

VALDEIR CELESTINO DOS SANTOS JUNIOR

HISTOPATOLOGIA DE ÓRGÃOS DE DIGESTÃO DO PREDADOR *Podisus nigrispinus* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) CAUSADO PELO INSETICIDA ESPINOSADE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

S237h
2017 Santos Junior, Valdeir Celestino, 19-
Histopatologia de órgãos de digestão do predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) causado pelo inseticida espinosade / Valdeir Celestino Santos Junior. – Viçosa, MG, 2017.

xi, 64f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Cola Zanuncio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Podisus nigrispinus*. 2. Percevejo (Inseto). 3. Glândulas salivares. 4. Intestinos. 5. Histopatologia. 6. Inseticidas. 7. Toxicologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.754

VALDEIR CELESTINO DOS SANTOS JUNIOR

HISTOPATOLOGIA DE ÓRGÃOS DE DIGESTÃO DO PREDADOR *Podisus nigrispinus* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) CAUSADO PELO INSETICIDA ESPINOSADE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2017.

Luis Carlos Martínez

Rosa Angelica Plata Rueda

Aparecida das Dores Texeira

José Cola Zanuncio
(Orientador)

It is not the strongest of the species that survive, nor the most intelligent, but the one most responsive to change.

Charles Darwin

Aos meus pais e irmãs
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que com sua divina glória, me permitiu chegar até aqui, sempre ao meu lado, dando forças para superar os desafios.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Entomologia pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos meus pais, Valdeir Celestino dos Santos e Elenita Pereira dos Santos e irmãs, Vanubia Maria dos Santos, Tatiele Pereira dos Santos e Adriele Pereira dos Santos, pelo amor e compreensão desprendidos por este tempo longe de casa.

Ao professor José Cola Zanuncio, pelos ensinamentos e orientação, sugestões e correções.

Ao professor José Eduardo Serrão e ao José Milton Milagres Pereira pela co-orientação, conselhos e ideias para o desenvolvimento da dissertação.

À banca, que prontamente, se disponibilizou a contribuir com o trabalho.

Aos Colegas do laboratório de Controle Biológico de Insetos, pela amizade e confiança. Por todos os momentos de alegria que me proporcionaram no horário do café ou conversas pelos corredores. Agradecimento especial a Juliana, Gabriela, Barbara e Carlos, pela grande amizade que surgiu durante este período, companheiros de almoço no restaurante universitário e horas investidas nos micrótomos.

À Flavia e Dona Luzia, por me acolherem e me fazerem sentir como em casa, com muito carinho e dedicação, me proporcionando deliciosos jantares cheios de felicidade e filosofia.

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização da pesquisa e redação da presente dissertação, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	x
Introdução geral	1
Referências	5
Capítulo 1 – Mudanças histológicas causadas pelo inseticida espinosade no intestino médio de <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae)	16
Resumo	16
Abstract	17
Introdução	18
Material e Métodos	21
<i>Insetos</i>	21
<i>Bioensaios</i>	21
<i>Microscopia de luz</i>	22
<i>Microscopia confocal</i>	23
<i>Análise estatística</i>	24
Resultados	24
<i>Mortalidade</i>	24
<i>Mudanças histológicas</i>	24
<i>Morte celular</i>	26
Discussão	26
Referências	28

Capítulo 2 – Espinosade provoca mudanças histológicas nas glândulas salivares do percevejo predador, <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae)	40
Resumo	40
Abstract	41
Introdução	42
Material e Métodos	45
<i>Insetos</i>	45
<i>Bioensaio de toxicidade</i>	46
<i>Alterações histológicas</i>	46
<i>Apoptose</i>	47
<i>Análise estatística</i>	48
Resultados	48
<i>Toxicidade</i>	48
<i>Histologia</i>	48
<i>Microscopia confocal</i>	50
Discussão	50
Referências	52

RESUMO

SANTOS JUNIOR, Valdeir Celestino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Histopatologia de órgãos de digestão do predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) causado pelo inseticida espinosade.** Orientador: José Cola Zanuncio. Coorientadores: José Eduardo Serrão e José Milton Milagres Pereira.

O uso de predadores no controle biológico é uma realidade. *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae) é indicado para o controle de lepidópteros em plantações agrícolas e campos de reflorestação. No entanto, o consumo de pesticidas é um agravante para a manutenção de insetos benéficos. O espinosade é um inseticida descrito como seletivo para grande parte dos inimigos naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças histológicas nas glândulas salivares e intestino médio de *P. nigrispinus* exposto ao inseticida espinosade. Teste de toxicidade foi realizado a fim de verificar toxicidade do inseticida ao predador e suas concentrações letais CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e CL₉₉. *P. nigrispinus* foram alimentados com pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) contaminadas pela CL₅₀ de espinosade, seguida da extração dos tecidos não-alvo (intestino médio) e tecido controle (cérebro) em diferentes tempos (30 minutos, 1 hora, 3 horas e 6 horas) após início da alimentação.. O intestino foi separado nas regiões anterior, médio e posterior e as glândulas salivares em glândula principal e acessória. Microscopia de luz e confocal foram realizadas para verificar as mudanças histológicas e morte celular. O espinosade foi tóxico ao *P. nigrispinus*. Vacuolização foi o primeiro sintoma de intoxicação a ser visualizado em todos os tecidos não-alvo avaliados, seguido de desestruturação celular e perda de material celular para o lúmen dos órgãos. A vacuolização é uma tentativa da retirada da substância tóxica da célula, seguida

da desestruturação da célula pela excessiva perda de material. A morte celular foi observada em todos os tecidos testados, sendo resultado das grandes mudanças sofridas pela célula na tentativa de desintoxicação. O espinosade é tóxico para o *P. nigrispinus*, e sua CL_{50} promove mudanças histológicas, levando a célula das três regiões do intestino médio e as glândulas principais e acessórias a morte.

ABSTRACT

SANTOS JUNIOR, Valdeir Celestino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Histopathology of digestive organs of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) caused by the insecticide spinosad.** Adviser: José Cola Zanuncio. Co-advisers: José Eduardo Serrão and José Milton Milagres Pereira.

The use of predators on biological control programs is a reality. *Podisus nigrispinus* is indicated to control lepidopterans in agricultural plantations and reforestation areas. The use of pesticides is an aggravating factor for the maintenance of natural enemies in production fields. spinosad is an insecticide described as selective for most of the natural enemies. The objective of this work was to evaluate how histological changes in the salivary glands and midgut of *P. nigrispinus* exposed to spinosad. Toxicity test was performed to verify the toxicity of the insecticide to the predator and its LC₂₅, LC₅₀, LC₇₅, LC₉₀ and LC₉₉. *Tenebrio molitor* pupae contaminated by LC₅₀ of spinosad were given as food source to *P. nigrispinus* and 30 minutes, one, three and six hours after the beginning of feeding, the gut and glands as non target tissues and brain as control tissue were extracted. The intestine was separated in the anterior, middle and posterior regions and in salivary glands in the main and accessory gland. Light microscopy and confocal microscopy were performed to verify histological changes and cell death. Spinosad was toxic to *P. nigrispinus*. Vacuolization was the first symptom of intoxication visualized in all non-target tissues, followed by cell destruction and loss of cellular material to the lumen of the organs. Vacuolization is an attempt to remove the toxic substance from the cell interior, followed by destruction of the cell by excessive loss of material. Cell death was observed in all tissues tested. Cell death is the result of the great changes undergone

by the cell in the attempt to detox. Spinosad is toxic to *Podisus nigrispinus* and its LC₅₀ promotes histological changes, leading cells of the three regions of the midgut and main and accessory glands to de

Introdução Geral

A produção de inseticidas sintéticos causou grande entusiasmo devido a capacidade de acabarem com problemas de fornecimento de alimentos e produtividade (Zadoks & Waibel, 2000). A aplicação de pesticidas é comum para aumentar produtividades e garantir a qualidade das culturas agrícolas (Xu et al., 2017). Cerca de 4,6 milhões de toneladas de pesticidas são usadas, anualmente, no mundo para a proteção de culturas agrícolas (Zhang et al., 2011). No entanto, desde sua criação, os efeitos negativos de pesticidas sintéticos na saúde humana e meio ambiente têm sido discutidos (Zadoks & Waibel, 2000).

O uso excessivo de agrotóxicos pode causar problemas ambientais, contaminação de trabalhadores, de alimentos e redução de inimigos naturais (Araújo et al., 2000; Duntas & Stathatos, 2015; Ghazy et al., 2016), além de reduzir a eficiência de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Miranda et al., 1998). A redução de populações de inimigos naturais é um dos maiores efeitos negativos dos agrotóxicos. A manutenção e preservação destes organismos no agroecossistema é parte integrante do MIP para auxiliar no manejo da resistência de insetos a inseticidas (Zanuncio, 1993). A resistência de mais de 954 espécies de organismos foi documentada, sendo 546 de artrópodes (Whalon et al., 2013; Tabashnik et al., 2014). Pesticidas convencionais são retirados do mercado por seus efeitos indesejáveis à saúde humana e aos organismos benéficos e novos produtos vêm sendo desenvolvidos (Moustafa et al., 2016).

O aumento no surgimento de pragas, os efeitos negativos ao meio ambiente e a saúde humana devido ao uso de pesticidas sintéticos e o aumento da demanda de

produtos mais saudáveis pelos consumidores revigoraram a pesquisa de novas moléculas (Moshi & Matoju, 2017). Efeitos de inseticidas sobre insetos benéficos como abelhas, predadores e parasitoides tem sido estudados (Zanuncio et al., 1998; Cook et al., 2016; Samuelson et al., 2016; Lefebvre et al., 2017), pois esses compostos são usados no MIP e devem ser compatíveis com agentes de controle biológico (Stark et al., 2002; Tavares et al., 2010).

Os organofosforados foram introduzidos na década de 50 e, até meados de 90, foram largamente utilizados em pomares dos Estados Unidos (Jones et al., 2009). No Brasil, o clorpirifos (organofosforado) é uma das moléculas que mais causam contaminação (Jardim & Caldas, 2012). O grande uso de organofosforados se deve ao relativo baixo custo e eficiência no controle de pragas e doenças (Silveira et al., 2016). No entanto, efeitos negativos à saúde humana e ambientais de pesticidas à base de organofosforados (Pimentel, 1995) têm causado a retirada destas moléculas do mercado (Jones et al., 2010). Isto permite a entrada de novos produtos com novos modos de ação e menos tóxicos a mamíferos e invertebrados (Agnello et al., 2009; Fornasiero et al., 2017).

O espinosade é uma molécula com atividade inseticida, seletiva à algumas espécies e considerada de baixo risco. Essa molécula, secretada pela bactéria *Saccharopolyspora spinosa*, apresenta eficácia maior que a de outras classes de inseticidas (Thompson et al., 1997, Cleveland et al., 2002), tem sido utilizada no manejo de insetos-praga. O espinosade possui atividade neurotóxica semelhante a de inseticidas do grupo dos neonicotinóides, mas diferindo no sítio específico de sua ligação ao receptor de acetilcolina nicotínico e / ou de ácido gama-aminobutírico (GABA) (Salgado, 1997; Thompson et al., 2000; Watson, 2001; López et al., 2012). Por isto, pode ser utilizada em

rotação com moléculas como o imidaclopride (Orr et al., 2009) e com agentes de controle biológico em algumas culturas (Liu et al., 2016).

Inimigos naturais são importantes em programas de manejo integrado de pragas (MIP) (Zanuncio et al., 1996; Molina-Rugama et al., 1997). Espécies do gênero *Podisus* (Heteroptera: Pentatomidae) são predadores generalistas (Prezoto et al., 2006; Poderoso et al., 2016) de lepidópteros desfolhadores como *Anticarsia gemmantalis* Hübner (Noctuidae), *Spodoptera exigua* Hübner (Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Noctuidae) e *Alabama argilacea* Hübner (Noctuidae) (Mohaghegh et al., 2001; Oliveira et al., 2004; Zanuncio et al., 2008; Santos et al., 2016; Strapasson et al., 2016). Este gênero é encontrado em diversos ambientes e partes do mundo (Molina-Rugama et al., 1998).

O predador *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) (Magalhães et al., 2014) apresenta potencial para programas de controle biológico (Medeiros et al., 2000) em culturas agrícolas como algodão e soja, e áreas florestais (Lemos et al., 2001; Medeiros et al., 2004; Zanuncio et al., 2014; Castro et al., 2015). A fácil criação massal e alta capacidade predatória (Zanuncio et al., 2001; De Bortoli et al., 2016;) facilitam o uso de *P. nigrispinus* como inimigo natural em grandes cultivos (Denez et al., 2014; Strapasson et al., 2016;). A aplicabilidade desse predador em programas de MIP torna necessário estudar sua compatibilidade com outros métodos de controle (Castro et al., 2015). Pesticidas como clorantniliprol, deltametrina, espinosade, imidaclopride, metamidafos e tiametoxam são compatíveis com o predador *P. nigrispinus* (Torres & Ruberson, 2004; Castro et al., 2013).

Podisus nigrispinus começa seu processo de digestão injetando saliva na presa, um processo chamado de digestão extra-oral (Gonçalves et al., 2016). A saliva desse inseto paralisa e causa a morte da presa (Cohen, 1990). Este processo de alimentação permite o *P. nigrispinus* se alimentar de presas de mesmo tamanho ou maiores que seu corpo (Gonçalves et al., 2016). No entanto, a produção de saliva desse inseto tem grande quantidade de substâncias e, por isto, alto custo energético (Martínez et al., 2014). Toxinas e enzimas digestivas envolvidas no processo de digestão extra-oral podem ser produzidas em estruturas especializadas como glândulas ou intestino de besouros, percevejos e aranhas (Cohen, 1995; Martínez et al., 2014).

O alimento sugado pelo aparelho bucal de percevejos Asopine segue para o intestino onde é absorvido. Estruturalmente, o canal alimentar é composto por uma camada simples de células epiteliais, ancoradas a uma membrana basal, com uma camada descontínua de células musculares (Dow, 1987). O órgão é considerado uma barreira física e química contra patógenos, ingeridos na alimentação (Chapman, 1998; Levy et al., 2004) e representa a primeira defesa contra intoxicações por diferentes substâncias em insetos (Tate et al., 1982; Pradeepa et al., 2016).

Este trabalho teve como objetivo avaliar efeitos histológicos e letalidade celular em tecidos não alvo de *P. nigrispinus* pela ingestão de presas contaminadas com o inseticida neurotóxico espinosade.

Referências

Agnello, A.M., Atanassov, A., Bergh, J.C., Biddinger, D.J., Gut, L.J., Haas, M.J., Harper, J.K., Hogmire, H.W., Hull, L.A., Kime, L.F., Krawczyk, G., McGhee, P.S., Nyrop, J.P., Reissig, W.H., Shearer, P.W., Straub, R.W., Villanueva, R.T., Walgenbach, J.F. 2009. Reduced-risk pest management programs for Eastern U.S. apple and peach orchards: a 4-year regional project. *American Entomologist* 55: 184-197.

Araújo, A.C.P., Nogueira, D.P., Augusto, L.G.S. 2000. Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate. *Revista de Saúde Pública* 34 309-313.

Castro, A.A., Corrêa, A.S., Legaspi, L.C., Guedes, N.R.C., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2013. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* 93: 1043-1050.

Castro, A.A., Poderoso, J.C.M., Ribeiro, R.C., Legaspi, J.C., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2015. Demographic parameters of the insecticide-exposed predator *Podisus nigrispinus*: implications for IPM. *BioControl* 60: 231-239.

Chapman, R.F.1998. Alimentary canal, digestion and absorption. In: Simpson, S. J., Douglas, A. E. (Eds.). *The Insect: structure and function*. Cambridge University, United Kingdom, 38-68.

Cleveland, C.B., Mayes, M.A., Cryer, S.A. 2002. An ecological risk assessment for spinosad use on cotton. *Pest Management Science* 58: 70-84.

- Cohen, A.C. 1990. Feeding adaptations of some predaceous Hemiptera. *Annals of the Entomological Society of America* 83: 1215-1223.
- Cohen, A.C. 1995. Extra-oral digestion in predaceous terrestrial arthropoda. *Annual Review of Entomology* 40: 85-103.
- Cook N., Green J., Shuker D.M., Whitehorn P.R. 2016. Exposure to the neonicotinoid imidacloprid disrupts sex allocation cue use during superparasitism in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Ecological Entomology* 41: 693-697.
- De Bortoli, S.A., Vacari, A.M., Laurentis, V.L., De Bortoli, C.P., Santos, R.F., Otuka, A.K. 2016. Selection of prey to improve biological parameters of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) in laboratory conditions. *Brazilian Journal of Biology* 76: 307-314.
- Denez, M.D., Bueno, A.F., Pasini, A., Bortolotto, O.C., Stecca, C.S. 2014. Biological parameters of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with different soybean insect pests. *Annals of the Entomological Society of America* 107: 967-974.
- Dow, J.A.T. 1987. Insect midgut function. *Advances in Insect Physiology*, 19: 187-328.
- Duntas, L.H., Stathatos, N. 2015. Toxic chemicals and thyroid function: hard facts and lateral thinking. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 16: 311-318.
- Fornasiero, D., Mori, N., Tirello, P., Pozzebon, A., Duso, C., Tescari, E., Bradascio, R., Otto, S. 2017, Effect of spray drift reduction techniques on pests and predatory mites in orchards and vineyards. *Crop Protection* 98: 283-292.

Ghazy, N.A., Osakabe, M., Negm, M.W., Schausberger, P., Gotoh, T., Amano, H. 2016. Phytoseiid mites under environmental stress. *Biological Control* 96: 120-134.

Gonçalves, T.S., Soares, M.A., Santos, C.A., Santos, D.A., Santos, J.B., Barroso, G.A. 2016. Does the ingestion of isoxaflutole herbicide affect the midgut and salivary glands of Pentatomidae predators?. *Planta Daninha* 34: 125-132.

Jardim, A.N.O., Caldas, E.D. 2012. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Food Control* 25: 607-616.

Jones, V.P., Steffan, S.A., Hull, L.A., Brunner, J.F., Biddinger, D.J. 2010. Effects of the loss of organophosphate pesticides in the US: Opportunities and needs to improve IPM programs. *Outlooks on Pest Management* 21: 161-166.

Jones, V.P., Unruh, T.R., Horton, D.R., Mills, N.J., Brunner, J.F., Beers, E.H., Shearer, P.W. 2009. Tree fruit IPM programs in the western United States: the challenge of enhancing biological control through intensive management. *Pest Management Science* 65: 1305-1310.

Lefebvre, M., Franck, P., Olivares, J., Ricard, J.M., Madrin, J.F., Lavigne, C. 2017. Spider predation on rosy apple aphid in conventional, organic and insecticide-free orchards and its impact on aphid populations. *Biological Control* 104: 57-65.

Lemos, W.P., Medeiros, R.S., Ramalho, F.S., Zanuncio, J.C. 2001. Effects of plant feeding on the development, survival and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *International Journal of Pest Management* 47: 89-93.

- Levy, S.M., Falleiros, A.M.F., Gregório, E.A., Arrebola, N.R., Toledo, L.A. 2004. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Brazilian Journal of Biology* 64: 633-638.
- Liu, Y., Li, X., Zhou, C., Liu, F., Mu, W. 2016. Toxicity of nine insecticides on four natural enemies of *Spodoptera exigua*. *Scientific Reports* 6: 39060.
- López, J. D., Jr, Latheef, M. A., Fritz, B.F. 2012. Effect of spinosad mixed with sucrose on gustatory response and mortality of adult Boll Weevils (Coleoptera: Curculionidae) by feeding and field assessment. *The Journal of Cotton Science* 16: 152-159.
- Martinez, L.C., Fialho, M.C., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E. 2014. Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Protoplasma* 251: 535-543.
- Medeiros, R.S., Ramalho, F.S., Lemos, W.P., Zanuncio, J.C. 2000. Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). *Journal of Applied Entomology* 124: 319-324.
- Medeiros, R.S., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2004. Estimative of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) development time with non linear models. *Neotropical Entomology* 33: 141-148.
- Miranda, M.M.M., Picanço, M.C., Leite, G.L.D., Zanuncio, J.C., Clercq, P. 1998. Sampling and non-action levels for predations and parasitoids for virus vectors

- and miners of tomato in Brazil. Mededelingen-Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent (Belgium) 63: 519-526.
- Mohaghegh, J., De Clercq, P., Tirry, L. 2001. Functional response of the predators *Podisus maculiventris* (Say) and *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae) to the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lep., Noctuidae): effect of temperature. Journal of Applied Entomology 125: 131-134.
- Molina-Rugama, A., Zanuncio, J.C., Torres, J.B., Zanuncio, T.V. 1997. Longevidad y fecundidad de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado con *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) y frijol. Revista de Biología Tropical 45: 1125-1130.
- Molina-Rugama, A.J., Zanuncio, J.C., Zanuncio, T.V., Oliveira, M.L.R. 1998. Reproductive strategy of *Podisus rostralis* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) females under different feeding intervals. Biocontrol Science and Technology 8: 583-588.
- Moshi, A., Matoju, I. 2017. The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. Review. Crop Protection 92: 16-28.
- Moustafa, M.A.M., Kakai, A., Awad, M., Fonagy, A. 2016. Sublethal effects of spinosad and emamectin benzoate on larval development and reproductive activities of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae). Crop Protection 90: 197-204.

- Oliveira, H.N., Pratisoli, D., Pedruzzi, E.P., Espindula, M.C. 2004. Desenvolvimento do predador *Podisus nigrispinus* alimentado com *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39: 947-951.
- Orr, N., Shaffner, A.J., Richey, K., Crouse, G.D. 2009. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. Pesticide Biochemistry and Physiology 95: 1-5.
- Pimentel, D. 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. Journal of Agricultural and Environmental Ethics 8: 17-29.
- Poderoso, J.C.M., Correia-Oliverira, M.E., Chagas, T.X., Zanuncio, J.C., Ribeiro, G.T. 2016. Effects of plant extracts on developmental stages of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). Florida Entomologist 99: 113-116.
- Prezoto, F., Santos-Prezoto, H.H., Machado, V.L.L., Zanuncio, J.C. 2006. Prey captured and used in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) nourishment. Neotropical Entomology 35: 707-709.
- Pradeepa, V., Senthil-Nathan, S., Sathish-Narayanan, S., Selin-Rani, S., Vasantha-Srinivasan, P., Thanigaivel, A., Ponsankar, A., Edwin, E.S., Sakthi-Bagavathy, M., Kalaivani, K., Murugan, K., Duraipandiyan, V., Al-Dhabi, N. A. 2016. Potential mode of action of a novel plumbagin as a mosquito repellent against the malarial vector *Anopheles stephensi*, (Culicidae: Diptera). Pesticide Biochemistry and Physiology 134: 84-93.

Salgado, V.L. 1997. The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to Earth*. 52: 35-43.

Samuelson E.E.W., Chen-Wishart, Z.P., Gill, R.J., Leadbeater, E. 2016. Effect of acute pesticide exposure on bee spatial working memory using an analogue of the radial-arm maze. *Scientific Reports* 6: 38957.

Santos, B.D.B., Ramalho, F.S., Malaquias, J.B., Lira, A.C.S., Pachú, J.K.S., Fernandes, F.S., Zanuncio, J.C. 2016. How predation by *Podisus nigrispinus* is influenced by developmental stage and density of its prey *Alabama argillacea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 158: 142-151.

Silveira, T.M., Alves, R.D., de Queiroz, M.E.L.R., Neves, A.A., Coutrim, M.X., Afonso, R.J.C.F., Silva, G.A. 2016. Study of analytical techniques to determine chlorpyrifos in the surface waterways of the rural zone of Ouro Branco, Brazil: A case study. *Water, Air & Soil Pollution* 227: 335.

Stark, J.D., Banks, J.E., Acheampong, S. 2004. Estimating susceptibility of biological control agents to pesticides: influence of life history strategies and population structure. *Biological Control* 29: 392-398.

Strapasson, P., Pinto-Zevallos, D.M., Zarbin, P.H.G. 2016. Soybean (*Glycine max*) plants genetically modified to express resistance to glyphosate: can they modify airborne signals in tritrophic interactions?. *Chemoecology* 26: 7-14.

- Tabashnik, B.E., Mota-sanchez, D., Whalon, M.E., Hollingworth, R. M., Carriere, Y. 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *Journal of Economic Entomology* 107: 496-507.
- Tate, L.G., Nakat, S.S., Hodgson, E. 1982. Comparison of detoxication activity in midgut and fat body during fifth instar development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Comparative Biochemistry and Physiology C Comparative Pharmacology* 72: 75-81.
- Tavares, W.S., Costa, M.A., Cruz, I., Silveira, R.D., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2010. Selectivity effects of natural and synthect insecticides on morthality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Environment Science and Health Part B Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Waste* 45: 557-561.
- Thompson G.D., Dutton R., Sparks T.C. 2000. Spinosad - A case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science* 56: 696-702.
- Thompson, G.D., Michel, K.H., Yao, R.C., Mynderse, J.S., Mosburg, C.T., Worden, T.V., Chio, E.H., Sparks, T.C., Hutchins S.H. 1997. The discovery of *Saccharopolyspora spinosa* and a new class of insect control products. *Down to Earth*. 52: 1-5.

- Torres, J. B., Ruberson, J. R. 2004. Toxicity of thiamethoxam and imidacloprid to *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) nymphs associated to aphid and whitefly control in cotton. *Neotropical Entomology* 33: 99-106.
- Watson G.B. 2001. Actions of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 71: 20-28.
- Whalon, M.E., Mota-Sanchez, D. Hollingworth, R.M. 2016. Arthropod Pesticide Resistance Database. ([http:// www.pesticideresistance.com/index.php](http://www.pesticideresistance.com/index.php)).
- Xu Y., Song N., Zhang Q., Liu J., Chen G., Shi L., Wang J. 2017. A strategy for the evaluation of an analytical approach for selected pesticide residues in complex agricultural product matrices - A case study of leek. *Food Chemistry* 221: 205-213.
- Zadoks J.C., Waibel, H. 2000. From pesticides to genetically modified plants: history, economics and politics. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* 48: 125-149.
- Zanuncio, J.C. 1993. *Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia e controle*. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais / Sociedade de Investigações Florestais 140pp.
- Zanuncio, J.C., Batalha, V.C., Guedes, R.N.C., Picanço, M.C. 1998. Insecticide selectivity to *Supputius cincticeps* (Stal) (Het., Pentatomidae) and its prey

- Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lep., Noctuidae). Journal of Applied Entomology 122: 457-460.
- Zanuncio, J.C., Molina-Rugama, A.J., Serrão, J.E., Pratisoli, D. 2001. Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with combinations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. Biocontrol Science and Technology 11: 331-337.
- Zanuncio, J.C., Saavedra, J.L.D., Oliveira, H.N., Gheele, D., Clercq, P. 1996. Development of the predatory stinkbug *Brontocoris tabidus* Signoret Heteroptera: Pentatomidae on different proportions of an artificial diet and pupae of *Tenebrio molitor* L. Coleoptera: Tenebrionidae. Biocontrol Science and Technology 6: 618-626.
- Zanuncio, J.C., Silva, C.A.D, Lima, E.R., Pereira, F.F., Ramalho, F.S., Serrão, J.E. 2008. Predation rate of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with and without defense by *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Brazilian Archives of Biology and Technology 51:121-125.
- Zanuncio, J.C., Tavares, W.S., Fernandes, B.V., Wilcken, C.F., Zanuncio, T. V. 2014. Production and use of Heteroptera predators for the biological control of *Eucalyptus* pests in Brazil. Ekoloji 23: 98-104.

Zhang, W., Jiang, F., Ou, J. 2011. Global Pesticide consumption and pollution: with China as a focus. Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences 1: 125-144.

Capítulo 1

Mudanças histológicas causadas pelo inseticida espinosade no intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)

Valdeir Celestino dos Santos Junior^a, Luis Carlos Martinez^a, Angélica Plata-Rueda^b, José Eduardo Serrão^c, José Cola Zanuncio^a

^aBioagro, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. scvaldeir@hotmail.com, lc.martinez@outlook.com, zanuncio@ufv.com

^bInstituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, 38810-000, Rio Paranaíba, Minas Gerais, Brasil; angelicaplata@yahoo.com.mx

^cDepartamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil. jeserrao@ufv.br

Resumo: *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae) é um importante agente de controle biológico devido a sua ocorrência natural, agressividade, voracidade e por ser um predador generalista. O uso de pesticidas de amplo espectro é um risco para esse inseto em programas de controle biológico. Moléculas mais seletivas vem sendo introduzidas no mercado e o espinosade é descrito como seletivo a grande parte dos inimigos naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças histológicas no intestino médio de *P. nigrispinus* exposto ao inseticida espinosade. Teste de toxicidade foi realizado a fim de estimar as concentrações letais (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e CL₉₉).

Pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) contaminadas pela CL₅₀ de espinosade foram dadas como alimento para *P. nigrispinus* e após os tempos 30 minutos, 1, 3 e 6 horas do início da alimentação, o intestino médio, separado nas regiões anterior, médio e posterior, como tecido não alvo e o cérebro como tecido controle foram extraídos. Técnicas de Microscopia de luz e confocal foram realizadas para verificar as mudanças histológicas e morte celular, respectivamente. O espinosade foi tóxico ao *P. Nigrispinus* com uma CL₅₀ de 2,22 µL (1,898-2,457). A vacuolização e perda da matriz peritrófica foram sintomas histológicos observados, causados pelo espinosade. A vacuolização tem a função de tentar retirar substâncias tóxicas de dentro da célula. A perda da matriz peritrófica pode permitir danos ao tecido do órgão e a entrada de microrganismos no tecido. A morte celular foi o resultado final da contaminação do tecido, que perde a capacidade de defesa e de absorver nutrientes, levando o inseto morte. O espinosade foi tóxico para o *P. nigrispinus*, e sua CL₅₀ causou mudanças histológicas, levando a célula das três regiões do intestino médio a morte.

Palavras chave: controle biológico, inseticida, matriz peritrófica, organismo não-alvo, toxicidade

Abstract: *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae) is an important biological control agent due to its natural occurrence, aggressiveness, voracity and being a general predator. The use of broad spectrum pesticides is a risk for the use of biological control. More selective molecules have been introduced in the market and spinosad is described as selective of most of the natural enemies. The objective of this work was to

evaluate the histopathology in the midgut of *P. nigrispinus* exposed to the insecticide spinosad. Toxicity test was performed to verify toxicity of the insecticide to the predator and its lethal concentrations (LC₂₅, LC₅₀, LC₇₅, LC₉₀ and LC₉₉). *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae contaminated by the LC₅₀ of spinosad were offered as food source to *P. nigrispinus* for 30 minutes, one, three and six hours after feeding. Midgut as non-target tissue and brain as control tissue were extracted. Midgut was separated in the anterior, middle and posterior regions. Light microscopy and confocal microscopy were performed to verify histological changes and cell death, respectively. Spinosad was toxic to *P. nigrispinus*. Many are the works that bring spinosad as lethal to natural enemies. The vacuolization and peritrophic matrix loss are signs of cell intoxication. Vacuolation has the function of try to remove toxic substances from cell interior. The loss of the peritrophic matrix can cause damage to the organ tissue and allow the entry of microorganisms into the tissue. Cell death is the end result of tissue contamination, which loses the ability to defend and absorb nutrients, leading to insect death. Spinosad is toxic to *P. nigrispinus*, and its LC₅₀ promotes histological changes, leading to cell death in the three regions of the midgut.

Key words: Biological control, insecticide, non-target organism, peritrophic matrix, toxicity

Introdução

Podisus nigrispinus (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) é um predador importante no Brasil com ocorrência natural, agressividade, voracidade e generalista. Este predador é utilizado em programas de controle biológico em cultivo como algodão,

soja e plantios florestais (Medeiros et al. 2004; Zanuncio et al. 2014; Castro et al. 2015; Poderoso et al. 2016). Adultos e ninfas de *P. nigrispinus* se alimentam de várias espécies-pragas pertencentes às ordens Lepidoptera e Coleoptera (Lemos et al., 2005; De Bortoli et al., 2011; Zanuncio et al., 2016; Bottega et al., 2017).

O aumento no uso de pesticidas sintéticos pode provocar o surgimento de pragas resistentes, bem como de efeitos negativos ao meio ambiente e à saúde humana, e isso vem aumentando a demanda por produtos mais saudáveis pelos consumidores, revigorando a pesquisa de novas moléculas (Moshi & Matoju, 2017). Efeitos de inseticidas sobre insetos benéficos à agricultura como abelhas, predadores e parasitoides tem sido relatados (Cook et al., 2016; Samuelson et al., 2016; Lefebvre et al., 2017). Inseticidas usados no manejo integrado de pragas (MIP) em muitos sistemas de produção devem ser compatíveis com agentes de controle biológico (Michaud & Grant, 2003).

O excesso de agrotóxicos pode reduzir populações de inimigos naturais (Regan et al., 2017). A manutenção e preservação desses organismos no agroecossistema deve ser considerada no do MIP, e auxiliar o manejo da resistência de insetos a inseticidas (Ghazy et al., 2016), reduzindo frequências e volumes de aplicação. Novos produtos seletivos vêm sendo desenvolvidos e utilizados em substituição à pesticidas convencionais que causam efeitos indesejáveis à organismos não-alvo e à saúde humana (Moustafa et al., 2016).

Espinosade é uma molécula do grupo das espinosinas, com atividade inseticida seletiva à algumas espécies e considerada de baixo risco (Anjum & Wright, 2016; Bai et al., 2016). Nas condições naturais, a espinosina é secretado pela bactéria *Saccharopolyspora spinosa*, e tem alta eficácia comparada com outras classes de

inseticidas (Thompson et al., 1997, Cleveland et al., 2002). O espinosade possui atividade neurotóxica semelhante aos inseticidas do grupo dos neonicotinóides, mas diferindo no sítio específico de sua ligação ao receptor de acetilcolina nicotínico e/ou ao receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) (Salgado 1997; Thompson et al., 2000; Watson 2001, López et al., 2012). O espinosade tem sido indicado para cultivos orgânicos e no manejo integrado em rotação com moléculas como o imidaclopride (Orr et al., 2009; Gonzáles-Cobos et al., 2016; Herbst et al., 2017).

O intestino médio do inseto está envolvido com digestão e absorção de nutrientes, produção de enzimas, e se encontra dividido em três porções, um intestino médio anterior e posterior largo, e um intestino médio tubular (Gonçalves et al., 2016). O epitélio do órgão é composto de uma única camada de células colunares uniformes (Rost et al., 2005) e secreta a matriz peritrófica, um envelope que envolve o bolo alimentar, separando o alimento do epitélio (Lehane, 1997). O intestino pode ser considerado a primeira barreira contra intoxicações e porta de entrada de substâncias em vários insetos (Tate et al., 1982; Pradeepa et al., 2016).

A utilização de moléculas para o controle de pragas, mesmo as mais seletivas, como o espinosade, pode gerar efeitos adversos em inimigos naturais, como *P. nigrispinus*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar toxicidade, mudanças histológicas e mortalidade celular no intestino médio de *P. nigrispinus* após consumir alimento contaminado por espinosade.

Material e Métodos

Insetos

Adultos de *P. nigrispinus* foram obtidos da criação massal do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural (Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil), mantida a 27 ± 2 °C, umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e 12:12 h de fotoperíodo (l:e). Esses insetos foram alimentados com pupas de *Tenebrio molitor* e folhas de *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex. Maiden) *ad libitum* (Neves et al., 2010).

Pupas de *T. molitor* 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 (UFV) em Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. Pupas de *T. molitor* foram mantidas em bandejas de plástico (60 cm de comprimento \times 40 cm de largura \times 12 cm de altura) com temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e 12:12 h de fotoperíodo (l:e). Adultos de *P. nigrispinus* e pupas de *T. molitor*, sem amputações ou malformações aparentes, foram utilizados nos bioensaios.

Bioensaios

Seis concentrações da molécula inseticida espinosade foram preparadas a partir do produto comercial Tracer® (Dow AgroSciences Industrial Ltda., São Paulo – SP, Brasil), diluídas em série, a partir da concentração inicial de uma parte do inseticida comercial, para uma parte de água destilada, além do controle (água destilada) foram ajustadas em 1 mL de solução estoque (tratamentos e água destilada): 0,75, 1,5, 3, 6, 12 e 24%(m/v). As

seis concentrações obtidas a partir das diluições foram aplicadas em um volume de 5 µL sobre a presa, *T. molitor*, para alimentação dos adultos de *P. nigrispinus*. Oitenta insetos foram utilizados por concentração do espinosade. Os insetos foram individualizados em tubos de vidro de fundo chato (2,5 x 9 cm). A mortalidade foi registrada, a cada 24 h, por 72 h após o início da exposição.

Dez pupas de *T. molitor* foram mergulhadas por 10 segundos numa solução inseticida à base de espinosade com CL₅₀ estimada (2,22 µL de ingrediente ativo/mL de solução, equivalente à CL₅₀ determinada anteriormente) e colocadas sobre papel toalha por um minuto para retirar o excesso de inseticida. Em seguida, as pupas foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato (2,5 x 9 cm) vedados com algodão hidrófilo, onde foram colocados um adulto de *P. nigrispinus* (com idade seis dias). Cada indivíduo permaneceu se alimentando da presa por 0,5, 1, 3 ou 6 h, constituindo os tratamentos. No controle, as presas foram mergulhadas em água destilada e oferecidas como alimento aos adultos de *P. nigrispinus* por uma hora.

Microscopia de luz

Adultos de *P. nigrispinus* foram alimentados por *T. molitor* contaminados com espinosade na concentração letal estimada de CL₅₀ em diferentes períodos de tempo (0,5, 1, 3 e 6 horas) e crioanestesiados a -4 °C. O cérebro e intestino médio foram dissecados em solução salina para insetos (NaCl 0,1 M; KH₂PO₄ 0,1 M e Na₂HPO₄ 0,1 M) e transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12 h à 5 °C. A seguir as amostras de intestino médio foram desidratadas em série crescente de etanol (70°, 80°, 90° e 95°v/v) e embebidas em historesina JB4 (Electron Microscopy Sciences,

Fcrt Washington, PA). Seções com 3 µm de espessura foram obtidas, coradas com hematexilina e ebsina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Microscopia confocal

Podisus nigrispinus foram alimentados com *T. molitor* contaminados com concentração letal estimada de CL₅₀ de espincidade. Após diferentes períodos de tempo de exposição (6, 12, 24 e 48 h), *P. nigrispinus* foram dissecados em tampão de fosfato de sódio (PBS a 0,1 M), o cérebro e as três regiões de intestino médio foram transferidos para solução fixadora de Zamboni por 2 h. A seguir, as amostras de intestino médio e cérebro foram lavadas com PBS contendo 1% de Triton X-100 (PBST) e incubadas com 1,5% de soro albumina bovina em PBST durante 15 min. As amostras foram incubadas com anticorpo anti-clivado-caspase 3 (Trevigen, Gaithersburg, MD, EUA) a 1:500 em PBST durante três dias. Após lavagem com PBST, as amostras foram incubadas com anticorpo IgG de coelho conjugado com FITC com isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 1:500 em PBST durante dois dias no escuro, lavadas com PBST. O núcleo foi corado com iodeto propídio (5 mg / mL) durante 5 min. As amostras de intestino médio foram montadas em lâminas de vidro com 50% Sacarose e examinadas usando um microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM510 META, Carl Zeiss, Jena, Germany).

Análise estatística

As concentrações letais CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀, CL₉₉ 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).

Resultados

Mortalidade

Toxicidade

As concentrações letais do espinosade ($\chi^2 = 30,6776$; gl= 5) foram tóxicas para adultos de *P. nigrispinus*. As cinco concentrações letais (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e CL₉₉) (Tabela 1) foram estimadas por Probit (χ^2 ; P< 0,001). A mortalidade foi < 1% no controle.

Mudanças histológicas

A estruturação histológica do cérebro de *P. nigrispinus* se apresenta normal, com células de formato regular e núcleos com cor e formato uniforme. O histologia do cérebro não apresentou mudanças visíveis entre tratamentos (Fig 1-A, B, C, D, E).

Intestino médio anterior

As células colunares do intestino médio anterior exibiram conformação normal, com núcleos evidentes e citoplasma com baixa vacuolização. As células se encontraram justapostas com matriz peritrófica de forma contínua e sem dobras (Fig 1- F). Após 30 minutos de exposição ao espinosade, a célula do intestino médio anterior não teve

mudanças (Fig 1-G). O aumento no número e tamanho dos vacúolos formados no interior das células, além da perda do formato colunar característico e a condensação da cromatina ocorrem após uma hora (Fig 1-H). A partir de três horas de exposição, não foi visível a matriz peritrófica e a célula começou a ter perda parcial de sua porção apical (Fig 1-I). Após seis horas de exposição ao espinosade, foi possível visualizar dobras do epitélio e todos os eventos visualizados nos tempos anteriores, foram repetidos (Fig 1-J).

Intestino Médio Médio

As células do intestino médio médio exibiram conformação colunar característico, núcleos evidentes, citoplasma com vacuolização normal e sem dobras (Fig 1-L). Após 30 minutos de exposição ao espinosade, o tecido apresentou características similares ao comparado ao controle (Fig 1-M). A partir de uma hora, a vacuolização e as dobras do epitélio aumentaram (Fig 1-N). Após três horas de exposição ao inseticida, os tecidos exibiram as mesmas características observadas nos tecidos dos indivíduos após uma hora de exposição (Fig 1-O). Após seis horas de exposição, as células do intestino médio médio começaram a eliminar material celular para o lúmen do órgão (Fig 1-P).

Intestino Médio Posterior

As células do intestino médio posterior do controle apresentaram aspectos semelhantes as do intestino médio médio e médio anterior (Fig 1-Q). Após 30 minutos de exposição ao alimento contaminado com espinosade, as células do intestino posterior não apresentaram sintomas de intoxicação (Fig 1-R). A partir de uma hora, a vacuolização foi observada (Fig 1-S), seguida de uma intensificação neste processo nos tempos 3 e 6 horas e a perda do formato característico da célula (Fig 1-T; 1-U).

Morte celular

Os tecidos do cérebro, intestino médio anterior, intestino médio médio e intestino médio posterior apresentaram um aumento na apoptose, com o passar dos tempos avaliados (Fig. 2).

Discussão

A mortalidade de *P. nigrispinus* demonstrou a sensibilidade desse predador ao espinosade. Cerca de 71% dos trabalhos publicados relatam o espinosade como letal a predadores e 100% dos trabalhos demonstram ser este inseticida tóxico para parasitoides (Biondi et al., 2012). O espinosade foi compatível com *Picromerus bidens* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) no manejo integrado de pragas (Mahdian et al., 2007). Este inseticida foi seletivo para inimigos naturais, incluindo *P. nigrispinus* (Salgado, 1998; Thompson & Hutchins, 1999; Torres et al., 2002). A seletividade do espinosade para organismos não alvo é discutível (Castro et al., 2013) devido a alterações em comportamento e morte de insetos benéficos, descritos como respostas a exposição (Desneux et al., 2007; Rabea et al., 2010).

A vacuolização após uma hora de alimentação mostra que o processo é a primeira resposta a contaminação nas três regiões do intestino (Bravo et al., 1992). A vacuolização é um processo associado à ação detoxicante, responsável por defender células e evitar que grandes quantidades de substâncias atinjam demais órgãos (Wang et al., 2013). A intensa vacuolização do citoplasma tem sido caracterizado como processo de morte celular causado por autofagia (Levine & Klionsly, 2004), provocando a perda da forma padrão e aparência de degeneração da célula indicam o processo de apoptose celular (Gonçalves et

al., 2016). Inseticidas provocaram danos estruturais à células de intestino de larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae) (Alves et al., 2010). A condensação da cromática ocorre normalmente no momento de mitose celular (Dou et al., 1999), e em casos de citotoxicidade, a cromatina condensada é um dos sintomas de apoptose (Wahab et al., 2009). Os inseticidas cipermetrina, malation e o óleo de nem aumentaram a condensação de cromatina em células da glândula de seda de lagartas de terceiro instar da *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) (Santos et al., 2014). A ruptura da matriz peritrófica diminui a sobrevivência de insetos, sendo esta, responsável por proteger o epitélio de abrasões e microrganismos, além de promover compartimentação de enzimas (Bolognesi, 2008). *Bacillus thuringiensis* causa o distanciamento da matriz peritrófica e do epitélio de *Psoroptes cuniculi* (Delafond, 1859) (Sarcoptiformes: Psoroptidae) (Dunstand-Guzmán et al., 2015). A desorganização do epitélio reduz a resposta à intoxicação, sendo este responsável por ativar resposta de defesa do órgão (Janeh et al., 2017). O inseticida lufenuron provocou a desorganização do epitélio de *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae) (Costa et al., 2017), semelhante ao encontrado neste trabalho.

O tempo requerido pelo bolo alimentar no trato digestivo e as diferentes funções que cada região do intestino desempenham podem ser responsáveis pelas diferenças de sintomas nas três partes do intestino médio (Trumm & Dorn, 2000; Bu & Chen 2009). O movimento peristáltico é responsável por realizar a passagem do bolo alimentar através do sistema digestivo do inseto (Gallopín & Kitching, 1972). As três regiões do intestino médio apresentam histologia diferente e funções distintas, proporcionando uma melhor alimentação e digestão (Guedes et al., 2007).

A morte celular foi contínua em todos os tecidos avaliados onde o inseto ingeriu alimento contaminado com espinosade. Pesticidas provocam estresse oxidativo, aumentando as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a diminuição da habilidade de defesa de antioxidantes e indução da fragmentação do DNA, provocando morte celular (Astiz et al., 2009). O progresso na mortalidade de células sugere falta de capacidade das células em se recuperar, sendo a apoptose um processo autodestrutivo, que tem papel importante na determinação de sobrevivência celular (Shao et al., 2016). O espinosade é conhecido por provocar apoptose em células de *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (Gu et al., 2014; Yang et al., 2017).

O espinosade é tóxico para o *P. nigrispinus*, e sua CL₅₀ provocou mudanças histológicas, causando a morte das células das três regiões do intestino médio. O intestino médio é importante para alimentação do inseto, sendo este órgão responsável pela absorção de nutrientes utilizados na manutenção da vida do inseto.

Referências

- Alves, S. N., Serrão, J.E., Melo, A.L. 2010. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron* 41: 592–597.
- Anjum, F., Wright, D. 2016. Relative toxicity of insecticides to the crucifer pest *Plutella xylostella* and *Myzus persicae* and their natural enemies. *Crop Protection* 88: 131-136.

- Astiz, M., Alaniz, M. J. T., Marra, C. A. 2009. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 2025-2032.
- Bai, Y., Shen, X., Li, Y., Dai, M. 2016. Total synthesis of (-) –Spinosyn A via carbonylative macrolactonization. *Journal of the American Chemical Society* 138: 10838-10841.
- Bolognesi, R., Terra, W. R., Ferreira, C. 2008. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency theoretical and experimental models. *Journal of Insect Physiology* 54: 1413-1322.
- Bottega, D. B., Souza, B. H. S., Rodrigues, N. E. L., Barbosa, J. C., Boiça Junior, A. L. 2017. Resistant and susceptible tomato genotypes have direct and indirect effects on *Podisus nigrispinus* preying on *Tuta absoluta* larvae. *Biological Control* 106: 27-34.
- Bravo, A., Jansens, S., Peferoen, M. 1992. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 237-246.
- Bu, S. H., Chen, H. 2009. The alimentary canal of *Dendroctonus arandi* Tsai and Li (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *The Coleopterists Bulletin* 63: 485-496.
- Castro, A. A., Correa, A. S., Legaspi, J. C., Guedes, R. N. C., Serrão, J. E., Zanuncio, J. C. 2013. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* 93: 1043-1050.

- Castro, A. A., Poderoso, J. C. M., Ribeiro, R. C., Legaspi, J. C., Serrão, J. E., Zanuncio, J. C. 2015. Demographic parameters of the insecticide-exposed predator *Podisus nigrispinus*: implications for IPM. *BioControl* 60(2): 231-239.
- Cleveland C.B., Mayes M.A., Cryer S.A. 2002. An ecological risk assessment for spinosad use on cotton. *Pest Management Science* 58: 70–84.
- Cook, N., Green, J., Shuker, D. M., Whitehorn, P. R. 2016. Exposure to the neonicotinoid imidacloprid disrupts sex allocation cue use during superparasitism in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Ecological Entomology* 41: 693-697.
- Costa, H.N., Cunha, F.M., Cruz, G.S., D'Assunção, C.G., Rolim, G.G., Barros, M. E.D.G., Breda, M.O. 2017. Lufenuron impact upon *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) midgut and its reflection in gametogenesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 137: 71-80.
- De Bortoli, S.A., Otuka, A.K., Vacari, A.M., Martins, M.I.E.G., Volpe, H.X.L. 2011. Comparative biology and production costs of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) when fed different types of prey. *Biological Control* 58: 127–132
- Dou, Y., Mizzen, C.A., Abrams, M., Allis, C.D., Gorovsky, M.A. 1999. Phosphorylation of linker histone H1 regulates gene expression in vivo by mimicking H1 removal. *Molecular Cell* 4: 641-647.
- Dustand-Guzmán, E., Peña-Chora, G., Hallal-Calleros, C., Pérez-Martínez, M., Hernández-Velazquez, V.M., Morales-Montor, J., Flores-Pérez, F. 2015. Acaricidal effect and histological damage induced by *Bacillus thuringiensis* protein extracts on the mite *Psoroptes cuniculi*. *Parasites & Vectors* 8: 285.
- Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. Cambridge University press.

- Gallopín, G.C., Kitching, R.L. 1972. Studies on the process of digestion in the predatory bug *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). The Canadian Entomologist 104: 231-237.
- Ghazy, N.A., Osakabe, M., Negm, M.W., Schausberger, P., Gotoh, T., Amano, H. 2016. Phytoseiid mites under environmental stress. Biological Control, 96, 120-134.
- Gonçalves, T.S., Soares, M.A., Santos, C.A., Santos, D.A., Santos, J.B., Barroso, G.A. 2016. A Ingestão do herbicida isoxaflutole afeta o intestino médio e glândulas salivares de predadores Pentatomidae? Planta Daninha 34(1): 125-132.
- González-Cobos, L., Jimarez-Jimarez, N., Acosta-Velasco, E., Birke-Biewendt, A. 2016. Efecto del insecticida-cebo GF120TM sobre el comportamiento de forrajeo y ovoposición de *Anastrepha oblique*. Southwestern Entomologist 41: 813-825.
- Gu, Z., Zhou, Y., Xie, Y., Li, F., Ma, L., Sun, S., Wu, W., Wang, B., Wang, J., Hong, F., Shen, W., Li, B. 2014. The adverse effects of phoxim exposure in the midgut of silkworm, *Bombyx mori*. Chemosphere 96: 33-38.
- Guedes, B.A.M., Zanuncio, J.C., Ramalho, F.S., Serrão, J.E. 2007. Midgut morphology and enzymes of the obligate zoophytophagous stinkbug *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1863) (Heteroptera: Pentatomidae). The Pan-Pacific Entomologist 83: 66-74.
- Herbst, M., Razinger, J., Ugrinović, K., Škof, M., Schroers, H.J., Hommes, M., Poehling, H.M. 2017. Evaluation of low risk methods of managing *Delia radicum*, cabbage root fly, in broccoli production. Crop Protection 96: 273-280.
- Janeh, M., Osman, D., Kambris, Z. 2017. Damage-induced cell regeneration in the midgut of *Aedes albopictus* mosquitoes. Scientific Reports 7: 44594.

- Lefebvre, M., Franck, P., Olivares, J., Ricard, J.M., Mandrin, J.F., Lavigne, C. 2017. Spider predation on rosy apple aphid in conventional, organic and insecticide-free orchards and its impact on aphid population. *Biological Control* 104: 57-64.
- Lehane, M.J. 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* 42: 525-550.
- Lemos, WP, Ramalho, FS, Serrão, JE, Zanuncio, JC. 2005. Morphology of female reproductive tract of the predator *Podisus nigripisnus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on different diets. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 129-138.
- Levine, B., Klionsky, D.J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell* 6: 463-477.
- López, J.D., Jr Latheef, M.A., Fritz B.F. 2012. Effect of spinosad mixed with sucrose on gustatory response and mortality of adult Boll Weevils (Coleoptera: Curculionidae) by feeding and field assessment. *Journal of Cotton Science* 16: 152–159.
- Mahab, S.I.A., Abdul, A.B., Alzubairi, A.S., Elhassan, M.M., Mohan, S. 2009. In vitro ultramorphological assessment of apoptosis induced by zerumbone on (HeLa). *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 10 pages: 769568.
- Medeiros, R.S., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2004. Estimative of *Podisus nigripisnus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) development time with non linear models. *Neotropical Entomology* 33: 141–148.

- Michaud, J.P., Grant, A.K. 2003. IPM-compatibility of foliar insecticides for citrus: indices derived from toxicity to beneficial insects from four orders. *Journal of Insect Science* 3: 3-18.
- Moshi, A.P., Matoju, I. 2017. The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. Review. *Crop Protection* 92: 16-28.
- Moustafa, M.A.M., Kakai, A., Awad, M., Fonagy, A. 2016. Sublethal effects of spinosad and emamectin benzoate on larval development and reproductive activities of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Protection* 90: 197-204.
- Neves, R.C.D., Torres, J.B., Zanuncio, J.C. 2010. Production and storage of mealworm beetle as prey for predatory stinkbug. *Biocontrol Science and Technology* 20: 1013-1025.
- Orr N., Shaffner A.J., Richey K., Crouse G.D. 2009. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95: 1–5.
- Poderoso, J.C.M., Correia-Oliverira, M.E., Chagas, T.X., Zanuncio, J.C., Ribeiro, G.T. 2016. Effect of plant extracts on developmental stages of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) *Florida Entomologist* 99(1): 113-116.
- Pradeepa, V., Senthil-Nathan, S., Sathish-Narayanan, S., Selin-Rani, S., Vasanthasrinivasan, P., Thanigaivel, A., Ponsankar, A., Edwin, E.S., Sakthi-Bagavathy, M., Kalaivani, K., Murugan, K., Duraipandiyan, V., Al-Dhabi, N. A. 2016. Potential mode of action of a novel plumbagin as a mosquito repellent against the

- malarial vector *Anopheles stephensi* (Culicidae: Diptera). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 134: 84-93.
- Regan, K., Ordosch, D., Glover, K.D., Tilmon, K.J., Szczepaniec, A. 2017. Effect of a pyrethroid and two neonicotinoid insecticides on population dynamics of key pests of soybean and abundance of their natural enemies. *Crop Protection* 98: 24-32.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208–212.
- Rost, M.M., Kuczera, M., Malinowska, J., Polak, M., Sidor, B. 2005. Midgut epithelium formation in *Thermobia domestica* (Pachard) (Insect, Zygentona). *Tissue and Cell* 37: 135-143.
- Salgado, V.L. 1997. The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to Earth*. 52: 35–43.
- Samuelson, E.E.W., Chen-Wishart, Z.P., Gill, R.J., Leadbeater, E. 2016. Effect of acute pesticide exposure on bee spatial working memory using a analogue of the radial-arm maze. *Scientific Reports* 6: 38957.
- Santos, S.A., Fermino, F., Moreira, B.M.T., Araujo, K.F., Falco, J.R.P., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C. 2014. Critical electrolyte concentration of silk grand chromatin of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*, induced using agrochemicals. *Genetics and Molecular Research* 13: 7958-7964.
- SAS. 2002. The SAS System for Windows, release 9.0. SAS Institute, Cary, N.C.

- Shao, X., Lai, D., Zhang, L., Xu, H. 2016. Induction of autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/TOR pathways by azadirachtin A in *Spodoptera litura* cells. Scientific Reports 6: 35482.
- Stefanini, M., De Martino, C., Zamboni, L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. Nature 216: 173–174.
- Tate, L.G., Nakat, S.S., Hodgson, E. 1982. Comparison of detoxication activity in midgut and fat body during fifth instar development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Comparative Biochemistry and Physiology C Comparative Pharmacology 72: 75-81.
- Thompson, G.D., Michel, K.H., Yao, R.C., Mynderse, J.S., Mosburg, C.T., Worden, T.V., Chio, E.H., Sparks, T.C., Hutchins, S.H. 1997. The discovery of *Saccharopolyspora spinosa* and a new class of insect. Down to Earth. 52: 1–5.
- Thompson, G.D., Dutton, R., Sparks T.C. 2000. Spinosad - A case study: an example from a natural products discovery programme. Pest Management Science 56: 696–702.
- Trumm, P., Dorn, A. 2000. Effects of azadirachtin on the regulation of midgut peristalsis by the stomatogastric nervous system in *Locusta migratoria*. Phytoparasitica 28: 7-26.
- Wang, Y. H., Gu, Z. Y., Wang, J. M., Sun, S.S., Wang, B.B., Jin, Y.Q., Shen WD, Li B. 2013. Changes in the activity and the expression of detoxification enzymes in silkworms (*Bombyx mori*) after phoxim feeding. Pesticide Biochemistry and Physiology 105: 13–17.

- Watson, G.B. 2001. Actions of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 71: 20–28.
- Yang, M., Wang, B., Gao, J., Zhang, Y., Xu, W., Tao, L. 2017. Spinosad induces programmed cells death involves mitochondrial dysfunction and cytochrome C release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Chemosphere* 169: 155-161.
- Zanuncio, J.C., Mourão, S.A., Martinez, L.C., Wilcken, C.F., Ramalho, F.S., Plata-Rueda, A., Soares, M.A., Serrão, J.E. 2016. Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Scientific Reports* 6: 30261.
- Zanuncio, J.C., Tavares, W.D., Fernandes, B.V., Wilcken, C.F., Zanuncio, T.V. 2014. Production and use of Heteroptera predators for the biological control of eucalyptus pests in Brazil. *Ekoloji* 23: 98-104.

Tabela 1. Concentrações letais de espinosade em adultos de *Podisus nigrispinus*
(Heteroptera: Pentatomidae)

CL	VE	IC	χ^2
25	1.341	1.065 - 1.583	
50	2.186	1.898 - 2.457	
75	3.563	3.184 - 4.050	30.67
90	5.809	4.986 - 7.154	
99	16.87	12.42 - 26.45	

CL, concentração letal para matar 25%, 50%, 75%, 90% e 99% de adultos de *Podisus nigrispinus*; VE, valor estimado (mg ml^{-1}); IC, intervalo de confiança (mg.L^{-1}); χ^2 , qui-quadrado para concentração letal e limites fiduciais baseados em uma escala logarítmica em nível de significância em $P < 0,0001$.

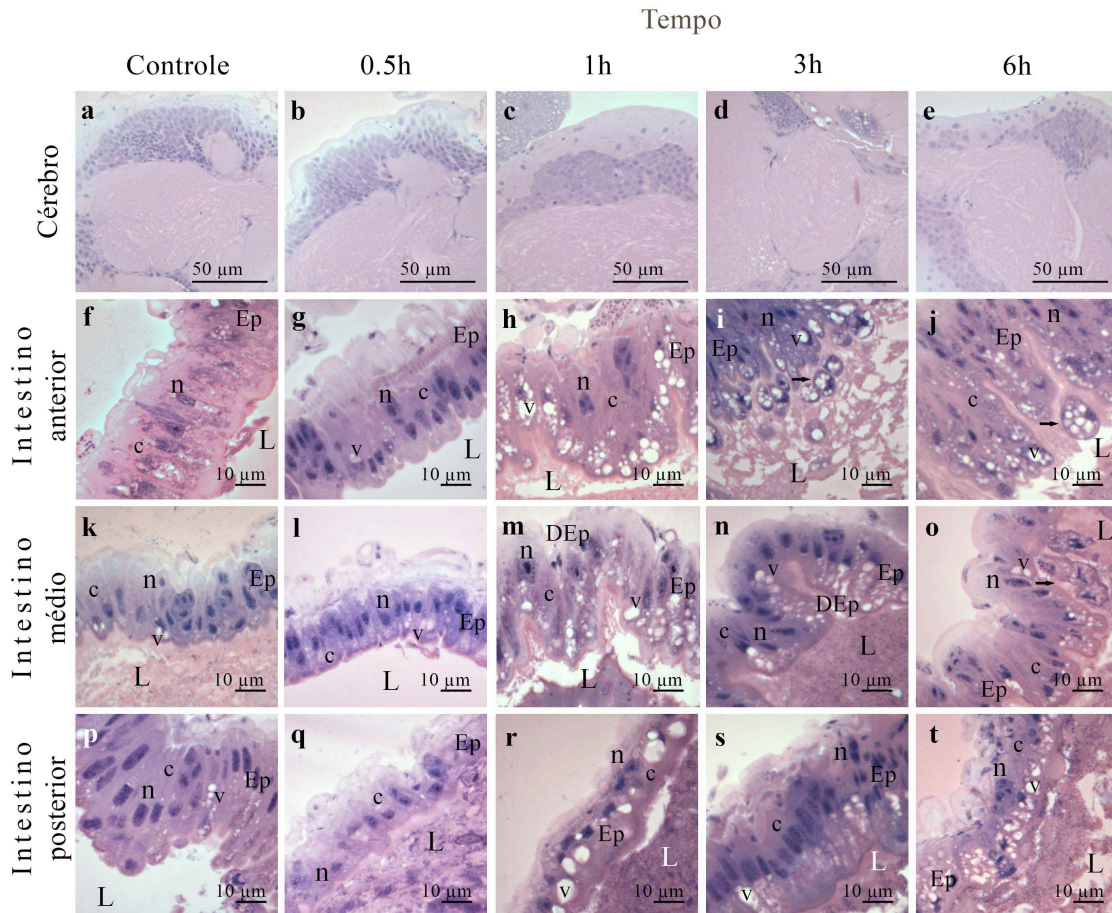


Figura 1. Secções histológicas do cérebro, intestino médio anterior, médio e posterior de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em diferentes tempos de alimentação contaminado com inseticida neurotóxico espinosade, mostrando epitélio (Ep), núcleo (n), citoplasma (c), vacúolo (V), lúmen (L) e formação de vesículas (seta), dobras do epitélio (DEp).

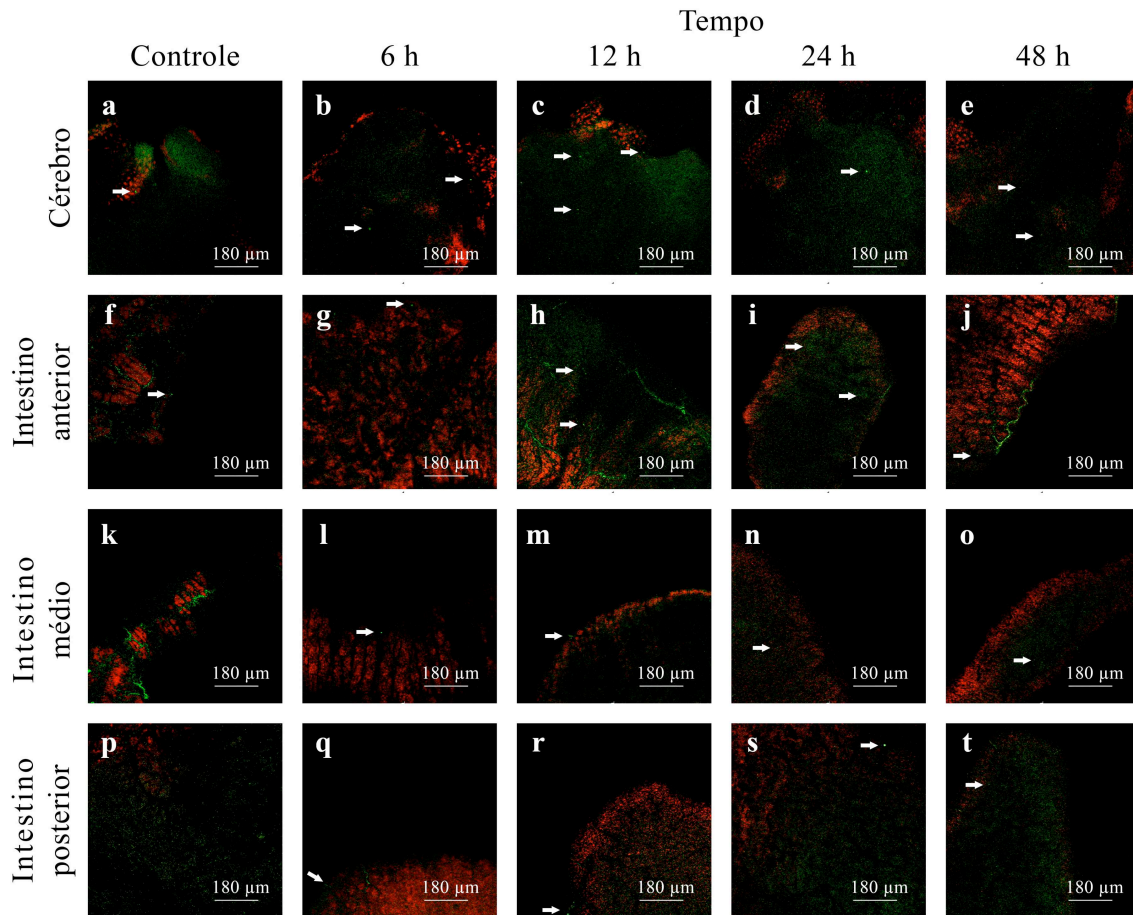


Figura 2. Imunofluorescência para detecção de apoptose em cérebro, intestino médio anterior, intestino médio médio e intestino médio posterior de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em diferentes tempos de exposição a alimento contaminado com inseticida neurotóxico espinosade, mostrando morte celular (seta).

Capítulo 2

Espinosade provoca mudanças histológicas nas glândulas salivares do percevejo predador, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)

Valdeir Celestino dos Santos Junior^a, Luis Carlos Martínez^a, Angelica Plata-Rueda^b, José Eduardo Serrão^{c*}, José Cola Zanuncio^{a*}

^aBioagro, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E.mail: scvaldeir@hotmail.com, lc.martinez@outlook.com, zanuncio@ufv.com

^bInstituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, 38810-000, Rio Paranaíba, Minas Gerais, Brasil; angelicaplata@yahoo.com.mx

^cDepartamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E.mail: jeserrao@ufv.br

Resumo: Para um bom manejo integrado de pragas, o controle biológico e o controle químico precisam ser compatíveis. As novas moléculas químicas que entram no mercado apresentam maior compatibilidade com inimigos naturais. O espinosade é descrito como seletivo para grande parte dos inimigos naturais, mas estudos vem demonstrando sua letalidade a diversos predadores e parasitoides. O objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças histológicas nas glândulas de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) exposto ao inseticida espinosade. Teste de toxicidade foi realizado a fim de verificar toxicidade do inseticida ao predador e suas concentrações letais (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e

CL₉₉). Pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) contaminadas pela CL₅₀ de espinosade foram dadas como alimento para *P. nigrispinus* e 30 minutos, 1, 3 e 6 horas após início da alimentação as Glândulas salivares (tecido não-alvo) e o cérebro (tecido controle) foram extraídas. As glândulas foram separadas em glândulas principais e glândulas acessórias. Microscopia de luz e confocal foram realizadas para verificar as mudanças histológicas e morte celular, respectivamente. O espinosade é tóxico ao *P. nigrispinus*, se mostrando letal ao inseto quando aplicado em suas presas. A vacuolização, seguida da desestruturação celular é um sintoma da intoxicação do inseto pelo espinosade. A vacuolização foi a primeira tentativa de detoxicação da célula. A desestruturação da célula foi decorrente da excessiva vacuolização e perda de partes essenciais para a sobrevivência celular. A apoptose avaliada em todos os tecidos foi progressiva. O espinosade é conhecido por induzir a morte programada de células pela disfunção mitocondrial. O espinosade foi tóxico para o percevejo predador *P. nigrispinus*, e sua CL₅₀ promove mudanças histológicas, levando a célula de glândulas salivares a morte.

Palavras-chave: apoptose, controle biológico, tecido não alvo, toxicidade, vacuolização celular

Abstract: For a good integrated pest management, biological control and chemical control must be compatible. The new chemical molecules that are entering the market are more compatible with natural enemies. Spinosad is described as selective to most of the natural enemies, but studies have shown its lethality to various predators and parasitoids.

The objective of this work was to evaluate the histological changes in the glands of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) exposed to the insecticide spinosad. Toxicity test was performed to verify toxicity of the insecticide to the predator and its lethal concentrations (LC₂₅, LC₅₀, LC₇₅, LC₉₀ and LC₉₉). *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae contaminated by spinosad LC₅₀ were given as food source to *P. nigrispinus* and 30 minutes, one, three and six hours after feeding, salivary glands as non-target tissue and brain as control tissue were extracted. The glands were separated into main glands and accessory glands. Light microscopy and confocal microscopy were performed to verify histological changes and cell death, respectively. Spinosad is toxic to *P. nigrispinus*, being lethal to predator when applied on its prey. Vacuolization, followed by cellular disruption is a symptom of insect poisoning by spinosad. Vacuolisation is the first attempt to detox the cell, the cell disruption is due to excessive vacuolization and loss of essential parts of cell. The apoptosis is seen in all tissues as progressive. Spinosad is known to induce programmed cell death by mitochondrial dysfunction. Spinosad is toxic to predatory bug *P. nigrispinus*, and its LC₅₀ promotes histological changes, leading the salivary gland cell to death.

Key words: apoptosis, biological control, cell vacuolation, non-target tissue, toxicity

Introdução

Diversos estudos vêm sendo realizados ao longo dos anos sobre o predador *P. nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) (Molina-Rugama et al., 1998; Magalhães et al., 2014), por apresentar grande potencial para compor programas de

controle biológico (Medeiros et al., 2000). Fatores como fácil criação massal e alta capacidade predatória (Zanuncio et al., 2001; De Bortoli et al., 2016) facilitam o uso do *P. nigrispinus* em culturas agrícolas e áreas florestais (Lemos et al., 2001; Zanuncio et al., 2014; Denez et al., 2015; Strapasson et al., 2016). O uso de *P. nigrispinus* em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), torna necessária a compatibilidade desse predador com outras formas de controle (Castro et al., 2015). Pesticidas como deltametrim, imidaclopride, metamidafos, espinosade, tiametoxam e clorantroliprol demonstram compatibilidade com *P. nigrispinus* (Torres & Ruberson, 2004; Castro et al., 2013).

Efeitos colaterais à saúde humana, à vertebrados e ao meio ambiente mostra a necessidade de se reduzir o uso de pesticidas (Zadoks & Waibel, 2000). Contaminação de corpos d'água, alimentos e trabalhadores por pesticidas (Gangemi, et al., 2016; Gérez et al., 2017; Rivera-Becerril et al., 2017) tem mudado o comportamento dos consumidores, onde cada vez mais, pressionam o setor agrícola por produtos mais sustentáveis (Fernández-Alba & Agüera, 2007). Com o desuso de moléculas como o organoclorados (Gueeque et al., 2013), a indústria química necessita produzir novas moléculas mais eficientes e menos tóxicas (Agnello et al., 2009).

O espinosade é uma molécula com atividade inseticida seletiva para algumas espécies artrópodes e de baixo risco para vertebrados e invertebrados (Liu et al., 2016; Kovariková et al., 2017). Pertencente ao grupo das espinosinas, em condições naturais, é secretada pela bactéria *Saccharopolyspora spinosa* (Actinomycetales: Pseudonocardiaaceae) e atualmente é utilizado para manejo de diversas pragas nos maiores países produtores agrícolas (Kirst, 2010). O espinosade é um inseticida neurotóxico (Salgado, 1998), semelhante ao grupo dos neonicotinóides (Mota-Sanchez et al., 2006),

mas diferindo no sítio específico de sua ligação aos receptores de acetilcolina nicotínico e do ácido gama-aminobutírico (GABA) (Watson, 2001). Em MIPs, o espinosade pode ser rotacionado com moléculas como o imidaclopride e amitraz (Orr et al., 2009; Jonsson et al., 2010).

A citotoxicidade por inseticidas, um novo ramo derivado da toxicologia e da citotoxicologia procura avaliar danos e elucidar o mecanismo de ação de moléculas químicas em células de insetos (Zhong et al., 2016). A citotoxicidade vem sendo utilizada como ferramenta para entender os efeitos de substâncias potencialmente tóxicas em tecidos alvo e não alvo de diferentes organismos (Davila et al., 1998; Yang et al., 2017).

P. nigrispinus apresenta hábito alimentar zoofitófago (Torres & Boyd, 2006) e a digestão ocorre através da injeção de saliva na presa, um processo chamado de digestão extra-oral (Gonçalves et al., 2016). As glândulas salivares desse inseto produzem saliva composta por diferentes substâncias tais como água, lipídios, carboidratos e enzimas favorecendo a digestão extra-oral, além de manter a eficácia no consumo das presas (Martínez et al., 2014), embora, compostos tóxicos proteicos e não proteicos desse inseto são responsáveis pela paralização e morte da presa (Cohen, 1990; Martínez et al., 2016). Por apresentar grande quantidade de substâncias na saliva, sua produção apresenta alto custo energético na digestão extra-oral (Martínez et al., 2014; Martínez et al., 2016). Cerca de 79% dos artrópodes terrestres predadores utilizam a digestão extra-oral como forma de alimentação, e através da injeção de compostos tóxicos em suas presas, estes aumentam sua eficiência na extração de matéria e nutrientes da presa (Cohen, 1995).

Predadores tem tolerância relativa a inseticidas, o que enfatiza a importância para o potencial sucesso de programas de MIP (Zanuncio et al., 2011). Embora exista pouca

informação dos efeitos histológicos e ultraestruturais causados em insetos predadores quando expostos a inseticidas usados para o controle de suas presas. A utilização de tais moléculas para o controle de pragas, mesmo as mais seletivas, como o espinosade, pode gerar efeitos nocivos as populações desse inimigo natural com consequências diretas nas estratégias de predação e alimentação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar toxicidade, mudanças histológicas e mortalidade celular em glândulas salivares de *P. nigrispinus* após consumir alimento contaminado por espinosade.

Material e Métodos

Insetos

Adultos de *P. nigrispinus* foram obtidos da criação massal no Laboratório de Biologia Celular e Estrutural (Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil), mantida a 27 ± 2 °C, umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e 12: 12 h de fotoperíodo. Esses insetos foram alimentados com pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) e folhas de *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex. Maiden) *ad libitum* (Neves et al., 2010).

Pupas de *T. molitor* 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 (UFV) em Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. Pupas de *T. molitor* foram mantidas em bandejas de plástico (60 cm de comprimento \times 40 cm de largura \times 12 cm de altura) com temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e 12:12 h de fotoperíodo. Adultos de *P. nigrispinus* e

pupas de *T. molitor*, sem amputações ou malformações aparentes, foram utilizados nos bioensaios.

Bioensaio de toxicidade

Seis concentrações da molécula inseticida espinosade foram usadas nos teste de toxicidade a partir do produto comercial Tracer® SC 480 g L⁻¹ (Dow AgroSciences Industrial Ltda., São Paulo, SP, Brasil), diluídas em série, a partir uma solução estoque do inseticida comercial. Seis concentrações de espinosade além do controle (água destilada) foram ajustadas em 1 mL de solução estoque (tratamentos e água destilada): 0,75, 1,5, 3, 6, 12 e 24% (m/v). As seis concentrações obtidas a partir das diluições foram aplicadas em um volume de 5 µL sobre pupas de *T. molitor* e deixadas secar no ambiente. A seguir, pupas com expostas ao inseticida foram usadas como presa e oferecidas para alimentação do predador. Oitenta adultos de *P. nigrispinus* foram individualizados em tubos de vidro de fundo chato (2,5 × 9 cm), utilizados por concentração e o número de insetos mortos contados após a exposição das pupas de *T. molitor* com o inseticida em intervalos de 6 h até 72 h.

Alterações histológicas

Adultos de *P. nigrispinus* foram expostos à concentração letal estimada CL₅₀ do espinosade em diferentes períodos de tempo (0.5, 1, 3 e 6 h) e crioanestesiados a -4 °C. O cérebro e as glândulas salivares foram dissecados em solução salina para insetos (NaCl 0,1 M; KH₂PO₄ 0,1 M e Na₂HPO₄ 0,1 M) e transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12 h à 5 °C. A seguir as amostras foram desidratadas

em série crescentes de etanol (70°(v/v), 80°(v/v), 90°(v/v) e 95°(v/v)) e embebidas em historesina Leica (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). Seções com 3 µm de espessura foram obtidas, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Apoptose

O cérebro, a glândula salivar principal e glândula salivar acessória de *P. nigrispinus* expostos por 6, 12, 24 e 48 h ao espinosade (com a concentração letal estimada CL₅₀) 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 2 h.. A seguir, as amostras foram lavadas com PBS contendo 1% de Triton X-100 (PBST). As amostras foram incubadas com anticorpo anti-clivado-caspase 3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) diluído 1:500 em PBS por 24 h a -4°C. Após incubação, as amostras foram lavadas 10x em PBS e incubadas com anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado com isotiosinate de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) diluído 1:500 em PBS por 24 horas no escuro a -4°C. O cérebro, a glândula salivar principal e glândula salivar acessória, marcados para Caspase-3 foram lavados novamente, e os núcleos das células foram corados com iodeto TO-PRO-3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) durante 1 h. As amostras foram montadas em lamina de vidro com 50% sacarose e examinadas usando um microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Análise estatística

As concentrações letais CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀, CL₉₉ 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). 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 dos percevejos que sobreviveram até o final do experimento foram tratados como dados censurados.

Resultados

Toxicidade

As diferentes concentrações letais (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅, CL₉₀ e CL₉₉) foram estimadas pelo Probit (X^2 ; $P < 0,001$) (Tabela 1). As concentrações letais de espinosade ($X^2 = 30.67$; gl = 5, $P < 0,001$) demonstraram toxicidade deste composto a adultos de *P. nigrispinus*. Mortalidade foi < 1% no controle.

Histologia

A estruturação histológica do cérebro se apresentou normal, com células de formato firme e núcleo de cor e formato uniforme. O cérebro não apresentou mudanças histológicas visíveis entre controle e os tratamentos com espinosade (Figs. 1a-e).

A glândula salivar principal de *P. nigrispinus* não exposta ao inseticida não mostrou alterações nas células epiteliais. O epitélio foi formado por uma camada simples de células variando de cúbicas a colunares (Fig. 1f), com núcleo esférico bem

desenvolvido com predomínio de cromatina descondensada e nucléolo evidente. O citoplasma mostrou aspecto homogêneo com poucos vacúolos e grânulos. O conteúdo do lúmen teve aspecto homogêneo e acidófilo. Externamente, a glândula salivar principal estava revestida por uma membrana basal delgada.

Alterações histológicas no epitélio da glândula salivar principal foram observadas após 30 minutos da exposição do espinosade, mostrando células com um maior número e tamanho de vacúolos no citoplasma e núcleos com cromatina descondensada (Fig. 1g). O aumento de grânulos no citoplasma e perda do formato padrão das células de cúbicas a colunares que compõem o epitélio foram observados a partir de 1 h (Fig. 1h). Secreção apócrina no lúmen foi observada com aumento gradual entre 1 e 6 h (Figs. 1H-J). Após 3 h, as células secretoras do epitélio exibiram alto número de grânulos e vacúolos com formato irregular, núcleos dilatados, condensação de cromatina e ruptura da membrana plasmática com vazamento do conteúdo citoplasmático em direção ao lúmen (Fig. 1i). O epitélio da glândula salivar foi destruído após 6 h de exposição à espinosade (Fig. 1j). Ruptura da membrana plasmática foi total mostrando vazamento do conteúdo plasmático em direção ao lúmen e ruptura da membrana basal com vazamento do conteúdo plasmático em direção ao hemocele.

A glândula salivar acessória controle foi composta por células epiteliais colunares delimitando um estreito lúmen (Fig. 1k). O citoplasma das células secretoras da glândula salivar acessória foi caracterizado pelo acúmulo de vacúolos e material finamente granular no citoplasma, enquanto o núcleo foi esférico, bem desenvolvido com predomínio de cromatina condensada e nucléolo evidente. O número de vacúolos e grânulos no citoplasma e núcleos com cromatina descondensada aumentou a partir de 1 h

(Fig. 1l). Após 3 h, o formato das células se torna muito variado e pode ser visto inchaço celular, desorganização do conteúdo celular, vacuolização intensa e ruptura da membrana perinuclear (Fig. 1m). Células secretoras que compõem o epitélio foram destruídas após exposição por seis horas ao espinosade (Fig. 1n). A membrana citoplasmática não foi observada existindo uma mistura do conteúdo celular em direção ao lúmen (Fig 1-j).

Microscopia confocal

Os tecidos do cérebro, glândula posterior, lóbulo anterior e glândula acessória apresentaram um aumento na apoptose, com o passar dos tempos avaliados.

Discussão

Estudos com efeitos de dose letal relatam a mortalidade de insetos, mas as doses subletais estudadas são importantes por descrever variação de comportamento do inseto e respostas estruturais e ultraestruturais em células (Tomé et al., 2015; Adamski et al., 2016). O uso de novas moléculas de inseticidas, pouco conhecidos, podem aumentar seu uso por sua segurança ambiental, baseados apenas em sua origem natural (Tomé et al., 2015). Estudos relacionados a efeitos citotóxicos de inseticidas ainda são pouco relatados (Yun et al., 2017).

A mortalidade do *P. nigrispinus* pelo espinosade mostrou sua toxicidade a esse percevejo predador. Este inseticida afeta a ligação dos receptores de acetilcolina nicotínico no sistema neurológico, causando compulsórias contrações musculares, paralisia, interrupção da alimentação e morte (Salgado, 1998; Sparks et al., 2001). O espinosade estimula produção de espécies de oxigênio reativo, levando a apoptose de

células do fígado de *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) (Piner & Uner, 2013). O espinosade foi relatado como compatível com *P. nigrispinus* (Torres et al., 2002), e também como tóxico ao mesmo percevejo predador (Castro et al., 2015), demonstrando controversa seletividade (Castro et al., 2013). Alterações no comportamento e morte de insetos benéficos são descritos como respostas a exposição ao espinosade (Desneux et al., 2007; Rabea et al., 2010). O neurotóxico foi letal ou tóxico para predadores e parasitoides em 71% e 100% dos trabalhos, respectivamente (Biondi et al., 2012).

A vacuolização nas células da glândula principal é o primeiro sintoma, trinta minutos após a contaminação do inseto por espinosade. A vacuolização é a primeira forma de desintoxicação celular (Bravo *et al.* 1992). Bicho da seda apresenta aumento da vacuolização em glândulas de seda, quando se alimentam de folhas contaminadas com extratos botânicos de *Azadirachta indica* (Sapindale: Meliaceae), *Ocimum sanctum* (Lamiales: Lamiaceae) e *Parthenium hysterophorus* (Asterales: Asteraceae) (Naik & Naik, 2015). Resultado semelhante foi relatado em glândula salivar de *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) em fase larval quando utilizado *Metarhizium anisopliae* (Metch.) (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Sree & Padmaja, 2008). A desestruturação das células, seguida da perda do material para o lúmen da glândula, observada a partir de uma hora após a ingestão de alimento contaminado demonstra a tentativa da célula em retirar o material contaminado do interior das células (Gutierrez et al., 2007). *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) quando contaminada com *Brevibacillus laterosporus* (Bacillales: Paenibacillaceae) causa vacuolização e desorganização citoplasmática (Carramaschi et al., 2017). Em adição, fipronil causa mudanças

histológicas em tecidos reprodutivos de machos de *Coturnix japonica* (Galliformes: Phasianidae) (Khalil et al., 2017).

A apoptose é progressiva em todos os tecidos avaliados dos insetos que consumiram alimento contaminado por espinosade. O espinosade induz a morte programada de células pela disfunção mitocondrial e liberação de citocromo C em células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Yang et al., 2017). A apoptose ocorre naturalmente ou em resposta a algum tipo de estresse sofrido pela célula (Santos et al., 2015; Yang et al 2016). A mortalidade celular sugere a falta de capacidade do tecido em se recuperar da contaminação do tecido ao pesticida, diferente do intestino de *Callibaetis radiatus* (Ephemeroptera: Baetidae), que se recupera da contaminação por deltametrim 24 horas após contaminação (Gutiérrez et al., 2016). O espinosade pode apresentar toxicidade genética a insetos (Yang et al., 2016; Pires Aciole et al., 2014), causando a morte celular .

O espinosade é tóxico para o percevejo predador *P. nigrispinus*, e sua CL_{50} promove mudanças histológicas, levando a célula de glândulas salivares à morte. As glândulas salivares são de extrema importância para alimentação e reprodução, e consequente manutenção de insetos praga abaixo ao níveis de danos econômico de áreas agrícolas e florestais.

Referencias

Adamski, Z., Radtke, K., Kopiczko, A., Chowański, S., Marciniak, P., Szymczak, M., Spochacz, M., Faladella, P., Lelario, F., Scrano, L., Bufo, S.A. 2016. Ultrastructural and developmental toxicology of potato and tomato leaf extracts to

- beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: noctuidae). *Microscopy Research Technique* 79: 948–958.
- Agnello, A.M., Atanassov, A., Bergh, J.C., Biddinger, D.J., Gut, L.J., Haas, M.J., Harper, J.K., Hogmire, H.W., Hull, L.A., Kime, L.F., Krawczyk, G., McGhee, P.S., Nyrop, J.P., Reissig, W.H., Shearer, P.W., Straub, R.W., Villanueva, R.T., Walgenbach, J.F. 2009. Reduced-risk pest management programs for Eastern U.S. apple and peach orchards: a 4-year regional project. *American Entomologist* 55: 184–197.
- Biondi, A., Mommaerts, V., Smaghe, G., Viñuela, E., Zappalà, L., Desneux, N. 2012. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Management Science* 68: 1523–1536.
- Bravo, A., Jansens, S., Peferoen, M. 1992. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 237–246.
- Carramaschi, I.N., Pereira, L.A., Baia, V.S., Mallet, J.R.S., Queiroz, M.M C., Zahner, V. 2017. Laboratory evaluation of *Brevibacillus laterosporus* strains as biocidal agents against *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 146: 69–72.
- Cohen, A.C. 1990. Feeding adaptations of some predaceous Heteroptera. *Annals of the Entomological Society of America* 83: 1215–1223.
- Cohen, A.C. 1995. Extra-oral digestion in predaceous terrestrial arthropoda. *Annual Review of Entomology* 40: 85–103.

- Davila, J.C., Rodriguez, R.J., Melchert, R.B., Acosta, D.Jr. 1998. Predictive value of in vitro model systems in toxicology. *Annual Review of Pharmacological and Toxicology* 38: 63–96.
- De Bortoli, S.A., Vacari, A.M., Laurentis, V.L., De Bortoli, C.P., Santos, R.F., Otuka, A.K. 2016. Selection of prey to improve biological parameters of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) in laboratory conditions. *Brazilian Journal of Biology* 76: 307–314.
- Castro, A.A., Corrêa, A.S., Legaspi, J.C., Guedes, R.N., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2013. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* 93: 1043–1050.
- Castro, A.A., Poderoso, J.C.M., Ribeiro, R.C., Legaspi, J.C., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2015. Demographic parameters of the insecticide-exposed predator *Podisus nigrispinus*: implications for IPM. *BioControl* 60: 231–239.
- Denez, M.D., Bueno, A.F., Pasini, A., Bortolotto, O.C., Stecca, C.S. 2014. Biological parameters of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with different soybean insect pests. *Annals of the Entomological Society of America* 107: 967–974.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52: 81–106.
- Ferández-Alba, A.R., Agüera, A. 2007. Pesticides in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 1661–1661.
- Finney, D.J. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University Press.

- Gangemi, S., Miozzi, E., Teodoro, M., Briguglio, G., De Luca, A., Alibrando, C., Polito, I., Libra, M. 2016. Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans (Review). *Molecular Medicine Reports* 14: 4475–4488.
- Gérez, N., Pérez-Parada, A., Cesio, M.V., Heinzen, H. 2017. Occurrence of pesticide residues in candies containing bee products. *Food Control* 72: 293–299.
- Geueke, B., Garg, N., Ghosh, S., Fleischmann, T., Holliger, C., Lal, R., Kohler, H.P. 2013. Metabolomics of hexachlorocyclohexane (HCH) transformation: ratio of LinA to LinB determines metabolic fate of HCH isomers. *Environmental Microbiology* 15: 1040–1049.
- Gonçalves, T.S., Soares, M.A., Santos, C.A., Santos, D.A., Santos, J.B., Barroso, G.A. 2016. Does the ingestion of isoxaflutole herbicide affect the midgut and salivary glands of Pentatomidae predators?. *Planta Daninha* 34: 125–132.
- Gutierrez, M.G., Saka, H.A., Chinen, I., Zoppino, F.C., Yoshimari, T., Bocco, J.L., Colombo, M.I. 2007. Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 104: 1829–1834.
- Gutiérrez, Y., Helen, P.S., Serrão, J.E., Oliveira, E.E. 2016. Deltamethrin-mediated toxicity and cytomorphological changes in the midgut and nervous system of the mayfly *Callibaetis radiates*. *PLoS ONE* 11(3) 10.1371/journal.pone.0152383
- Jansson, N.N., Miller, R.J., Kemp, D.H., Knowles, A., Ardila, A.E., Verrall, R.G., Rothwell, J.T. 2010. Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the

- control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations with amitraz resistance. *Veterinary Parasitology* 169: 157–164.
- Khalil, S.R., Awad, A., Mohammed, H.H. 2017. Behavioural response and gene expression changes in fipronil-administered male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Environmental Pollution* 223: 51–61.
- Kirst, H.A. 2010. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *The Journal of Antibiotics* 63 101–111.
- Kovaríková, K., Holy, K., Skuhrovec, J., Saska, P. 2017. The efficacy of insecticides against eggs and nymphs of *Aleyrodes proletella* (Hemiptera: Aleyrodidae) under laboratory conditions. *Crop Protection* 98: 40-45.
- Lemos, W.P., Medeiros, R.S., Ramalho, F.S., Zanuncio, J.C. 2001. Effects of plant feeding on the development, survival and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *International Journal of Pest Management* 47: 89–93.
- Liu, Y., Li, X., Zhou, C., Liu, F., Mu, W. 2016. Toxicity of nine insecticides on four natural enemies of *Spodoptera exigua*. *Scientific Reports* 6: 39060.
- Magalhães, G.O., Vacari, A.M., Laurentis, V.L., De Bortoli, S.A., Polanczyk, R.A. 2014. Interactions of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides and the predatory stink bug *Podisus nigrispinus* to control *Plutella xylostella*. *Journal of Applied Entomology* 139: 123–133.
- Martínez, L.C. Fialho, M.C.Q., Zanuncio, J.C., Serrão J.E. 2014. Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Protoplasma* 251: 535–543.

- Martínez, L.C., Fialho, M.C.Q., Barbosa, L.C.A., Oliveira, L.L., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E. 2016. Stink bug predator kills prey with salivary non-proteinaceous compounds. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 68: 71–78.
- Medeiros, R.S., Ramalho, F.S., Lemos, W.P., Zanuncio, J.C. 2000. Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). *Journal of Applied Entomology* 124: 319–324.
- Molina-Rugama, A.J., Zanuncio, J.C., Zanuncio, T.V., Oliveira, M.L.R. 1998. Reproductive strategy of *Podisus rostralis* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) females under different feeding intervals. *Biocontrol Science and Technology* 8: 583-588.
- Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M., Grafius, E.J., Moyer, D.D. 2006. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Management Science* 62: 30–37.
- Naik, M.J., Naik, A.S. 2015. Impact of botanical extracts on histopathology of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 3: 281–287.
- Neves, R.C.D., Torres, J.B., Zanuncio, J.C. 2010. Production and storage of mealworm beetle as prey for predatory stinkbug. *Biocontrol Science and Technology* 20:1013-1025.
- Orr, N., Shaffner, A.J., Richey, K., Crouse, G.D. 2009. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95: 1–5.

- Piner, P., Üner, N. 2013. Oxidative stress and apoptosis was induced by bio-insecticide spinosad in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Environment Toxicology and Pharmacology* 36: 956–963.
- Pires Aciole, E.H., Guimarães, N.N., Silva, A.S., Amorim, E.M., Nunomura, S.M., Garcia, A.C.L., Cunha, K.S., Rohde, C. 2013. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Pest Management Science* 70: 559–565.
- Rabea, E.I., Nars, H.M., Badawy, M.E.I. 2010. Toxic effects and biochemical study of chlorfluazuron, oxymatrine, and spinosad on honey bees (*Apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58: 722–732.
- Rivera-Becerril, F., Tuinen, D.V., Chatagnier, O., Rouard, N., Béguet, J., Kuszala, C., Soulas, G., Gianinazzi-Pearson, V., Martin-Laurent, F. 2017. Impact of a pesticide cocktail (fenhexamid, folpel, deltamethrin) on the abundance of *Glomeromycota* in two agricultural soils. *Science of the Total Environment* 577: 84–93.
- Salgado, V.L. 1998. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 60, 91–102.
- Santos, D.E., Azevedo, D.O., Campos, L.A.O., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E. 2015. *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cell and increased autophagy. *Protoplasma* 252: 619–627.
- Sparks, T.C., Crouse, G.D., Durst, G. 2001. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure–activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest Management Science* 57: 896–905.

- Sree, K.S., Padmaja, V. 2008. Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch.) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates ultrastructural changes in the salivary glands of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae. *Toxicon* 51: 1140–1150.
- Strapasson, P., Pinto-Zevallos, D.M., Zarbin, P.H.G. 2016. Soybean (*Glycine max*) plants genetically modified to express resistance to glyphosate: can they modify airborne signals in tritrophic interactions?. *Chemoecology* 26: 7–14.
- Thompson, G., Hutchins, S. 1999. Spinosad: a new class of fermentation-derived insect control agent. *Pesticide Outlook* 10: 78–91
- Tomé, H.V.V., Barbosa, W.F., Martins, G.F., Guedes, R.N.C. 2015. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere* 124: 103–109.
- Torres J.B., Boyd, D.W. 2009. Zoophytophagy in predatory Hemiptera. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 1199–1208.
- Torres, J.B., Silva-Torres, C.S.A., Silva, M.R., Ferreira, J.F. 2002. Compatibilidade de inseticidas e acaricidas com o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) em algodoeiro. *Neotropical Entomology* 31: 311–317
- Torres, J.B., Ruberson, J.R. 2004. Toxicity of thiamethoxam and imidacloprid to *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) nymphs associated to aphid and whitefly control in cotton. *Neotropical Entomology* 33: 99–106.
- Watson G.B. 2001. Actions of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 71: 20–28.

- Yang, M., Wang, B., Gao, J., Zhang, Y., Xu, W., Tao, L. 2017. Spinosad induces programmed cells death involves mitochondrial dysfunction and cytochrome C release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Chemosphere* 169: 155–161.
- Yang, M., Xiang, G., Li, D., Zhang, Y., Xu, W., Tao, L. 2016. The insecticide spinosad induces DNA damage and apoptosis in HEK293 and HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environment Mutagenesis* 812: 12–19.
- Yun, X., Huang, Q., Rao, W., Xiao, C., Zhang, T., Mao, Z., Wan, Z. 2017. A comparative assessment of cytotoxicity of commonly used agricultural insecticides to human and insect cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137: 179–185.
- Zadoks J.C., Waibel, H. 2000. From pesticides to genetically modified plants: history, economics and politics. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* 48: 125–149.
- Zanuncio, J.C., Jusselino-Fillho, P., Ribeiro, R.C., Zanuncio, T.V., Ramalho, F.S., Serrão, J.E. 2011. Hormetic responses of a stinkbug predator to sublethal doses of pyrethroid. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87: 608–614.
- Zanuncio, J.C., Molina-Rugama, A.J., Serrão, J.E., Pratisoli, D. 2001. Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with combinations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology* 11: 331–337.
- Zanuncio, J.C., Tavares, W.S., Fernandes, B.V., Wilcken, C.F., Zanuncio, T.V. 2014. Production and use of Heteroptera predators for the biological control of *Eucalyptus* pests in Brazil. *Ekoloji* 23: 98–104.

Zhong, G., Cui, G., Yi, X., Sun, R., Zhang, J. 2016. Insecticide cytotoxicology in China: current status and challenges. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 132: 3–12.

Tabela 1. Concentrações letais de espinosade em adultos de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)

CL	VE	IC	χ^2
25	1.341	1.065 - 1.583	
50	2.186	1.898 - 2.457	
75	3.563	3.184 - 4.050	30.67
90	5.809	4.986 - 7.154	
99	16.87	12.42 - 26.45	

CL, concentração letal para matar 25%, 50%, 75%, 90% e 99% de adultos de *Podisus nigrispinus*; VE, valor estimado (mg ml^{-1}); IC, intervalo de confiança (mg L^{-1}); χ^2 , qui-quadrado para concentração letal e limites fiduciais baseados em uma escala logarítmica com nível de significância em $P < 0,0001$.

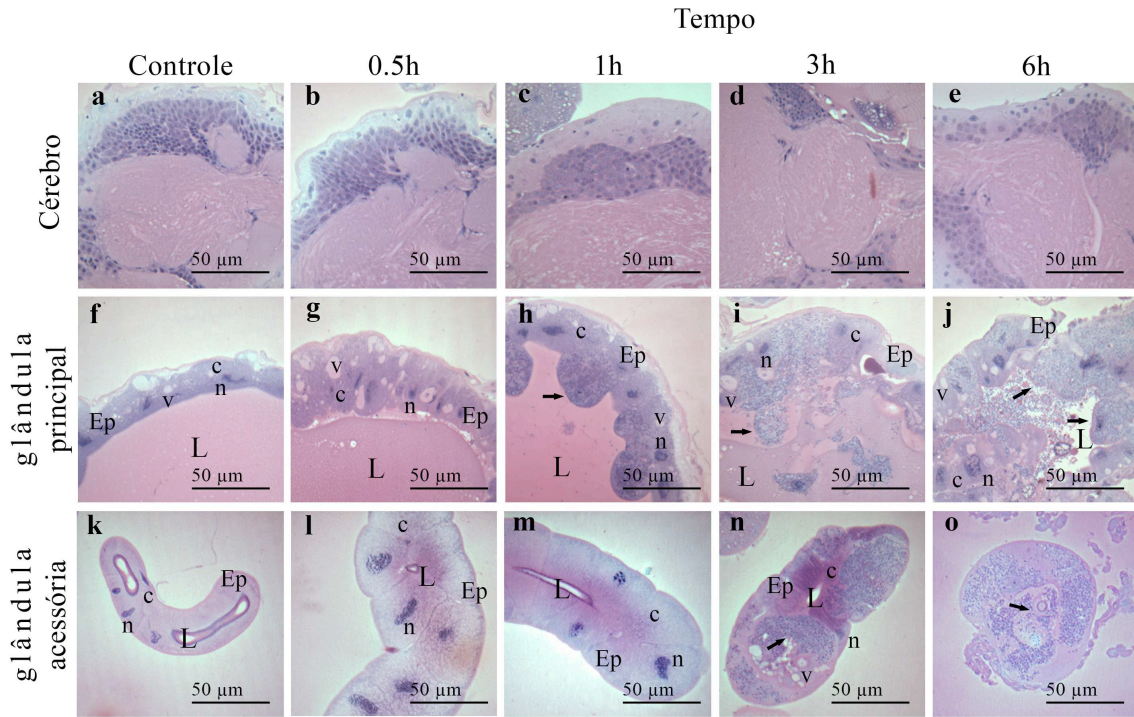


Figura 1. Secções histológicas do cérebro, glândula principal e glândula acessória de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em diferentes tempos de exposição a alimento contaminado com inseticida neurotóxico espinosade, mostrando epitélio (Ep), núcleo (n), vacúolo (V), lúmen (L) e perda de formato padrão de células das glândulas (seta).

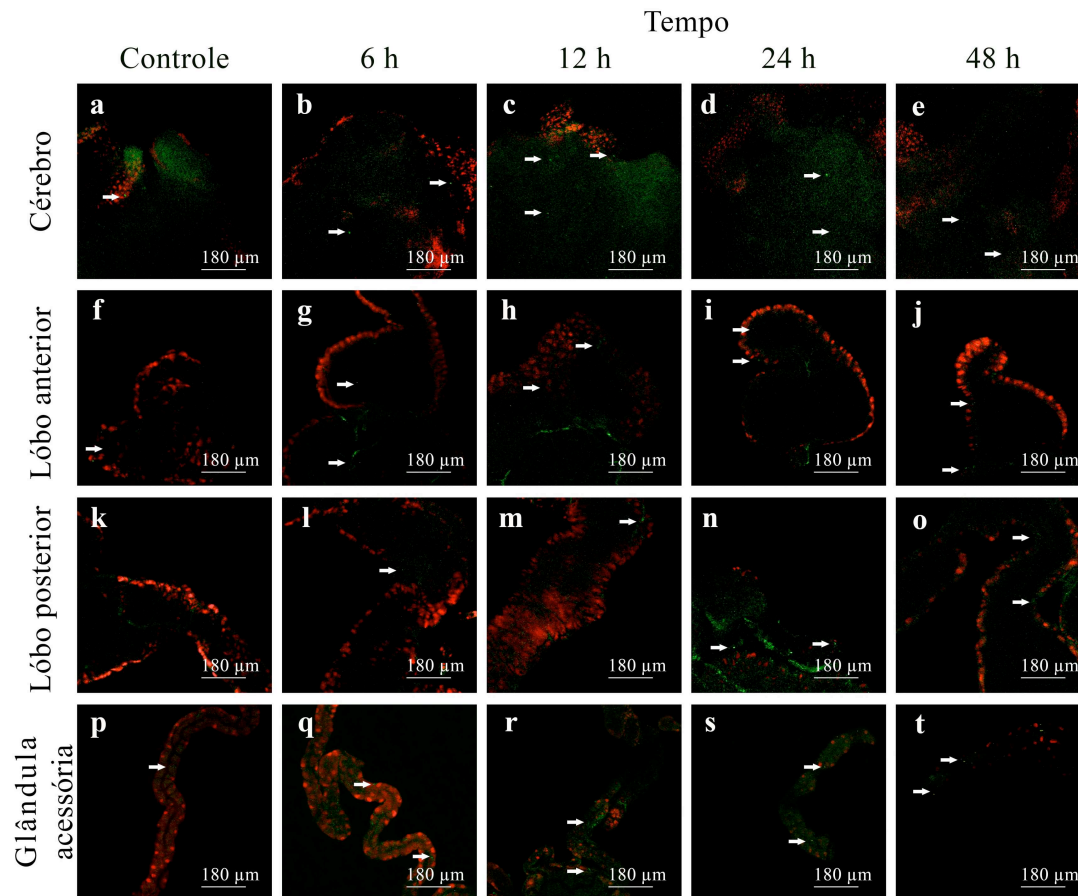


Figura 2. Imonofluorescência para detecção de apoptose em cérebro, glândula principal e glândula acessória de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em diferentes tempos de exposição a alimento contaminado com inseticida neurotóxico espinosade, mostrando morte celular (seta).