

# Interações entre anticontaminantes utilizados em dietas artificiais e suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae) a proteína Cry1Ac

PENTEADO, F.G.<sup>1</sup>; LOPES, I. de O.N.<sup>2</sup>; ALMEIDA, A.M.R.<sup>2</sup>; SOSA-GÓMEZ, D.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Ponta Grossa, <sup>2</sup>Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass, Distrito de Warta, C.P. 231, CEP 86001-970, Londrina-PR, daniel.sosa-gomez@embrapa.br.

## Introdução

Bioensaios para determinar a atividade inseticida de diversos compostos geralmente são realizados com insetos oriundos de criações em laboratório utilizando dietas artificiais. Entretanto, pouco é conhecido sobre a influência dos componentes da dieta sobre os resultados dos bioensaios. Além disso, para se obter resultados reproduzíveis e que apresentem consistência, há necessidade de se determinar as possíveis alterações ocasionadas por esses componentes, uma vez que resultados de longa duração devem ser livres da ação de agentes contaminantes e propiciar resultados confiáveis e que apresentem repetitividade. Portanto, os anticontaminantes que são eficientes na redução de fungos e não afetam o vigor dos insetos criados podem ser interessantes na realização de bioensaios. Roeder et al. (2010) estudaram um novo agente antimicrobiano à base de ácidos que eles denominaram de "Diet Antimicrobial Agent (DAA)". Este produto foi eficiente na redução fúngica, tendo aumentado a qualidade das dietas artificiais e o vigor dos insetos criados [*Chloridea virescens* (F.)]. Além disso, ele também foi eficaz como substituto do formaldeído, um antimicrobiano comum em dietas artificiais que apresenta, porém, risco à saúde humana e que pode prejudicar o desenvolvimento dos insetos.

Para que haja confiabilidade nos resultados obtidos, algumas características de anticontaminantes são necessárias, tais como: a substância a ser testada não deve ser quimicamente afetada ou alterada pela dieta; a substância não deve afetar a palatabilidade e/ ou atratividade da dieta; os ingredientes da formulação básica da dieta não podem mascarar ou alterar o efeito da substância testada; e a dieta deve ser totalmente adequada para oferecer e manter características saudáveis (sem microrganismos) durante o período do bioensaio (Parra et al., 2012). Dessa forma, nesse trabalho avaliou-se a influência dos anticontaminantes de dieta artificial formol e DAA sobre resultados de bioensaios de mortalidade realizados com *A. gemmatalis*.

## Material e Métodos

Os insetos utilizados nos estudos encontravam-se entre a 275<sup>a</sup> e 280<sup>a</sup> geração de laboratório, coletada inicialmente em Sertãoópolis, PR e posteriormente criados segundo a metodologia proposta por Hoffmann-Campo et al. (1985). Para se verificar o impacto dos anticontaminantes, compararam-se as curvas de suscetibilidade obtidas em bioensaios de mortalidade realizados sobre dietas preparadas com dois anticontaminantes: um constituiu apenas de 4,38  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  de formol e o outro de 1,1  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  de formol + 1,4  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  da solução antifúngica DAA. Portanto, as dietas variaram entre si quanto à concentração de formol e quanto à adição de solução antifúngica (SAF), a qual foi adaptada do DAA de Roeder et al. (2010) por meio da retirada do ácido sórbico e do antibiótico que já estavam presentes na dieta.

O efeito de ambas dietas na mortalidade dos insetos foram avaliados por comparação entre as curvas de dose-resposta, obtidas a partir das mortalidades observadas em bioensaios utilizando diferentes concentrações da proteína Cry1Ac e dos extratos de folíolos de soja Bt em fase fenológica R4, do cultivar BRS 1010 IPRO. O plantio da soja ocorreu no dia 19/10/2017 e seu manejo seguiu as recomendações para a região.

As concentrações da proteína padrão a serem utilizadas foram determinadas a partir da formulação padrão MVP II, com 11,2% de Cry1Ac (Gilroy; Wilcox, 1992), em que sete soluções foram preparadas para formar as concentrações 0,044; 0,066; 0,099; 0,148; 0,222; 0,333 e 0,5  $\mu\text{g}$  de ativo. $\text{cm}^{-2}$ . Já as concentrações dos extratos de folíolos foram determinadas a partir de um extrato inicial, obtido através da maceração do tecido foliar em água destilada (proporção de 1g de folíolos: 10 mL de água) com peso aproximado de 70 mg. A maceração dos tecidos foi realizada em microtubos com auxílio de pistilo plástico e acréscimo do abrasivo carborundum. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas e retirou-se o sobrenadante para se obter o extrato inicial. A partir desse, obtiveram-se as diluições seriadas, cujas concentrações foram 0,22; 0,33; 0,5; 0,74; 1,11; 1,67 e 2,5  $\mu\text{g}$  de folha.  $\mu\text{L}^{-1}$  de extrato. $\text{cm}^{-2}$ .

Para a condução dos bioensaios, utilizou-se bandejas de 128 células (BIO-BA-128; CD International Inc., Pitman, NJ) com aplicação de 1 mL de dieta por célula. Em cada célula, 1 lagarta neonata foi acondicionada após a secagem do volume da proteína ou do extrato aplicados. Cada concentração, aplicada à ambas dietas, foi avaliada em seis repetições (realizadas em dias subsequentes), totalizando assim 96 insetos por bioensaio.

As bandejas de bioensaios foram mantidas em câmaras B.O.D. reguladas a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14 horas. A mortalidade foi avaliada aos sete dias após a exposição inicial ao produto. Os indivíduos foram considerados mortos quando não apresentavam movimentação após estimulação com uma agulha. A análise de dados foi realizada adotando-se o modelo Log-Logístico com quatro parâmetros (Ritz, 2010) em ambiente R, com utilização do pacote drc para ajuste dos modelos e estimações das concentrações letais (Ritz et al., 2015).

## Resultados e Discussão

Os dados apresentados na tabelas 1 e 2 mostram que a dieta contendo a concentração maior de formol ( $4,48 \mu\text{L.mL}^{-1}$ ) não apresentou  $\text{CL}_{50}$  significativamente maior que a  $\text{CL}_{50}$  da dieta contendo menor concentração de formol ( $1,1 \mu\text{L.mL}^{-1}$ ) mais solução antifúngica. No entanto, observando as curvas de mortalidade nas figuras 1 e 2, que representam a respostas dentro de todo o intervalo de concentrações estudados nesses bioensaios, e respectivos intervalos de confiança, nota-se que o anticontaminante com maior concentração de formol pode afetar a sensibilidade dos insetos, quando concentrações menores dos princípios ativos são utilizadas. Por exemplo, nos bioensaios com extratos de folhas, observou-se mortalidade significativamente maior nos insetos expostos a concentração mais elevada de formol, quando as concentrações do extrato foram inferiores a  $1,2 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ . A semelhança de respostas nas curvas para concentrações mais altas de folhas e de proteína pode ser interpretada como consequência da alta concentração da toxina Bt, o que tornaria o efeito do anticontaminante irrelevante.

A redução no uso de anticontaminantes em dieta artificial reduz o risco de exposição do executor à agentes tóxicos, além de reduzir o risco de aumento na sensibilidade dos insetos submetidos ao bioensaio. A exclusão total de formol em ensaios de longa duração representa elevado risco de contaminação por microrganismos, os quais encontram condições ideais de desenvolvimento em salas de criação. Há necessidade de futuros estudos visando a substituição de anticontaminantes tóxicos aos insetos e que assegurem a qualidade de formulações de dietas.

## Conclusão

Esse estudo mostrou que é viável reduzir a concentração de formol pela solução antifúngica avaliada no preparo de dietas artificiais para *Anticarsia gemmatalis*, uma vez que essa não mostrou interação negativa com os princípios ativos da toxina Bt estudados além de ter preservado a integridade da dieta.

## Referências

GILROY, T. E., WILCOX, E. R. **Hybrid *Bacillus thuringiensis* gene plasmid, and transformed *Pseudomonas fluorescens***. US Patent, 5,128-130, 1992.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B. de; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1985, 23 p. (Embrapa Soja. Documentos, 10).

PARRA, J. R. P.; PANIZZI, A. R.; HADDAD, M. L. Nutritional indices for measuring insect food intake and utilization. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Insect Bioecology and Nutrition for integrated Pest Management**, 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012, cap. 2, p. 13-49.

RITZ, C. Towards a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, p. 220-229, 2010.

RITZ, C., BATY, F., STREIBIG, J. C., GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **Plos One**, v. 10, n. 12, e0146021, 2015.

ROEDER, K. A.; KURIACHAN, I.; VINSON, S. B.; BEHMER, S. T. Evaluation of a microbial inhibitor in artificial diets of a generalist caterpillar, *Heliothis virescens*. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 97, p. 1-12, 2010.

Tabela 1. Efeito de dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes em bioensaios com extratos de folha. N=672 *Anticarsia gemmatalis*;  $\hat{b}$  =estimativa da taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL<sub>50</sub>; CL<sub>50</sub>=concentração letal para 50% dos indivíduos;  $\hat{\sigma}_b$ =erro padrão da estimativa  $b$ ;  $\hat{\sigma}_{CL50}$ =erro padrão da estimativa da CL<sub>50</sub>

Dieta	$\hat{b} \pm \hat{\sigma}_b$	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	$\hat{\sigma}_{CL50}$
Formol (4,38 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ dieta)	-1,89 $\pm$ 0,68	0,93	0,28
Formol (1,1 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ dieta) + SAF (1,4 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ dieta)	-1,94 $\pm$ 0,36	1,47	0,4

\* $\hat{b}$  é diretamente proporcional ao incremento de mortalidade nas proximidades da CL<sub>50</sub>.

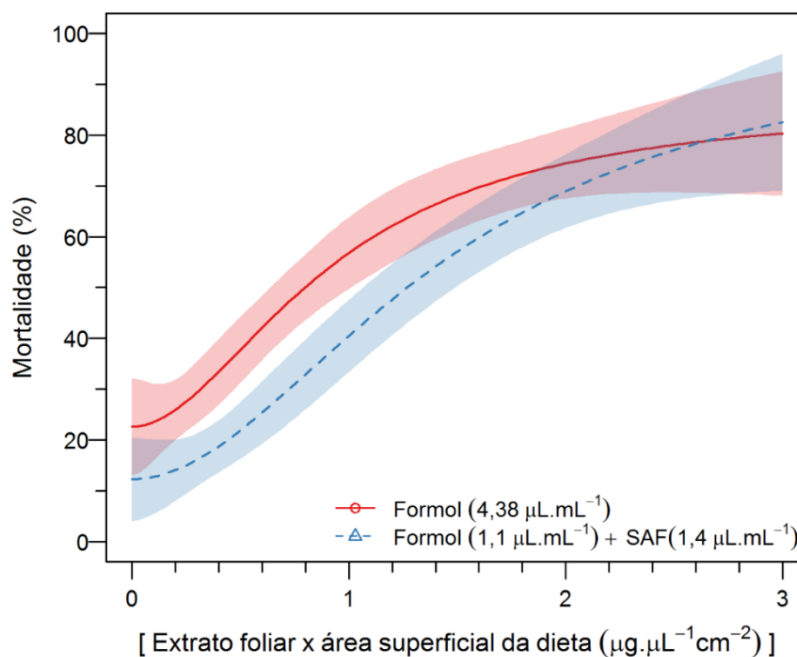


Figura 1. Curvas de mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* inferidas pelo modelo log-logístico através da mortalidade obtida em bioensaios conduzidos com extratos de folíolos de soja Bt, em diferentes diluições aplicadas nas dietas artificiais preparadas utilizando-se dois anticontaminantes.

Tabela 2. Efeito de dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes em bioensaios com proteína Cry1Ac. N=640 insetos;  $\hat{b}$ =estimativa da taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL<sub>50</sub>; CL<sub>50</sub>=concentração letal para 50% dos indivíduos;  $\hat{\sigma}_b$ =erro padrão da estimativa  $b$ ;  $\hat{\sigma}_{CL50}$ =erro padrão da estimativa da CL<sub>50</sub>

Dieta	$\hat{b} \pm \hat{\sigma}_b$	CL <sub>50</sub> (ng.cm <sup>-2</sup> )	$\hat{\sigma}_{CL50}$
Formol (4,38 μL.mL <sup>-1</sup> dieta)	-2,21 ± 0,59	0,10	0,03
Formol (1,1 μL.mL <sup>-1</sup> dieta) + SAF (1,4 μL.mL <sup>-1</sup> dieta)	-2,21 ± 0,54	0,14	0,02

\* $\hat{b}$  é diretamente proporcional ao incremento de mortalidade nas proximidades da CL<sub>50</sub>.

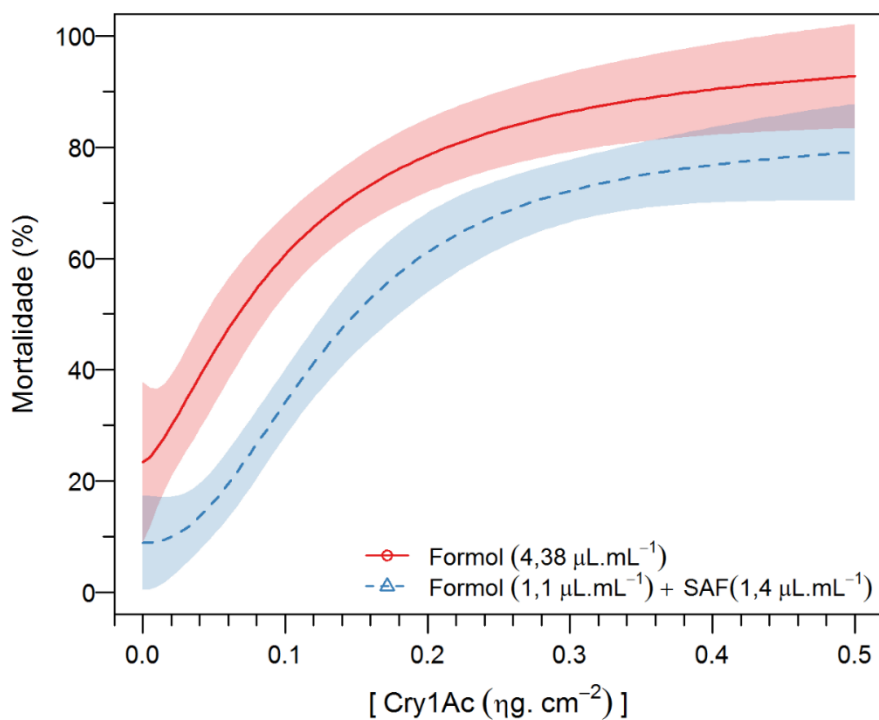


Figura 2. Curvas de mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* inferidas pelo modelo log-logístico através da mortalidade obtida em bioensaios conduzidos com proteína Cry1Ac, em diferentes concentrações aplicadas nas dietas artificiais preparadas utilizando-se dois anticontaminantes.