

BÁRBARA MONTEIRO DE CASTRO E CASTRO

**TOXICIDADE, CITOPATOLOGIA NO INTESTINO MÉDIO, RESPOSTA
COMPORTAMENTAL E RESPIRATÓRIA DE *Anticarsia gemmatalis*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) APÓS EXPOSIÇÃO A INSETICIDAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C355t
2018
Castro, Bárbara Monteiro de Castro e, 1990-
Toxicidade, citopatologia no intestino médio, resposta
comportamental e respiratória de *Anticarsia gemmatalis*
(Lepidoptera: Noctuidae) após exposição a inseticidas / Bárbara
Monteiro de Castro e Castro. – Viçosa, MG, 2018.
ix, 71f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Cola Zanuncio.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Doenças e pragas - Controle. 2. *Anticarsia
gemmatalis*. 3. Citopatologia. 4. Diamidas - Testes de toxicidade.
5. Histopatologia. 6. Lagarta-da-soja. 7. Inseticidas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

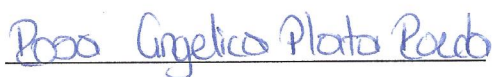
CDD 22. ed. 633.3495

BÁRBARA MONTEIRO DE CASTRO E CASTRO

Toxicidade, citopatologia no intestino médio, resposta comportamental e respiratória de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) após exposição a inseticidas

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

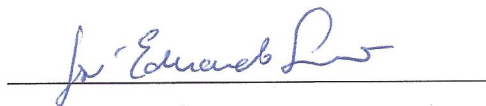
APROVADA: 26 de setembro de 2018.



Rosa Angelica Plata Rueda



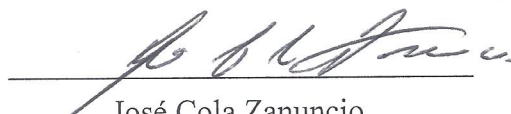
Fausto da Costa Matos Neto



José Eduardo Serrão
(Coorientador)



Luis Carlos Martinez Castrillon
(Coorientador)



José Cola Zanuncio
(Orientador)

À Família Monteiro de Castro

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer presente em todos os momentos, me concedendo saúde e força para superar as dificuldades e comemorar as alegrias.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Núcleo de Microscopia e Microanálise e ao Laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento de Biologia Geral, pelo apoio à realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao meu orientador José Cola Zanuncio e aos meus coorientadores, José Eduardo Serrão, Luis Carlos Martínez Castrillon e Marcus Alvarenga Soares, pelos inúmeros ensinamentos, pela atenção e orientação.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Insetos, obrigada pela amizade, convívio diário e pelas pesquisas e experiências compartilhadas.

Aos meus pais e a família Monteiro de Castro que souberam entender a minha ausência e me apoiaram em todos os momentos.

A Vinícius Lages Guimarães, por ser um dos meus maiores estímulos e porto seguro nos momentos turbulentos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

BÁRBARA MONTEIRO DE CASTRO E CASTRO, filha de Ediberto de Castro e Gilsiléia Lourdes de Castro e Castro, nasceu em 09 de junho de 1990 em Curvelo, Minas Gerais, Brasil.

Em agosto de 2008, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em Diamantina, Minas Gerais, concluindo-o em julho de 2013.

Em agosto de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, submetendo-se à defesa, em 24 de fevereiro de 2015.

Em março de 2015, iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese no dia 26 de setembro de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. Introdução Geral	1
2. Objetivos.....	4
3. Referências	5
CAPÍTULO 1 - Toxicidade e citopatologia mediadas por <i>Bacillus thuringiensis</i> no intestino médio de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	10
CAPÍTULO 2 - Toxicidade, citopatologia no intestino médio, resposta comportamental e respiratória de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae) após exposição ao clorantraniliprole	39
Conclusões gerais	71

RESUMO

CASTRO, Bárbara Monteiro de Castro e, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2018. **Toxicidade, citopatologia no intestino médio, resposta comportamental e respiratória de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) após exposição a inseticidas.** Orientador: José Cola Zanuncio. Coorientadores: José Eduardo Serrão, Luis Carlos Martínez Castrillon e Marcus Alvarenga Soares.

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal desfolhadora de plantas de soja e seu controle é feito, principalmente, pelo uso de inseticidas. Bioinseticidas e plantas transgênicas, baseados em toxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), são importantes para o manejo de *A. gemmatalis*. Clorantraniliprole é um inseticida recomendado para programas de manejo integrado dessa praga na soja por possuir baixa toxicidade para organismos não alvos. A interação desses produtos com células do intestino médio de lagartas determina sua eficácia inseticida. O objetivo foi avaliar a toxicidade e as alterações citopatológicas mediadas por *B. thuringiensis*, var. *kurstaki*, linhagem HD-1 e o inseticida clorantraniliprole no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis*, além de verificar as alterações comportamentais e na taxa respiratória de lagartas mediadas pelo clorantraniliprole. A eficácia dos inseticidas foi determinada calculando os valores das concentrações letais (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e CL₉₉) em laboratório. Intestino médio de *A. gemmatalis* foi extraído após ingestão dos inseticidas e avaliado por microscopia de luz, eletrônica de transmissão e confocal. O comportamento das lagartas após ingestão do clorantraniliprole foi analisado por sistema de rastreamento em vídeo e a taxa respiratória com respirômetro. *Bacillus thuringiensis* e clorantraniliprole induziram a citotoxicidade das células epiteliais do intestino médio de *A. gemmatalis* causando desorganização celular, degeneração das microvilosidades, fragmentação e protrusão de células, desorganização da matriz peritrófica e vacuolização celular. Células expostas ao *Bt* apresentaram núcleos com cromatina condensada e a quantidade de lisossomos foi aumentada. Apoptose ocorreu nas células do intestino médio de lagartas expostas ao *Bt* e resposta regenerativa foi observada 8 horas após a exposição ao entomopatógeno, no entanto, essa resposta não foi contínua. Secreção apócrina foi expelida do epitélio para o lúmen após exposição ao clorantraniliprole. Lagartas expostas ao clorantraniliprole apresentaram maior período de repouso e redução na distância e velocidade de caminhamento e nas taxas respiratórias. Clorantraniliprole e toxinas produzidas por *Bt* são nocivos a *A. gemmatalis* em concentrações letais médias provocando mudanças histológicas e ultraestruturais

severas com degeneração do epitélio do intestino médio. O clorantraniliprole reduz as taxas respiratórias e induz resposta comportamental arrematante desse inseto.

ABSTRACT

CASTRO, Bárbara Monteiro de Castro e, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2018. **Toxicity, cytopathology in the midgut, behavioral and respiratory response of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) after exposure to insecticides.** Advisor: José Cola Zanuncio. Co-advisors: José Eduardo Serrão, Luis Carlos Martínez Castrillon and Marcus Alvarenga Soares.

The velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), is the main defoliating pest of soybean plants and its control is performed mainly with insecticides. Bioinsecticides and transgenic plants, based on *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxins, are important for the management of *A. gemmatalis*. Chlorantraniliprole is an insecticide recommended for programs of integrated management of *A. gemmatalis* in soybean because it has low toxicity to non-target organisms. The interaction of these chemicals with caterpillar midgut cells determines its efficacy as an insecticide. The objective was to evaluate the toxicity and cytopathological changes mediated by *B. thuringiensis*, var. *kurstaki*, HD-1 strain and chlorantraniliprole insecticide in the midgut of *A. gemmatalis* caterpillars, as well as to verify the behavioral and the respiratory rate changes of caterpillars mediated by chlorantraniliprole. Insecticidal efficacy was determined by calculating lethal concentration values (LC₂₅, LC₅₀, LC₇₅, LC₉₀ and LC₉₉) in the laboratory. Midgut from *A. gemmatalis* was extracted after insecticides ingestion and evaluated by light, transmission electron and confocal microscopy. The behavior of caterpillars after ingestion of chlorantraniliprole was analyzed by video tracking system and respiratory rate with respirometer. *Bacillus thuringiensis* and chlorantraniliprole induced cytotoxicity of *A. gemmatalis* midgut epithelial cells causing cellular disorganization, microvilli degeneration, cell fragmentation and protrusion, peritrophic matrix rupture, and cell vacuolization. Cells exposed to *Bt* showed nuclei with condensed chromatin and the amount of lysosomes was increased. Apoptosis occurred in the midgut cells of caterpillars exposed to *Bt* and regenerative response was observed 8 hours after exposure to entomopathogen; however, this response was not continuous. Apocrine secretion was expelled from the epithelium to the lumen after exposure to chlorantraniliprole. Caterpillars exposed to chlorantraniliprole presented a longer rest period and reduction in distance and walking speed and in the rates respiratory. Chlorantraniliprole and toxins produced by *Bt* are harmful to *A. gemmatalis* in medium lethal concentrations causing severe histological and ultrastructural changes with degeneration of the midgut epithelium.

Chloranthraniliprole reduces respiratory rates and induces an arrestant behavioral response of this insect.

1. Introdução Geral

A desfolha das lavouras de soja (*Glycine max* L. Merrill, Fabaceae) é causada por diferentes espécies de insetos que podem reduzir o rendimento e a qualidade dos grãos. A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é a principal praga desfolhadora dessa cultura no Brasil (Sosa-Gomes, 2004; Panizzi, 2013). As lesões causadas por esse inseto começam com o consumo da epiderme e do mesofilo até o consumo de toda a folha, deixando apenas as veias intactas (Bund e Mcpherson, 2000).

Atualmente, inseticidas químicos de amplo espectro de ação são usados para controlar essa praga (Agrofit, 2018). A interação desses produtos com células do intestino médio de lagartas determina sua eficácia como inseticida (Sousa et al., 2010). O trato digestivo dos insetos é dividido em três regiões principais: intestino anterior e posterior, que são derivados do ectoderma e intestino médio que tem origem endodérmica (Chapman, 2013). O intestino médio corresponde a maior porção do trato digestivo dos insetos, constituindo uma barreira física e química contra compostos xenobióticos. Herbívoros, geralmente, tem intestino médio curto e alargado, permitindo uma alta taxa de transferência de alimentos. As principais funções do intestino médio são digestão e absorção de alimentos, regeneração de células em caso de dano (Lehane e Billingsley, 2012) e defesa imunológica local pela barreira física que impede a disseminação de patógenos ingeridos (Silva et al., 2016) ou resposta fisiológica para desintoxicação de compostos xenobióticos (Dow, 1987).

Programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) enfatizam o uso combinado de métodos biológicos, culturais, físicos e químicos (Timprasert et al., 2014) para suprimir as populações de pragas abaixo do nível de dano econômico em vez da erradicação

(Sharma et al., 2009), de forma segura, econômica e ambientalmente saudável (Ehler, 2006). Por isto, mais promissor em longo prazo (Soares et al., 2007; 2009).

Inseticidas biológicos, como estirpes de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner (Bacillaceae), específicas a insetos-alvos, sem efeitos tóxicos em animais ou ao meio ambiente (Bishop et al., 1999), são uma alternativa ao controle químico (Monnerat et al., 2007, Almeida et al., 2014). A extensa variedade de estirpes e toxinas *Bt* permite a produção de bioinseticidas e o desenvolvimento de plantas transgênicas (Romeis et al., 2006). *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, em forma de bastonete que, durante a esporulação, produz proteínas tóxicas para insetos (Van Rie et al., 1990; Hofmann et al., 1998). Esses cristais são dissolvidos e as protoxinas ativadas por proteases formando poros na membrana do intestino médio, provocando lise celular, septicemia e morte do inseto (Herrero et al., 2001; Bravo et al., 2007; Oestergaard et al., 2007). Os corpos parasporais de *Bt*, var. *kurstaki*, linhagem HD-1 apresentam atividade tóxica a lepidópteros e estão entre os bioinseticidas mais utilizados no controle de lagartas (Federici, 2003; Sanahuja et al., 2011).

O inseticida clorantraniliprole pertence ao grupo químico das diamidas (Dong et al., 2011) e apresenta modo de ação alternativo para controle de pragas resistentes aos piretróides e neonicotinóides (Malhat, 2012a), sem causar riscos para saúde humana (Malhat, 2012b; Wang et al., 2012). Esse inseticida é recomendado em programas de manejo integrado de *A. gemmatilis* e outras pragas na soja (De Castro et al., 2013) por possuir baixa toxicidade para organismos não alvos (Fernandes et al., 2016; Lavtizar et al., 2016; Whalen et al., 2016). Embora, a ação do clorantraniliprole seja no sistema muscular, alvos secundários também podem ser afetados por inseticidas (Lopes et al., 2017), como o intestino médio que é o principal órgão de contato quando o insetoingere o produto químico (Catae et al., 2014).

Neste estudo relatamos pela primeira vez as alterações citopatológicas mediadas por toxinas *Bt*, var. *kurstaki*, linhagem HD-1 e pelo inseticida clorantraniliprole no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* utilizando técnicas de microscopia de luz, transmissão eletrônica e eletrônica confocal. Além de verificar as alterações comportamentais e na taxa respiratória dessas lagartas mediadas pelo clorantraniliprole.

2. Objetivo Geral

- Avaliar a toxicidade de *B. thuringiensis*, var. *kurstaki*, linhagem HD-1 e alterações citopatológicas mediadas por toxinas desta bactéria no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis*.

2.1 Objetivo específico

- Avaliar o efeito tóxico, alterações histológicas e ultraestruturais nas células epiteliais do intestino médio, comportamentais e na taxa respiratória de lagartas de *A. gemmatalis* expostas ao clorantraniliprole.

3. Referências

- Almeida, G.D., Zanuncio, J.C., Senthil-Nathan, S., Pratisoli, D., Polanczyk, R.A., Azevedo, D.O. & Serrão, J.E. Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. *Isj-Invert. Surviv. J.* **11**, 79–86 (2014).
- Bishop, A.H., Johnson, C. & Perani, M. The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammalian investigated by oral and subcutaneous dosage. *World J. Microb. Biot.* **15**, 375–380 (1999).
- Bravo, A., Gill, S.S. & Soberón, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**, 423–435 (2007).
- Bund, C.S. & Mcpherson, R.M. Cropping preferences of common lepidopteran pests in a cotton/soybean cropping system. *J. Entomol. Sci.* **42**, 105–118 (2000).
- Catae, A.F., Roat, T.C., Oliveira, R.A., Nocelli, R.C.F. & Malaspina, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.* **77**, 274–281 (2014).
- Chapman, R.F. In: Simpson, S.J. (Ed.), *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press (2013).
- Dong, F.S., Xu, J., Liu, X.G., Li, J., Li, Y.B., Kong, Z.Q., Shan, W.L., Zheng, Z.T. & Zheng, Y.Q. Determination of CAP residues in corn and soil by UPLC-ESI-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Chromatographia* **74**, 399–406 (2011).
- Dow, J.A. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* **19**, 187–328 (1987).
- Ehler, L.E. Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest Manag. Sci.* **62**, 787–789 (2006).

- Federici, B.A. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *J. Invertebr. Pathol.* **89**, 30–38 (2003).
- Fernandes, M.E.S., Alves, F.M., Pereira, R.C., Aquino, L.A., Fernandes, F.L. & Zanuncio, J.C. Lethal and sublethal effects of seven insecticides on three beneficial insects in laboratory assays and field trials. *Chemosphere* **156**, 45–55 (2016).
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Tabashnik, B. & Ferré, J. Shared binding sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 5729–5734 (2001).
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Vanrie, J., Jansens, S. & Van Mellaert, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding site in the brush border membrane of target insect midgut. *P. Natl. A. Sci.* **85**, 7844–7848 (1998).
- Lavtizar, V., Berggren, K., Trebše, P., Kraak, M.H.S., Verweij, R.A. & van Gestel, C.A.M. Comparative ecotoxicity of chlorantraniliprole to non-target soil invertebrates. *Chemosphere* **159**, 473–479 (2016).
- Lehane, M., Billingsley, P. Biology of the insect midgut. Springer Science & Business Media (2012).
- Lopes, M.P., Fernandes, K.M., Tomé, H.V.V., Gonçalves, W.G., Miranda, F.R., Serrão, J.E. & Martins, G.F. Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and malpighian tubules of africanized honey bee workers. *Pest Manag. Sci.* **74**, 1311–1318 (2017).
- Malhat, F., Abdallah, H. & Hegazy, I. Dissipation of chlorantraniliprole in tomato fruits and soil. *B. Environ. Contam. Tox.* **88**, 349–351 (2012a).

- Malhat, F.M. Determination of chlorantraniliprole residues in grape by high-performance liquid chromatography. *Food Anal. Method.* **5**, 1492–1496 (2012b).
- Monnerat, R.G., Batista, A.C., Medeiros, P.T., Martins, E.S., Melatti, V.M., Praça, L.B., Duma, V.F., Morinaga, C., Demo, C., Gomes, A.C.M., Falcão, R., Siqueira, C.B., Silva-Werneck, J.O. & Berry, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biol. Control* **41**, 291–295 (2007).
- Oestergaard, J., Ehlers, R.U., Martínez-Ramírez, A.C. & Real, M.D. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. *Appl. Environ. Microb.* **73**, 3623–3629 (2007).
- Panizzi, A. R. History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotrop. Entomol.* **42**, 119–127 (2013).
- Romeis, J., Meissle, M. & Bigler, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat. Biotechnol.* **24**, 63–71 (2006).
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capel, T. & Chrstou, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* **9**, 283–300 (2011).
- Sharma, D., Moorthy, P.N.K. & Krishnamoorthy, A. Comparative study of pesticide residue pattern in vegetables grown using IPM and non-IPM practice. *Journal of Horticultural Sciences* **4**, 191–194 (2009).
- Silva, F.W.S., Serrão, J.E. & Elliot, S.L. Density-dependent prophylaxis in primary anti-parasite barriers in the velvetbean caterpillar. *Ecol. Entomol.* **41**, 451–458 (2016).

- Soares, M.A., Leite, G.L.D., Zanuncio, J.C., Rocha, S.L., De Sá, V.G.M. & Serrão, J.E. Flight capacity, parasitism and emergence of five *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species from forest areas in Brazil. *Phytoparasitica* **35**, 314–318 (2007).
- Soares, M.A., Zanuncio, J.C., Leite, G.L.D., Wermelinger, E.D. & Serrão, J.E. Does *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) use different defense behaviours against predators? *J. Plant Dis. Protect* **116**, 30–33 (2009).
- Sosa-Gomes, D.R. 2004. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Genet. Mol. Biol.* **27**, 378–384.
- Sousa, M.E.C., Santos, F.A.B., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Siqueira, H.A.A., Alves, L.C. & Torres, J.B. Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. *J. Insect Physiol.* **56**, 1913–1919 (2010).
- Timprasert, S., Datta, A.A. & Ranamukhaarachchi, S.L. Factors determining adoption of integrated pest management by vegetable growers in Nakhon Ratchasima Province, Thailand. *Crop Prot.* **62**, 32–39 (2014).
- Van Rie, J., Jansen, S., Höfte, H., Degheled, D. & Van Mellaert, H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Appl. Environ. Microb.* **56**, 1378–1385 (1990).
- Wang, T.T., Cheng, J., Liu, X.J., Jiang, W., Zhang, C.L. & Yu, X.Y. Effect of biochar amendment on the bioavailability of pesticide CAP in soil to earthworm. *Ecotox. Environ. Safe.* **83**, 96–101 (2012).

Whalen, R.A., Herbert, D.A., Malone, S., Kuhar, T.P., Brewster, C.C. & Reisig, D.D.

Effects of diamide insecticides on predators in soybean. *J. Econ. Entomol.* **109**,

2014–2019 (2016).

CAPÍTULO 1

Toxicidade e citopatologia mediadas por *Bacillus thuringiensis* no intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

Resumo: Bioinseticidas e plantas transgênicas, baseados em toxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), são importantes para o manejo de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), praga desfolhadora de soja. A interação dessas toxinas com células do intestino médio de lagartas determina sua eficácia como inseticida. O objetivo foi avaliar a suscetibilidade a *B. thuringiensis*, var. *kurstaki*, linhagem HD-1 e alterações citopatológicas mediadas por toxinas desta bactéria no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis*. A eficácia inseticida foi determinada calculando os valores das concentrações letais (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e CL₉₉) em laboratório. Intestino médio de *A. gemmatalis* foi extraído após ingestão do bioinseticida e avaliado por microscopia de luz, eletrônica de transmissão e confocal. As concentrações letais médias de *Bt* mostraram toxicidade [CL₅₀ = 0,46 (0,43 – 0,49) mg mL⁻¹] para as lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis* após 108 horas. *Bacillus thuringiensis* induz a citotoxicidade severa que aumenta com o período de exposição das células epiteliais do intestino médio de *A. gemmatalis* causando desorganização celular, degeneração das microvilosidades, fragmentação e protrusão de células, desorganização da matriz peritrófica e vacuolização celular. Os núcleos celulares apresentaram cromatina condensada e a quantidade de lisossomos foi aumentada. Apoptose ocorreu nas células do intestino médio de lagartas expostas ao *Bt*. Resposta regenerativa, em lagartas de *A. gemmatalis*, foi observada 8 horas após a exposição ao entomopatógeno, no entanto, essa resposta não foi contínua. Toxinas produzidas por *Bt* são nocivas a *A. gemmatalis*

em concentrações letais médias com danos estruturais e a morte das células epiteliais do intestino médio desse inseto.

Palavras-chave: Apoptose, citotoxicidade, epitélio, histopatologia, lagarta-da-soja, ultraestrutura.

1. Introdução

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é a principal desfolhadora de plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill, Fabaceae) (Panizzi, 2013). No Brasil, essa praga ocorre durante todo o ano, especialmente, na fase vegetativa das plantas e seu controle é feito, principalmente, com inseticidas sintéticos (Guedes et al., 2009; De Castro et al., 2013, 2015). Programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) visam a redução do uso de químicos no controle de pragas (Panizzi, 2013) devido aos efeitos negativos, desses produtos, sobre organismos não alvos (Zanuncio et al., 1998; Tavares et al., 2010) e ao meio ambiente (Vryzas et al., 2011; Damalas e Eleftherohorinos, 2011). Inseticidas biológicos, como estirpes de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner (Bacillaceae), específicas a insetos-alvos, sem efeitos tóxicos em animais ou ao meio ambiente (Bishop et al., 1999), são uma alternativa ao controle químico (Monnerat et al., 2007; Almeida et al., 2014). A extensa variedade de estirpes e toxinas *Bt* permitem a produção de bioinseticidas e o desenvolvimento de plantas transgênicas (Romeis et al., 2006).

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, em forma de bastonete que, que produz proteínas tóxicas para insetos durante a esporulação (Van Rie et al., 1990; Hofmann et al., 1998). Após a ingestão, os cristais da toxina são solubilizados devido ao pH alcalino no intestino médio da lagarta e suas protoxinas ativadas pelas proteases intestinais. Essas protoxinas se ligam a receptores específicos nas microvilosidades das células colunares do intestino médio, formando poros na membrana plasmática, causando lise celular e morte de insetos (Grochulski et al., 1995; Herrero et al., 2001; Bravo et al., 2007; Oestergaard et al., 2007). Corpos paraesporais de *Bt*, var. *kurstaki*, linhagem HD-1, são os mais utilizados no controle de lagartas (Federici et al., 2003, Sanahuja et al., 2011).

A interação dessas toxinas no intestino médio de lagartas determina sua eficácia como inseticida (Sousa et al., 2010), pois o trato digestivo dos insetos é uma barreira física e química contra patógenos invasivos. O intestino médio de *A. gemmatalis* é a maior porção do trato digestivo com epitélio constituído por quatro tipos celulares: células colunares ou digestivas responsáveis pela secreção das enzimas digestivas e absorção (Lehane e Billingsley, 1996); células caliciformes responsáveis pela homeostase iônica e absorção (Lehane e Billingsley, 1996; Terra et al., 2006); células regenerativas responsáveis pela renovação celular (Turbeck, 1974; Serrão e Cruz-Landim, 1996; Martins et al., 2006) e as células endócrinas posicionadas basalmente no epitélio como células isoladas (Andries e Beauvillain, 1988) responsáveis pela função endócrina (Lehane e Billingsley, 1996).

Alterações nas células colunares e caliciformes e redução de células regenerativas foram relatadas no intestino médio dos lepidópteros *Plodia interpunctella* Hübner (Pyralidae) (Abdel-Razek et al., 2002), *Epiphyas postvittana* Walker (Tortricidae) (Sutherland et al., 2003), *Bombyx mori* L. (Bombycidae) (Hong-Wei et al., 2008) e *Alabama argillacea* Hübner (Noctuidae) (Sousa et al., 2010) quando elas foram expostas ao *Bt*. Proteínas inseticidas podem afetar as células do intestino médio de maneira única, pois há muitas rotas potenciais para causar a morte das células epiteliais. Neste estudo, determinamos toxicidade e alterações citopatológicas mediadas por toxinas de *Bt*, var. *kurstaki*, linhagem HD-1 no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Insetos

Lagartas de *A. gemmatalis* foram obtidas da criação massal do Laboratório de Controle Biológico de Insetos (LCBI) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, Minas Gerais, Brasil e mantidas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas. Essas lagartas foram alimentadas com dieta artificial constituída por 10 g de ágar, 15,6 g de levedura de cerveja, 25 g de gérmen de trigo, 25 g de proteína de soja, 31,2 g de feijão, 12,5 g de caseína, e 2,5 mL de solução de vitaminas (1,2% de ácido ascórbico, 0,03% pantotenato de cálcio, 0,015% de niacina, 0,008%, riboflavina, 0,004% de tiamina e 0,004% de HCl) (Greene et al., 1976). Grupos de vinte lagartas de *A. gemmatalis* foram colocados por pote de poliestireno (15 × 9 cm) até a pupação. A reposição de alimento e a assepsia dos potes foram realizadas a cada 48 horas. Lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis*, sem amputações ou malformações aparentes, foram utilizadas nos bioensaios.

2.2 Teste de toxicidade

Bacillus thuringiensis (*Bt*), variedade *kurstaki*, linhagem HD-1 Dipel® foi usado no teste de toxicidade diluído em 1L de água ultrapura em sistema de purificação Milli-Q (Millipore) para produzir uma solução estoque, ajustando 100 g L^{-1} para obter as concentrações necessárias. A eficácia inseticida foi determinada com os valores das concentrações letais (CL_{25} , CL_{50} , CL_{75} , CL_{90} e CL_{99}) em laboratório. Seis concentrações de *Bt*, além do controle (água ultrapura), foram ajustadas em 10 mL de solução estoque (tratamentos e água): 0.1; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6 and 3.2 mg mL^{-1} (p/v). Diferentes concentrações de *Bt* foram aplicadas em solução de 0,5 μL em 1 g de dieta artificial.

Cinquenta lagartas de *A. gemmatalis* de quarto instar foram utilizadas por concentração individualizadas em placas de Petri (90 × 1,5 mm). O número de lagartas mortas foi contabilizado após exposição ao *Bt* em intervalos de 12 h por 108 h.

2.3 Histologia

Vinte lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis* foram alimentadas com dieta contaminada por *Bt* com concentração letal média (CL₅₀), além do controle, por diferentes períodos de tempo (2, 4, 8, 16 e 32 h) e crioanestesiadas a -4°C. O intestino médio foi dissecado em solução salina para insetos (0,1 M NaCl + 0,1 M KH₂PO₄ + 0,1 M Na₂HPO₄) e transferido para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12 h à 5°C. As amostras foram desidratadas em série crescentes de etanol (70, 80, 90 e 95%), embebidas em historesina Leica (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany) e seccionadas a 3 µm de espessura com micrótomo Leica RM2255. As seções foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

2.4 Ultraestrutura

Vinte lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis* foram alimentadas com dieta contaminada por *Bt* com concentração letal média (CL₅₀) por 32h e crioanestesiadas a -4°C. O intestino médio, dessas lagartas, foi dissecado e transferido para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 contendo 0,2 M de sacarose por 4 h em temperatura ambiente. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 h, lavadas em tampão, desidratadas em série crescente de etanol (70, 80, 90 e 99%) e embebidas em resina LR White (London Resin Company Ltd.). Seções ultrafinas (80-90 nm de espessura) foram obtidas com navalha de

diamante em ultramicrotomo Power Tome-X (Boeckeler Instruments, Tucson, AZ, USA), contrastadas com acetato de uranila aquosa 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.5 Imunofluorescência

Vinte intestinos médios de lagartas de *A. gemmatalis*, alimentadas com dieta contaminada com *Bt* com a concentração letal média (CL_{50}) por 8, 16 e 32h, além do controle, foram dissecados em 0,1 M de tampão de fosfato de sódio (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) e transferidos para solução fixadora de Zamboni por 2h. A seguir, as amostras foram lavadas com PBS contendo 1% de Triton X-100 (PBST) e incubadas com anticorpo anti-caspase 3 clivada (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) diluído 1:500 em PBS, para detecção de apoptose ou com anticorpo anti-histona H3 fosforida (PH3) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a 1:400 em PBS por 24h a 4°C para detecção de proliferação celular. Após incubação, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com isotiosinate de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) diluído 1:500 em PBS por 24h no escuro a 4°C. A seguir as amostras foram lavadas em PBS e os núcleos das células corados com iodeto TO-PRO-3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) durante 1 h. As amostras foram montadas em lâminas de vidro com 50% sacarose e examinadas em microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.6 Análise estatística

As concentrações letais CL_{25} , CL_{50} , CL_{90} , CL_{99} e os limites de confiança foram determinados por regressão baseada em concentração probit-mortalidade (Finney, 1971)

com o procedimento PROC PROBIT do programa SAS User v. 9.0 para Windows (SAS Institute, 2002).

3. Resultados

3.1 Toxicidade

As concentrações letais de *Bt* ($X^2 = 90,27$; $GL = 5$, $P < 0,001$) (Tabela 1) mostraram a toxicidade [$CL_{50} = 0,46$ (0,43 – 0,49) $mg mL^{-1}$] para lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis* (Fig. 1) após 108 horas. A mortalidade foi $< 1\%$ no controle.

3.2 Histologia

O intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* não expostas ao *Bt* apresentou epitélio composto de células colunares altas, células caliciformes e matriz peritrófica evidente. O citoplasma das células colunares e caliciformes apresentou poucos vacúolos, vesículas e pequenos grânulos. O núcleo foi alongado, ocupando a porção mediano-basal das células, com cromatina predominantemente descondensada (Fig. 2A).

Alterações histológicas foram observadas no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* duas horas após exposição ao *Bt* (Figs. 2B-3F). O epitélio apresentou formato irregular, início da degeneração celular e fragmentos celulares foram observados no lúmen. A vacuolização do citoplasma foi alta e a matriz peritrófica foi rompida (Fig. 2B). Após 4h de exposição ao entomopatógeno, a quantidade e tamanho dos vacúolos aumentaram, ocupando grande parte do volume celular (Fig. 2C). Fragmentos do citoplasma e núcleos com cromatina condensada foram observados no lúmen do intestino médio com aumento progressivo durante as 4-32 h (Figs. 2C-F).

3.3 Ultraestrutura

A ultraestrutura das células do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis*, não alimentadas com *Bt*, foi bem organizada com citoplasma denso e a membrana plasmática intacta (Fig. 3A).

Alterações foram observadas nas células do intestino médio de lagartas alimentadas com dieta contaminada por 32 h. A vacuolização do citoplasma foi mais pronunciada com vacúolos grandes contendo restos de organelas citoplasmáticas (Fig. 3B). Mitocôndrias em formato de *donut* e numerosos lisossomos foram encontrados no intestino de insetos expostos a toxina (Fig. 3C-D). As microvilosidades estavam degeneradas (Fig. 3E). Protrusões celulares e fragmentação de conteúdo celular foram observadas no lúmen do intestino médio (Fig. 3E-F).

3.4 Imunofluorescência

A caspase-3 clivada foi distribuída aleatoriamente no intestino médio de *A. gemmatalis* expostas ou não ao *Bt* (Fig. 4), mas um aumento dessa protease foi observado no intestino médio das lagartas às 8, 16 e 32h após a exposição ao *Bt* (Figs. 4B-D).

Oito horas após exposição ao *Bt* houve aumento do número de células em proliferação no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis*. No entanto, esta resposta regenerativa não foi observada nas horas subsequentes à ingestão do bioinseticida (Fig. 5).

4. Discussão

A susceptibilidade de *A. gemmatalis* ao *Bt* confirma o fato dessa bactéria ser utilizada para controlar pragas, mas isto varia entre as espécies de insetos (Wermelinger et al., 2000; Elleuch et al., 2016). *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Da Silva et al.,

2016), *Helicoverpa armigera* Hübner (Regode et al., 2016) e *Spodoptera litura* Fabricius (Vineela et al., 2017) (Lepidoptera: Noctuidae) são susceptíveis à *Bt* em diferentes concentrações. Após ingestão, os cristais da toxina são solubilizados devido ao pH alcalino do intestino médio das lagartas e suas protoxinas ativadas por proteases intestinais. Essas protoxinas se ligam aos receptores específicos nas microvilosidades das células colunares do intestino médio, formando poros na membrana plasmática, causando lise celular e morte do inseto (Grochulski et al., 1995; Aronson e Shai, 2001; Bravo et al., 2007). A mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis*, por toxinas *Bt*, dependente da concentração do bioinseticida mostrando a toxicidade dessa bactéria via ingestão.

Características típicas de degeneração celular, como epitélio com formato irregular, aumento da vacuolização citoplasmática, condensação de cromatina nuclear e fragmentos celulares com conteúdo citoplasmático e nuclear sendo liberados no lúmen no intestino médio de *A. gemmatalis* mostram efeito das toxinas *Bt*. A degeneração celular no intestino médio, devido à exposição a compostos tóxicos, foi descrita para *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Sousa et al., 2010) e *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Ribeiro et al., 2013). A eliminação para o lúmen do intestino médio de fragmentos celulares do citoplasma, inclusive núcleos, observada no intestino médio de *A. gemmatalis* após 2h da exposição ao *Bt* reduz a capacidade digestiva de insetos como observado para *H. armigera* (Barbeta et al., 2008) e sugere resposta ao efeito tóxico do *Bt* como parte do processo de morte celular (Santos et al., 2015a). A maior vacuolização nas células digestivas de *A. gemmatalis*, expostas ao entomopatógeno, sugere morte celular (Hariri et al., 2000). Presença de vacúolos nas células do intestino médio é habitual em insetos (Alves et al., 2010; Fernandes et al., 2015), mas sua maior quantidade no citoplasma tem sido caracterizada como processo

de autofagia (Levine e Klionsky, 2004; Santos et al., 2015b). Os efeitos histológicos observados no intestino de *A. gemmatalis* sugerem uma tentativa de desintoxicar as células infectadas pelo entomopatógeno.

Alterações morfológicas observadas nas células caliciformes do intestino médio de *A. gemmatalis* são semelhantes ao observado em outros lepidópteros (Loeb et al., 2001), como *A. argillacea* com estas células com deformações e numerosos vacúolos de tamanhos e formatos variados no citoplasma (Sousa et al., 2010) sugerindo modo de ação de *B. thuringiensis* semelhante em *A. gemmatalis*.

Bt induziu a desorganização da matriz peritrófica do intestino médio de *A. gemmatalis*. Essa membrana, em algumas regiões do intestino médio de *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas de algodão transgênico com genes *Bt*, foi destruída (Sousa et al., 2010). A absorção de nutrientes é reduzida devido aos danos à matriz peritrófica que tem papel fundamental na digestão (Terra, 1988) e protege as células epiteliais de danos mecânicos provocados pelo bolo alimentar (De Priester, 1971; Terra, 1988; Ryerse et al., 1992), dificultando a entrada de patógenos e particionando o processo de digestão (Terra, 1988; 2001). A matriz peritrófica age como uma barreira contra toxinas *Bt* (Hayakawa et al., 2004; Rodrigo-Simon et al., 2006) atrasando o contato com células digestivas (Wu et al., 2016). No entanto, essas toxinas podem ultrapassar essa membrana (Adang e Spence, 1981), se ligarem aos receptores das microvilosidades das células colunares e infectarem as células epiteliais do intestino médio de *A. gemmatalis*.

Degeneração das microvilosidades de células colunares de *A. gemmatalis* pode ser explicada pelo efeito de toxinas na actina do citoesqueleto, pois, *Bt* pode interagir com proteínas de membrana durante as fases iniciais da ação (Griffitts et al., 2003) induzindo o vazamento do citoplasma no lúmen do intestino médio (Qi et al., 2011).

Protrusões celulares liberadas no lúmen do intestino médio das lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contaminada com *Bt* sugere efeito citotóxico dessa bactéria causando apoptose, um padrão morfológico de morte celular programada (Ihara et al., 1998). A eliminação de células pela morte celular (Santos et al., 2015a) seria uma resposta ao dano às células epiteliais do intestino médio após ingestão de *Bt*. Mitocôndrias em forma de *donut* foram observadas no intestino de insetos expostos ao *Bt*. Essa mudança de forma é causada pela inibição da cadeia respiratória e é um marcador precoce de estresse celular (Ahmad et al., 2013) provocado pelo entomopatógeno.

O maior número de células positivas para caspase-3 clivada no intestino médio de lagartas que ingeriram o bioinseticida indica a ocorrência de apoptose (Vishwanathreddy et al., 2014; Santos et al., 2015b). Células com reação positiva a caspase-3 clivada, no intestino médio de lagartas que se alimentaram de dieta não contaminada, indicam processo normal de renovação celular (Franzetti et al., 2012; Santos et al., 2015b).

O aumento no número de células em proliferação no intestino médio de *A. gemmatalis*, após oito horas de ingestão da bactéria foi indicado pelo anticorpo anti-PH3, um marcador específico de células em mitose (Su et al., 1998; Idikio, 2006). Danos ao sistema digestivo de insetos por entomopatógenos e suas toxinas ativam respostas defensivas como relatado para *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) (Forcada et al., 1999; Martinez-Ramirez et al., 1999). A regeneração do epitélio com substituição das células mortas por outras recém-diferenciadas depende da proliferação e diferenciação das células regenerativas e permite que insetos resistentes se recuperem e sobrevivam à exposição ao agente biótico (Castagnola e Jurat-Fuentes, 2016). A substituição celular é importante para a manutenção homeostática da

integridade do intestino médio (Okuda et al., 2007; Rost-Roszkowska et al., 2010a,b). *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) responde a infecção por *Bt* com um mecanismo regenerativo (Chiang et al., 1986; Spies e Spence, 1985) pela divisão assimétrica de células regenerativas (Loeb et al., 2001). Lagartas de *A. gemmatalis* não tem resposta regenerativa contínua como observado pela ausência de processo de proliferação celular no epitélio do intestino médio após 16 e 32 horas de ingestão do *Bt*, possivelmente, devido à lise celular e a ruptura do epitélio que propicia meio favorável para germinação dos esporos levando a septicemia severa e morte de insetos (De Maagd et al., 2001, Bravo et al., 2007).

Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*, var. *kurstaki*, linhagem HD-1 são nocivas a *A. gemmatalis* em concentrações letais médias e provocam mudanças histológicas e ultraestruturais severas com degeneração do epitélio causando a morte das células epiteliais do intestino médio desse inseto. *Anticarsia gemmatalis* apresenta resposta regenerativa após a exposição ao entomopatógeno, no entanto essa resposta não é contínua.

5. Referências

- Abdel-Razek, A.S., Morris, O.N., White, N.D.G., Salama, H.S., El-Moursy, A. & Aboul-El, R. Comparative histopathology of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) as affected by *Bacillus thuringiensis* varieties Indiana or Morrison. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **35**, 307–320 (2002).
- Adang, M.J. & Spence, K.D. Surface morphology of peritrophic membrane formation in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Cell Tissue Res.* **218**, 141–147 (1981).
- Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., Mukherjee, S., Sethi, T., Tiwari, B. K., Kumar, M., Micheal, A., Mabalirajan, U., Ghosh, B., Sinha Roy, S. & Agrawal, A. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death Dis.* **4**, e461 (2013).
- Almeida, G.D., Zanuncio, J.C., Senthil-Nathan, S., Pratissoli, D., Polanczyk, R.A., Azevedo, D.O. & Serrão, J.E. Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. *Isj-Invert. Surviv. J.* **11**, 79–86 (2014).
- Alves, S.N., Serrão, J.E. & Melo, A.L. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron* **41**, 592–597 (2010).
- Andries, J.C. & Beauvillain, J.C. Ultrastructural study of cholecystokinin like immunoreactivity in endocrine cells of the insect midgut of *Nepa cinerea* (Insecta, Heteroptera): ultrastructure and genesis. *Biol. Cell.* **46**, 195–202 (1988).
- Aronson, Ai. & Shai, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *Fems Microbiol. Lett.* **195**, 1-8 (2001).

- Barbeta, B.L., Marshal, A.T., Gillon, A., Craik, D.J. & Marlyn, A.A. Plant cyclotides disrupt epithelial cell in the midgut of Lepidoptera larvae. *P. Natl. Acad. Sci. Usa.* **105**, 1221–1225 (2008).
- Bishop, A.H., Johnson, C. & Perani, M. The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammalian investigated by oral and subcutaneous dosage. *World J. Microb. Biot.* **15**, 375–380 (1999).
- Bravo, A., Gill, S.S. & Soberón, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**, 423–435 (2007).
- Castagnola, A. & Jurat-Fuentes, J.L. Intestinal regeneration as an insect resistance mechanism to entomopathogenic bacteria. *Curr. Opin. Insect Sci.* **15**, 104–110 (2016).
- Chiang, A.S., Yen, D.F. & Peng, W.K. Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **47**, 333–339 (1986).
- Da Silva, K.F., Spencer, T.A., Crespo, A.L.B. & Siegfried, B.D. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to the Cry1F *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein. *Fla. Entomol.* **99**, 629–633 (2016).
- Damalas, C.A. & Eleftherohorinos, I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Env. Res. Pub. He.* **8**, 1402–1419 (2011).
- De Castro, A.A., Corrêa, A.S., Legaspi, J.C., Guedes, R.N.C., Serrão, J.E. & Zanuncio, J.C. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* **93**, 1043–1050 (2013).

- De Castro, A.A., Poderoso, J.C.M., Ribeiro, R.C., Legaspi, J.C., Serrão, J.E. & Zanuncio, J.C. Demographic parameters of the insecticide-exposed predator *Podisus nigrispinus*: Implications for IPM. *BioControl* **60**, 231–239 (2015).
- De Maagd, R.A., Bravo, A. & Crickmore, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* **17**, 193–199 (2001).
- De Priester, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora erythrocephala*. *Journal of Ultrastructure Research* **36**, 783–805 (1971).
- Elleuch, J., Jaoua, S., Ginibre, C., Chandre, F., Tounsi, S. & Zghal, R.Z. Toxin stability improvement and toxicity increase against dipteran and lepidopteran larvae of *Bacillus thuringiensis* crystal protein Cry2Aa. *Pest Manag. Sci.* **72**, 2240–2246 (2016).
- Federici, B.A. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *J. Invertebr. Pathol.* **89**, 30–38 (2003).
- Fernandes, K.M., Gonzaga, W.G., Pascini, T.V., Miranda, F.R., Tomé, H.V.V., Serrão, J.E. & Martins, G.F. Imidacloprid impairs the post-embryonic development of the midgut in the yellow fever mosquito *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). *Med. Vet. Entomol.* **29**, 245–54 (2015).
- Finney, D.J. Probit Analysis. Cambridge University Press (1971).
- Forcada, C., Alcacer, E., Garcera, M.D., Tato, A. & Martinez, R. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch. Insect Biochem.* **42**, 51–63 (1999).
- Franzetti, E., Huang, Z.J., Shi, Y.X., Xie, K., Deng, X.J., Li, J.P., Li, Q.R., Yang, W.Y., Zeng, W.N., Casartelli, M., Deng, H.M., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q.,

- Feng, Q., Cao, Y. & Tettamanti, G. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis* **17**, 305–324 (2012).
- Greene, G.L., Leppa, N.C. & Dickerson, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* **69**, 487–488 (1976).
- Griffitts, J.S., Huffman, D.L., Whitacre, J.L., Barrows, B.D., Marroquin, L.D., Müller, R., Brown, J.R., Hennes, T., Esko, J.D. & Aroian, R.V. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin host interactions. *J. Biol. Chem.* **278**, 45594–45602 (2003).
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. & Cygler, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **54**, 447–464 (1995).
- Guedes, R.N.C., Magalhaes, L.C. & Cosme, L.V. Stimulatory sublethal response of a generalist predator to permethrin: hormesis, hormoligosis, or homeostatic regulation? *J. Econ. Entomol.* **102**, 170–176 (2009).
- Hariri, M., Millane, G., Guimond, M.P., Guay, G., Dennis, J.W. & Nabi, I.R. Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 255–268 (2000).
- Hayakawa, T., Shitomi, Y., Miyamoto, K. & Hori, H. GalNAc pretreatment inhibits trapping of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac on the peritrophic membrane of *Bombyx mori*. *FEBS Lett.* **576**, 331–335 (2004).
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Tabashnik, B. & Ferré, J. Shared binding sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 5729–5734 (2001).
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Vanrie, J., Jansens, S. & Van Mellaert, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence

- of high affinity binding site in the brush border membrane of target insect midgut. *P. Natl. A. Sci.* **85**, 7844–7848 (1998).
- Hong-Wei, Y., Cai-Ying, J., Gong-Yin, Y., Cui, H. & Yu-Fa, P. Toxicological assessment of pollen from different *Bt* rice lines on *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombyxidae). *Environ. Entomol.* **37**, 825–837 (2008).
- Idikio, H. A. Spindle checkpoint protein hMad2 and histone H3 phosphoserine 10 mitosis marker in pediatric solid tumors. *Anticancer Res.* **26**, 4687–4694 (2006).
- Ihara, T., Tsukiko, Y.M.S. & Ueno, H.O.Y. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch.* **433**, 443–447 (1998).
- Lehane, M.J. & Billingsley, P.F. Biology of the insect midgut. Chapman & Hall, London (1996).
- Levine, B. & Klionsky, D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **6**, 463–477 (2004).
- Loeb, M.J., Martin, P.A.W., Hakim, R.S., Goto, S. & Takeda, M. Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Physiol.* **47**, 599–606 (2001).
- Martinez-Ramirez, A.C., Gould, F. & Ferre, J. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Sci. Techn.* **9**, 239–246 (1999).
- Martins, G.F., Neves, C.A., Campos, L.A.O. & Serrão, J.E. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* **37**, 161–168 (2006).
- Monnerat, R.G., Batista, A.C., Medeiros, P.T., Martins, E.S., Melatti, V.M., Praça, L.B., Duma, V.F., Morinaga, C., Demo, C., Gomes, A.C.M., Falcão, R., Siqueira, C.B., Silva-Werneck, J.O. & Berry, C. Screening of Brazilian *Bacillus*

- thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biol. Control* **41**, 291–295 (2007).
- Oestergaard, J., Ehlers, R.U., Martínez-Ramírez, A.C. & Real M.D. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. *Appl. Environ. Microb.* **73**, 3623–3629 (2007).
- Okuda, K., Almeida, F., Mortara, R.A., Krieger, H., Marinotti, O. & Bijovsky, A.T. Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.* **53**, 1307–1315 (2007).
- Panizzi, A. R. History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotrop. Entomol.* **42**, 119–127 (2013).
- Qi, Z., Shi, B., Hua, Z., Zhang, Y. & Wua, W. Ultrastructural effects of Celangulin V on midgut cells of the oriental armyworm, *Mythimna separata* walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotox. Environ. Safe.* **74**, 439–444 (2011).
- Regode, V., Kuruba, S., Mohammad, A.S. & Sharma, H.C. Isolation and characterization of gut bacterial proteases involved in inducing pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* toxin in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Front. Microbiol.* **7**, 1567–1567 (2016).
- Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208–212 (1963).
- Ribeiro, L.M.S., Wanderley-Teixeira, V., Siqueira, H.A.A., Oliveira, A.C.B., Lemos, A.J.J.M. & Teixeira, A.A.C. Midgut histopathology of resistant and susceptible *Plutella xylostella* exposed to commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *B. Insectol.* **66**, 161–171 (2013).

- Rodrigo-Simon, A., Maagd, R.A., Avilla, C., Bakker, P.L., Molthoff, J., Gonzalez-Zamora, J.E. & Ferre, J. Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. *Appl. Environ. Microb.* **72**, 1595–1603 (2006).
- Romeis, J., Meissle, M. & Bigler, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat. Biotechnol.* **24**, 63–71 (2006).
- Rost-Roszkowska, M.M., Machida, R. & Fukui, M. The role of cell death in the midgut epithelium in *Filientomon takanawanum* (Protura). *Tissue Cell* **42**, 24–31 (2010a).
- Rost-Roszkowska, M.M., Poprawa, I. & Chachulska-Zymeka, A. Apoptosis and autophagy in the midgut epithelium of *Acheta domesticus* (Insecta, Orthoptera, Gryllidae). *Zool. Sci.* **27**, 740–745 (2010b).
- Ryerse, J.S., Purcell, J.P., Sammons, R.D. & Lavrik, P.B. Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. *Tissue Cell* **24**, 751–771 (1992).
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capel, T. & Chrstou, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* **9**, 283–300 (2011).
- Santos, D.E., Azevedo, D.O., Campos, L.A.O., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy. *Protoplasma* **252**, 619–627 (2015b).
- Santos, M.C., Junqueira, A.M.R., de Sá, V.G.M., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. Effect of silicon on the morphology of the midgut and mandible of tomato leafminer *Tuta*

- absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae. *Isj-Invert. Surviv. J.* **12**, 158–165 (2015a).
- SAS Institute. The SAS System for Windows, release 9.0. SAS Institute, Cary, N.C (2002).
- Serrão, J.E. & Cruz-Landim, C. Ultrastructure of midgut endocrine cells in workers of stingless bee (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Iheringia* **81**, 151–156 (1996).
- Sousa, M.E.C., Santos, F.A.B., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Siqueira, H.A.A., Alves, L.C. & Torres, J.B. Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. *J. Insect Physiol.* **56**, 1913–1919 (2010).
- Spies, A.G. & Spence, K.D. Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca sexta*. *Tissue Cell* **17**, 379–394 (1985).
- Stefanini, M., Martino, C.D. & Zamboni, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* **216**, 173–174 (1967).
- Su, T.T., Sprenger, F., DiGregorio, P.J., Campbell, S.D. & O’Farrell, P.H. Exit from mitosis in *Drosophila* syncytial embryos requires proteolysis and cyclin degradation, and is associated with localized dephosphorylation. *Gene Dev.* **12**, 1495–1503 (1998).
- Sutherland, P.W., Harris, M.O. & Markwick, N.P. Effects of starvation and the *Bacillus thuringiensis* endotoxin Cry1Ac on the midgut cells, feeding behavior, and growth of light brown apple moth larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **96**, 250–264 (2003).

- Tavares, W.S., Costa, M.A., Cruz, I., Silveira, R.D., Serrão, J.E. & Zanuncio, J.C. Selective effects of natural and synthetic insecticides on mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Environ. Sci. Heal.* **45**, 557–561 (2010).
- Terra, W.R. Physiology and biochemistry of insect digestion, an evolutionary perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **21**, 675–734 (1988).
- Terra, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem.* **47**, 47–61 (2001).
- Terra, W.R., Costa, R.H. & Ferreira, C. Plasma membranes from insect midgut cells. *An. Acad. Bras. Cienc.* **78**, 255–269 (2006).
- Turbeck, B. A study of the concentrically laminated concretions spherites in the regenerative cells of the midgut of Lepidopterous larvae. *Tissue Cell* **6**, 627–640 (1974).
- Van Rie, J., Jansen, S., Höfte, H., Degheled, D. & Van Mellaert, H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Appl. Environ. Microb.* **56**, 1378–1385 (1990).
- Vineela, V., Nataraj, T., Reddy, G. & Devi, P.S.V. Enhanced bioefficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) through particle size reduction and formulation as a suspension concentrate. *Biocontrol Sci. Techn.* **27**, 58–69 (2017).
- Vishwanathreddy, H., Bhat, G.G., Inamdar, S.R., Gudihal, R.K. & Swamy, B.M. *Sclerotium rolfsii* lectin exerts insecticidal activity on *Spodoptera litura* larvae by binding to membrane proteins of midgut epithelial cells and triggering caspase-3-dependent apoptosis. *Toxicon* **78**, 47–57 (2014).

- Vryzas, Z., Alexoudis, C., Vassiliou, G., Galanis, K., & Papadopoulou-Mourkidou, E. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotox. Environ. Safe.* **74**, 174–181 (2011).
- Wermelinger, E.D., Zanuncio, J.C., Rangel, E.F., Cecon, P.R. & Rabinovitch, L. Toxicity of *Bacillus* species to larvae of *Lutzomyia longipalpis* (L. & N.) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **29**, 609–614 (2000).
- Wu, K., Yang, B., Huang, W., Dobens, L., Song, H. & Ling, E. Gut immunity in Lepidopteran insects. *Developmental & Comparative Immunology* **64**, 6465–6474 (2016).
- Zanuncio, J.C., Batalha, V.C., Guedes, R.N.C. & Picanço, M.C. Insecticide selectivity to *Supputius cincticeps* (Stal) (Het., Pentatomidae) and its prey *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lep., Noctuidae). *J. Appl. Entomol.* **122**, 457–460 (1998).

Tabela 1. Concentrações letais do *Bacillus thuringiensis*, variedade *kurstaki*, linhagem HD-1 para lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

¹ CL	² VE	³ IC	⁴ X ²
25	0,37	0,32 – 0,40	
50	0,46	0,43 – 0,49	90,27
75	0,56	0,53 – 0,59	
90	0,65	0,61 – 0,70	
99	0,86	0,79 – 0,94	

Concentrações de ¹CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e CL₉₀ causam 25, 50, 75, 90 e 99% de mortalidade; ²VE, valor estimado (mg mL⁻¹), ³IC, intervalo de confiança (mg mL⁻¹), ⁴X², valor do qui-quadrado para concentrações letais e limites fiduciais baseados em uma escala logarítmica em nível de significância de $P < 0,0001$.

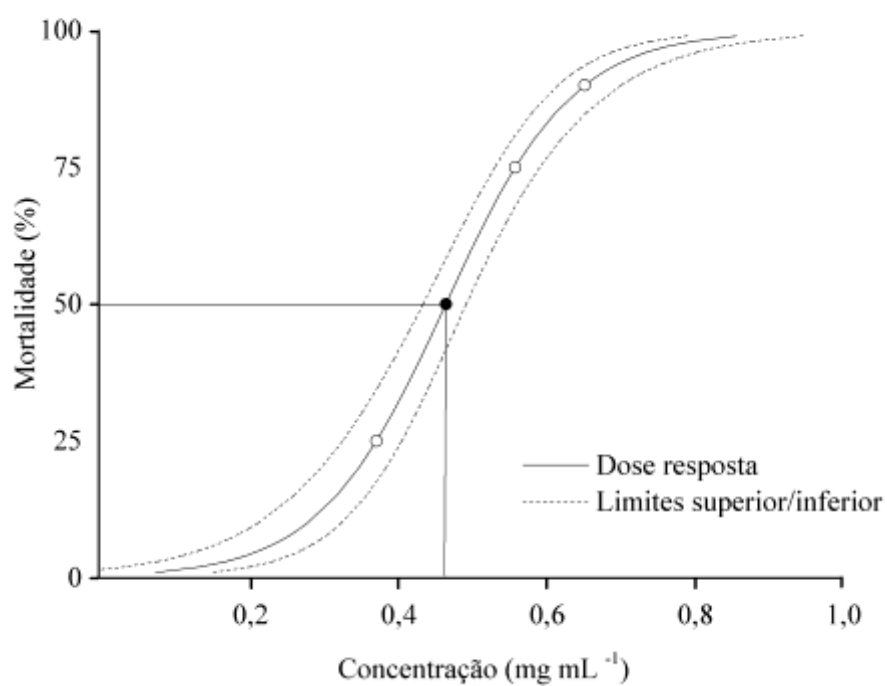


Figura 1. Mortalidade e limites superior e inferior para lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) expostas a diferentes concentrações de *Bacillus thuringiensis*, variedade *kurstaki*, linhagem HD-1.

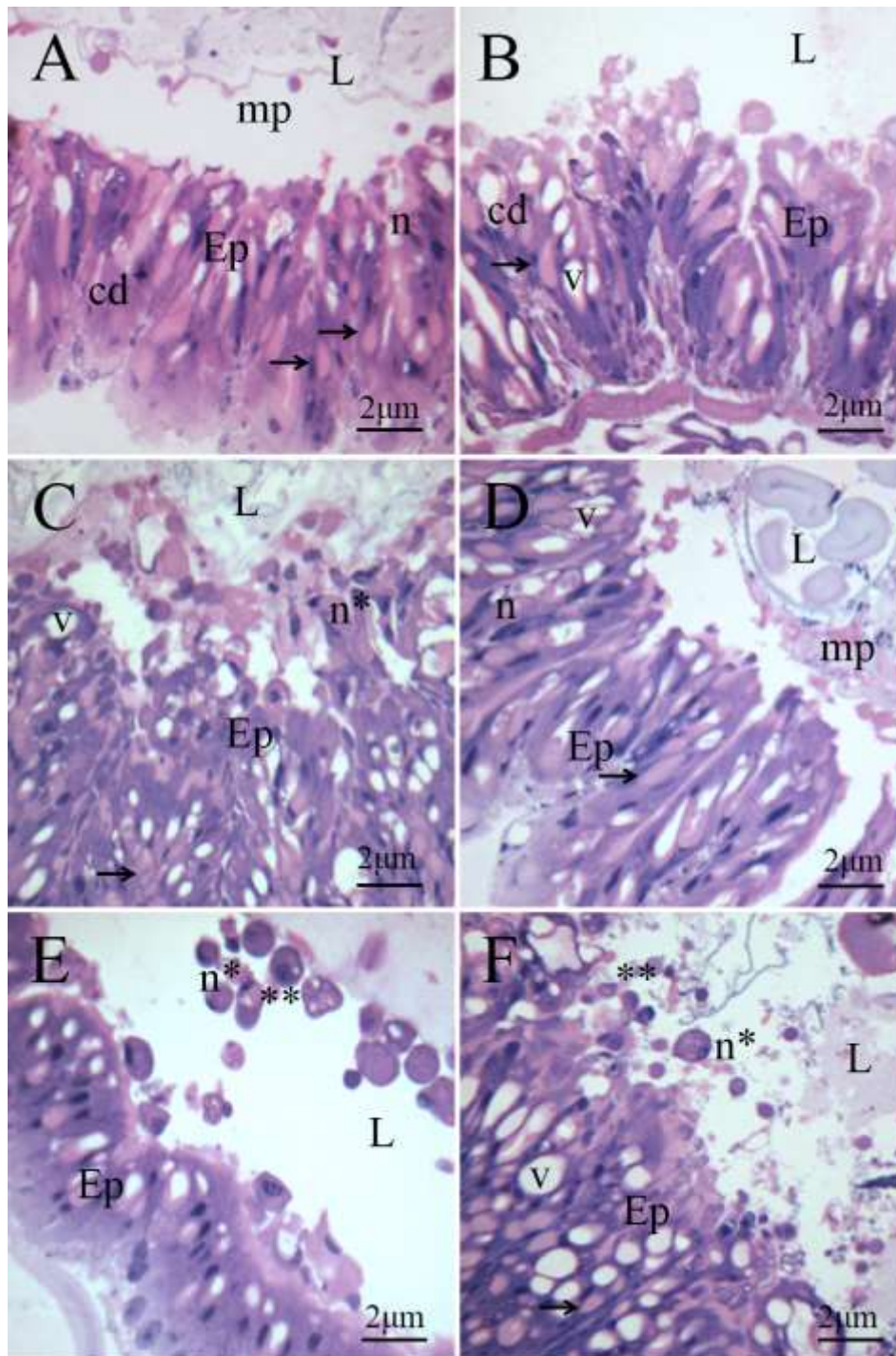


Figura 2. Seções histológicas do intestino médio de lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) não expostas a *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), variedade *kurstaki*, linhagem HD-1 (A) mostrando epitélio (Ep) com células digestivas (cd), núcleos com cromatina descondensada (n), células caliciformes (setas) e matriz peritrófica preservada (mp) no lúmen (L) e de lagartas expostas a *Bt* após 2 h (B), 4 h (C), 8 h (D), 16 h (E) e 32 h (F) da ingestão mostrando células digestivas (cd) com vacúolos (v), núcleos com cromatina condensada (n*) e fragmentos de células (**) liberados no lúmen (L).

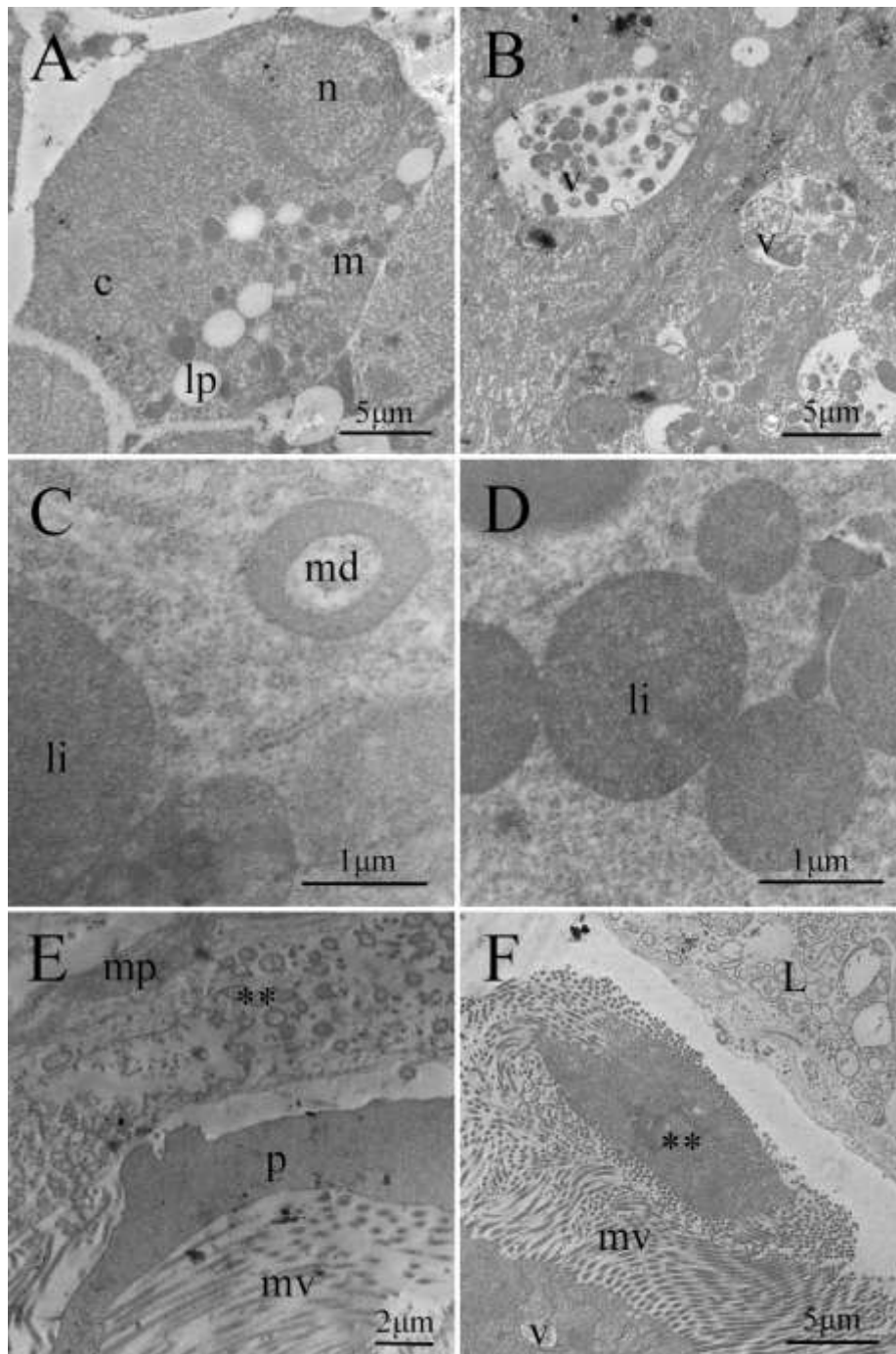


Figura 3. Micrografia eletrônica de transmissão do intestino médio de lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) não expostas a *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), variedade *kurstaki*, linhagem HD-1 (A) mostrando núcleo (n), células digestivas com citoplasma (c) rico em mitocôndrias (m) e gotas lipídicas (lp) e de lagartas expostas ao *Bt* por 32 h (B-F) mostrando células digestivas com vacúolos com restos celulares (v), lisossomos (li), mitocôndria em formato de “donut” (md), matriz peritrófica (mp), microvilosidades (mv), protrusões de células apicais (p) algumas liberadas (**), no lúmen (L).

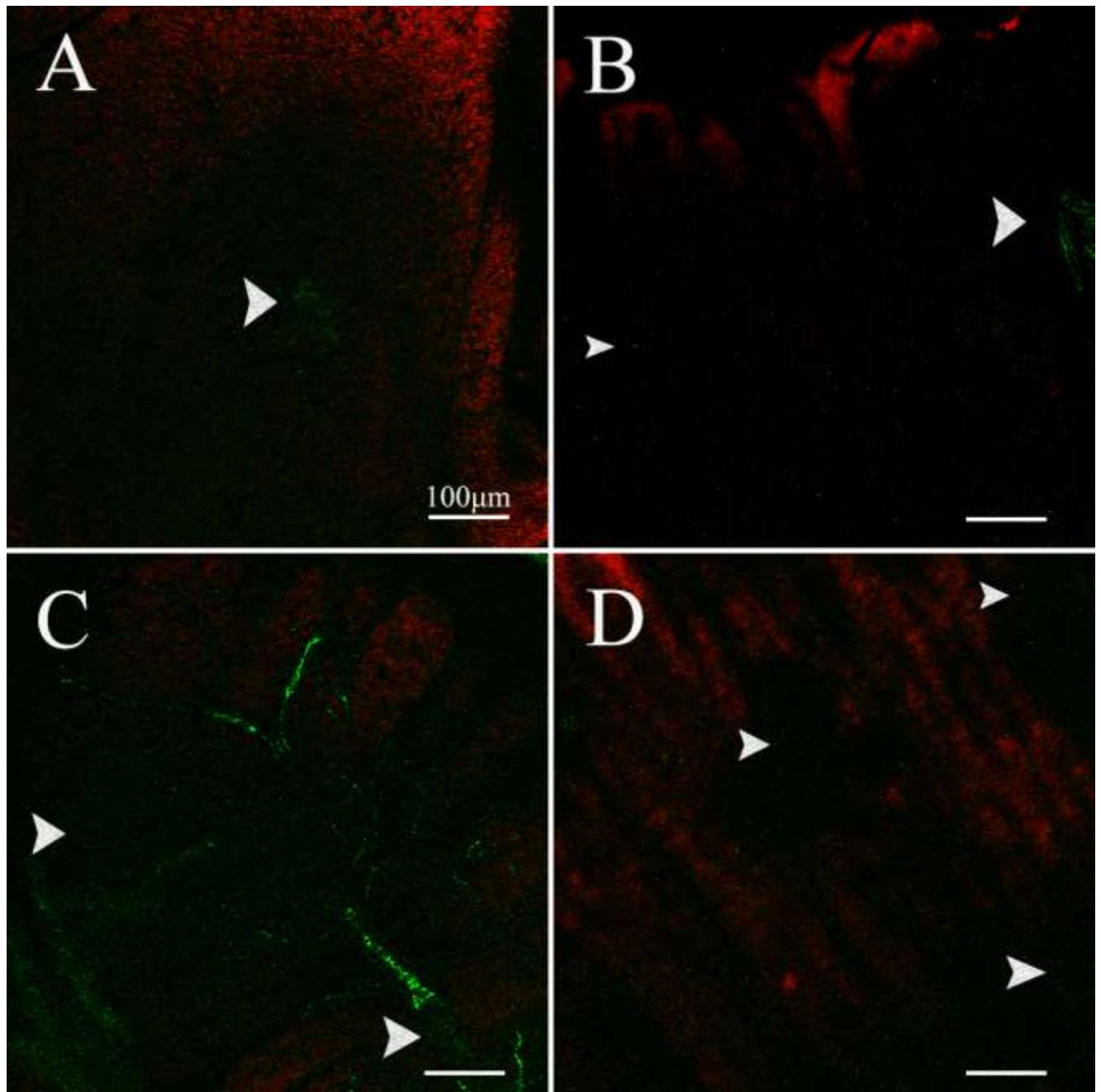


Figura 4. Imunofluorescência de intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) usando o anticorpo caspase-3 (verde - setas). Seções do intestino de lagartas não expostas às toxinas da bactéria (A) e alimentadas com dieta contaminada com *Bacillus thuringiensis*, variedade *kurstaki*, linhagem HD-1 por 8 h (B), 16 h (C) e 32 h (D).

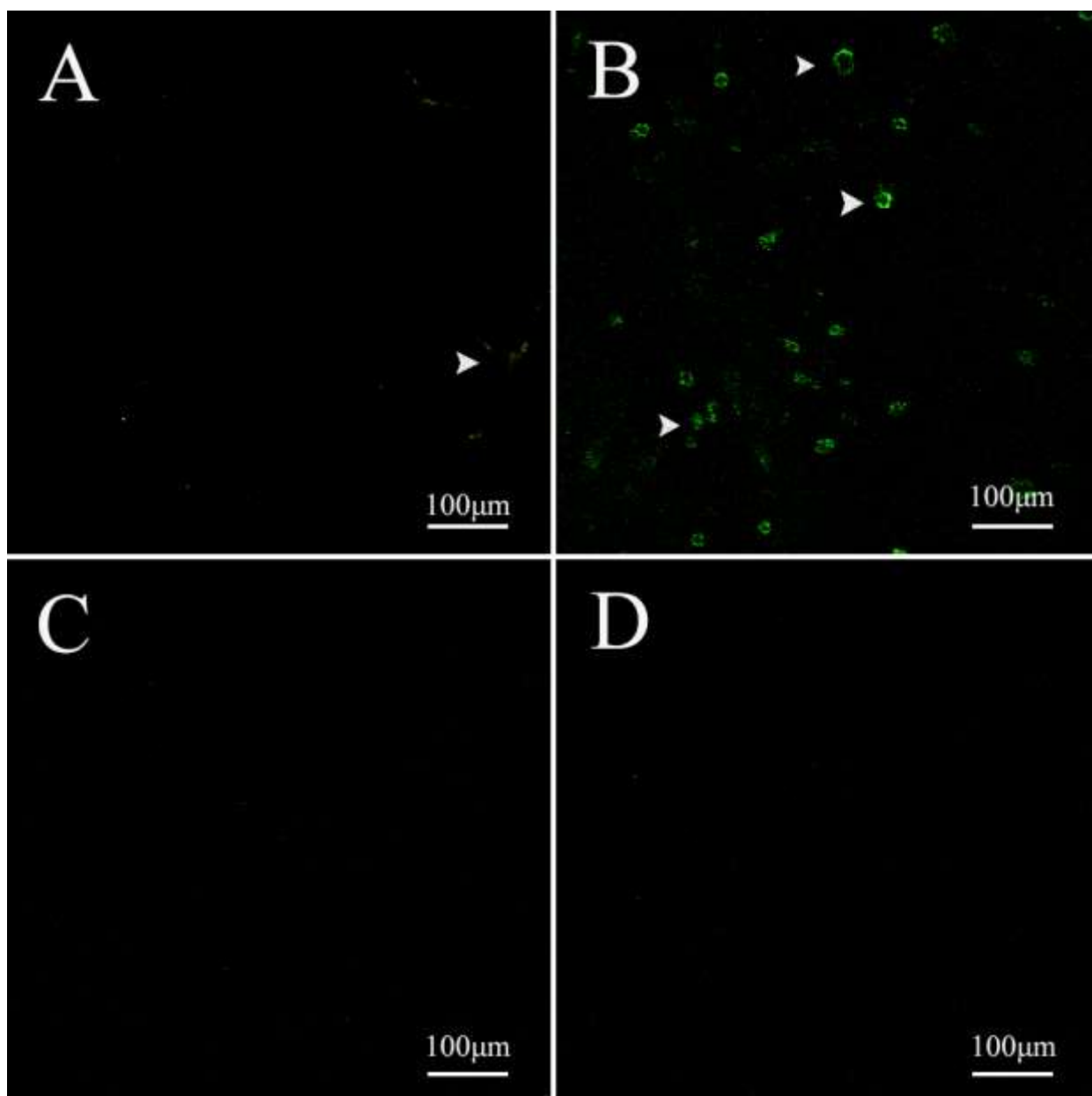


Figura 5. Imunofluorescência de intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) usando o anticorpo fosfo-histona H3 (PH3) (verde - setas). Seções do intestino de lagartas não expostas às toxinas da bactéria (A) e alimentadas dieta contaminada com *Bacillus thuringiensis*, variedade *kurstaki*, linhagem HD-1 por 8 h (B), 16 h (C) e 32 h (D).

CAPÍTULO 2

Toxicidade, citopatologia no intestino médio, resposta comportamental e respiratória de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) após exposição ao clorantraniliprole

Resumo: Clorantraniliprole, do grupo químico das diamidas antranílicas, é um inseticida sistêmico afetando receptores de rianodina. Esse inseticida é recomendado para programas de manejo integrado de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em soja por ter baixa toxicidade a organismos não alvos. O objetivo foi identificar alterações citopatológicas no intestino médio, comportamentais e respiratórias causadas pelo inseticida clorantraniliprole em *A. gemmatalis*. A toxicidade desse inseticida foi determinada pelos valores das concentrações letais (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e CL₉₉) em laboratório. Fragmentos do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* que ingeriram o inseticida foram extraídos e avaliados por microscopia de luz e eletrônica de transmissão. O comportamento das lagartas, após ingestão do clorantraniliprole, foi analisado por sistema de rastreamento em vídeo e a taxa respiratória com respirômetro. As concentrações letais médias de clorantraniliprole mostraram toxicidade [CL₅₀ = 0,28 (0,26-0,30) mg mL⁻¹] para as lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis* após 96 horas. O clorantraniliprole causa citotoxicidade severa promovendo desorganização celular, degeneração das microvilosidades, fragmentação celular, vacuolização celular e desorganização da matriz peritrófica. Os núcleos celulares apresentaram cromatina condensada e secreção apócrina foi liberada no lúmen. O período de repouso foi maior e a distância e velocidade de caminhar e as taxas respiratórias menores para lagartas expostas a este inseticida. Clorantraniliprole é tóxico a *A. gemmatalis* em concentrações letais médias provocando mudanças

histológicas e ultraestruturais severas com degeneração do epitélio do intestino médio, redução das taxas respiratórias e induzindo resposta comportamental arrestante desse inseto.

Palavras-chave: arrestante, citotóxico, comportamento, diamidas, respirometria, ultraestrutura.

1. Introdução

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é praga importante da soja (*Glycine max* L. Merrill, Fabaceae) (Sosa-Gomes, 2004; Panizzi, 2013). Esse inseto é controlada com inseticidas sintéticos que atuam, principalmente, no sistema nervoso ou inibem a síntese de quitina (Agrofit, 2018) ou com bioinseticidas baseados em *Bacillus thuringiensis* e *Baculovirus anticarsia* (Haase et al., 2015). Resistência da lagarta-da-soja a inseticidas têm sido relatada (Abot et al., 1996; Sosa-Gómez e Miranda, 2012).

Inseticidas do grupo químico das diamidas controlam pragas, eficientemente, atingindo um novo alvo de ação (Cordova et al., 2006; Sparks e Nauen, 2015). Diamidas atuam em receptores de rianodina com liberação excessiva de Ca^{2+} , induzindo a paralisia dos músculos, inibição da alimentação e morte do inseto (Lahm et al. 2005; Qi et al., 2014; Sparks e Nauen, 2015). O modo de ação do clorantraniliprole (3-bromo-4'-chloro-1-(3-chloro-2-pyridil-2'-methyl-6'methylcarbamoil) pyrazole-5carboxanilide) (Dong et al., 2011) difere daquele de piretróides e neonicotinoides (Malhat, 2012a), sem riscos à saúde humana, pois a estrutura dos receptores de rianodina difere entre insetos e mamíferos (Malhat, 2012b; Wang et al., 2012). Esse inseticida é utilizado em diferentes culturas controlando, eficientemente, insetos (Schwarz et al., 2011; Zhang et al., 2012; Cui et al., 2014). O clorantraniliprole tem baixa toxicidade para organismos não alvos, como inimigos naturais e invertebrados de solo (Fernandes et al., 2016; Lavtizar et al., 2016; Whalen et al., 2016), é recomendado no manejo integrado de *A. gemmatalis* na soja (De Castro et al., 2013). Esse inseticida é, também, recomendado para o controle de outras pragas da soja, como *Chrysodeixis includens* Walker, *Helicoverpa armigera* Hübner, *Heliothis virescens* Fabricius, *Pseudoplusia includens* Walker, *Spodoptera eridania* Cramer, *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), *Phyllophaga*

cuyabana Moser (Coleoptera: Scarabaeidae), *Elasmopalpus lignosellus* Zeller e *Hedylepta indicata* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) (Agrofit, 2018).

O clorantraniliprole atua no sistema muscular, mas pode também afetar outros órgãos (Lopes et al., 2017). O intestino dos insetos, um dos primeiros órgãos de contato com inseticidas ingeridos (Catae et al., 2014), é dividido em três regiões principais: intestino anterior e posterior (derivados do ectoderma) e o médio (de origem endodérmica) (Chapman, 2013). As principais funções do intestino médio são digestão e absorção de alimentos, regeneração celular (Lehane e Billingsley, 2012) e defesa imunológica local como barreira física impedindo a disseminação de patógenos ingeridos (Silva et al., 2016) ou como resposta fisiológica para desintoxicação de compostos xenobióticos (Dow, 1987).

O modo de ação do clorantraniliprole no desenvolvimento e reprodução de insetos e aspectos moleculares são conhecidos (Cao et al., 2017; Liu et al., 2018; Wu et al., 2018), mas alterações citopatológicas no intestino médio, comportamentais e respiratórias mediadas por esse inseticida são pouco conhecidas. O objetivo foi avaliar o efeito tóxico, alterações histológicas e ultraestruturais nas células epiteliais do intestino médio, comportamentais e na taxa respiratória de lagartas de *A. gemmatalis* expostas ao clorantraniliprole.

2. Materiais e Métodos

2.1 Insetos

Lagartas de *A. gemmatalis* foram obtidas da criação massal do Laboratório de Controle Biológico de Insetos (LCBI) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, Minas Gerais, Brasil e mantidas a 25 ± 2 °C, $75 \pm 5\%$ de umidade relativa e fotofase de 12

horas. Essas lagartas foram alimentadas com dieta artificial constituída por 10 g de ágar, 15,6 g de levedura de cerveja, 25 g de gérmen de trigo, 25 g de proteína de soja, 31,2 g de feijão, 12,5 g de caseína, e 2,5 mL de solução de vitaminas (1,2% de ácido ascórbico, 0,03% pantotenato de cálcio, 0,015% de niacina, 0,008%, riboflavina, 0,004% de tiamina e 0,004% de HCl) (Greene et al., 1976). Grupos de vinte lagartas de *A. gemmatalis* foram colocados por pote de poliestireno (15 × 9 cm) até a pupação. A reposição de alimento e a assepsia dos potes foram realizadas a cada 48 horas. Lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis*, sem amputações ou malformações aparentes, foram utilizadas nos bioensaios.

2.2 Teste de toxicidade

Clorraniliprole foi utilizado no teste de toxicidade, diluído em série, a partir uma solução estoque do inseticida comercial ajustada a 100 g L⁻¹ para obter as concentrações necessárias. Seis concentrações de clorraniliprole, além do controle (água ultrapura), foram ajustadas em 1 mL de solução estoque (tratamentos e água): 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09 mg mL⁻¹ (p/v).

A eficácia do inseticida foi determinada com os valores das concentrações letais (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e CL₉₉) em laboratório. Diferentes concentrações do inseticida foram aplicadas em solução de 0,5 µL em 1 g de dieta artificial. Cinquenta lagartas de *A. gemmatalis*, de quarto instar, foram utilizadas por concentração/inseticida, individualizadas em placas de Petri (90 × 1,5 mm). O número de lagartas mortas foi contabilizado por 96 horas após exposição ao clorraniliprole.

2.3 Teste de sobrevivência

Cinquenta lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis* foram individualizadas em placas de Petri e expostas às concentrações letais de clorraniliprole (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅

e CL₉₀) determinadas no bioensaio de toxicidade, além de um controle com água ultrapura. Os procedimentos da exposição seguiram os descritos para o bioensaio de toxicidade. O número de insetos mortos foi registrado por 96 horas.

2.4 Histologia

Vinte lagartas, de quarto instar de *A. gemmatalis*, foram expostas ao clorantraniliprole por ingestão de dieta artificial contaminada com 0,5 µL da concentração média letal (CL₅₀), além do controle, por duas, quatro, oito, 16 e 32 h e crioanestesiadas a -4°C. O intestino médio, dessas lagartas, foi dissecado em solução salina para insetos (0,1 M NaCl + 0,1 M KH₂PO₄ + 0,1 M Na₂HPO₄) e transferido para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12 h à 5°C. As amostras foram desidratadas em série crescentes de etanol (70, 80, 90 e 95%), embebidas em historesina Leica (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany) e seccionadas a 3 µm de espessura com micrótomo Leica RM2255. As seções foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

2.4 Ultraestrutura

Vinte lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis* foram expostas ao clorantraniliprole por ingestão de dieta artificial contaminada com 0,5 µL da concentração média letal (CL₅₀) por 32 h e crioanestesiadas a -4°C. O intestino médio dessas lagartas foi dissecado e transferido para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 contendo 0,2 M de sacarose por 4 h em temperatura ambiente. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 h, lavadas em tampão, desidratadas em série crescente de etanol (70, 80,

90 e 99%) e embebidas em resina LR White (London Resin Company Ltd.). Seções ultrafinas (80-90 nm de espessura) foram obtidas com navalha de diamante em ultramicrotomo Power Tome-X (Boeckeler Instruments, Tucson, AZ, USA), contrastadas com acetato de uranila aquosa 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.5 Ensaio de comportamento

Lagartas de *A. gemmatalis* foram individualizadas em arena constituídas por placas de Petri abertas (90 mm × 15 mm) revestidas com papel de filtro (Whatman N° 1). As paredes internas das placas foram cobertas com politetrafluoroetileno (PTFE) Teflon® (Dupont, Wilmington, DE, EUA) para evitar a fuga de insetos. Os bioensaios comportamentais foram realizados em arenas com metade de sua área tratada com clorotraniliprole dissolvido em água destilada, tendo o controle, apenas, água destilada. O papel filtro foi pulverizado com o inseticida em solução de 250 µL com os valores estimados de CL₅₀ e CL₉₀ e colocado em placas de Petri. Uma lagarta de quarto instar de *A. gemmatalis* foi liberada no centro de cada arena. Vinte lagartas (e arenas) foram utilizadas por concentração letal e no controle em delineamento inteiramente casualizado. O movimento de cada lagarta, dentro da arena, foi gravado durante 10 minutos com uma câmera de vídeo Canon® NTSC (XL1 3CCD, Canon EUA, Lake Success, NY), equipada com uma lente de vídeo 16x (zoom XL 5.5-88 mm) e as imagens, digitalmente, transferida para computador para análise por sistema de rastreamento de vídeo (ViewPoint LifeSciences, Montreal, Quebec, Canadá). As medidas tomadas com o sistema de vídeo incluíram a distância percorrida e o tempo de repouso em cada metade da arena.

2.6 Taxa de respiração

Os bioensaios de respirometria foram conduzidos três horas após exposição de lagartas de quarto instar ao clorantraniliprole por ingestão de dieta artificial contaminada na concentração letal estimada (CL_{50} e CL_{90}), além do controle. A produção de dióxido de carbono (CO_2) (μL de CO_2 h^{-1} /inseto) foi medida por respirômetro do tipo Analisador de CO_2 TR3C (Sable System International, Las Vegas, EUA) com metodologia adaptada de estudos anteriores. Tubos de respirometria (25 mL) foram usados, cada um com uma lagarta de *A. gemmatalis* e ligado a um sistema fechado. O CO_2 produzido em cada câmara foi quantificado com gás oxigênio comprimido (99,99% puro) passando através da câmara a um fluxo de 100 mL min^{-1} por dois minutos. Este fluxo de ar força todas as moléculas de CO_2 produzidas a passarem por um leitor de infravermelho acoplado ao sistema que mede, continuamente, o CO_2 produzido pelos insetos em cada câmara. Quinze repetições (câmaras) foram utilizadas por tratamento.

2.7 Análises estatísticas

As concentrações letais (CL_{25} , CL_{50} , CL_{75} , CL_{90} , CL_{99}) e os limites de confiança foram determinados por regressão baseada em concentração probit-mortalidade (Finney, 1971) com o procedimento PROC PROBIT. Os dados do bioensaio de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência utilizando o estimador Kaplan-Meier (método Log-rank) usando o programa Origin Pro v. 9.1 (OriginLab Corporation, 2013). Dados das lagartas que sobreviveram até o final do experimento foram tratados como censurados. Os dados do ensaio de comportamento foram analisados por análise de variância unidirecional e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Dados da taxa de respiração foram submetidos à análise de

variância (tempo x tratamento) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A toxicidade, o bioensaio de comportamento e respirometria foram analisados com o programa SAS User v. 9.0 para Windows (SAS Institute 2002).

3. Resultados

3.1 Teste de toxicidade e sobrevivência

Cinco níveis de concentrações letais de clorantraniliprole, estimados por Probit, causaram mortalidade de lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis* (Tabela 1). As concentrações letais de clorantraniliprole ($X^2 = 90,2$; GL = 5, $P < 0,001$) foram tóxicas para lagartas de *A. gemmatalis* [$CL_{50} = 0,28$ (0,26 – 0,30) mg mL⁻¹] (Fig. 1) e a mortalidade no controle foi menor que 1%. A sobrevivência de lagartas de *A. gemmatalis* variou entre as concentrações do inseticida (teste de Log-rank, $X^2 = 138,65$, GL = 4, $P < 0,001$), sendo de 96,7% para aquelas não expostas ao clorantraniliprole e de 53,3, 30, 16,6 e 10% nas concentrações CL_{25} , CL_{50} , CL_{75} e CL_{90} , respectivamente, após 96 h de exposição.

3.2 Histologia

O epitélio do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* não expostas ao inseticida era composto por células colunares altas, células caliciformes com citoplasma com poucos vacúolos e matriz peritrófica evidente. O núcleo foi alongado, ocupando a porção mediano-basal das células, com cromatina predominantemente descondensada (Fig. 2A). Alterações histológicas após a ingestão do inseticida no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* incluíram secreção apócrina do epitélio após duas horas de exposição ao clorantraniliprole (Fig. 2B). O formato do epitélio estava irregular com

início da degeneração celular e liberação de fragmentos celulares no lúmen mais evidente após 8 h da ingestão do inseticida (Fig. 2D). Vacuolização no citoplasma foi alta ocupando grande parte do volume celular e aumentando após as horas de exposição ao clorantraniliprole (Figs. 2B-F). Matriz peritrófica foi desorganizada (Fig. 2E-F). Fragmentos do citoplasma e núcleos com cromatina condensada foram liberados no lúmen do intestino médio com aumento progressivo durante as 4-32 h de exposição (Figs. 2D-F).

3.3 Ultraestrutura

A ultraestrutura das células do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis*, não expostas ao clorantraniliprole, foi bem organizada com citoplasma denso e a membrana plasmática intacta (Figs. 3A-C-E). Células do intestino médio de lagartas expostas ao inseticida mostraram fragmentos do citoplasma no lúmen do órgão e microvilosidades degeneradas (Fig. 3B). Vacuolização do citoplasma mais pronunciada com vacúolos autofágicos grandes contendo restos de organelas citoplasmáticas (Fig. 3D) e a membrana plasmática foi rompida (Fig. 3F).

3.4 Ensaio de comportamento

Trilhas representativas de deslocamento de lagartas de *A. gemmatalis* em arenas semi-tratadas mostraram menor velocidade de caminhamento naquelas expostas ao inseticida (Fig. 4). A distância percorrida pelas lagartas foi maior no controle que em arenas com concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) de clorantraniliprole ($F_{2,11} = 16,76$; $P < 0,0001$) (Fig. 5A). Lagartas permaneceram por maior período de repouso na arena exposta a CL_{90} que em CL_{50} e no controle ($F_{2,11} = 33,57$; $P < 0,0001$) (Fig. 5B).

3.5 Taxa de respiração

A taxa de respiração das lagartas expostas ao controle e ao clorantraniliprole (CL₉₀) diferiu ($F_{2,9} = 3,47$, $P < 0,0530$). Clorantraniliprole reduziu a taxa de respiração de *A. gemmatalis* após uma e três horas de exposição a CL₉₀ (Fig. 6).

4. Discussão

O modo de ação de inseticidas da classe das diamidas é novo e específico. Esses produtos têm elevada atividade, baixa toxicidade para mamíferos e são, amplamente, utilizados em todo o mundo (Lahm et al., 2007). O clorantraniliprole, desse grupo, tem amplo espectro de ação contra pragas das ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera e Lepidoptera, (Teixeira et al., 2009; Spmer et al., 2009; Sial et al., 2012; Xing et al., 2011; Lanka et al., 2013; Bird, 2015).

Efeitos letais em larvas de *A. gemmatalis* pelo clorantraniliprole são semelhantes ao relatado para outras pragas (Pasquini et al., 2017; Bosch et al., 2018) com alta toxicidade e ação rápida contra *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (Liu et al., 2017). Isto reforça a importância desse inseticida no controle de pragas Lepidoptera e com baixo impacto para insetos não alvos (Lahm et al., 2005; Qi et al., 2014; Sparks e Nauen, 2015) como os parasitóides *Aphelinus mali* Hald. (Hymenoptera: Encyrtidae), *Aphidius rhopalosiphi* De Stefani Perez (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae), *Diadegma semiclausum* Hellen (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Dolichogenidea tasmanica* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), *Trichogramma chilonis* Ishii, *Trichogramma dendrolimi* Matsumura e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Brugger et al., 2010) e pouco tóxico aos predadores *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera:

Coccinellidae) e *Chrysoperla sinica* Tjeder (Neuroptera: Chrysopidae) (Liu et al., 2016). A mortalidade de *A. gemmatalis* atingiu 90% com efeito letal em 96 h após a exposição ao clorantraniliprole demonstrando a toxicidade para esse inseto via ingestão.

Degeneração celular do epitélio com fragmentos celulares com conteúdo citoplasmático e nuclear e secreções apócrina sendo liberados no lúmen, aumento da vacuolização citoplasmática e desorganização da matriz peritrófica do intestino médio de *A. gemmatalis* mostra efeito tóxico do clorantraniliprole. A eliminação de fragmentos celulares para o lúmen do intestino médio é uma resposta fisiológica comumente observada em insetos (Chapman, 1998; Lehane e Billingsley, 1996) os quais podem estar envolvidos na secreção apócrina de enzimas digestivas (Caetano et al., 1994, Serrão e Cruz-Landim, 1995; Cristofolletti et al., 2001), na renovação do conteúdo citoplasmático (Cruz-Landim et al., 1996) ou apoptose (Rost-Roszkowska, 2008; Tettamanti et al., 2007; Azevedo et al., 2009). Essa fragmentação pode reduzir a capacidade digestiva de insetos como observado para *H. armigera* (Barbeta et al., 2008) e, com a maior vacuolização nas células digestivas do intestino médio sugere processo de morte celular (Hariri et al., 2000; Tsujimoto e Shimizu, 2005; Santos et al., 2015a). Vacúolos nas células do intestino médio são normais em insetos (Alves et al., 2010; Fernandes et al., 2015; Mir et al., 2015), mas o aumento de seu número e tamanho no citoplasma caracteriza processo de autofagia (Levine e Klionsky, 2004; Santos et al., 2015b). Vacualização aumentou em células do intestino médio de *A. gemmatalis* após a ingestão dos bioinseticidas de squamocina (Fiaz et al., 2018), caracterizado pela eliminação de detritos, toxinas e reciclagem de componentes celulares (Levy et al., 2008; Gomes et al., 2013). A desorganização da matriz peritrófica do intestino médio de lagartas expostas ao clorantraniliprole compromete absorção de nutrientes e expõe células epiteliais a danos mecânicos provocados pelo bolo alimentar. Essa matriz age

como uma barreira contra produtos tóxicos, retardando o contato com células digestivas (De Priester, 1971; Terra, 1988; Ryerse et al., 1992; Wu et al., 2016), mas o clorantraniliprole pode ultrapassar a matriz peritrófica e atingir as células epiteliais do intestino médio de *A. gemmatalis*. Efeitos histológicos e ultraestruturais no intestino sugerem uma tentativa de desintoxicar as células expostas ao clorantraniliprole e morte celular em *A. gemmatalis*.

Alterações no padrão comportamental se devem à ação de compostos tóxicos que podem reduzir ou estimular a mobilidade de insetos (Dethier et al., 1960; Miller et al., 2009). Efeito arrestante do clorantraniliprole no comportamento de *A. gemmatalis* é característico da redução da locomoção de insetos após o contato com o inseticida (Zhu et al., 2013). Diamidas antranílicas, classe inseticida do clorantraniliprole, interferem nas contrações musculares dos insetos, estimulando a liberação contínua de cálcio intracelular, levando à depleção das reservas de cálcio no retículo sarcoplasmático promovendo a paralisia muscular, cessação da alimentação, letargia e morte (Cordova et al., 2006; Hannig et al., 2007; Fend et al., 2011). O imidaclopride causou resposta comportamental arrestante em larvas de *Amphimallon majale* Razoumowsky (Coleoptera: Scarabaeidae) (Zhu et al., 2013) e o clorantraniliprole reduziu a velocidade de caminamento do cupim *Reticulitermes flavipes* Kollar (Blattodea: Rhinotermitidae) (Thorne et al., 2015). O clorantraniliprole inibiu a atividade locomotora de *A. gemmatalis* aumentando o período de permanência de lagartas dessa praga nas arenas pulverizadas com o inseticida e a contaminação das mesmas, pois esse inseticida tem, também, ação de contato (Thorne et al., 2015; Van Herk et al., 2015).

A menor taxa de respiração de *A. gemmatalis* com o clorantraniliprole é semelhante ao relatado com o bioinseticida squamocin nesse inseto evidenciando danos moleculares às mitocôndrias (Fiaz et al., 2018) e estresse e custos fisiológicos devido à

realocação de energia de outros processos fisiológicos básicos (Plata-Rueda et al., 2018). Além de agir sobre os receptores de rianodina mediando à liberação de íons cálcio (Ca^{2+}) das reservas intracelulares do retículo sarcoplasmático causando contração e paralisia muscular (Cordova et al., 2006; Lahm et al. al., 2009), o clorantraniliprole promove danos histopatológicos diretos no intestino médio. Isto reflete na resposta comportamental, atividade locomotora e redução das taxas respiratórias.

Clorantraniliprole é tóxico a *A. gemmatalis* em concentrações subletais provocando mudanças histológicas e ultraestruturais severas com degeneração do epitélio do intestino médio, redução das taxas respiratórias e indução de resposta comportamental arretante desse inseto.

5. Referências

- Abot, A.R., Moscardi, F., Fuxa, J.R., Sosa-Gómez, D.R. & Richter, A.R. Development of Resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a Nuclear Polyhedrosis Virus under Laboratory Selection Pressure. *Biol. Control* **7**, 126–130 (1996).
- AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 08/06/2018.
- Alves, S.N., Serrão, J.E. & Melo, A.L. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron* **41**, 592–597 (2010).
- Azevedo, D.O., Neves, C.A. Santos-Mallet, J.R., Gonçalves, T.C.M., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. Notes on midgut ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *J. Med. Entomol.* **46**, 435–441 (2009).
- Barbeta, B.L., Marshal, A.T., Gillon, A., Craik, D.J. & Marlyn, A.A. Plant cyclotides disrupt epithelial cell in the midgut of Lepidoptera larvae. *P. Natl. Acad. Sci. Usa* **105**, 1221–1225 (2008).
- Bird, L.J. Baseline susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to indoxacarb, emamectin benzoate, and chlorantraniliprole in Australia. *J. Econ. Entomol.* **108**, 294–300 (2015).
- Bosch, D., Rodríguez, M.A., Depalo, L. & Avilla, J. Determination of the baseline susceptibility of European populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) to chlorantraniliprole and the role of cytochrome P450 monooxygenases. *J. Econ. Entomol.* **111**, 844–852 (2018).

- Brugger, K.E., Cole, P.G., Newman, I.C., Parker, N., Scholz, B., Suvagia, P., Walker, G. & Hammond, T.G. Selectivity of chlorantraniliprole to parasitoid wasps. *Pest Manag. Sci.* **66**, 1075–1081 (2010).
- Cao, G., Jia, M., Zhao, X., Wang, L., Tu, X., Wang, G., Nong, X. & Zhang, Z. Effects of chlorantraniliprole on detoxification enzymes activities in *Locusta migratoria* L. *J. Asia-Pac. Entomol.* **20**, 741–746 (2017).
- Caetano, F.H., Torres Jr., A.H., Matias, M.I.C. & Tomotake, M.E.M. Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). *Cytobios* **80**, 235–242 (1994).
- Catae, A.F., Roat, T.C., Oliveira, R.A., Nocelli, R.C.F. & Malaspina, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.* **77**, 274–281 (2014).
- Chapman, R.F. In: Simpson, S.J. (Ed.), *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press (2013).
- Chapman, R.F. *The insects: structure and function*, 4th edn. Harvard University Press, Cambridge, 770 p. (1998).
- Cordova, D., Benner, E.A., Sacher, M.D., Rauh, J.J., Sopa, J.S., Lahm, G.P., Selby, T.P., Stevenson, T.M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D.F., Wu, L., Smith, R.M. & Tao, Y. Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Phys.* **84**, 196–214 (2006).
- Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F. & Terra, W.R. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* **47**, 143–155 (2001).

- Cruz-Landim, C., Serrão, J.E. & Silva de Moraes, R.L.M. Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees. *Cytobios* **88**, 95–104 (1996).
- Cui, Y.L., Liu, K.C., Xu, C., Liu, F., Li, Q.X., Liu, S.Z. & Wang, B.M. Development of a sensitive monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for analysing CAP residues. *Food Chem.* **143**, 293-299 (2014).
- De Castro, A.A., Corrêa, A.S., Legaspi, J.C., Guedes, R.N.C., Serrão, J.E. & Zanuncio, J.C. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* **93**, 1043–1050 (2013).
- De Priester, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora erythrocephala*. *Journal of Ultrastructure Research* **36**, 783–805 (1971).
- Dethier, V.G., Barton, B.L. & Smith, C.N. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *J. Econ. Entomol.* **53**, 134–136 (1960).
- Dong, F.S., Xu, J., Liu, X.G., Li, J., Li, Y.B., Kong, Z.Q., Shan, W.L., Zheng, Z.T. & Zheng, Y.Q. Determination of CAP residues in corn and soil by UPLC-ESI-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Chromatographia* **74**, 399–406 (2011).
- Dow, J.A. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* **19**, 187–328 (1987).
- Feng, Q., Wang, M., Xiong, L., Liu, Z. & Li, Z. Synthesis and insecticidal activities of novel analogues of chlorantraniliprole containing nitro group. *Chem. Res. Chin. Univ.* **27**, 610–613 (2011).
- Fernandes, K.M., Gonzaga, W.G., Pascini, T.V., Miranda, F.R., Tomé, H.V.V., Serrão, J.E. & Martins, G.F. Imidacloprid impairs the post-embryonic development of

- the midgut in the yellow fever mosquito *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). *Med. Vet. Entomol.* **29**, 245–254 (2015).
- Fernandes, M.E.S., Alves, F.M., Pereira, R.C., Aquino, L.A., Fernandes, F.L. & Zanuncio, J.C. Lethal and sublethal effects of seven insecticides on three beneficial insects in laboratory assays and field trials. *Chemosphere* **156**, 45–55 (2016).
- Fiaz, M., Martínez, L.C., Costa, M.S., Cossolin, J.F.S., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W.G., Sant’Ana, E.G., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotox. Environ. Safe.* **156**, 1–8 (2018).
- Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press.
- Gomes, F.M., Carvalho, D.B., Machado, E.A. & Miranda, K. Ultrastructural and functional analysis of secretory goblet cells in the midgut of the lepidopteran *Anticarsia gemmatalis*. *Cell Tissue Res.* **352**, 313–326 (2013).
- Greene, G.L., Leppla, N.C. & Dickerson, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* **69**, 487–488 (1976).
- Haase, S., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. *Baculovirus* insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses* **7**, 2230–2267 (2015).
- Hannig, G.T., Ziegler, M. & Marçon, P.G. Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode-of-action groups. *Pest Manag. Sci.* **65**, 969–974 (2009).

- Hariri, M., Millane, G., Guimond, M.P., Guay, G., Dennis, J.W. & Nabi, I.R. Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Mol. Biol. Cell* **11**, 255–268 (2000).
- Lahm, G.P., Cordova, D. & Barry, J.D. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorgan. Med. Chem.* **17**, 4127–4133 (2009).
- Lahm, G.P., Selby, T.P., Freudenberger, J.H., Stevenson, T.M., Myers, B.J., Seburyamo, G., Smith, B.K., Flexner, L., Clark, C.E. & Cordova, D. Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 4898–4906 (2005).
- Lahm, G.P., Stevenson, T.M., Selby, T.P., Freudenberger, J.H., Cordova, D., Flexner, L., Bellin, C.A., Dubas, C.M., Smith, B.K., Hughes, K.A., Hollingshaus, J.G., Clark, C.E. & Benner, E.A. Rynaxypyr™: a new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 6274–6279 (2007).
- Lanka, S.K., Ottea, J.A., Davis, J.A., Hernandez, A.B. & Stout, M.J. Systemic effects of thiamethoxam and chlorantraniliprole seed treatments on adult *Lissorhoptus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae) in rice. *Pest Manag. Sci.* **69**, 250–256 (2013).
- Lavtizar, V., Berggren, K., Trebše, P., Kraak, M.H.S., Verweij, R.A. & van Gestel, C.A.M. Comparative ecotoxicity of chlorantraniliprole to non-target soil invertebrates. *Chemosphere* **159**, 473–479 (2016).
- Lehane, M., Billingsley, P. Biology of the insect midgut. Springer Science & Business Media (2012).
- Lehane, M.J., Billingsley, P.F. Biology of the insect midgut. Chapman and Hall, London, 486p. (1996).

- Levine, B. & Klionsky, D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **6**, 463–477 (2004).
- Levy, S.M., Ferreira Falleiros, A.M., Moscardi, F., Gregório, E.A. & Toledo, L.A. Ultramorphology of digestive tract of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) at final larval development. *Semin.: Cienc. Agrar.* **29**, 313–322 (2008).
- Liu, M., Wang, X., Chen, D., Li, Y. & Wang, F. Growth, reproduction and biochemical toxicity of chlorantraniliprole in soil on earthworms (*Eisenia fetida*). *Ecotox. Environ. Safe.* **150**, 18–25 (2018).
- Liu, Y., Gao, Y., Liang, G. & Lu, Y. Chlorantraniliprole as a candidate pesticide used in combination with the attracticides for lepidopteran moths. *Plos One* **12**, e0180255 (2017).
- Liu, Y.Q., Li, X.Y., Zhou, C., Liu, F. & Mu, W. Toxicity of nine insecticides on four natural enemies of *Spodoptera exigua*. *Sci. Rep.* **6**, 39060 (2016).
- Lopes, M.P., Fernandes, K.M., Tomé, H.V.V., Gonçalves, W.G., Miranda, F.R., Serrão, J.E. & Martins, G.F. Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and malpighian tubules of africanized honey bee workers. *Pest Manag. Sci.* **74**, 1311–1318 (2017).
- Malhat, F., Abdallah, H. & Hegazy, I. Dissipation of chlorantraniliprole in tomato fruits and soil. *B. Environ. Contam. Tox.* **88**, 349–351 (2012a).
- Malhat, F.M. Determination of chlorantraniliprole residues in grape by high-performance liquid chromatography. *Food Anal. Method.* **5**, 1492–1496 (2012b).
- Miller, J.R., Siegert, P.Y., Amimo, F.A. & Walker, E.D. Designation of chemicals in terms of the locomotor responses they elicit from insects: an update of Dethier, et al. (1960). *J. Econ. Entomol.* **102**, 2056–2060 (2009).

- Mir, S.U., George, N.M., Zahoor, L., Harms, R., Guinn, Z. & Sarvetnick, N.E. Inhibition of autophagic turnover in β -cells by fatty acids and glucose leads to apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* **290**, 6071–6085 (2015).
- Originlab Corporation. 2013. OriginPro v. 9.0.0 SR2 b87. Originlab Corporation. Northampton, MA: Originlab Corporation (<http://www.OriginLab.com>).
- Panizzi, A.R. History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotrop. Entomol.* **42**, 119–127 (2013).
- Pasquini, S., Haxaire-Lutun, M.O., Rison, J., Flier, W.G. & Teixeira, L.A. Susceptibility of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) to chlorantraniliprole in the Emilia Romagna Region of northeast Italy. *J. Econ. Entomol.* **111**, 369–374 (2017).
- Plata-Rueda, A., Campos, J.M., Rolim, G.S., Martínez, L.C., Santos, M.H., Fernandes, F.L., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Ecotox. Environ. Safe.* **156**, 263–270 (2018).
- Qi, S., Lümmen, P., Nauen, R. & Casida, J.E. Diamide insecticide target site specificity in the *Heliothis* and *Musca* ryanodine receptors relative to toxicity. *J. Agr. Food Chem.* **62**, 4077–4082 (2014).
- Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208–212 (1963).
- Rost-Roszkowska, M.M. Degeneration of the midgut epithelium in *Allacma fusca* L. (Insecta, Collembola, Symphypleona): apoptosis and necrosis. *Zool. Sci.* **25**, 753–759 (2008).

- Ryerse, J.S., Purcell, J.P., Sammons, R.D. & Lavrik, P.B. Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. *Tissue Cell* **24**,751–771 (1992).
- Santos, D.E., Azevedo, D.O., Campos, L.A.O., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy. *Protoplasma* **252**, 619–627 (2015b).
- Santos, M.C., Junqueira, A.M.R., de Sá, V.G.M., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. Effect of silicon on the morphology of the midgut and mandible of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae. *Isj-Invert. Surviv. J.* **12**, 158–165 (2015a).
- SAS Institute. 2002. The SAS System for Windows, release 9.0. SAS Institute, Cary, N.C.
- Schwarz, T., Snow, T.A., Santee, C.J., Mulligan, C.C., Class, T., Wadsley, M.P. & Nanita, S.C. QuEChERS multiresidue method validation and mass spectrometric assessment for the novel anthranilic diamide insecticides chlorantraniliprole and cyantraniliprole. *J. Agr. Food Chem.* **59**, 814–821 (2011).
- Serrão, J.E. & Cruz-Landim, C. Gut structures in adult workers of necrophorous neotropical stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Entomol. Gen.* **19**, 261–265 (1995).
- Sial, A.A. & Brunner, J.F. Selection for resistance, reversion toward susceptibility, and synergism of chlorantraniliprole and spinetoram in obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Manag. Sci.* **68**, 462–468 (2012).

- Silva, F.W.S., Serrão, J.E. & Elliot, S.L. Density-dependent prophylaxis in primary anti-parasite barriers in the velvetbean caterpillar. *Ecol. Entomol.* **41**, 451–458 (2016).
- Sosa-Gomes, D.R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Genet. Mol. Biol.* **27**, 378–384 (2004).
- Sosa-Gómez, D.R. & Miranda, J.E. Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). *Rev. Bras. Entomol.* **56**, 359–362 (2012).
- Sparks, T.C. & Nauen, R. IRAC: mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Phys.* **121**, 122–128 (2015).
- Spmer, N.A., Kamble, S.T. & Siegfried, B.D. Bioavailability of chlorantraniliprole and indoxacarb to eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in various soils. *J. Econ. Entomol.* **102**, 1922–1927 (2009).
- Stefanini, M., Martino, C.D. & Zamboni, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* **216**, 173–174 (1967).
- Teixeira, L.A., Gut, L.J., Wise, J.C. & Isaacs, R. Lethal and sublethal effects of chlorantraniliprole on three species of *Rhagoletis* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Pest Manag. Sci.* **65**, 137–143 (2009).
- Terra, W.R. Physiology and biochemistry of insect digestion, an evolutionary perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **21**, 675–734 (1988).
- Tettamanti, G., Grimaldi, A., Casartelli, M., Ambrosetti, E., Ponti, B., Congiu, T., Ferrarese, R., Rivas-Pena, M.L., Pennacchio, F. & Eguileor, M. Programmed cell death and stem cell differentiation responsible for midgut replacement in

- Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell Tissue Res.* **330**, 345–359 (2007).
- Thorne, B.L., Breisch, N.L. & Scherer, C.W. Impacts on *Reticulitermes flavipes* (Infraorder Isoptera: Rhinotermitidae) by chlorantraniliprole applied to soil surrounding established tunnels. *J. Econ. Entomol.* **108**, 2414–2420 (2015).
- Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* **12**, 1528–1534 (2005).
- Van Herk, W.G.; Vernon, R.S., Vojtko, B., Snow, S., Fortier, J. & Fortin, C. Contact behaviour and mortality of wireworms exposed to six classes of insecticide applied to wheat seed. *J. Pest Sci.* **88**, 717–739 (2015).
- Wang, T.T., Cheng, J., Liu, X.J., Jiang, W., Zhang, C.L. & Yu, X.Y. Effect of biochar amendment on the bioavailability of pesticide CAP in soil to earthworm. *Ecotox. Environ. Safe.* **83**, 96–101 (2012).
- Whalen, R.A., Herbert, D.A., Malone, S., Kuhar, T.P., Brewster, C.C. & Reisig, D.D. Effects of diamide insecticides on predators in soybean. *J. Econ. Entomol.* **109**, 2014–2019 (2016).
- Wu, K., Yang, B., Huang, W., Dobens, L., Song, H. & Ling, E. Gut immunity in Lepidopteran insects. *Dev. Comp. Immunol.* **64**, 6465–6474 (2016).
- Wu, S., Zhao, D., Huang, J., Zhao, S., Zhou, L. & Gao, C. Molecular characterization and expression profiling of ryanodine receptor gene in the pink stem borer, *Sesamia inferens* (Walker). *Pestic. Biochem. Phys.* **146**, 1–6 (2018).
- Xing, J., Liang, P. & Gao, X.W. Effects of sublethal concentrations of chlorantraniliprole on insecticide susceptibility and detoxifying enzyme activity in *Plutella xylostella*. *Chin. J. Pestic. Sci.* **13**, 464–470 (2011).

Zhang, J.M., Chai, W.G. & Wu, Y.L. Residues of CAP in rice field ecosystem.

Chemosphere **87**, 132–136 (2012).

Zhu, G., Petersen, M.J., Liuc, G. & Peck, D.C. Imidacloprid as a contact arrestant for

larvae of the European chafer, *Amphimallon majale*. *Pest Manag. Sci.* **69**, 483–

492 (2013).

Tabela 1. Concentrações letais do clorantraniliprole para lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

¹ CL	² VE	³ IC	⁴ X ²
25	0,23	0,20 – 0,25	
50	0,28	0,26 – 0,30	
75	0,34	0,32 – 0,36	90.2
90	0,40	0,38 – 0,43	
99	0,52	0,48 – 0,58	

Concentrações de ¹CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e CL₉₉ causam 25, 50, 75, 90 e 99% de mortalidade; ²VE, valor estimado (mg mL⁻¹), ³IC, intervalo de confiança (mg mL⁻¹), ⁴X², valor do qui-quadrado para concentrações letais e limites fiduciais baseados em uma escala logarítmica em nível de significância de $P < 0,0001$.

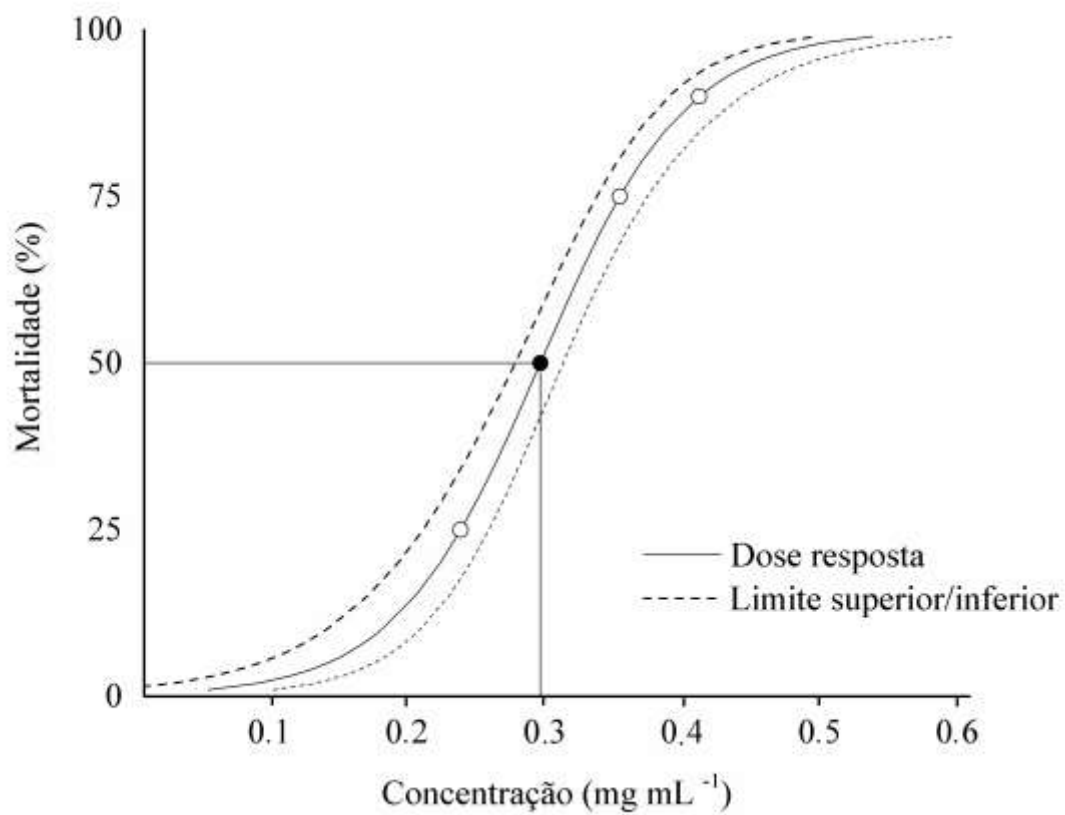


Figura 1. Curva de mortalidade e limites superior e inferior para lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) após tratamento com diferentes concentrações de clorantraniliprole.

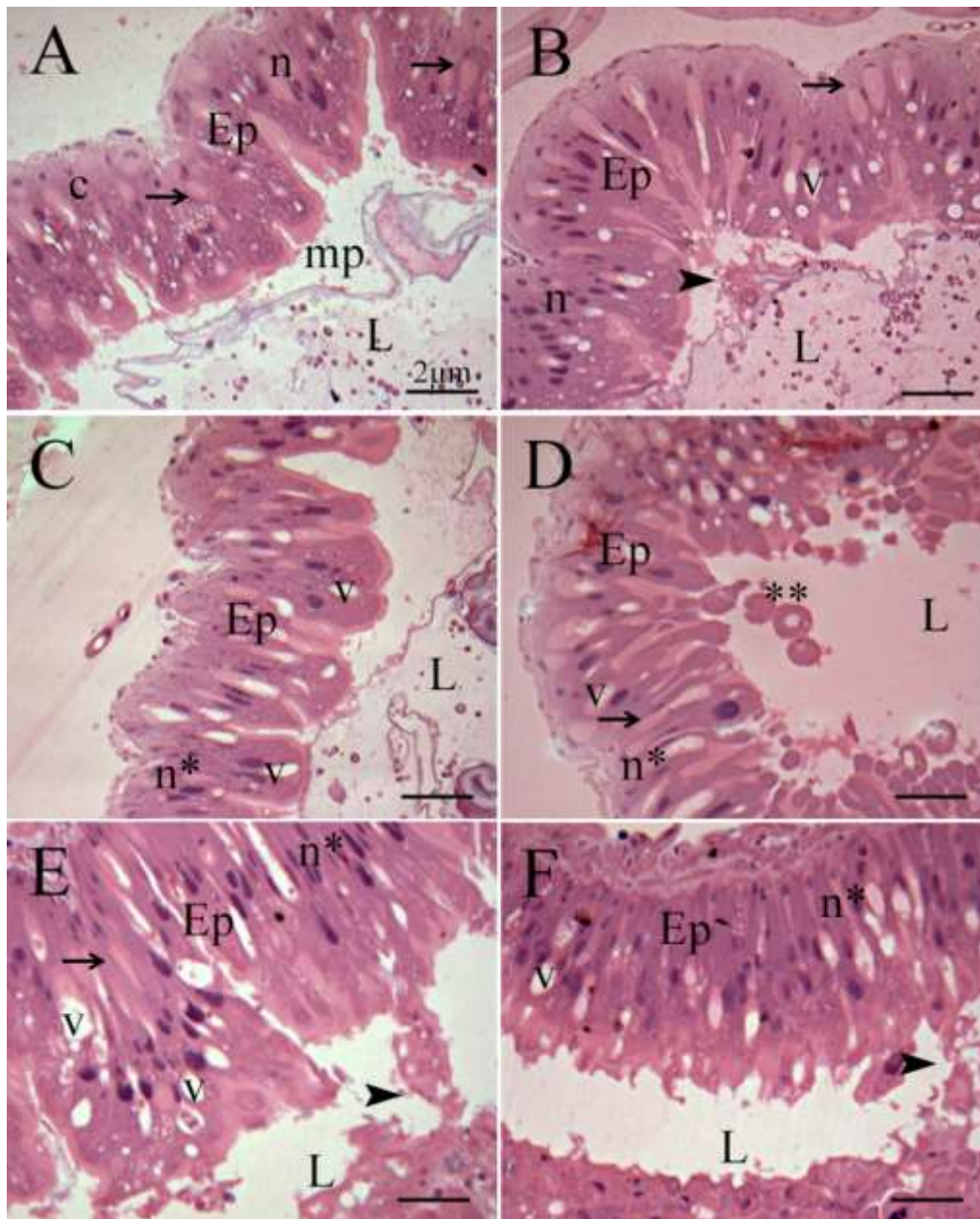


Figura 2. Seções histológicas do intestino médio de lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) não expostas ao clorantraniliprole (A) mostrando epitélio (Ep) com células digestivas (c) com núcleos com cromatina descondensada (n), células caliciformes (setas) e matriz peritrófica preservada (mp) e expostas ao clorantraniliprole após 2 h (B), 4 h (C), 8 h (D), 16 h (E) e 32 h (F) mostrando vacúolos (v), núcleos com cromatina condensada (n*) e fragmentos celulares (**) e secreção apócrina (flechas) liberados no lúmen (L).

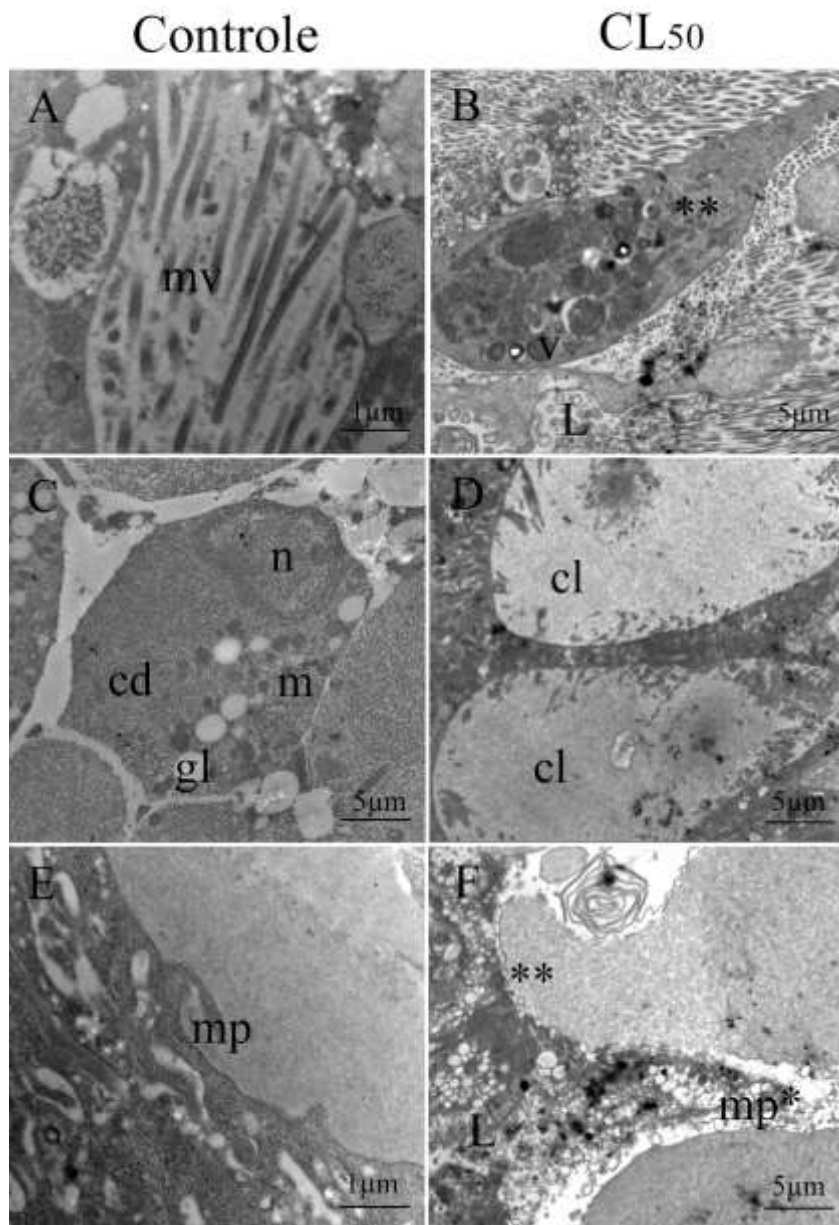


Figura 3. Micrografia eletrônica de transmissão do intestino médio de lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) não expostas ao clorantraniliprole (A - C - E) mostrando células digestivas (cd) com citoplasma rico em mitocôndrias (m), núcleo (n) e gotas lipídicas (gl), matriz peritrófica (mp) e microvilosidades (mv) preservadas e expostas ao clorantraniliprole (B - D - F) mostrando células caliciformes (cl) com microvilosidades degeneradas, rompimento da membrana plasmática (mp*), protrusões apicais, alguns liberados (**) no lúmen (L).

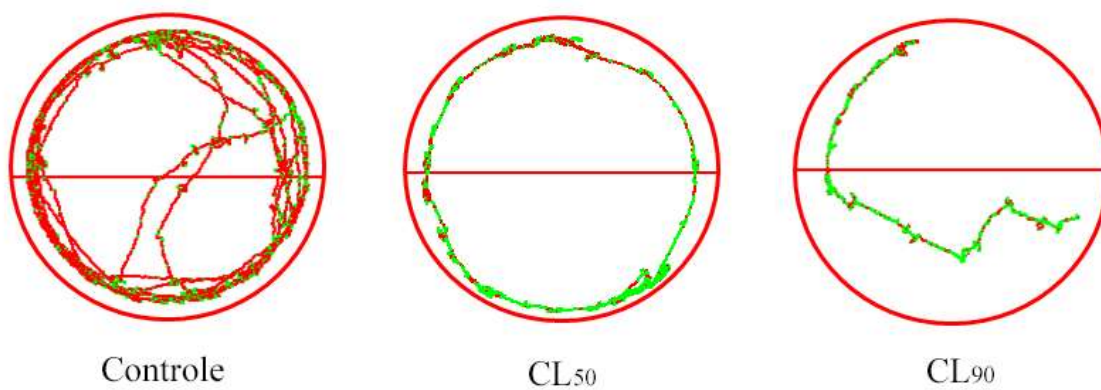


Figura 4. Trilhas representativas mostrando a atividade de caminhada de lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) durante período de 10 minutos em arenas de papel filtro com metade impregnada com clorantraniliprole (metade inferior da arena). Trilhas vermelhas indicam caminhada em alta velocidade e verdes indicam baixa velocidade (inicial).

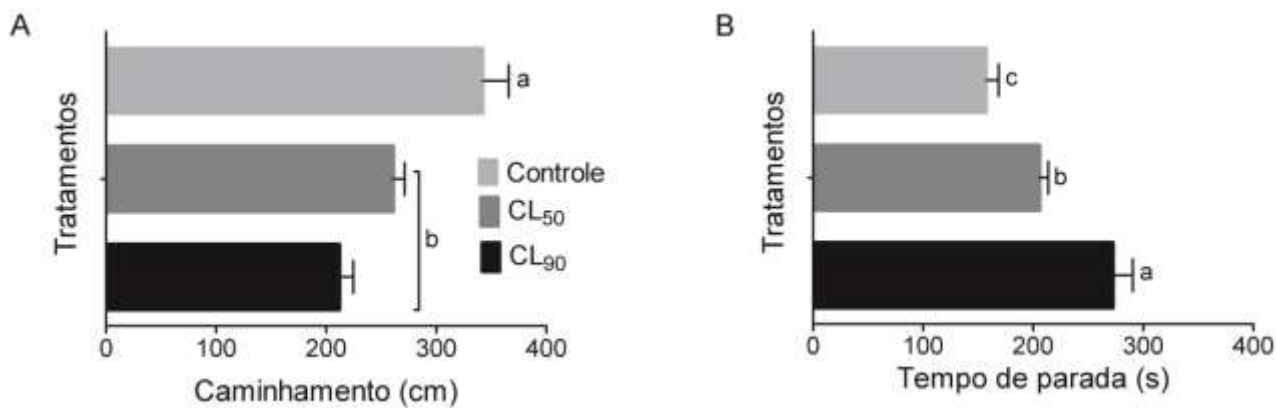


Figura 5. Distância percorrida e tempo de repouso (média \pm erro padrão) durante 10 minutos de lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) expostas via ingestão ao clorantraniliprole (valores estimados de CL₅₀ e CL₉₀). Os tratamentos (média \pm erro padrão) diferem em $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

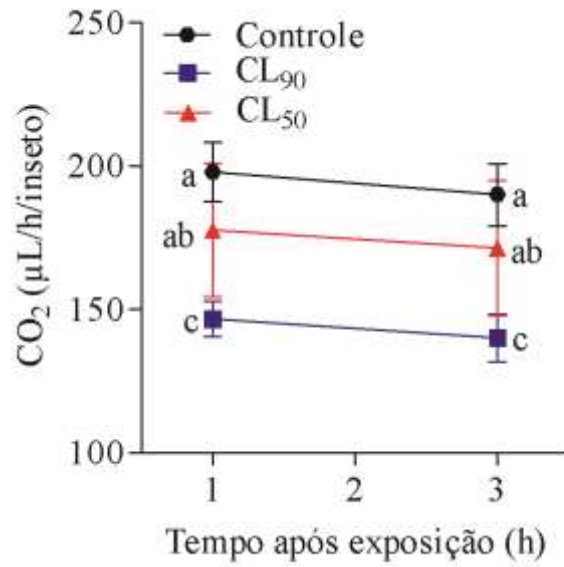


Figura 6. Taxa de respiração (média \pm SE) de lagartas de quarto instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) expostas via ingestão ao clorantraniliprole (valores estimados de CL₅₀ e CL₉₀). Médias com letras diferentes no mesmo tempo diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Conclusões gerais

Clorantraniliprole e toxinas produzidas por *Bt* são nocivos a *A. gemmatalis* em concentrações letais médias provocando mudanças histológicas e ultraestruturais severas com degeneração do epitélio do intestino médio, causando desorganização celular, degeneração das microvilosidades, fragmentação e protrusão de células, desorganização da matriz peritrófica e vacuolização celular.

Células expostas ao *Bt* apresentaram núcleos com cromatina condensada e a incremento na quantidade de lisossomos. Apoptose ocorreu nas células do intestino médio de lagartas expostas ao *Bt* e resposta regenerativa após a exposição ao entomopatógeno não foi contínua.

Secreção apócrina foi expelida do epitélio do intestino médio para o lúmen após exposição ao clorantraniliprole. Lagartas expostas a esse inseticida apresentaram maior período de repouso e redução na distância e velocidade de caminhamento e nas taxas respiratórias. O clorantraniliprole induz a resposta comportamental arrestante desse inseto.