividad de la combinación biofertilizantes–análogo de brasinoesteroides en la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*). *Cultivos Tropicales*. **22**(2); 22-27.
16. Thummel, C., Chory, J. (2002). Steroid signaling in plants and insects—common themes, different pathways. *Genes & Development*. **16**; 3113–29.

Recibido: 12/01/10

Aceptado: 12/03/10