**Universidade de São Paulo**
**Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

# Metabolização de xenobióticos e produção de bioinseticidas por bactérias associadas a insetos

**Luís Gustavo de Almeida**

Tese apresentada para obtenção do título Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba**
**2018**

**Luís Gustavo de Almeida**
**Engenheiro Agrônomo**

# Metabolização de xenobióticos e produção de bioinseticidas por bactérias associadas a insetos

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO LUIS CÔNSOLI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba**
**2018**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Almeida, Luís Gustavo de

Metabolização de xenobióticos e produção de bioinseticidas por bactérias associadas a insetos / Luís Gustavo de Almeida. - - Piracicaba, 2018.

111 p.

Tese (Doutorado) - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Simbionte 2. Microbiota 3. Inseticida 4. Bioatividade 5. Biotecnologia I. Título

## DEDICATÓRIA

À minha querida esposa Natalia, à minha querida filha Lívia e aos meus queridos pais, Luiz Carlos e Maria Lúcia, pelo amor, apoio, incentivo, segurança e compreensão durante meus estudos.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Luís Cônsoli pela oportunidade, orientação, amizade, confiança e por todos os valiosos conhecimentos compartilhados, que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

À Dra. Ana Flávia Canovas Martinez pela grande parceria, amizade, ensinamentos e contribuição nos resultados multidisciplinares deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada à Química de Produtos Naturais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, pelas análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS).

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Aos amigos do Laboratório de Interações em Insetos pela amizade, companhia e que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

À Capes e CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à FAPESP (processo 2011/50877-0) pelo financiamento de parte dessa pesquisa.

**SUMÁRIO**

RESUMO ..... 9
ABSTRACT ..... 10
1. INTRODUÇÃO ..... 11
Referências ..... 12
2. PARTICIPAÇÃO DE SIMBIONTES NA SOBREVIVÊNCIA E APTIDÃO BIOLÓGICA DE INSETOS EXPOSTOS A INSETICIDAS ..... 17
Resumo ..... 17
Abstract ..... 17
2.1. Introdução ..... 18
2.2. Material e métodos ..... 19
2.2.1. Criação e manutenção de *Spodoptera frugiperda* ..... 19
2.2.2. Participação de bactérias simbiontes na resposta de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas ..... 20
2.2.3. PCR diagnóstico para detecção da infecção de *Spodoptera frugiperda* ..... 20
2.2.4. Determinação da curva dose-resposta de linhagens suscetível apossimbionte ou associada a bactérias com potencial de degradação de inseticidas ..... 21
2.2.5. Efeito da colonização do trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* com *Leclercia adecarboxylata* e *Pseudomonas psychrotolerans* na biologia do inseto ..... 22
2.3. Resultados ..... 23
2.3.1. Colonização do trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* ..... 23
2.3.2. Participação de bactérias simbiontes na resposta de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas ..... 23
2.3.3. Efeito da colonização do trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* com *Leclercia adecarboxylata* e *Pseudomonas psychrotolerans* na biologia do inseto ..... 27
2.4. Discussão ..... 31
2.5. Conclusões ..... 32
Referências ..... 33

3. BIOACUMULAÇÃO DE INSETICIDAS POR SIMBIONTES DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA ECOLOGIA DO HOSPEDEIRO..... 37
Resumo..... 37
Abstract..... 37
3.1. Introdução..... 38
3.2. Material e Métodos..... 40
3.2.1. Material biológico..... 40
3.2.2. Criação e manutenção de *Spodoptera frugiperda*..... 40
3.2.3. Cultivo dos isolados e obtenção de amostras para análises químicas..... 40
3.2.4. Quantificação de inseticidas por análise cromatográfica..... 41
3.2.5. Perfil químico de amostras obtidas pelo cultivo de *Microbacterium arborescens* em meio com lufenuron..... 42
3.2.6. Análise de produtos de degradação do lufenuron..... 43
3.2.7. Análise metabólica e rede molecular..... 43
3.2.8. Estudo da toxicidade do conteúdo intracelular do isolado IIL-Luf14 *Microbacterium arborescens*..... 44
3.3. Resultados..... 44
3.3.1. Quantificação de inseticidas para estudo dos mecanismos envolvidos na degradação dessas moléculas por simbiontes de *Spodoptera frugiperda*..... 44
3.3.2. Estudo de produtos de degradação de lufenuron pela ação de *Microbacterium arborescens* simbionte de *Spodoptera frugiperda* resistente a essa molécula..... 47
3.3.3. Rede de interações moleculares..... 50
3.3.4. Toxicidade de metabólitos intracelulares de *Microbacterium arboresc*ens cultivado em lufenuron como única fonte de carbono..... 55
3.4. Discussão..... 55
3.5. Conclusões..... 58
Referências..... 58

4. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIONTES DA FORMIGA CORTADEIRA *Acromyrmex coronatus* (FABRICIUS, 1804) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E O SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A DESCOBERTA DE MOLÉCULAS INSETICIDAS ..... 63
Resumo ..... 63
Abstract ..... 63
4.1. Introdução ..... 64
4.2. Material e métodos ..... 65
4.2.1. Material biológico ..... 65
4.2.2. Isolamento e cultivo ..... 65
4.2.3. Caracterização molecular ..... 66
4.2.4. Análise filogenética ..... 67
4.2.5. Obtenção dos extratos brutos para análise química e biológica ..... 68
4.2.6. Análise química para extratos brutos obtidos com acetato de etila ..... 68
4.2.7. Análise química para extratos brutos hexânicos ..... 68
4.2.8. Potencial inseticida dos extratos brutos ..... 69
4.2.9. Análise de mortalidade por bioensaio *in vitro* ..... 70
4.3. Resultados ..... 71
4.3.1. Isolamento de bactérias simbiontes de *Acromyrmex coronatus* ..... 71
4.3.2. Caracterização molecular e diversidade de simbiontes de *Acromyrmex coronatus* ..... 71
4.3.3. Potencial inseticida de simbiontes de *Acromyrmex coronatus* ..... 75
4.3.4. Análise de mortalidade por bioensaio *in vitro* ..... 80
4.4. Discussão ..... 84
4.5. Conclusões ..... 87
Referências ..... 87
5. IIL-Asp77, UM SIMBIONTE DE *Acromyrmex coranatus*, FONTE DE DOIS COMPOSTOS NATURAIS COM ATIVIDADE INSETICIDA ÀS LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ..... 91
Resumo ..... 91
Abstract ..... 91

5.1. Introdução ..... 92
5.2. Material e métodos ..... 94
5.2.1. Material biológico ..... 94
5.2.2. Cultivo, extração e fracionamento dos metabólitos produzidos por IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii* ..... 94
5.2.3. Análise química por inserção direta (DI-ESI-MS) ..... 95
5.2.4. Detecção das frações ativas por bioensaio ..... 95
5.2.5. Determinação da curva dose-resposta das frações com atividade inseticida ..... 96
5.2.6. Identificação dos compostos bioativos por análise química (MS/MS) ..... 96
5.2.7. Análise cromatográfica LC-UV ..... 96
5.3. Resultados ..... 97
5.3.1. Potencial inseticida do isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii* ..... 97
5.3.2. Caracterização química de compostos inseticidas produzidos pelo isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii* ..... 97
5.3.3. Curva dose-resposta de compostos inseticidas produzidos pelo isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*. ..... 101
5.4. Discussão ..... 102
5.5. Conclusões ..... 105
Referências ..... 106

## RESUMO

### Metabolização de xenobióticos e produção de bioinseticidas por bactérias associadas a insetos

Os insetos são o grupo de organismos multicelulares mais abundantes e diversos, habitando os mais variados ambientes. Muitas de suas adaptações a condições adversas podem estar relacionadas à sua associação a bactérias. O conhecimento da diversidade dessa associação pode elucidar a importância desses microrganismos nas respostas de insetos a fatores bióticos e abióticos. Bactérias também são o principal alvo de exploração para o desenvolvimento de produtos de interesse biotecnológico. Dada à sua diversidade e interações com o ambiente, insetos representam um novo nicho para a exploração de microrganismos com potencial biotecnológico. A longa história de associação dos insetos com bactérias e os dados recentes da participação da microbiota a eles associada na degradação de moléculas orgânicas, naturais e/ou sintéticas, indicam o potencial desses microrganismos de interferir na resposta do inseto a inseticidas. Adicionalmente, simbiontes bacterianos associados aos insetos também podem ser uma fonte promissora de compostos bioativos. A descoberta de novos compostos naturais vem decaindo, surgindo a necessidade de exploração de novos nichos de microrganismos e o uso de novas tecnologias para superar o número reduzido de novas moléculas identificadas. Assim, este trabalho buscou explorar simbiontes de insetos para o estudo da sua participação na metabolização de xenobióticos pelo hospedeiro e a identificação de novos compostos inseticidas, tendo como objetivos investigar i) os mecanismos envolvidos na degradação de inseticidas e sua contribuição na capacidade de sobrevivência do hospedeiro, e ii) a diversidade biológica na busca de novas moléculas inseticidas. Bactérias com potencial de degradação de xenobióticos isoladas da microbiota intestinal de insetos resistentes a inseticidas foram utilizadas para a colonização do trato intestinal de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) suscetível à inseticidas e investigação da sua participação na sobrevivência do hospedeiro quando exposto a inseticidas, assim como a existência de custo adaptativo da associação a bactérias com capacidade de metabolização de inseticidas. O isolado IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata* foi capaz de contribuir para a sobrevivência de lagartas expostas a chlorpyrifos ethyl, passando a exigir uma $CL_{50}$ cerca de 2 vezes superior àquela de lagartas apossimbiontes. Estudo de biologia comparada entre a linhagem apossimbionte e aquela associadas ao isolado IIL-Cl29 demonstrou a existência de custo adaptativo para essa associação, quando na ausência da pressão de seleção do inseticida. A investigação dos mecanismos envolvidos na metabolização de inseticidas por bactérias simbiontes de *S. frugiperda* resistente ao organofosforado chlorpirifos ethyl, aos piretroides lambda-cyhalothrin e deltamethrin, a espinosina spinosad e a benzoilureia lufenuron revelou, por meio de análises químicas, que essas bactérias são capazes de metabolizar e bioacumular inseticidas interferindo ativamente na atividade de xenobióticos no hospedeiro. O isolado IIL-Luf14 *Microbacterium arborescens* foi selecionado para a realização de estudos mais aprofundados para a identificação de produtos de degradação e comprovação do mecanismo de bioacumulação de lufenuron. O potencial de simbiontes de insetos para o isolamento de bioinseticidas foi avaliado em estudos da diversidade de bactérias cultiváveis associadas a *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae). Foram identificados 46 isolados pertencentes a *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* associados a essa formiga e estudos da atividade inseticida *in vivo* e *in vitro* de extratos orgânicos de metabólitos mostraram grande variação nos resultados de atividade. Ensaios *in vivo* com lagartas de 1º instar de *S. frugiperda* mostraram-se mais adequados, e o isolado Asp77 *Streptomyces drozdowiczii* foi selecionado para a identificação de moléculas ativas com efeito inseticida. Dois compostos bioativos com atividade inseticida foram identificados e a atividade inseticida atribuída para duas classes químicas diferentes: um composto pirrolobenzodiazepino e um alcaloide. Nossos resultados comprovam a hipótese de que simbiontes participam da metabolização de xenobióticos em insetos, ao mesmo tempo que possuem potencial para exploração de novos compostos inseticidas.


Palavras-chave: Simbionte; Microbiota; Inseticida; Bioatividade; Biotecnologia

## ABSTRACT


### Metabolization of xenobiotics and bioinsecticide production by insect-associated bacteria

The insects are the most diverse and abundant group of multicellular organisms, inhabiting a range of environments. Many of their adaptations to restricting conditions are related to their association with bacteria. The knowledge of the diversity of insect associations with bacteria can elucidate their role in insect response to biotic and abiotic factors. Bacteria are also the main target of exploitation for the development of biotechnological products. Insect´s diversity and interactions with the environment turn insects a new niche for the exploration of microorganisms with biotechnological potential. The long history of association of insects with bacteria and the participation of insect-associated bacteria in the degradation of natural and/or synthetic organic molecules indicate the potential of these microorganisms to interfere with insect response to insecticides. Additionally, bacterial symbionts associated with insects may also be a promising source of bioactive compounds. The discovery of new natural compounds has been declining, requiring the exploration of new niches of microorganisms and the use of new technologies to overcome the reduced number of molecules discovered. This work aimed to investigate the role of insect-associated bacteria in the metabolism of xenobiotics in the host and their potential to synthesize insecticidal compounds. Our objectives were to demonstrate i) the mechanisms involved in insecticide degradation by selected microbial symbionts, and to determine their contribution to host survival when exposed to insecticides, and ii) the biological and metabolic diversity of the microbiota associated with a leaf cutting ant. Bacteria that are able to degrade xenobiotics isolated from the gut microbiota of insecticide-resistant insects were used for the colonization of the gut of a susceptible strain of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Comparisons of larval survival after insecticide exposure and the existence of adaptive costs of the association were done by using a aposymbiotic and infected susceptible lines. Suceptible larvae infected with IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata* require twice the dose of chlorpyrifos ethyl to kill 50% of the larave ($LC_{50}$) when compared to the aposymbiotic larvae. But the association with IIL-Cl29 was shown costly to *S. frugiperda*, particularly affecting female fecundity. However, no fitness costs were detected to infected larvae in the presence of the selection pressure (insecticide). GC-MS and LC-MS-MS analyses of the bacteria isolated from resistant larvae of *S. frugiperda* to organophosphate (chlorpirifos ethyl), pyrethroid (lambda-cyhalothrin and deltamethrin), spinosyn (spinosad) and benzoylurea (lufenuron) revealed they are able to hydrolyze, metabolyze and bioaccumulate insecticides, showing they can actively interfere with the efficacy of insecticides against the host. These processes were better characterized for the isolate IIL-Luf14 *Microbacterium arborescens*. The species and metabolic diversity of culturable bacteria associated with *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae) were investigated to demonstrated their potential to produce bioinsecticides. A total of 46 isolates belonging to *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* were identified. *In vivo* and *in vitro* assays to detect insecticide activity in organic extracts of fermentates indicated a great number of active extracts. *In vivo* assays with 1st instars of *S. frugiperda* were more adequate in detecting toxic molecules to insects, and the isolate Asp77 *Streptomyces drozdowiczii* was selected for the identification of active molecules with insecticidal effect. Two bioactive compounds with insecticidal activity were identified and the insecticidal activity attributed to two different chemical classes: pyrrolobenzodiazepine and alkaloid. Our results support the hypothesis that symbionts participate in the metabolization of xenobiotics in insects, at the same time that they have potential for exploration of new insecticides.


Keywords: Symbiont; Microbiota; Insecticide; Bioactivity; Biotechnology

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos dois bilhões de anos, a simbiose com microrganismos foi um processo chave que moldou a evolução de diversos organismos. As associações de mutualismo estiveram envolvidas em significativas fases de transições evolutivas, incluindo as origens das mitocôndrias e o estabelecimento da fotossíntese em eucariotos. Além disso, os simbiontes são cada vez mais reconhecidos por terem um papel importante em muitos aspectos da biologia de eucariontes, como, por exemplo, no desenvolvimento, reprodução, imunidade e nutrição [1].

Com relação aos insetos, vários traços de sua aptidão são fortemente influenciados por sua microbiota associada. Essa associação é muito importante para a evolução das características ecológicas e os hábitos alimentares dos insetos [2-4]. As bactérias simbiontes de insetos podem apresentar associações facultativas ou obrigatórias, habitando o espaço endocelular, a cavidade hemocélica, o lúmen intestinal ou a superfície do tegumento de insetos [5]. Apesar dos insetos estarem associados a uma variedade de microrganismos, as associações com bactérias são mais comuns, e quanto mais investiga-se o papel de associações de bactérias com insetos, mais se aprende sobre a diversidade de sua contribuição aos insetos [6].

Embora a contribuição de bactérias primárias e obrigatórias associadas aos insetos esteja basicamente relacionada ao fornecimento de nutrientes ao hospedeiro, bactérias secundárias, facultativamente associadas a insetos, colaboram para um sistema com elevada diversidade microbiana e para a existência de mecanismos de interação fundamentais ao entendimento de processos bioecológicos de insetos [7]. O papel de simbiontes secundários é bastante estudado, incluindo sua contribuição na melhora da resposta imunológica do hospedeiro contra entomófagos [8-10] e entomopatógenos [11-13], nas interações inseto-planta [14], na proteção contra estresse térmico [15] e no processo de desintoxicação de metabólitos produzidos na defesa de plantas contra herbivoria [16-18] ou de moléculas orgânicas empregadas no controle de pragas [19-21].

O papel diverso e a influência dos simbiontes na aptidão biológica dos insetos ganham novas perspectivas para a exploração biotecnológica. Desta forma, os simbiontes de insetos estão sendo investigados i) para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de pragas e de doenças disseminadas por insetos vetores [22-24] e ii) como fonte de moléculas para aplicações biotecnológicas [25-27], enzimas para conversão de biomassa [28,29] e moléculas antimicrobianas, inseticidas [30-32] e para manipulação do comportamento de insetos [33,34].

As relações inseto-simbiontes e suas implicações ecológicas já relatadas são promissoras em muitas áreas da pesquisa em biotecnologia [35]. Simbiontes de insetos podem

constituir fontes promissoras e inexploradas para aplicações na medicina, agricultura e processos industriais. Contudo, existem muitas associações inseto-simbiontes ainda desconhecidas, completamente inexploradas e que podem ser verdadeiras fontes de biodiversidade com potencial de aplicação em processos biotecnológicos [25]. A exploração de simbiontes de insetos ainda pode apresentar uma grande vantagem em relação à exploração de microrganismos de vida livre comumente isolados, uma vez que a eficiência dos metabólitos e das enzimas produzidas por simbiontes pode ter sido otimizada por mais de milhões de anos devido à seleção natural, aumentando as chances de aplicações bem-sucedidas [25]. Assim, o isolamento de bactérias simbiontes de insetos pode ser um grande passo para o desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização eficaz na agricultura, proteção ambiental e saúde humana e animal [35].

Em nosso laboratório, diversas linhagens de bactérias simbiontes de insetos foram isoladas de diferentes hospedeiros, incluindo simbiontes de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes a inseticidas com capacidade de biorremediação, assim como simbiontes de *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae) com capacidade de produção de compostos bioativos contra insetos-praga. Esse trabalho tem por objetivos i) caracterizar a contribuição de bactérias na metabolização de xenobióticos, ii) avaliar sua contribuição na resposta do inseto ao inseticida, verificando a existência de custos adaptativos associados e iii) explorar o potencial de produção de compostos bioativos por bactérias para o isolamento de moléculas com atividade inseticida para utilização na agricultura.

**Referências**

1. Henry L, Maiden M, Ferrari J, Godfray H. Insect life history and the evolution of bacterial mutualism. Ecology Letters. 2015;18(6):516-525.

2. Harris HL, Brennan LJ, Keddie BA, Braig HR. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. Symbiosis. 2010;51:37-53.

3. Leigh E. The evolution of mutualism. Journal of Evolutionary Biology. 2010;23(12):2507-2528.

4. Feldhaar H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. Ecological Entomology. 2011;36:533-543.

5. Douglas A. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. Annual Review of Entomology. 2015;60(1):17-34.

6. Almeida LG, Moraes LAB, Trigo JR, Omoto C, Cônsoli FL. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: a potential source for biotechnological exploitation. Plos One. 2017;12(3):e0174754.

7. Douglas A. Lessons from studying insect symbioses. Cell Host & Microbe. 2011; 10(4):359-367.

8. Oliver KM, Moran NA, Hunter MS. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102:12795-12800.

9. Hansen AK, Jeong G, Paine TD, Stouthamer R. Frequency of secondary symbiont infection in an invasive psyllid relates to parasitism pressure on a geographic scale in California. Applied and Environmental Microbiology. 2007;73:7531-7535.

10. Vorburger C, Gehrer L, Rodriguez P. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. Biology Letters. 2009;6:109-111.

11. Scarborough CL, Ferrari J, Godfray HCJ. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. Science. 2005;310:1781-1781.

12. Brownlie JC, Johnson KN. Symbiont-mediated protection in insect hosts. Trends in Microbiology. 2009;17:348-354.

13. Jaenike J, Unckless R, Cockburn SN, Boelio LM, Perlman SJ. Adaptation via symbiosis: recent spread of a drosophila defensive symbiont. Science. 2010;329:212-215.

14. Frago E, Dicke M, Godfray HCJ. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. Trends in Ecology & Evolution. 2012;27:705-711.

15. Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. Ecological Entomology. 2002;27:189-195.

16. Dowd PF. Symbiont-mediated detoxification in insect herbivores. In: Barbosa P, Krischik VA, Jones CG. Microbial mediation of plant-herbivore interactions. New York: Wiley; 1991. p. 411-440.

17. Ibanez S, Gallet C, Desprês L. Plant insecticidal toxins in ecological networks. Toxins. 2012;4:228-243.

18. Hammer TJ, Bowers MD. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. Oecologia. 2015;179:1-14.

19. Boush GM, Matsumura F. Insecticidal degradation by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of the apple maggot. Journal of Economic Entomology. 1967;60:918-920.

20. Dowd PF, Shen SK. The contribution of symbiotic yeast to toxin resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricorne*). Entomologia Experimentalis et Applicata. 1990;56:241-248.

21. Dowd PF. In situ production of hydrolytic detoxifying enzymes by symbiotic yeasts in the cigarette beetle (Coleoptera: Anobiidae). Journal of Economic Entomology. 1989;82:396-400.

22. Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. International Journal for Parasitology. 2001;31:621-627.

23. Sanchez-Contreras M, Vlisidou I. The diversity of insect-bacteria interactions and its applications for disease control. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 2008;25:203-244.

24. Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. Nature. 2011;476:454-457.

25. Berasategui A, Shukla S, Salem H, Kaltenpoth M. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology. 2015;100:1567-1577.

26. Chaves S, Neto M, Tenreiro R. Insect-symbiont systems: from complex relationships to biotechnological applications. Biotechnology Journal. 2009;4:1753-1765.

27. Ramadhar TR, Beemelmanns C, Currie CR, Clardy J. Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery. The Journal of Antibiotics. 2013;67:53-58.

28. Watanabe H, Tokuda G. Cellulolytic systems in insects. Annual Review of Entomology. 2010;55:609-632.

29. Vilanova C, Marco G, Domínguez-Escribà L, Genovés S, Sentandreu V, Bataller E et al. Bacteria from acidic to strongly alkaline insect midguts: potential sources of extreme cellulolytic enzymes. Biomass and Bioenergy. 2012;45:288-294.

30. Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. Natural Product Reports. 2009;26:338-362.

31. Zucchi TD, Almeida LG, Dossi FCA, Cônsoli FL. Secondary metabolites produced by *Propionicimonas* sp. (ENT-18) induce histological abnormalities in the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. BioControl. 2010;55:811-819.

32. Martinez AFC, Almeida LG, Moraes LAB, Cônsoli FL. Tapping the biotechnological potential of insect microbial symbionts: new insecticidal porphyrins. BMC Microbiology. 2017;17(1):143.

33. Boone CK, Six DL, Zheng Y, Raffa KF. Parasitoids and dipteran predators exploit volatiles from microbial symbionts to locate bark beetles. Environmental Entomology. 2008;37:150-161.

34. van Houte S, Ros VI, van Oers MM. Walking with insects: molecular mechanisms behind parasitic manipulation of host behaviour. Molecular Ecology. 2013;22:3458-3475.

35. Ahmad I, Khan MSA, Aqil F, Singh M. Microbial applications in agriculture and the environment: a broad perspective. In: Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J. Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications. New York: Springer, 2011. p. 1-28.

# 2. PARTICIPAÇÃO DE SIMBIONTES NA SOBREVIVÊNCIA E APTIDÃO BIOLÓGICA DE INSETOS EXPOSTOS A INSETICIDAS


## Resumo

A microbiota intestinal de insetos possui grande participação em diversos aspectos biológicos do hospedeiro, na ecologia nutricional, capacidade de resposta do sistema imunológico, adaptação ao meio ambiente, nas interações tróficas e na dinâmica populacional. Entretanto, o seu o papel na metabolização de xenobióticos raramente é relatado, existindo poucos exemplos nos quais simbiontes associados aos insetos foram demonstrados como responsáveis pela desintoxicação do hospedeiro, parcial ou total, quando os mesmos são expostos aos estressores químicos naturais e sintéticos, como os inseticidas. Desta forma, investigamos a participação de bactérias intestinais na sobrevivência do hospedeiro quando exposto a inseticidas, assim como a existência de custo adaptativo da associação a bactérias com capacidade de metabolização de inseticidas. A colonização induzida do trato intestinal de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por bactérias simbiontes foi eficiente para os isolados IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata* e IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans*, as quais possuem capacidade de degradação de chlorpyrifos ethyl e spinosad, respectivamente. Entretanto, apenas o isolado IIL-Cl29 foi capaz de contribuir para a sobrevivência do hospedeiro, exigindo concentração de chlorpyrifos ethyl duas vezes maior para matar 50% das lagartas ($CL_{50}$) quando comparada àquela de lagartas apossimbiontes. O estudo da biologia comparada de linhagens apossimbionte de *S. frugiperda* ou infectada com IIL-Cl29 mostrou a existência de custo adaptativo na ausência da pressão de seleção pelo inseticida. Demonstramos que o simbionte intestinal IIL-Cl29 participa da metabolização e interfere na disponibilidade de chlorpyrifos ethyl, podendo interfrir na eficiência do produto no controle de lagartas de *S. frugiperda.*


Palavras-chave: Bactérias; Colonização; Hospedeiro; Suscetibilidade; Custo adaptativo


## Abstract

The gut microbiota of insects interfere with several host traits, affecting the host nutritional ecology, immune response, adaptation to the environment, trophic interactions, and population dynamics. However, the role of bacterial symbionts in the metabolization of xenobiotics is rarely reported. There are few examples in which insect-associated symbionts were shown to participate in the process of detoxification of hosts exposed to natural and synthetic chemical stressors, such as insecticides. Thus, we investigated the participation of the gut bacteria in host survival after host exposure to insecticides. We also assessed the existence of fitness costs to hosts associated with such bacteria. We successfully colonized the gut of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with the isolates IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata* and IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans*, which can degrade chlorpyrifos ethyl and spinosad, respectively. Nevertheless, only the isolate IIL-Cl29 improved the survival of hosts exposed to chlropyrifos ehtyl. IIL-Cl29 infected larvae required a two-fold higher concentration of chlorpyrifos ethyl to kill 50% of the larvae ($LC_{50}$) when compared to the aposymbiotic larvae. Comparative analysis of biological traits of symbiont-associated and aposymbiotic lines of *S. frugiperda* demonstrated the existence of fitness costs in the absence of the selection pressure (insecticide). We demonstrated that the gut symbiont IIL-Cl29 interferes with the availability of chlorpyrifos ethyl, indicating insecticide efficacy to control *S. frugiperda* larvae may be compromised in larvae carrying such symbiont.

Keywords: Bacteria; Colonization; Host; Susceptibility; Fitness cost

## 2.1. Introdução

Com mais de 500 mil espécies conhecidas, insetos herbívoros correspondem à quase um quarto de toda a biodiversidade macroscópica terrestre. Essa extraordinária diversificação de insetos pode ser atribuída a sua íntima associação com plantas terrestres, consideradas grandes responsáveis por sua especiação. As complexas relações tróficas entre plantas hospedeiras e herbívoros e seus inimigos naturais têm despertado grande interesse desde o desenvolvimento da agricultura [1,2].

Ao longo de sua evolução, as plantas desenvolveram inúmeros mecanismos de defesa ao ataque de herbívoros. Estes mecanismos de defesa envolvem a utilização dos mais variados tipos de metabólitos secundários, os quais podem desempenhar funções variadas da repelência à toxicidade ao herbívoro. Nesta corrida evolucionária, insetos herbívoros também desenvolveram mecanismos de adaptação à presença de compostos nocivos ao seu desenvolvimento em seu substrato alimentar [3]. Apesar de muitos dos processos de desintoxicação pela ingestão de toxinas associadas à planta hospedeira ter sua origem em processos metabólicos de insetos [4], em vários casos a sua microbiota intestinal apresenta papel fundamental nesse processo [4-9].

Simbiontes de insetos compartilham uma longa associação que envolveu processos de seleção e adaptação, principalmente no que se refere ao processo de seleção e utilização do substrato alimentar [7]. A microbiota associada a insetos também responde às pressões de seleção do ambiente, como, por exemplo, às moléculas inseticidas, visto as mudanças qualitativas e quantitativas na composição da microbiota de populações resistentes, quando comparadas a de populações suscetíveis [10,11]. Tais diferenças também sugerem que populações de insetos expostas a diferentes pressões de seleção em condições naturais podem apresentar microbiota diversificada. Além disso, a ocorrência das mesmas espécies microbianas na maioria das linhagens resistentes e suscetíveis de insetos, mas com potencial diferente para explorar os inseticidas testados como recursos nutricionais, demonstra que a microbiota intestinal também é submetida à seleção pela exposição contínua a inseticidas [11].

As bactérias que estão expostas à pressão de seleção direcionada são de grande interesse devido a sua maquinaria genética ser selecionada para responder a fonte de estresse [12]. No caso de insetos resistentes, as bactérias devem ser capazes de metabolizar os inseticidas para sobreviver, uma vez que vários desses compostos também podem ter atividade

antimicrobiana [13,14]. Porém, a microbiota intestinal pode ser bastante resiliente aos fatores de estresse que podem alterar sua composição. Por isso, os fatores nutricionais têm sido objeto de intensa investigação, produzindo evidências claras sobre o papel que a fonte de alimentos, a genética do hospedeiro e outros fatores desempenham na formação da microbiota intestinal [15,16], incluindo a dos insetos [7,10,17].

O papel dos simbiontes de insetos na metabolização de xenobióticos raramente é relatado [18-20]. As investigações são concentradas na contribuição do simbionte à ecologia nutricional [21], ao sistema imunológico [22,23] e à adaptação do hospedeiro ao meio ambiente [24], às interações tróficas [25] e à dinâmica da população do hospedeiro [26]. Assim, existem poucos exemplos nos quais os simbiontes de insetos foram demonstrados como responsáveis pela resistência ou tolerância do hospedeiro aos xenobióticos naturais e sintéticos, incluindo inseticidas. O potencial dessa capacidade de contribuição levanta hipóteses sobre o papel dos simbiontes em processos de evolução da resistência de insetos à inseticidas [27-29].

Desta forma, verificamos a participação de bactérias intestinais com comprovada capacidade de metabolização de inseticidas, na sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) expostas a inseticidas, e determinamos a existência de custo adaptativo da associação a essas bactérias ao hospedeiro. Pretendemos com esses experimentos demonstrar a participação da microbiota intestinal na metabolização de inseticidas em insetos e a importância de se considerar a associação de insetos a bactérias intestinais no desenvolvimento e uso de estratégias de manejo de pragas.

## 2.2. Material e métodos

### 2.2.1. Criação e manutenção de *Spodoptera frugiperda*

Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* da linhagem suscetível a inseticidas mantidas e disponibilizadas pelo Laboratório de Manejo de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). A linhagem foi mantida em dieta artificial à base de feijão [30], seguindo protocolo de criação descrito por Parra (1986) [31].

### 2.2.2. Participação de bactérias simbiontes na resposta de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas

O papel de bactérias simbiontes na resposta de *S. frugiperda* a inseticidas foi avaliado para os isolados da microbiota intestinal de lagartas de *S. frugiperda* resistente ao chlorpyrifos ethyl (IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata;* Genbank: KX272966), deltamethrin (IIL-Dm05 *Arthrobacter nicotinovorans;* Genbank: KX280775) e spinosad (IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans;* Genbank: KX280777) [11]. Os isolados foram inoculados na linhagem suscetível de referência de *S. frugiperda*, seguindo os procedimentos descritos por Almeida (2013) [32].

A capacidade dessas bactérias em afetar a resposta do inseto a inseticidas foi avaliada pela colonização induzida do trato digestivo de lagartas suscetíveis, visto que as mesmas não estão associadas às bactérias testadas [11]. Para a inoculação das bactérias de interesse em lagartas da linhagem suscetível de *S. frugiperda* a inseticidas, posturas foram coletadas e tratadas como coortes. Os neonatos de cada coorte foram divididos em dois grupos, sendo um subgrupo de neonatos alimentado com dieta (controle), enquanto o segundo subgrupo foi alimentado com dieta acrescida de 0,2 mL de suspensão a $10^6$ UFC/mL da bactéria de interesse em 0,85% salina estéril (NaCl). A dieta controle recebeu apenas solução salina. As lagartas foram mantidas em ambiente controlado (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 12h) para o seu completo desenvolvimento e obtenção de adultos. As posturas obtidas dos adultos oriundos de lagartas que se desenvolveram em dieta contendo as bactérias em questão foram separadas e parte das lagartas neonatas coletadas foi submetida à extração de DNA genômico (gDNA). O gDNA obtido foi utilizado na realização de PCR diagnósticos para a detecção da bactéria teste no trato digestivo dos imaturos da geração F1 [11]. O restante das lagartas obtidas dos adultos oriundos das criações dos subgrupos de cada coorte (com ou sem bactéria) foi inoculado em dieta artificial para a manutenção dos indivíduos da linhagem.

### 2.2.3. PCR diagnóstico para detecção da infecção de *Spodoptera frugiperda*

Foram utilizados iniciadores espécie-específicos obtidos por meio das sequências de 16S do rDNA dos simbiontes isolados do trato intestinal de linhagens de *S. frugiperda* resistentes a inseticidas [11]. Reações de PCR-diagnóstico para a detecção desses simbiontes foram realizadas utilizando 10-20 ng de DNA genômico, tampão da enzima (1x), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 μM de cada iniciador e 0,625 U de Taq polimerase

(Promega), em reação com volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador programado a 95ºC por 4 min (1 ciclo); 95ºC por 1 min, XºC por 1 min e 72ºC por 2 min (35 ciclos); e 72ºC por 10 min (1 ciclo), onde X refere-se às diferentes temperaturas de anelamento exigidas para cada conjunto de iniciador espécie-específico [11]. O produto da reação foi aplicado em gel de agarose a 1% e o amplicon resolvido em voltagem constante (100V). A visualização dos produtos de amplificação foi feita em transluminador UV acoplado a fotodocumentador (DNR Bioimaging Systems). Os amplicons obtidos foram analisados quanto ao seu tamanho, tendo como referência o marcador 100 bp Ladder DNA Marker (Axygen). As reações positivas foram submetidas ao tratamento com exonuclease e fosfatase alcalina para a eliminação de resíduos de iniciadores e dNTPs. Em um volume de 10 µL da reação de PCR foram adicionadas 1 U de exonuclease (Promega) e 1 U de fosfatase alcalina (Promega). A reação foi incubada a 37ºC por 30 min e depois a 80ºC por 15 min. Os amplicons foram encaminhados para sequenciamento bidirecional no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), da Universidade de São Paulo.

### 2.2.4. Determinação da curva dose-resposta de linhagens suscetível apossimbionte ou associada a bactérias com potencial de degradação de inseticidas

Comprovada a eficiência da inoculação das diferentes bactérias em coortes individualizadas da linhagem suscetível pela alimentação de lagartas neonatas em dieta artificial suplementada com as bactérias em estudo, as lagartas obtidas na geração F2 foram submetidas ao bioensaio de curva dose-resposta ao inseticida de interesse. O método de bioensaio adotado foi o de ingestão mediante tratamento superficial da dieta artificial com inseticida. Os experimentos foram conduzidos em placa para cultivo de células com 24 poços (Costar®, Cambridge, Massachusetts, EUA). Cada um dos 24 poços da placa foi preenchido com 1,25 mL de dieta artificial e as placas mantidas em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta até a geleificação da dieta, visando a esterilização superficial da mesma. Uma vez geleificada, a superfície da dieta no interior de cada poço da placa recebeu 30 µL de solução inseticida, em uma das concentrações testadas.

As diferentes concentrações do inseticida foram obtidas mediante diluição do ingrediente ativo em acetona contendo 0,1% (v/v) do surfactante Tween 20. Foram testadas as seguintes concentrações: 56, 100, 180, 320, 560 e 1000 µg/mL para o inseticida chlorpyrifos ethyl e 0,32, 0,56, 1,00, 1,80, 3,20 e 5,60 µg/mL para o inseticida spinosad. As placas do tratamento testemunha receberam apenas surfactante a 0,1% (v/v). Após o tratamento da

superfície da dieta, as placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar até a completa absorção da solução depositada na superfície da dieta. Posteriormente, uma lagarta de 3º ínstar (0-12 h) foi transferida para cada poço da placa, totalizando 120 lagartas por concentração. As placas foram vedadas e mantidas em condições controladas (25±2ºC; 60±10% UR; fotofase de 14 h) para a avaliação da mortalidade após 120 h do início do experimento. Nessas mesmas condições, apenas para o inseticida chlorpyrifos ethyl, o método de bioensaio por contato foi realizado para a obtenção da curva de dose-resposta pela aplicação tópica de 1 µL na região protorácica das lagartas.

Foram considerados mortos os indivíduos que, ao serem tocados com a ponta de um estilete nos últimos segmentos abdominais, não responderam com movimentos coordenados ou que tiveram o crescimento comprometido, sem a troca de ínstar. Os dados de mortalidade obtidos foram utilizados para a determinação das curvas dose-resposta das coortes com e sem simbiontes, via análise de Probit utilizando o programa R [33] com as extensões *ExpDes.pt* [34] e *ecotoxicology* [35]. A partir dessa análise, foram estimados os valores das concentrações letais mediana ($CL_{50}$).

### 2.2.5. Efeito da colonização do trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* com *Leclercia adecarboxylata* e *Pseudomonas psychrotolerans* na biologia do inseto

Estudo comparativo da biologia das linhagens de *S. frugiperda* suscetíveis infectadas, separadamente, com os isolados IIL-Cl29 *L. adecarboxylata* e IIL-Sp19 *P. psychrotolerans*, capazes de metabolizarem chlorpyrifos ethyl e spinosad, contra a linhagem suscetível de referência (sem infecção), foi realizado para verificar o efeito das associações nos atributos biológicos do inseto hospedeiro.

Para cada linhagem foram individualizadas 120 lagartas neonatas (0-24 h) em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,0 cm de altura), contendo dieta artificial [30]. Os tubos foram tampados com algodão hidrofóbico e mantidos em câmara climatizada mantidas em condições controladas (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 12h). Após o completo desenvolvimento larval, o sexo dos indivíduos foi determinado pela observação das pupas [36] e o peso das mesmas foi determinado após 24 h da ecdise. As pupas foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo papel de filtro umedecido, onde foram mantidas até a emergência dos adultos. Adultos recém-emergidos (0-24 h) foram individualizados em gaiolas de tubo de PVC (10 cm de diâmetro x 20 cm de altura) revestidas com papel sulfite (substrato de oviposição) e utilizados na formação de 10 casais até 48 horas após a sua emergência. Aos casais foi

disponibilizada apenas água durante os processos de acasalamento e reprodução. As posturas depositadas foram retiradas diariamente e o número de ovos determinado. As posturas foram mantidas em recipientes com papel umedecido até a eclosão das lagartas para a determinação da viabilidade dos ovos.

Os insetos foram avaliados diariamente, sendo observados os seguintes parâmetros biológicos: duração e viabilidade das fases de ovo, lagarta, pupa e adulto, peso de pupas com 24 horas (fêmeas e machos), razão sexual e a fecundidade das fêmeas [37]. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, considerando-se cada inseto uma repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de t de Student, a 5% de probabilidade.

Particularmente para a linhagem infectada com *L. adecarboxylata*, o mesmo experimento foi realizado sob pressão de seleção do inseticida chlorpyrifos ethyl para verificar o efeito dessa bactéria na sobrevivência do hospedeiro quando exposto ao inseticida. Assim, a sobrevivência de lagartas das linhagens de *S. frugiperda* suscetível, infectadas ou não com *L. adecarboxylata*, também foi comparada quando o hospedeiro foi submetido a dieta tratada superficialmente com concentração equivalente à $CL_{10}$ (180 µg/mL) de chlorpyrifos ethyl, determinada em experimentos anteriores.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Colonização do trato digestivo de *Spodoptera frugiperda*

Dos isolados testados, a colonização do trato digestivo de lagartas da linhagem suscetível de *S. frugiperda* foi bem-sucedida para *L. adecarboxylata* e *P. psychrotolerans*. *Arthrobacter nicotinovorans*, isolada em meio contendo deltamethrin como fonte de carbono, foi patogênica às lagartas da linhagem suscetível, inviabilizando a manutenção da linhagem infectada.

### 2.3.2. Participação de bactérias simbiontes na resposta de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas

Com a obtenção da curva dose-resposta de lagartas de 3º ínstar de *S. frugiperda* a chlorpyrifos ethyl utilizando-se o método de contato, não foi observada diferença significativa entre os valores de $CL_{50}$ obtidos para lagartas contendo ou não *L. adecarboxylata* em sua

microbiota intestinal. A análise de probit indicou $CL_{50}$ estimada de 268,98 µg/mL para a sublinhagem livre de *L. adecarboxylata*, com coeficiente angular (± erro padrão) de 2,63 (± 0,28) ($\chi^2$ = 12,18; *gl* = 4), enquanto a sublinhagem associada a *L. adecarboxylata* apresentou $CL_{50}$ de 338,71 µg/mL, com coeficiente angular (± erro padrão) de 2,24 (± 0,29) ($\chi^2$ = 14,92, *gl* = 4) (Tabela 1.1). Apesar do aumento em cerca de 20% nos valores de $CL_{50}$ de lagartas associadas a *L. adecarboxylata* em relação as lagartas apossimbiontes, a sobreposição dos valores de intervalo de confiança não nos permite sugerir o papel benéfico da associação dessa bactéria na sobrevivência do hospedeiro quando exposto ao inseticida testado (Figura 1.1). Porém, levando-se em consideração o método de bioensaio de ingestão, seguindo as mesmas condições anteriores, obteve-se uma curva dose-resposta que demonstrou a capacidade do isolado de *L. adecarboxylata* testado influenciar a resposta de lagartas de 3º ínstar de *S. frugiperda* ao inseticida chlorpyrifos ethyl. Neste caso, a análise de probit resultou em $CL_{50}$ estimada de 236,64 µg/mL para a linhagem apossimbionte, com coeficiente angular (± erro padrão) de 2,59 (± 0,18) ($\chi^2$ = 5,11; *gl* = 4), enquanto que para a linhagem associada ao simbionte a $CL_{50}$ foi de 447,60 µg/mL, com coeficiente angular (± erro padrão) de 2,41 (± 0,26) ($\chi^2$ = 5,11, *gl* = 4) (Tabela 1.2, Figura 1.2). A análise das curvas dose-resposta de lagartas de 3º ínstar da linhagem de *S. frugiperda* suscetível ao spinosad, associada ou não ao simbionte IIL-Sp19 *P. psychrotolerans*, utilizando-se o método de ingestão, não indicou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1.3, Figura 1.3).

Tabela 1.1. Dados da análise de probit das curvas de dose-resposta de linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda*, associada ou não ao simbionte IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata*, em bioensaio de contato com chlorpyrifos ethyl, utilizando o programa de estatística R.

| Tratamento | n[1] | Ca (±EP)[2] | $CL_{50}$ (IC95%)[3] | $X^2$ (g.l.)[4] | p-valor[5] |
|---|---|---|---|---|---|
| Apossimbionte | 720 | 2,64 ± 0,28 | 268,98 a (233,89 - 310,00) | 12,18 (4) | 0,9840 |
| Com IIL-Cl29 | 720 | 2,64 ± 0,28 | 338,71 a (289,63 - 400,63) | 14,92 (4) | 0,9951 |

1. número de indivíduos testados; 2. Coeficiente angular e erro padrão; 3. Concentração letal 50 (µg/mL) e intervalo de confiança a 95%; 4. Valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade; 5. Probabilidade de significância; Valores de $CL_{50}$ seguidos de letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si com base nos intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

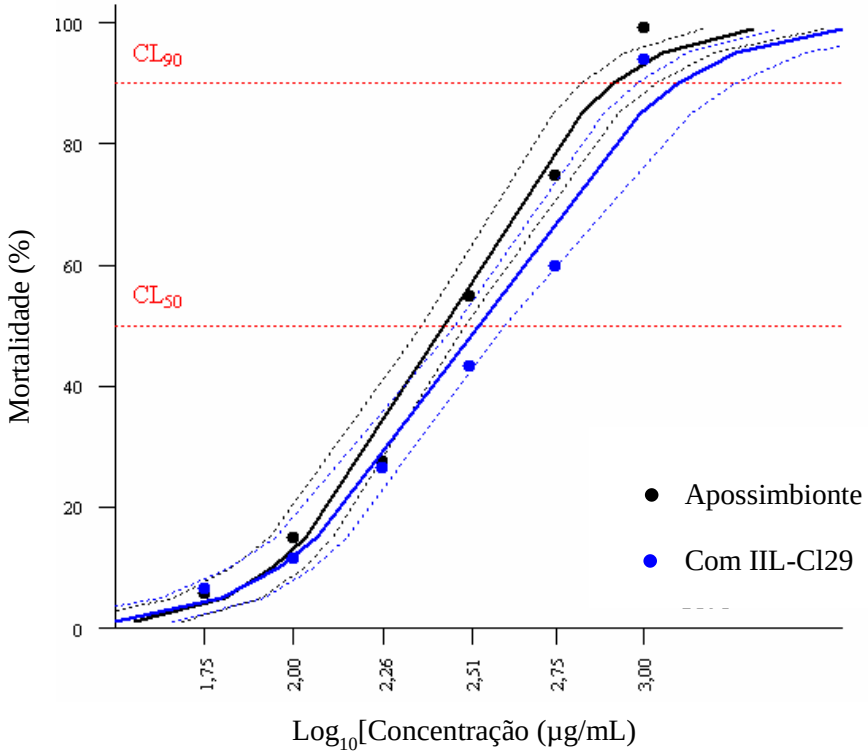


Figura 1.1. Curvas de mortalidade de linhagem de *Spodoptera frugiperda* suscetível a inseticidas, associada ou não ao simbionte IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata*, quando exposta a diferentes concentrações de chlorpyrifos ethyl por meio de bioensaio de contato. Cada curva contém o intervalo de confiança superior e inferior a 95% de probabilidade.

Tabela 1.2. Dados da análise de probit das curvas de dose-resposta de linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda*, associada ou não ao simbionte IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata*, em bioensaio de ingestão com chlorpyrifos ethyl, utilizando o programa de estatística R.

| Tratamento | n[1] | Ca (±EP)[2] | $CL_{50}$ (IC95%)[3] | $X^2$ (g.l.)[4] | p-valor[5] |
|---|---|---|---|---|---|
| Apossimbionte | 720 | 2,59 ± 0,18 | 215,70 a (186,81 - 248,48) | 5,11 (4) | 0,7234 |
| Com IIL-Cl29 | 720 | 2,41 ± 0,26 | 447,60 b (383,76 - 532,51) | 9,64 (4) | 0,9531 |

1. número de indivíduos testados; 2. Coeficiente angular e erro padrão; 3. Concentração letal 50 (µg/mL) e intervalo de confiança a 95%; 4. Valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade; 5. Probabilidade de significância; Valores de $CL_{50}$ seguidos de letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si com base nos intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

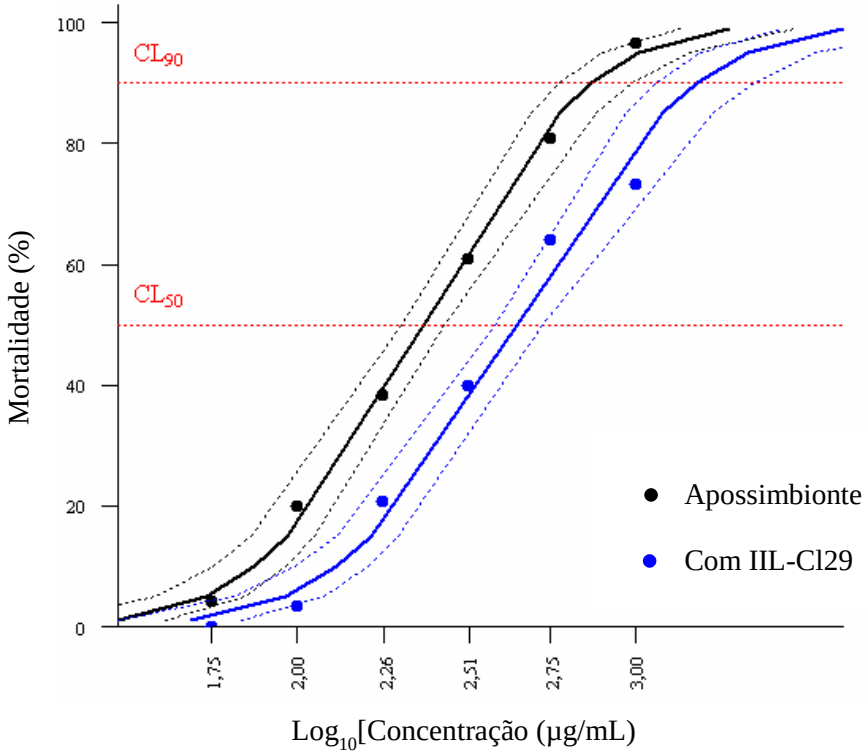


Figura 1.2. Curvas de mortalidade de linhagem de *Spodoptera frugiperda* suscetível a inseticidas, associada ou não ao simbionte IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata*, quanto exposta a diferentes concentrações de chlorpyrifos ethyl por meio de bioensaio de ingestão. Cada curva contém o intervalo de confiança superior e inferior a 95% de probabilidade.

Tabela 1.3. Dados da análise de probit das curvas de dose-resposta de linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda*, associada ou não ao simbionte IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans*, em bioensaio de ingestão com spinosad, utilizando o programa de estatística R.

| Tratamento | n[1] | Ca (±EP)[2] | $CL_{50}$ (IC95%)[3] | $X^2$ (g.l.)[4] | p-valor[5] |
|---|---|---|---|---|---|
| Apossimbionte | 720 | 9,23 ± 2,37 | 5,59 a (5,35 - 5,86) | 44,34 (4) | 1,00 |
| Com IIL-Sp19 | 720 | 6,73 ± 2,75 | 6,14 a (5,78 - 6,62) | 87,73 (4) | 1,00 |

1. número de indivíduos testados; 2. Coeficiente angular e erro padrão; 3. Concentração letal 50 (µg/mL) e intervalo de confiança a 95%; 4. Valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade; 5. Probabilidade de significância; Valores de $CL_{50}$ seguidos de letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si com base nos intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

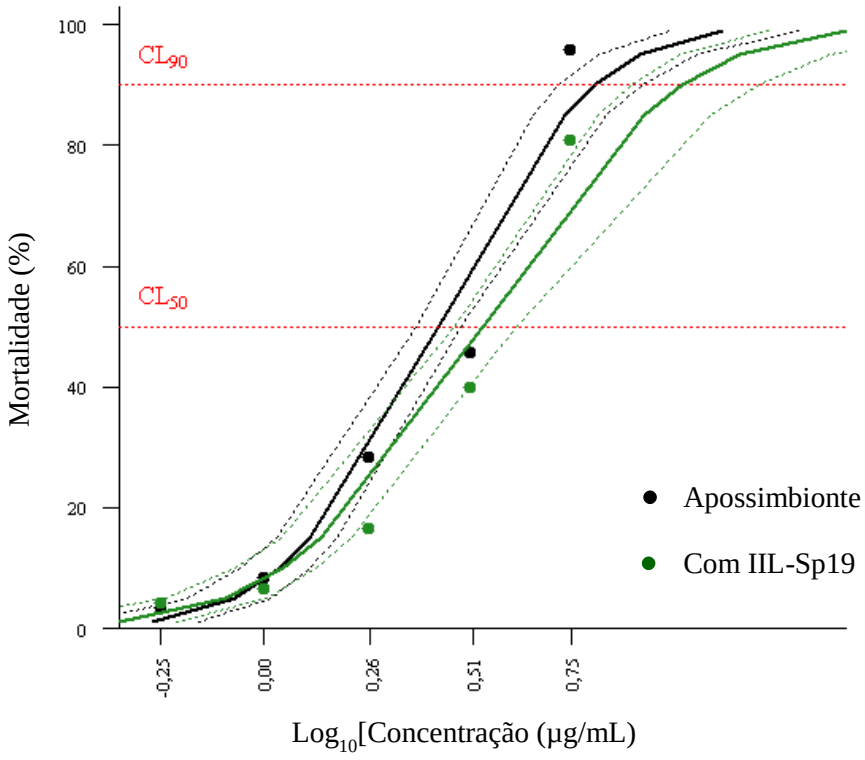


Figura 1.3. Curvas de mortalidade de linhagem de *Spodoptera frugiperda* suscetível a inseticidas, associada ou não ao simbionte IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans*, quanto exposta a diferentes concentrações de spinosad por meio de bioensaio de ingestão. Cada curva contém o intervalo de confiança superior e inferior a 95% de probabilidade.

### 2.3.3. Efeito da colonização do trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* com *Leclercia adecarboxylata* e *Pseudomonas psychrotolerans* na biologia do inseto

Após comprovação da colonização do trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* da linhagem suscetível pelas bactérias IIL-Cl29 *L. adecarboxylata* e IIL-Sp19 *P. psychrotolerans*, estudo de biologia comparada de linhagens infectadas revelou que as bactérias associadas induzem alterações em todas as fases do desenvolvimento do inseto.

Os isolados IIL-Cl29 e IIL-Sp19 afetaram negativamente a viabilidade de todas as fases de desenvolvimento avaliadas (Tabelas 1.4 e 1.6). Com relação à duração das fases estudadas, os períodos de desenvolvimento de ovo e pupa e a longevidade de adultos de *S. frugiperda* de linhagens infectadas não diferiram das linhagens apossimbiontes. Apenas a fase larval apresentou diferença entre os indivíduos apossimbiontes e os que apresentavam o simbionte associado. Na linhagem associada ao isolado IIL-Cl29 (Tabela 1.4) o período larval foi mais longo e naquela associada ao isolado IIL-Sp19 o período larval foi mais curto, quando

comparado aos períodos de desenvolvimento de indivíduos apossimbiontes (Tabela 1.6). Quanto à fase de pupa, houve alteração apenas na infecção com o isolado IIL-Cl29 que interferiu negativamente no peso de machos (Tabela 1.5).

Quando verificada a fecundidade de fêmeas, pode se notar de forma mais contundente o efeito da infecção dos simbiontes estudados. Os dados de fecundidade diária e total de fêmeas de linhagens infectadas evidenciaram o efeito negativo causado pela infecção na aptidão reprodutiva das fêmeas (Tabelas 1.5 e 1.7). Na linhagem infectada com o isolado IIL-Cl29, a capacidade de oviposição foi reduzida em aproximadamente 45%, enquanto que para o isolado IIL-Sp19 houve uma redução ainda maior, de aproximadamente 64%. Além disso, ovos colocados por fêmeas provenientes de lagartas infectadas tiveram menor viabilidade em relação à linhagem apossimbionte. A menor taxa de eclosão foi observada para a linhagem infectada com IIL-Sp19, com 69% de eclosão (Tabela 1.6). Assim, a oviposição e viabilidade de ovos foram parâmetros bastante afetados pela infeção com as bactérias testadas.

Tabela 1.4. Viabilidade e duração dos estágios de desenvolvimento de linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda*, associada ou não ao simbionte IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata*, criada em dieta artificial (25±1$^{o}$C; 60±10% UR; fotofase de 12h).

| Tratamento | Viabilidade (%) | | | Duração (dias ± EP) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ovo | Lagarta | Pupa | Ovo | Lagarta | Pupa | Adulto |
| Aposimbionte | 83,3 a | 96,6 | 84,2 | 3,8 ± 0,2 a (10) | 18,8 ± 0,8 a (114) | 10,4 ± 0,7 a (96) | 6,3 ± 0,3 a (10) |
| Com IIL-Cl29 | 77,8 b | 93,0 | 76,6 | 4,9 ± 0,3 a (10) | 19,7 ± 0,9 b (107) | 10,4 ± 0,8 b (82) | 6,4 ± 0,3 a (10) |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, no teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade. Valores entre parênteses expressam o número de observações (n).

Tabela 1.5. Peso de pupas fêmeas e machos, razão sexual, fecundidade diária e total de linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda*, associada ou não ao simbionte IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata*, criada em dieta artificial (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 12h).

| Tratamento | Fêmea (mg±EP) | Macho (mg±EP) | Razão sexual | Fecundidade diária | Fecundidade total |
|---|---|---|---|---|---|
| Apossimbionte | 233,3 ± 19,3 a (47) | 237,2 ± 18,9 a (67) | 0,41 | 126,8 ± 9,4 a (10) | 767,2 ± 31,3 a (10) |
| Com IIL-Cl29 | 233,3 ± 24,2 a (50) | 228,4 ± 17,2 b (57) | 0,47 | 67,5 ± 6,0 b (10) | 419,5 ± 39,8 b (10) |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, no teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade. Valores entre parênteses expressam o número de observações (n).

Tabela 1.6. Viabilidade e duração dos estágios de desenvolvimento de linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda*, associada ou não ao simbionte IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans*, criada em dieta artificial (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 12h).

| Tratamento | Viabilidade (%) | | | Duração (dias ± EP) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ovo | Lagarta | Pupa | Ovo | Lagarta | Pupa | Adulto |
| Aposimbionte | 82,9 a | 88,9 | 74,3 | 3,3 ± 0,1 a (10) | 18,7 ± 1,4 a (104) | 10,9 ± 1,9 a (77) | 6,4 ± 0,3 a (10) |
| Com IIL-Sp19 | 69,4 b | 79,5 | 59,5 | 3,6 ± 0,2 a (10) | 17,8 ± 1,2 b (89) | 11,3 ± 1,7 b (53) | 6,9 ± 0,3 a (10) |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, no teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade. Valores entre parênteses expressam o número de observações (n).

Tabela 1.7. Peso de pupas fêmeas e machos, razão sexual, fecundidade diária e total de linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda*, associada ou não ao simbionte IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans*, criada em dieta artificial (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 12h).

| Tratamento | Fêmea (mg±EP) | Macho (mg±EP) | Razão sexual | Fecundidade diária | Fecundidade total |
|---|---|---|---|---|---|
| Apossimbionte | 232,2 ± 22,9 a (50) | 232,7 ± 23,5 a (54) | 0,48 | 90,1 ± 11,8 a (10) | 565,4 ± 67,2 a (10) |
| Com IIL-Sp19 | 236,4 ± 20,5 a (37) | 234,5 ± 19,1 a (52) | 0,42 | 26,9 ± 5,8 b (10) | 202,9 ± 42,1 b (10) |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, no teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade. Valores entre parênteses expressam o número de observações (n).

A linhagem de *S. frugiperda* suscetível a inseticidas, quando associada ao isolado IIL-Cl29 *L. adecarboxylata*, capaz de degradar chlorpyrifos ethyl, quando comparada à linhagem apossimbionte, ambas em dieta tratada superficialmente com subdosagem do inseticida (180 µg/µL de chlorpyrifos ethyl), apresentou maior aptidão biológica do que a sublinhagem controle (apossimbionte), principalmente nas fases de lagarta e adulto, evidenciando que a bactéria auxilia a lagarta hospedeira no processo de desintoxicação após alimentação em dieta contaminada com chlorpyrifos ethyl.

A viabilidade larval (Tabela 1.8) e a fecundidade (Tabela 1.9) foram muito superiores em insetos associados ao simbionte. Entretanto, a linhagem infectada apresentou menor viabilidade e peso na fase pupal (Tabelas 1.8 e 1.9). Com relação a duração, não houve alterações significativas entre os tratamentos (Tabela 1.8), mantendo-se inclusive dentro dos padrões de valores da biologia demonstrada no item anterior, sem a aplicação do inseticida chlorpyrifos ethyl (Tabelas 1.4 e 1.5).

Tabela 1.8. Viabilidade e duração dos estágios de desenvolvimento de linhagem suscetível de *Spodoptera frugiperda*, associada ou não ao simbionte IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata*, criada em dieta artificial tratada superficialmente com 180 µg/mL (2,83 µg/cm$^2$) de chlorpyrifos ethyl (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 12h).

| Tratamento | Viabilidade (%) | | | Duração (dias ± EP) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ovo | Lagarta | Pupa | Ovo | Lagarta | Pupa | Adulto |
| Apossimbionte | 83,3 a | 24,2 | 75,9 | 3,7 ± 0,2 a (10) | 19,9 ± 1,8 a (29) | 10,6 ± 0,9 a (22) | 6,0 ± 0,3 a (10) |
| Com IIL-Cl29 | 81,2 a | 56,7 | 61,8 | 3,6 ± 0,2 a (10) | 19,5 ± 1,5 a (68) | 10,4 ± 0,9 a (42) | 6,1 ± 0,3 a (10) |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, no teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade. Valores entre parênteses expressam o número de observações (n).

Tabela 1.9. Peso de pupas fêmeas e machos, razão sexual, fecundidade diária e total de linhagem ssucetível de *Spodoptera frugiperda*, associada ou não ao simbionte IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata*, criada em dieta artificial tratada superficialmente com 180 µg/mL (2,83 µg/cm$^2$) de chlorpyrifos ethyl (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase de 12h).

| Tratamento | Fêmea (mg±EP) | Macho (mg±EP) | Razão sexual | Fecundidade diária | Fecundidade total |
|---|---|---|---|---|---|
| Apossimbionte | 277,0 ± 15,8 a (16) | 267,7 ± 27,2 a (13) | 0,55 | 30,9 ± 8,9 a (10) | 275,8 ± 29,1 a (10) |
| Com IIL-Cl29 | 248,0 ± 24,1 b (33) | 256,2 ± 22,6 a (35) | 0,49 | 71,3 ± 4,1 b (10) | 430,0 ± 15,8 b (10) |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, no teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade. Valores entre parênteses expressam o número de observações (n).

### 2.4. Discussão

A colonização induzida do trato intestinal de *S. frugiperda* por bactérias isoladas do intestino de linhagens resistentes foi possível apenas para dois (IIL-Cl29 *L. adecarboxylata* e IIL-Sp19 *P. psychrotolerans*) dos três isolados estudados, tendo o isolado IIL-Dm05 *A. nicotinovorans* se mostrado patogênico ao inseto. Os dados obtidos para o isolado IIL-Cl29, que interferiram na sobrevivência do hospedeiro exposto a chlorpyrifos ethyl, indica que esse simbionte participa, direta ou indiretamente, na desintoxicação desse inseticida. A $CL_{50}$ de lagartas suscetíveis inoculadas com essa bactéria foi cerca de duas vezes superior àquela de lagartas apossimbiontes. O isolado IIL-Sp19 *P. psychrotolerans*, apesar de ter colonizado o intestino de *S. frugiperda*, não demonstrou influenciar a sobrevivência do hospedeiro ao spinosad. Análises da existência de custo adaptativo dessas associações mostrou que essas bactérias afetam negativamente aspectos da biologia do inseto, principalmente a fecundidade. Mas os efeitos negativos da associação ao isolado IIL-Cl29 foram eliminados quando na presença da pressão de seleção exercida pelo chlorpyrifos ethyl.

Simbiontes facultativos de insetos podem se assemelhar a patógenos, podendo invadir vários tipos de células, inclusive órgãos reprodutivos e residir de forma extracelular na cavidade do corpo do hospedeiro [26]. Em muitos casos, simbiontes facultativos experimentalmente introduzidos em hospedeiros podem estabelecer infecção e serem transferidos verticalmente de forma estável [38,39], indicando que a persistência da simbiose é alcançada mais pelas capacidades do simbionte do que pelas adaptações do hospedeiro para a manutenção dessa simbiose [40,41]. Simbiontes facultativos bem-sucedidos podem, além de combater

mecanismos da resposta imunológica do hospedeiro, afetar os fenótipos do hospedeiro para a propagação e persistência dos indivíduos infectados. Para isso, as bactérias possuem diversas capacidades metabólicas e biossintéticas que muitas vezes são ausentes em insetos, podendo trazer muitos benefícios a esse hospedeiro [26,42,43].

Simbiontes facultativos podem beneficiar a aptidão do hospedeiro, levando ao aumento da fecundidade e longevidade, aumentando assim a frequência de indivíduos infectados. Entretanto, certos benefícios da associação aos simbiontes podem ser dependentes do ambiente [44]. Considerações semelhantes, incluindo o presente estudo, podem se aplicar aos efeitos prejudiciais ao hospedeiro causados por simbiontes em ambientes controlados de laboratório [26,45]. Entretanto, sob pressão de seleção do inseticida, a capacidade demonstrada de degradação de chlorpyrifos ethyl por essa bactéria em ensaios *in vitro* [11] é um forte indicativo de que essa bactéria contribua ativamente na degradação do produto ingerido pela lagarta e seus mecanismos de degradação envolvidos merecem novas investigações para elucidar questões ainda pouco estudadas pela comunidade científica. Nossos resultados subsidiam a hipótese de que simbiontes de insetos participam da metabolização de inseticidas, auxiliando o hospedeiro na metabolização da toxina, influenciando a sobrevivência de seus hospedeiros na presença ou ausência da pressão de seleção.

## 2.5. Conclusões

- O isolado IIL-Dm05 *A. nicotinovorans* se mostrou patogênico quanto utilizado na colonização induzida do trato intestinal de linhagem suscetível de *S. frugiperda*;

- O isolado IIL-Sp19 *P. psychrotolerans* não altera a sobrevivência de lagartas suscetíveis de *S. frugiperda* quando tratadas com spinosad;

- O isolado IIL-Cl29 *L. adecarboxylata* aumenta a sobrevivência de lagartas suscetíveis de *S. frugiperda* expostas ao chlorpyrifos ethyl, exigindo o dobro da concentração letal mediana quando comparada às lagartas suscetíveis livres do simbionte;

- Há custo adaptativo nas associações de *S. frugiperda* com os isolados IIL-Sp19 *P. psychrotolerans* e IIL-Cl29 *L. adecarboxylata*, na ausência da pressão de seleção;

- Na presença de pressão de seleção (inseticida), o simbionte IIL-Cl29 *L. adecarboxylata* melhora o desempenho biológico de *S. frugiperda*.

**Referências**

1. Kergoat GJ, Meseguer AS, Jousselin E. Evolution of plant–insect interactions: insights from macroevolutionary approaches in plants and herbivorous insects. Advances in botanical research. Academic Press, 2017;81:25-53.

2. Wininger K, Rank N. Evolutionary dynamics of interactions between plants and their enemies: comparison of herbivorous insects and pathogens. Annals of the New York Academy of Sciences. 2017;1408(1):46-60.

3. Després L, David JP, Gallet C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. Trends in Ecology & Evolution. 2007;22:298-307.

4. Douglas A. Multiorganismal Insects: Diversity and function of resident microorganisms. Annual Review of Entomology. 2015;60(1):17-34.

5. Oliver K, Martinez A. How resident microbes modulate ecologically-important traits of insects. Current Opinion in Insect Science. 2014;4:1-7.

6. Dowd PF. Symbiont-mediated detoxification in insect herbivores. In: Barbosa P, Krischik VA, Jones CG. Microbial mediation of plant-herbivore interactions. New York: Wiley; 1991. p. 411-440.

7. Hansen, AK, Moran, NA. The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. Molecular Ecology. 2013;23:1473-1496.

8. Hammer T, Bowers M. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. Oecologia. 2015;179(1):1-14.

9. van den Bosch T, Welte C. Detoxifying symbionts in agriculturally important pest insects. Microbial Biotechnology. 2016;10(3):531-540.

10. Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kim G, Saravanan V et al. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* and their potential for, antagonism towards entomopathogenic fungi and host insect nutriti. Journal of Applied Microbiology. 2007;103(6):2664-2675.

11. Almeida LG, Moraes LAB, Trigo JR, Omoto C, Cônsoli FL. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. Plos One. 2017;12(3):e0174754.

12. Rockne KJ, Reddy KR. Bioremediation of contaminated sites. In: Invited theme paper, international e-conference on modern trends in foundation engineering: geotechnical challenges and solutions. Indian Institute of Technology, Madras; 2003.

13. Bartha R, Lanzilotta RP, Pramer D. Stability and effects of some pesticides in soil. Applied microbiology.1967;15:67-75.

14. Tu CM. Influence of five pyrethroid insecticides on microbial populations and activities in soil. Microbial Ecology. 1980;5:321-327.

15. Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105:2117- 2122.

16. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. Nature Reviews Genetics. 2012;13:260-270.

17. Hayashi A, Aoyagi H, Kinjyo K, Yoshimura T, Tanaka H. Development of an efficient method for screening microorganisms by using symbiotic association between *Nasutitermes takasagoensis* and intestinal microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007;75:1437-1446.

18. Boush GM, Matsumura F. Insecticidal degradation by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of the apple maggot. Journal of Economic Entomology. 1967;60:918-920.

19. Dowd PF, Shen SK. The contribution of symbiotic yeast to toxin resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricorne*). Entomologia Experimentalis et Applicata. 1990;56:241-248.

20. Bartha R, Lanzilotta RP, Pramer D. Stability and effects of some pesticides in soil. Applied Microbiology. 1967;15:67-75.

21. Douglas AE. The microbial dimension in insect nutritional ecology. Functional Ecology. 2009;23:38-47.

22. Jaenike J, Unckless R, Cockburn SN, Boelio LM, Perlman SJ. Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. Science. 2010;329:212-215.

23. Haine ER. Symbiont-mediated protection. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2008;275:353-361.

24. Wernegreen JJ. Mutualism meltdown in insects: bacteria constrain thermal adaptation. Current Opinion in Microbiology. 2012;15:255-262.

25. Ibanez S, Gallet C, Després L. Plant insecticidal toxins in ecological networks. Toxins. 2012;4:228-243.

26. Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. Annual Review of Genetics. 2008;42:165-190.

27. Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T. Symbiont-mediated insecticide resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109:8618-8622.

28. Ghanim M, Kontsedalov S. Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. Pest Management Science. 2009;65:939-942.

29. Su Q, Zhou X, Zhang Y. Symbiont-mediated functions in insect hosts. Communicative & Integrative Biology. 2013;6:e23804-e23804-7.

30. Kasten P, Precetti AA, Precetti CM, Parra, JRP. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificias e substrato natural. Revista de Agricultura. 1978;53:68-78.

31. Parra JRP. Criação de insetos para estudo com patôgenos. In: Alves SB. Controle microbiano de insetos, Editora Manole: São Paulo; 1986. p. 348-373.

32. Almeida, LG. Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) [dissertação]. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2013.

33. Team, R. Core. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria; 2014. 2017.

34. Ferreira, EB, Cavalcanti, PP, Nogueira, DA. ExpDes.pt: experimental design package. R package version 1.1.2, 2013.

35. Gama, J. Ecotoxicology: methods for ecotoxicology. R package version 1.0.1, 2015.

36. Butt, BA, Cantu, E. Sex determination of lepidopterous pupae. Washington: USDA; 1962. p.7.

37. Silveira Neto S, Nakano O, Barbin D, Nova NV. Manual de ecologia dos insetos. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1976. p.419.

38. Chen D, Montllor C, Purcell A. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 2000;95(3):315-323.

39. Pontes M, Dale C. Culture and manipulation of insect facultative symbionts. Trends in Microbiology. 2006;14(9):406-412.

40. Fukatsu T, Nikoh N, Kawai R, Koga R. The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). Applied and Environmental Microbiology. 2000;66(7):2748-2758.

41. Moran N, Russell J, Koga R, Fukatsu T. Evolutionary relationships of three new species of enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. Applied and Environmental Microbiology. 2005;71(6):3302-3310.

42. Brownlie J, Johnson K. Symbiont-mediated protection in insect hosts. Trends in Microbiology. 2009;17(8):348-354.

43. Feldhaar H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. Ecological Entomology. 2011;36(5):533-543.

44. Oliver K, Campos J, Moran N, Hunter M. Population dynamics of defensive symbionts in aphids. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2008;275(1632):293-299.

45. Sakurai M, Koga R, Tsuchida T, Meng X, Fukatsu T. *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. Applied and Environmental Microbiology. 2005;71(7):4069-4075.

# 3. BIOACUMULAÇÃO DE INSETICIDAS POR SIMBIONTES DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA ECOLOGIA DO HOSPEDEIRO

**Resumo**

Embora a microbiota intestinal de lagartas de linhagens de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes a inseticidas ter se mostrado um nicho adequado para a seleção direcionada de microrganismos com capacidade de metabolização e de interferência na eficácia de inseticidas no controle do hospedeiro, o(s) mecanismo(s) de metabolização envolvido(s) na resposta do hospedeiro a inseticidas necessita(m) de investigação mais detalhada para sua caracterização. Desta forma, o presente estudo investigou os mecanismos que estão envolvidos na metabolização de inseticidas por bactérias simbiontes de *S. frugiperda* resistente ao organofosforado chlorpirifos ethyl, aos piretroides lambda-cyhalothrin e deltamethrin, a espinosina spinosad e a benzoilureia lufenuron. Amostras controle, do sobrenadante e do conteúdo intracelular foram obtidas após cultivo dos isolados em meio M9 acrescido do inseticida correspondente como única fonte de carbono por 5 dias. A quantificação das amostras por análise cromatográfica revelou a capacidade dessas bactérias em metabolizar e bioacumular inseticidas, sendo que apenas o isolado IIL-Sp19 não foi capaz de bioacumular spinosad em quantidade significativa. Experimentos de íons precursores e redes de interações moleculares comprovaram a capacidade do isolado IIL-Luf14 em bioacumular lufenuron, estando presente em sua forma íntegra no conteúdo intracelular dessa bactéria. Essa comprovação também foi observada em ensaio *in vivo*, onde amostras do conteúdo intracelular foram capazes de causar mortalidade em *S. frugiperda*. O estudo de produtos da degradação de lufenuron pelo isolado IIL-Luf14 mostrou que essa bactéria é capaz de acumular o grupo N-((2,5-Dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil)carbamoil) e degradar fluorobenzoato, ambos compostos resultante da degradação de lufenuron. A análise também permitiu identificar lisofosfolipídeos presentes em amostras do conteúdo intracelular de *M. arborescens*, mostrando ser um mecanismo de interação entre a célula microbiana e lufenuron. Assim, bactérias simbiontes de *S. frugiperda* resistentes a inseticidas são capazes de bioacumular inseticidas e interferir ativamente na atividade de xenobióticos no hospedeiro.

Palavras-chave: Bacteria; Degradação; Metabolização; Bioacumulação; Intracelular

**Abstract**

Although the gut microbiota of insecticide resistant *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae has proved to be a suitable niche for targeted selection of microorganisms that can metabolize insecticies and even interfere with the insecticide efficacy, the mechanism(s) by which these bacteria metabolize insecticides are unknown. Thus, we investigated the mechanisms that are involved in the metabolization of insecticides by symbiotic bacteria previously isolated from resistant lines of *S. frugiperda*. These bacteria were shown to degrade the organophosphate chlorpyrifos ethyl, the pyrethroids lambda-cyhalothrin and deltamethrin, the spinosyn spinosad and the benzoylurea lufenuron. Experiments under controlled cultured conditions and the chemical analyses of the culture media and the bacterial cell lysate obtained after culturing the isolates for 5 days in M9 medium added with each one of the insecticides as the sole carbon source. GC-MS and LC-MS-MS analyses allowed the quantification of the capacity of the tested bacteria to metabolize and bioaccumulate insecticides. Only the isolate IIL-Sp19 did not bioaccumulate spinosad in a significant amount. Precursor ion experiments and networks of molecular interactions demonstrated the isolate IIL-

Luf14 interfered with the efficacy of lufenuron against *S. frugiperda* larvae by affecting the availability of the insecticide in medium due to bioaccumulation. Lysates of IIL-Luf14 were demonstrated to cause mortality of *S. frugiperda* proving the accumulation of large quantities of lufenuron in the cultured cells. Analyses of the metabolites produced from the degradation of lufenuron by the isolate IIL-Luf14 identified the bioaccumulation of lufenuron and the metabolite N-((2,5-Dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy)phenyl)carbamoyl) and the degradation of the metabolite fluorobenzoate, both compounds resulting from the degradation of lufenuron. Lysophospholipids were also identified in the intracellular content of IIL-Luf14, pointing their participation in process of bioaccumulation of lufenuron. Thus, gut bacteria from insecticide-resistant *S. frugiperda* larvae degrade and bioaccumulate insecticides and can actively interfere with the activity of insecticides in the host.

Keywords: Bacteria; Degradation; Metabolization; Accumulation; Intracellular

### 3.1. Introdução

Microrganismos são amplamente utilizados para a descontaminação ambiental e são comumente selecionados em áreas agrícolas contaminadas por pesticidas, ambiente em que são expostos à pressão de seleção por esses produtos pelo seu uso inadequado e/ou excessivo [1-3]. O uso intensivo e contínuo de pesticidas orgânicos produz também outros efeitos indesejáveis, pois conduz à evolução da resistência de insetos a inseticidas [4,5] e resulta em efeitos colaterais a organismos não-alvo e ao ambiente [6,7]. O uso dessas moléculas está cada vez mais restrito, pois existe grande pressão da sociedade para a implementação de técnicas alternativas de controle mais seguras e práticas agrícolas mais sustentáveis, abrindo perspectivas para o uso de microrganismos com capacidade de biodegradação de tais pesticidas [8].

Insetos compartilham uma longa história de associação com bactérias e grande parte de suas adaptações a condições adversas ou inadequadas podem estar relacionadas a essa associação [9,10]. A microbiota intestinal de insetos pode representar um recurso valioso ao contribuir para a ecologia nutricional do hospedeiro, participando de processos envolvidos na utilização de alimentos (digestão, desintoxicação) e ciclagem e provisionamento de nutrientes, interferindo, ainda, nas interações multitróficas do hospedeiro [10-12]. Além disso, há uma série de indicações de que a microbiota de insetos pode participar na degradação de moléculas orgânicas naturais e sintéticas [13-16].

A relevância da contribuição da microbiota intestinal para as reações enzimáticas que ocorrem no lúmen do intestino do hospedeiro pode ser demonstrada pela existência de enzimas microbianas que auxiliam na digestão do alimento devido à sua insensibilidade aos inibidores enzimáticos produzidos pelas plantas em que o inseto hospedeiro se alimenta [17-19]. Diversos processos de desintoxicação de xenobióticos ocorrem no lúmen intestinal dos insetos pela sua

natureza óxido-redutora e pela atuação de um complexo de enzimas (monoxigenases, esterases, hidrolases, transferases) capaz de hidrolisar ou modificar o xenobiótico, reduzindo sua toxicidade e favorecendo sua excreção [20,21]. Há indicações ainda de que a contribuição enzimática microbiana no lúmen intestinal também pode auxiliar na degradação de inseticidas ingeridos pelo hospedeiro, com a hidrólise destes compostos para originar nutrientes para o crescimento da própria microbiota [22]. Assim, a diversidade e as diferenças entre enzimas produzidas por procariotos e eucariotos indicam que as enzimas microbianas podem contribuir fortemente para a metabolização de inseticidas em insetos [23,24].

Apesar de todas as evidências da existência de mecanismos comuns de defesa de insetos a compostos secundários de plantas e moléculas sintéticas, e da participação da microbiota associada a insetos em processos de degradação destes compostos, pouco se conhece a respeito da participação da microbiota no desenvolvimento de mecanismos de resistência de insetos a inseticidas. No entanto, a participação da microbiota associada a insetos na degradação de xenobióticos, incluindo os compostos orgânicos sintéticos geralmente utilizados para o controle de pragas, levanta questões importantes. A primeira seria relacionada à possibilidade de explorar insetos para selecionar bactérias capazes de degradar xenobióticos para posterior aplicação na biorremediação [8]. Em segundo lugar, o papel da microbiota na eficiência de inseticidas no controle de pragas agrícolas [8,23,25,26].

A exploração de bactérias simbiontes de insetos resistente a inseticidas como um novo nicho com potencial de degradação de xenobióticos mostrou que a microbiota intestinal é suscetível às mudanças em sua comunidade em resposta a pesticidas e à evolução da resistência do hospedeiro [8]. Assim, a microbiota intestinal de insetos resistentes a inseticidas pode ser um recurso valioso para o isolamento de bactérias capazes de degradar inseticidas e uma ferramenta promissora para a exploração biotecnológica em programas de biorremediação [8]. No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de metabolização de pesticidas envolvidos na degradação de inseticidas por bactérias simbiontes de insetos resistentes e seus impactos na evolução da resistência do hospedeiro.

Desta forma, esse trabalho teve por objetivo estudar os mecanismos envolvidos na metabolização de inseticidas pelas bactérias IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata*, IIL-Lc09 *Pseudomonas stutzeri*, IIL-Dm05 *Arthrobacter nicotinovorans*, IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans* e IIL-Luf14 *Microbacterium arborescens* isoladas da microbiota intestinal de linhagens de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes ao organofosforado chlorpirifos ethyl, aos piretroides lambda-cyhalothrin e deltamethrin, a espinosina spinosad e a benzoilureia lufenuron.

## 3.2. Material e Métodos

### 3.2.1. Material biológico

Para o estudo foram utilizados isolados de bactérias obtidos da microbiota intestinal de lagartas de *S. frugiperda* resistentes ao organofosforado chlorpyrifos ethyl (IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata;* Genbank: KX272966), aos piretroides lambda-cyhalothrin (IIL-Lc09 *Pseudomonas stutzeri;* Genbank: KX280771) e deltamethrin (IIL-Dm05 *Arthrobacter nicotinovorans;* Genbank: KX280775), a spinosina spinosad (IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans;* Genbank: KX280777) e a benzoilureia lufenuron (IIL-Luf14 *Microbacterium arborescens;* Genbank: KX280780) [8]. Os isolados foram mantidos em constante pressão de seleção em meio mínimo M9 [27] acrescido de 10 µg/mL dos respectivos inseticidas como única fonte de carbono.

### 3.2.2. Criação e manutenção de *Spodoptera frugiperda*

Para o estudo foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* da linhagem suscetível a inseticidas mantidas e disponibilizadas pelo Laboratório de Manejo de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). A linhagem foi mantida em dieta artificial à base de feijão [28], seguindo protocolo de criação descrito por Parra (1986) [29].

### 3.2.3. Cultivo dos isolados e obtenção de amostras para análises químicas

Os isolados de bactérias em estudo, com comprovada capacidade de degradação de inseticidas [8], foram inoculados ($10^6$ UFC/mL - 120 µL) em 3 mL de meio mínimo M9 acrescido de 10 µg/mL do inseticida correspondente e cultivados sob agitação constante a 28ºC, por 5 dias. Após esse período, o meio de cultivo foi submetido à centrifugação (3000*g* x 10 min x 4ºC) e o sobrenadante foi coletado. O sedimento de células formado foi submetido a duas lavagens sucessivas com solução salina 0,8% estéril (NaCl) e as células foram lisadas em sonicador (Unique) com frequência de 25 kHz por 30 min. O lisado celular e o sobrenadante foram, separadamente, sujeitos à extração orgânica de fase sólida com cartucho de fase reversa C8 (Varian Bond Elut® 3CC/500 mg), utilizando metanol (HPLC grade – JTBaker) como eluente. O cartucho foi previamente condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água

destilada (estéril), tendo-se o cuidado de não deixar a coluna secar. A amostra (3mL) foi percolada através do cartucho, sendo, em seguida, adicionado 1 mL de metanol para eluição e obtenção da amostra com o extrato de interesse. Da mesma forma, alíquotas de 3 mL do meio mínimo M9 acrescido de inseticida, mas sem bactéria, também foram cultivadas nas mesmas condições daqueles contendo bactérias, para que produtos da degradação natural dos inseticidas pudessem ser avaliados. As amostras foram acondicionadas em recipientes escuros de 1,8 mL (Sun Sri) a -20°C até a análise. Cada tratamento contou com três repetições, sendo cada amostra de cultivo de 3 mL considerada uma repetição.

### 3.2.4. Quantificação de inseticidas por análise cromatográfica

Os extratos orgânicos obtidos do controle, sobrenadante e conteúdo intracelular das bactérias estudadas foram analisados por cromatografia para a quantificação de inseticidas nas amostras. Os extratos orgânicos obtidos para chlorpyrifos ethyl, spinosad e lufenuron foram secos em fluxo de $N_2$, ressuspensos em 1 mL de metanol e submetidos à separação cromatográfica em sistema de cromatografia líquida. As análises das amostras e soluções padrões foram realizadas em Espectrômetro de Massa XevoTM TQ-S (Waters Corporation), associado a Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance AcquityTM (UPLCTM-Waters), equipado com uma coluna Hypersil GOLD (Thermo Scientific) (50x2,3 mm, 1,9 μm). As fases móvel A (ácido fórmico a 0,1%) e B (0,1% de ácido fórmico em metanol) foram utilizadas na composição de um gradiente para a eluição dos metabólitos, começando com 50% de fase B, aumentando linearmente para 95% em 5 min, seguida por uma espera por 2 min. A taxa de fluxo foi de 200 $\mu L.min^{-1}$ e o volume de injeção foi de 10 μL. Os parâmetros de operação utilizado no espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar 3,2 kV, temperatura da fonte 150°C, temperatura de dessolvatação de 300ºC do gás $N_2$, fluxo do gás do cone 150 L/h. A ionização das amostras foi realizada usando fonte de ionização Z-spray operando em modos positivo e negativo de análise. O método analítico utilizado foi realizado no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A dissociação ativada por colisão (CID) foi realizada utilizando argônio (Ar) como gás de colisão.

Para chlorpyrifos ethyl foi selecionado o íon precursor de *m/z* 350 e o íon fragmento de *m/z* 97 (350 > 97) como marcadores para monitoramento; para spinosad foi selecionado o íon precursor *m/z* 773 e o íon fragmento de *m/z* 142 (773 > 142) para a spinosyn A e o íon precursor de *m/z* 747 e o íon fragmento de *m/z* 142 (747 > 142) para a spinosyn D, sendo as análises para esses inseticidas feitas em modo positivo. Lufenuron foi analisado em modo

negativo, sendo monitorado pela seleção do íon precursor de *m/z* 509 e o íon fragmento de *m/z* 326 (509 > 326).

A concentração dos compostos nas amostras foi determinada por comparação com as curvas de calibração obtidas pela análise de diluições seriadas de chlorpyrifos ethyl (y = 2902x+20811, $r^2$ = 0,991), spinosyn A (y = 80,82x + 741,77, $r^2$ = 0,994), spinosyn D (30,17x + 60,56, $r^2$ = 0,998) e lufenuron (y = 206,66x – 254,79, $r^2$ = 0,999) nas concentrações de 0,5, 10, 50, 100, 250, 300 e 500 ng/mL. Cada concentração da curva e amostras de interesse foram injetadas por 3 vezes (repetições técnicas) e a aquisição dos dados realizada com o programa MassLynx 4.1 e o gerenciador de aplicativos TargetLynx (Waters).

Os extratos orgânicos obtidos para lambda-cyhalothrin e deltamethrin foram secos em fluxo de $N_2$, ressuspensos em 200 µL de metanol e analisados por cromatografia gasosa-espectrometria de massas em cromatógrafo gasoso HP6890, equipado com coluna capilar HP-5MS (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano, 30 m de comprimento x 320 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura da fase estacionária) (Agilent 19091J-413), e acoplado a um detector de massas HP5973 em modo de impacto de elétrons, com energia de ionização de 70eV. As injeções de 1 µL das amostras foram realizadas em split mode com razão de divisão 20:1, utilizando He como gás de arraste (1,2 mL/min), temperatura da porta de injeção de 250ºC, temperatura inicial do forno de 200ºC, com incremento de 4ºC/min até 300ºC, com 5 min a 300ºC.

A identificação dos compostos nas amostras foi dada pela comparação das fragmentações de massas obtidas com padrões de lambda-cyhalothrin [*m/z* 181 (100), 197 (92), 208 (72), 449 (10)] e deltamethrin [*m/z* 172 (30), 175 (29), 181 (100), 208 (15), 209 (16), 253 (57)]. A concentração de ambos os compostos nos extratos orgânicos foi calculada usando-se curvas-padrão construídas com diluições seriadas (10, 50, 200, 350, 500 e 600 µg/mL) de lambda-cyhalothrin (y = 459596x – 6464,3, $r^2$ = 0,994) e deltamethrin (y = 7179,1x - 173809, $r^2$ = 0,976).

### 3.2.5. Perfil químico de amostras obtidas pelo cultivo de *Microbacterium arborescens* em meio com lufenuron

Os perfis químicos das amostras controle, do sobrenadante e do conteúdo intracelular (lise de células), obtidas pelo cultivo do isolado IIL-Luf14 *M. arborescens* em meio mínimo M9 acrescido de lufenuron, foram analisados por inserção direta por espectrometria de massas. A análise direta DI-ESI-MS e DI-ESI-MS/MS foi realizada no Espectrômetro de Massa

XevoTM TQ-S (Waters Corporation), juntamente com uma Cromatografia Líquida Ultra Alta Performance AcquityTM (UPLCTM - Waters). O espectrômetro de massa operou com ionização por eletrospray nos modos negativo (ESI-) e positivo (ESI+). A concentração das amostras analisadas foi de 10 μg/mL. A tensão capilar e a tensão de pulverização foram ajustadas para 3.3 kV e 70 eV, respectivamente. A temperatura de dessolvatação foi fixada a 300°C e a temperatura da fonte foi de 150°C em todas as análises. A taxa de fluxo foi de 150 μL/min. A eluição isocrática foi de 0,1% de ácido fórmico em 80% de metanol durante 2 min. O volume de injeção foi de 2 μL. Para obtenção dos perfis químicos foram analisadas massas no intervalo de *m/z* de 50-1200 Da em experimento de varredura completa.

### 3.2.6. Análise de produtos de degradação do lufenuron

Para o estudo dos produtos de degradação do lufenuron, amostras do controle, sobrenadante e conteúdo intracelular obtidas pelo cultivo do isolado IIL-Luf14 - *M. arborescens* em meio mínimo M9 acrescido de lufenuron foram analisadas por cromatografia líquida de ultra performance (HRMS) com eletrospray aquecido (HESI) e alta resolução de dados dependente de análise MS2 (UPLC-HESI-HR-ddMS2). Os dados foram obtidos em sistema ULPC Dionex Ultimate 3000 acoplado a um Thermo Q Exactive. Para análise cromatográfica foi utilizada uma coluna Phenomenex Kinetex 2,6 μm C18 100 A (150x4,6 mm) a 27°C, com eluição gradiente de fase móvel A (ácido fórmico a 0,1% em água) e fase móvel B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila). A eluição começou com 50% de fase B e aumentou linearmente para 95% em 14 min, sendo mantida em 95% de fase B durante 5 min. O recondicionamento da coluna ocorreu por 3 minutos. A taxa de fluxo foi de 500 μL/min e o volume de injeção foi de 5 μL. O MS operou em modo positivo e negativo com intervalo de varredura de 30-1200 Da. A tensão de pulverização foi de 3,7V, temperatura capilar de 320°C e energia de colisão de 30eV.

### 3.2.7. Análise metabólica e rede molecular

Para a análise metabólica e a construção da rede molecular, as amostras controle, do sobrenadante e do conteúdo intracelular obtidas pelo cultivo de *M. arborescens* em meio mínimo acrescido de lufenuron foram analisados por UPLC-HESI-HR-ddMS2 em modo positivo e negativo. O software de exportação de MS foi utilizado para converter os dados

brutos em arquivos mzXML. Para a análise de rede do GNPS “The Global Natural Product Social Molecular Networking”, todos os arquivos mzXML foram carregados no site correspondente (http://gnps.ucsd.edu). Os parâmetros utilizados para a análise GNPS foram ajustados em 1,0 Da de tolerância para massa de íons precursores e em 0,5 Da de tolerância para massa de íons de fragmento. Outros ajustes como os parâmetros “min pairs Cos” em 0,65 e mínimo de íons fragmentados em 4 foram selecionados.

#### 3.2.8. Estudo da toxicidade do conteúdo intracelular do isolado IIL-Luf14 *Microbacterium arborescens*

Para esse estudo, o isolado IIL-Luf14 *M. arborescens* foi cultivado em meio mínimo M9 acrescido de 10 µg/mL de lufenuron sob agitação constante a 28ºC, por 5 dias, considerando como controle o cultivo em meio TSB (Acumedia®) nas mesmas condições. Os dois tratamentos foram submetidos aos processos de centrifugação, lavagem e lise das células para obtenção do conteúdo intracelular, conforme descrito anteriormente. Os conteúdos intracelulares foram avaliados quanto à mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* de 3º ínstar, adotando-se o método de bioensaio por ingestão. Assim, 30 µL do conteúdo intracelular de cada tratamento foi inoculado em cada um dos 24 poços de placas plásticas estéreis para o cultivo de células (35 x 10 mm por célula) contendo 3 mL de dieta artificial/poço. Posteriormente, uma lagarta de 3º ínstar (0-12 h) foi transferida para cada poço da placa, totalizando 120 lagartas por tratamento. As placas foram vedadas e mantidas em condições controladas (25±2ºC; 60±10% UR; fotofase de 14 h) para avaliação da mortalidade após 120 h do início do experimento.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Quantificação de inseticidas para estudo dos mecanismos envolvidos na degradação dessas moléculas por simbiontes de *Spodoptera frugiperda*

A quantificação de inseticidas após cultivo dos isolados estudados foi determinada utilizando GC-MS/MS para os piretroides lambda-cyhalothrin e deltamethrin, e LC-MS/MS para chlorpyrifos ethyl, spinosad e lufenuron. Os métodos propostos para análise de quantificação desses xenobióticos mostraram-se eficientes na detecção dos inseticidas após o cultivo e extração dos tratamentos propostos. A eficiência média de extração desses inseticidas

para a análise foi de cerca de 74%, sendo a concentração dos produtos determinada via comparação com curvas-padrão para cada inseticida (Figura 2.1).

Todos os isolados testados diminuíram a quantidade de inseticida disponível no meio após 5 dias de cultivo, quando comparados ao controle (Tabela 2.1). A análise do conteúdo intracelular revelou que, com exceção do isolado *P. psychrotolerans,* cultivado em spinosad, todos os outros isolados foram capazes de degradar e acumular quantidades expressivas dos respectivos inseticidas em suas células (Tabela 2.1).

*Microbacterium arborescens,* cultivado em lufenuron, foi o que apresentou maior capacidade de degradação do xenobiótico sobre o qual foi selecionado, sendo capaz de metabolizar 24,7% e acumular 37,3% desse inseticida em 5 dias de cultivo em meio contendo esse inseticida como a única fonte de carbono. Esse também foi o isolado com maior capacidade de acúmulo de inseticidas dentre os isolados estudados (Tabela 2.1). *Leclercia adecarboxylata*, cultivada em chlorpyrifos ethyl, foi a que apresentou a segunda maior capacidade de acúmulo do inseticida em suas células, acumulando 30,6% do chlorpyrifos ethyl disponível no meio após 5 dias de cultivo. Valor esse que correspondente ao dobro do chlorpyrifos ethyl metabolizado por esta bactéria (Tabela 2.1). Quanto aos piretroides, a capacidade de acumulação de lambda-cyhalothrin e deltamethrin pelos isolados IIL-Lc09 *P. stutzeri* e IIL-Dm05 *A. nicotinovorans*, respectivamente, foi muito próxima (24,1% e 20,6%). Porém, enquanto *A. nicotinovorans* foi capaz de metabolizar 44,9% de deltamethrin, *P. strutzeri* metabolizou apenas 8,4% de lambda-cyhalothrin (Tabela 2.1). Apenas *P. psychrotolerans,* cultivado em spinosad, não apresentou bioacumulação expressiva do inseticida; entretanto, foi capaz de metabolizar 20,9% de spinosyn A e 29,9% de spinosyn D (Tabela 2.1).

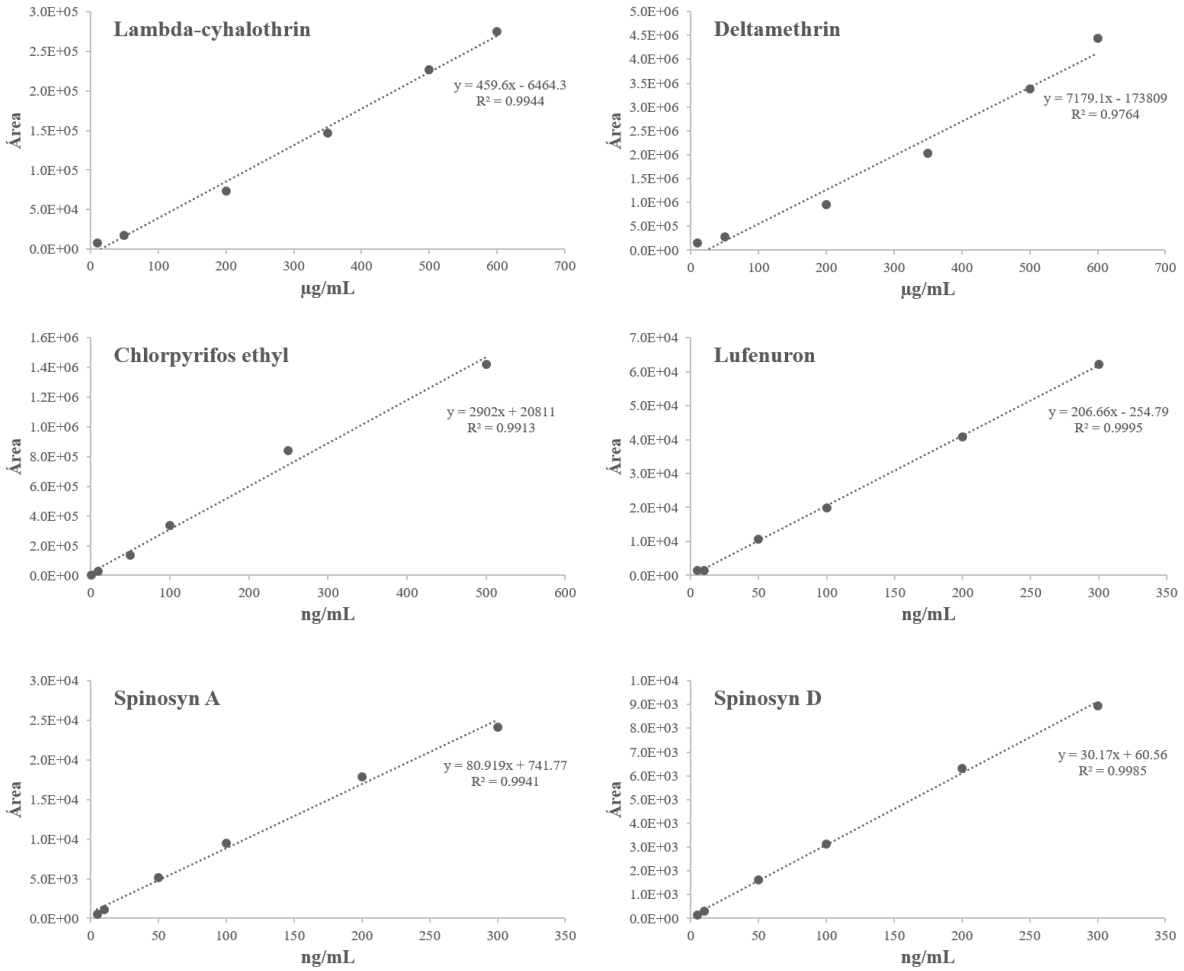


Figura 2.1. Curvas-padrão obtidas para lambda-cyhalothrin e deltamethrin via GC-MS/MS, utilizando concentrações de 10, 50, 200, 350, 500 e 650 µg/mL, e para chlorpyrifos ethyl, lufenuron, spinosyn A e spinosyn D via UPLC-MS/MS, utilizando as concentrações 0,5, 10, 50, 100, 250, 500 ng/mL (chlorpyrifos ethyl e lufenuron) ou 5, 10, 50, 200 e 300 ng/mL (spinosyn A e spinosyn D).

Tabela 2.1. Quantificação dos inseticidas lambda-cyhalothin, deltamethrin, chlorpyrifos ethyl, lufenuron e spinosad (spinosyn A e D) após 5 dias de cultivo dos isolados de bactérias associadas ao trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* resistentes a inseticidas.

| Inseticida | Isolado utilizado | Quantificação de inseticida (±EP, n=3) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | D %[1] | I %[2] | M %[3] | DN %[4] |
| Lambda-cyhalothrin | IIL-Lc09 | 48,4 ± 1,7 | 24,1 ± 2,3 | 8,4 ± 3,7 | 19,0 ± 5,0 |
| Deltamethrin | IIL-Dm05 | 18,3 ± 1,9 | 20,6 ± 0,6 | 39,5 ± 1,9 | 21,6 ± 0,7 |
| Chlorpyrifos-ethyl | IIL-Cl29 | 29,8 ± 4,4 | 30,5 ± 3,4 | 15,2 ± 5,9 | 17,7 ± 7,8 |
| Lufenuron | IIL-Luf14 | 21,9 ± 3,1 | 37,3 ± 1,8 | 24,7 ± 7,9 | 16,1 ± 4,6 |
| Spinosyn A | IIL-Sp19 | 78,0 ± 1,3 | 1,1 ± 0,6 | 20,9 ± 1,4 | 0,0 ± 0,0 |
| Spinosyn D | | 70,1 ± 1,3 | 0,0 ± 0,0 | 29,9 ± 5,3 | 0,0 ± 0,0 |

[1] D% = quantidade relativa de inseticida disponível; [2] I% = quantidade relativa de inseticida no lisado da célula; [3] M% = quantidade relativa de inseticida metabolizado; [4] DN% = quantidade relativa de inseticida degradado naturalmente; IIL-Lc09 *Pseudomonas stutzeri*; IIL-Dm05 *Arthrobacter nicotinovorans*; IIL-Cl29 *Leclercia adecarboxylata*; IIL-Luf14 *Microbacterium arborescens*; IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans*

### 3.3.2. Estudo de produtos de degradação de lufenuron pela ação de *Microbacterium arborescens* simbionte de *Spodoptera frugiperda* resistente a essa molécula

Amostras obtidas a partir do cultivo de *M. arborescens* em meio M9 + lufenuron como única fonte de carbono e analisadas por DI (ESI)-MS e DI (ESI)-MS/MS revelaram perfis químicos diversos para o controle (sem o cultivo da bactéria), sobrenadante (com o cultivo da bactéria) e conteúdo intracelular, sendo seus espectros de massas analisados em modo positivo e negativo em intervalo de massa-carga (*m/z*) compreendido entre 50 e 1200 Da (Figura 2.2).

Lufenuron apresentou melhor ionização em modo negativo e devido à sua alta ionização neste modo, não foi possível identificar sinais em inserção direta. Todos os sinais observados nos espectros de massa em modo negativo corresponderam a fragmentos de lufenuron e a molécula desprotonada. Já em modo positivo não foram observados fragmentos derivados de lufenuron, sendo identificado apenas metabólitos produzidos pela bactéria e componentes do meio de cultivo (Figura 2.2).

Amostras do conteúdo intracelular se apresentaram mais simples em comparação às amostras do sobrenadante. Entretanto, sinais de lufenuron *m/z* 511 $[luf+H]^+$ e *m/z* 533 $[luf+Na]^+$ foram observados apenas em amostras do conteúdo intracelular. Alguns sinais como *m/z* 149, 163 e 301 foram observados em amostras de sobrenadante e conteúdo intracelular. Estes sinais

correspondem a compostos produzidos pela bactéria derivados do processamento de lufenuron (Figura 2.2).

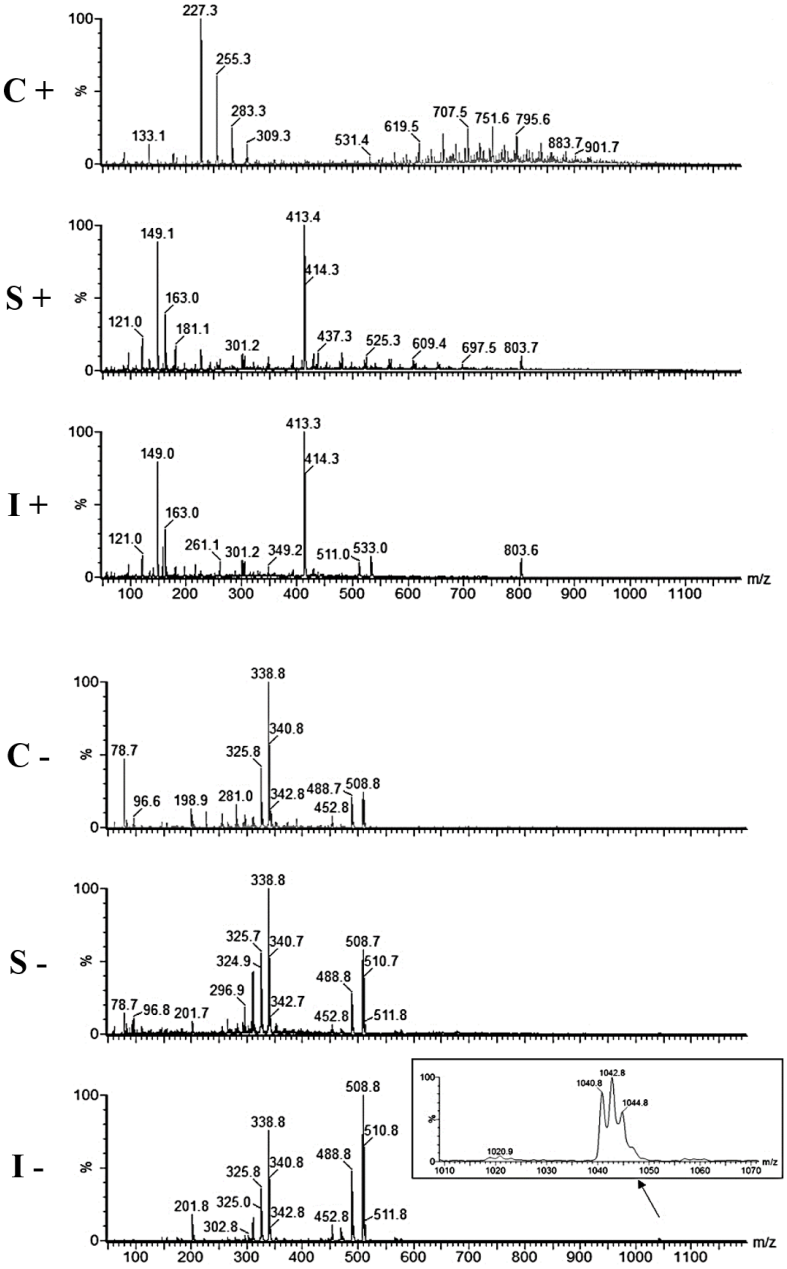


Figura 2.2. Perfil químico obtido por análise cromatográfica das amostras controle (C), sobrenadante (S) e conteúdo intracelular (I). Análise em modo positivo (+) e negativo (-) em baixa resolução de espectrometria de massa. O sinal *m/z* 1042 Da (em destaque) apresentou padrão isotópico similar ao lufenuron, correspondendo ao dímero sodiado desta molécula $[2luf+Na-H]^-$. Amostras obtidas pelo cultivo de *Microbacterium arborescens* em meio mínimo M9 contendo lufenuron como única fonte de carbono por 5 dias. Abundância relativa (%) por massa sobre carga (*m/z*).

Na análise DI(ESI)-MS/MS, alguns sinais foram selecionados para análise da caracterização estrutural dos metabólitos produzidos por *M. arborescens* nesta condição especial de cultivo. No modo negativo, o sinal *m/z* 1042 Da (destacado na Figura 2.2) apresentou padrão isotópico similar ao de lufenuron que corresponde ao dímero sodiado deste inseticida $[2luf+Na-H]^-$. O sinal de *m/z* 391/393, em modo positivo, apresenta padrão isotópico semelhante a compostos com dois átomos de cloro. Desta forma, esta estrutura foi atribuída a um derivado sodiado de lufenuron (Figura 2.3).

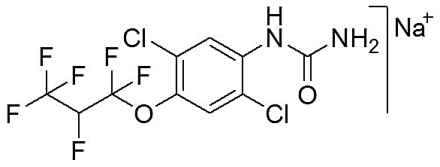


Figura 2.3. Íon *m/z* 391/393 em modo positivo. Estrutura atribuída a um derivado sodiado de lufenuron obtido por hidrólise.

Para o monitoramento de produtos de lufenuron biotransformados, o experimento de íons precursores foi selecionado devido à alta seletividade e sensibilidade da análise. A estratégia aplicada deu prioridade às estruturas que mantiveram alguns fragmentos da estrutura do lufenuron. Com isso, para contemplar a cadeia de carbono, foram selecionados dois íons precursores, um em modo positivo (*m/z* 158) e outro em modo negativo (*m/z* 326) (Figura 2.4). Esta estratégia foi capaz de comprovar a presença de lufenuron em amostras do controle, sobrenadante e do conteúdo intracelular (Figura 2.5). Porém, nessa estratégia de análise, não foi possível identificar nenhuma molécula de lufenuron biotransformado.

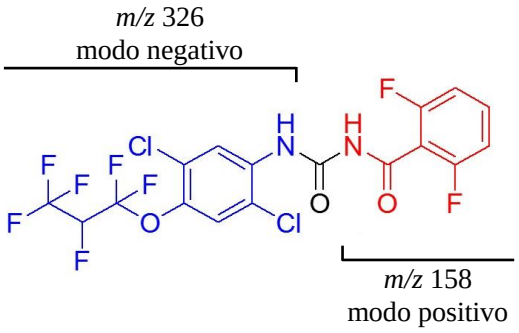


Figura 2.4. Estratégia utilizada no experimento de monitoramento de íons precursores para caracterização da degradação de lufenuron pela bactéria *Microbacterium arborescens* simbionte de *Spodoptera frugiperda* resistente a esta molécula. Monitoramento do íon *m/z* 326 em modo negativo para detecção de produtos de lufenuron com grupos intactos de N-((2,5-Dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil)carbamoil) (em azul) e monitoramento do íon em *m/z* 158 em modo positivo para detecção de derivados de fluorobenzoato a partir da degradação de lufenuron (em vermelho).

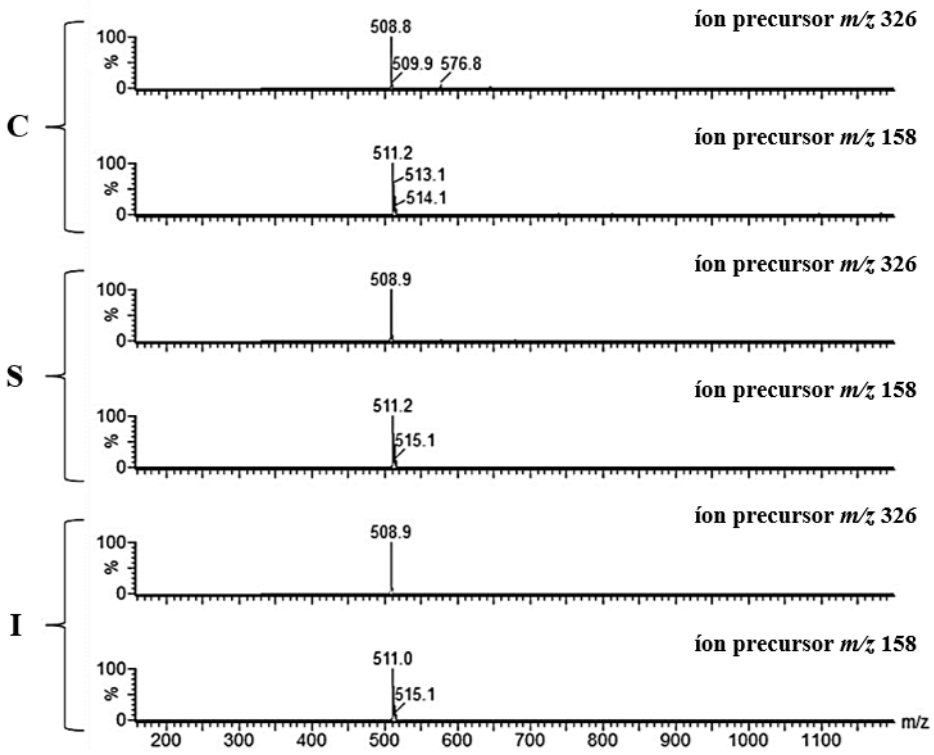


Figura 2.5. Monitoramento dos íons precursores *m/z* 326 em modo negativo e *m/z* 158 em modo positivo para detecção tentativa de produtos de lufenuron com grupos intactos de N-((2,5-Dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil)carbamoil) e de fluorobenzoato, respectivamente. Amostras do controle, sobrenadante e conteúdo intracelular obtidas pelo cultivo de *Microbacterium arborescens* em meio mínimo M9 contendo lufenuron como única fonte de carbono por 5 dias. Abundância relativa (%) por massa sobre carga (*m/z*).

### 3.3.3. Rede de interações moleculares

As redes de interações moleculares foram construídas em modo negativo e positivo por meio da análise das amostras do controle, sobrenadante e conteúdo intracelular obtidas pelo cultivo da bactéria *M. arborescens* em meio acrescido de lufenuron como única fonte de carbono. Em modo positivo, poucas informações foram obtidas a partir desta análise. Entretanto, no modo negativo foi encontrado um conjunto de moléculas relacionadas ao lufenuron (Figura 2.6).

Apenas para amostras do sobrenadante não foram encontrados compostos relacionados ao lufenuron, possivelmente devido às baixas concentrações presentes desse inseticida nessas amostras. Já em amostras do controle e conteúdo intracelular de *M. arborescens*, lufenuron foi encontrado em altas proporções. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos na quantificação de lufenuron nessas amostras (item 3.3.1), onde 21,9% de lufenuron estava presente em amostras de sobrenadante, 30,5% foi bioacumulado e 24,7% metabolizado pela

bactéria *M. arborescens* após 5 dias de cultivo em meio onde a única fonte de carbono foi o inseticida. Quanto aos produtos de degradação de lufenuron nas amostras, a rede molecular mostrou que nenhum sinal relacionado à fração de fluorobenzoato da molécula de lufenuron foi detectado. Em contrapartida, a outra fração analisada, o grupo N-((2,5-Dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil)carbamoil) foi identificado em amostras do controle e conteúdo intracelular (Figura 2.6).

Outras informações podem ser destacadas na análise da rede de interações moleculares (Figura 2.6), onde alguns íons identificados no grupo do lufenuron são decorrentes da hidrólise natural desta molécula, uma vez que esses íons também foram observados em amostras do controle (Figura 2.7). A análise também permitiu verificar que vários lisofosfolipídeos (LysoPE) estão exclusivamente presentes em amostras do conteúdo intracelular de *M. arborescens* (Figura 2.6). Essas moléculas foram caracterizadas em três tipos de LysoPE; 16:1, 16:0 e 18:1 (Figura 2.8).

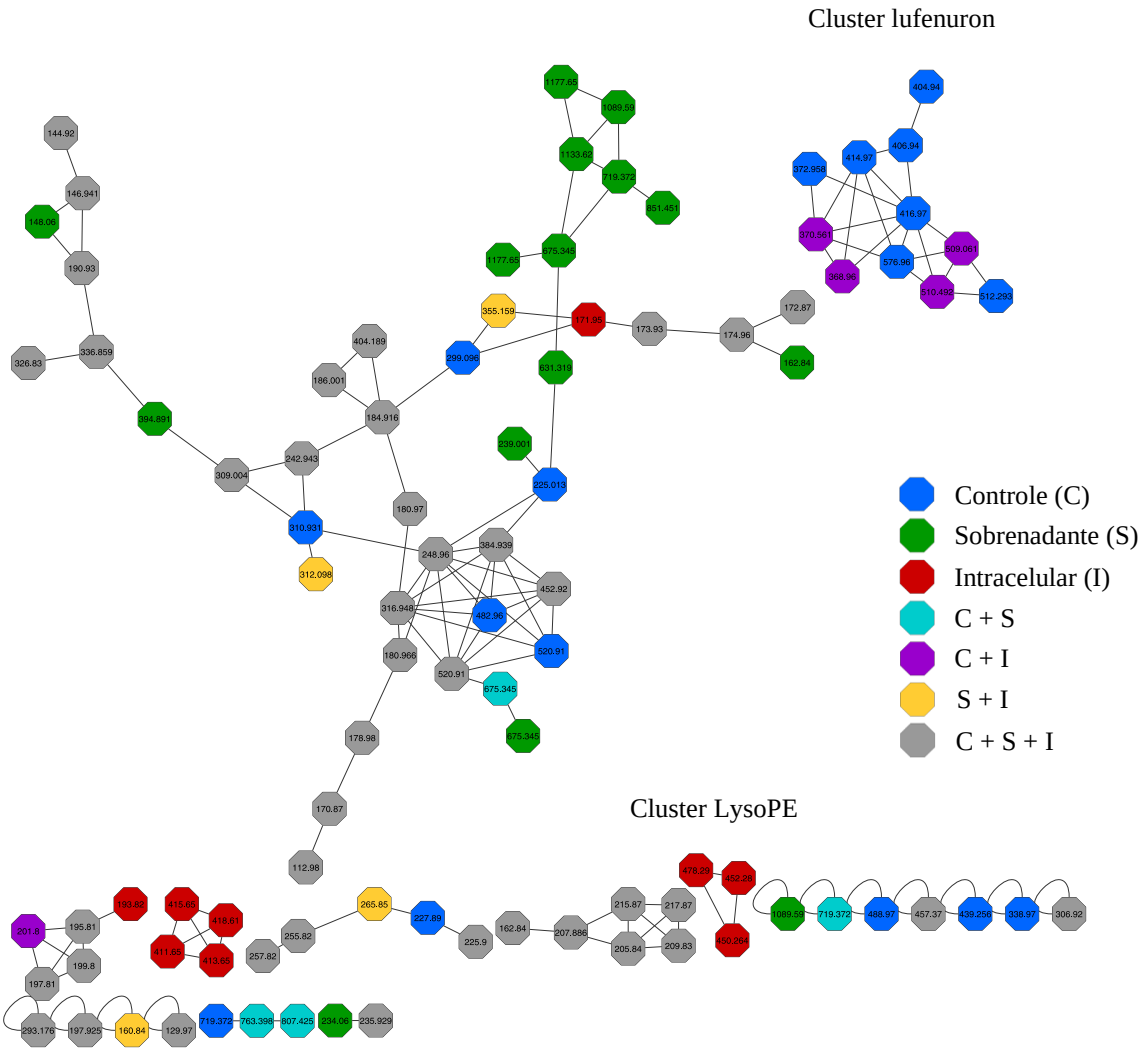


Figura 2.6. Rede de interações moleculares de amostras obtidas pelo cultivo de *Microbacterium arborescens* em meio mínimo M9 contendo lufenuron como única fonte de carbono por 5 dias. Análise obtida por cromatografia em modo negativo. Amostras de controle (C), conteúdo intracelular (I) e sobrenadante (S) obtidas por extração orgânica com cartucho C8 utilizando metanol como eluente. Cluster de lufenuron e de lisofosfolipídeos (LysoPE) encontrado em amostras do controle e/ou conteúdo intracelular.

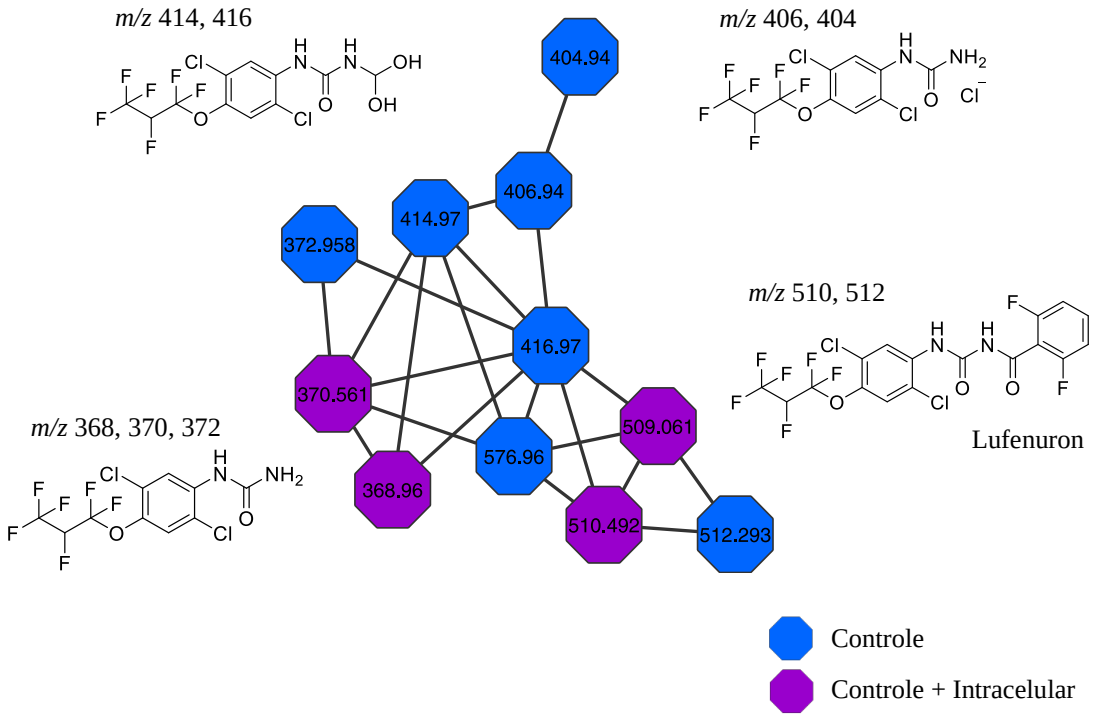


Figura 2.7. Cluster que contém a molécula de lufenuron e seus derivados da rede de interações moleculares obtida pelo cultivo de *Microbacterium arborescens* em meio mínimo M9 contendo lufenuron como única fonte de carbono por 5 dias. Análise obtida por cromatografia em modo negativo. Amostras de controle (C) e conteúdo intracelular (I) obtidas por extração orgânica com cartucho C8 utilizando metanol como eluente. Valores *m/z* com variação de 2 ou mais íons correspondem à mesma estrutura devido a variação isotópica.

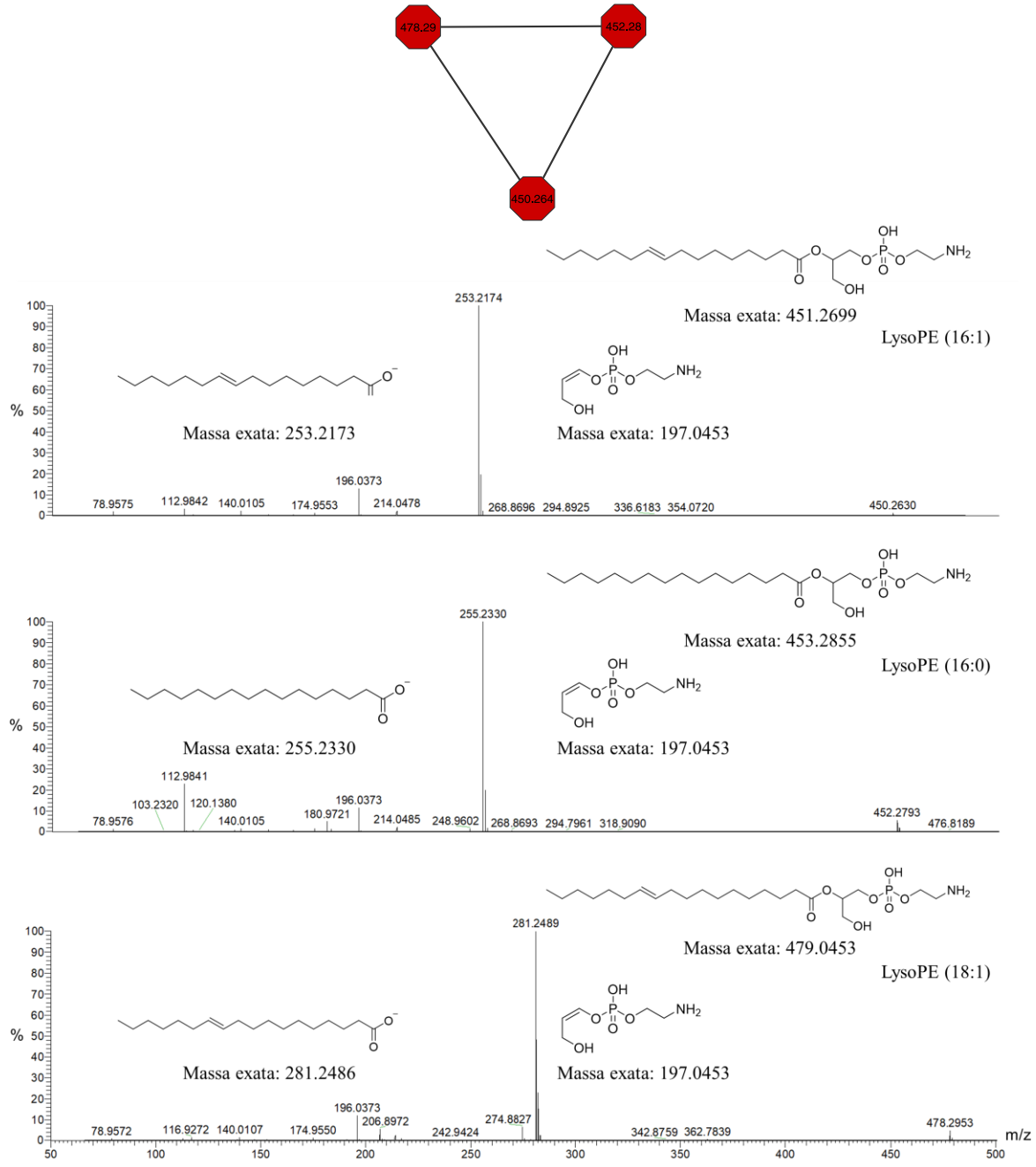


Figura 2.8. Cluster que contém moléculas de lisofosfolipídeos (LysoPE) encontradas exclusivamente no conteúdo intracelular de *Microbacterium arborescens* cultivada em meio mínimo M9 contendo lufenuron como única fonte de carbono por 5 dias. Análise obtida por cromatografia em modo negativo. Abundância relativa (%) por massa sobre carga (*m/z*).

A Figura 2.9 apresenta o cromatograma iônico de extração para o íon *m/z* 370. Este é um dos íons mais representativos da hidrólise do lufenuron. Com base na intensidade do íon, para o controle 0h, foi encontrado uma intensidade de $5{,}3x10^5$ e para controle 5 dias, a intensidade foi de $8{,}7x10^5$. Este resultado mostra uma taxa de hidrólise 64% maior após 5 dias. Para amostras de sobrenadante e conteúdo intracelular, a intensidade foi de $1{,}37x10^4$ e $8{,}6x10^4$

respectivamente. Este resultado sugere uma menor taxa de hidrólise em relação ao controle devido à absorção do lufenuron por *M. arborescens*.

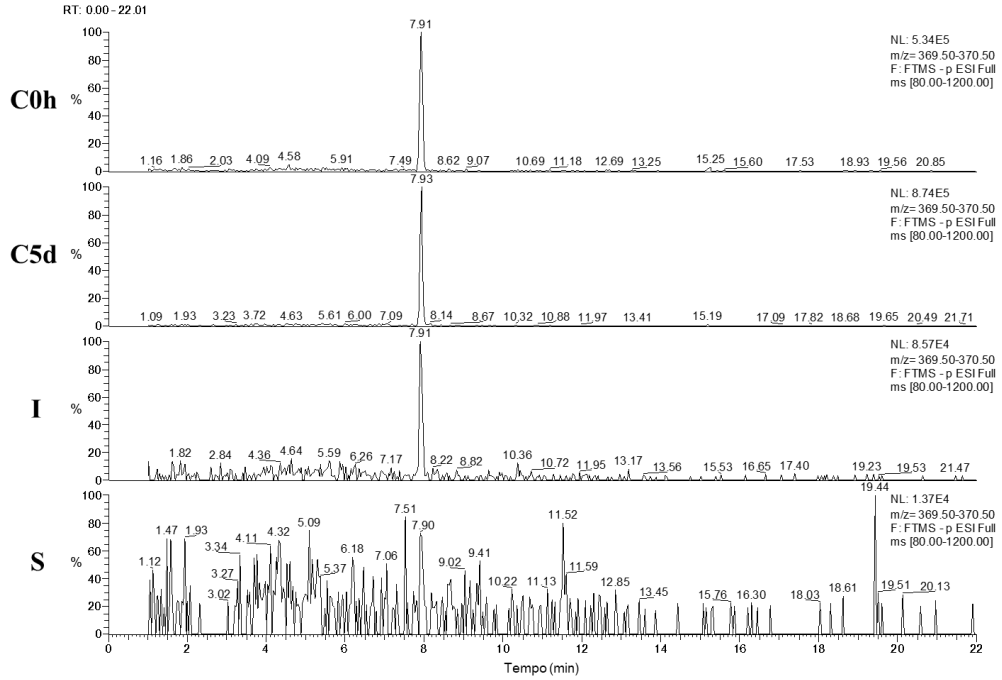


Figura 2.9. Análise de íons representativos na hidrólise de lufenuron. Cromatogramas iônicos de extração para íon *m/z* 370 obtidos para o controle 0h (C0h), controle 5 dias (C5d), conteúdo intracelular (I) e sobrenadante (S). Amostras obtidas por meio do cultivo de *Microbacterium arborescens* em meio mínimo M9 contendo lufenuron como única fonte de carbono por 5 dias. Abundância relativa (%) por massa sobre carga (*m/z*).

### 3.3.4. Toxicidade de metabólitos intracelulares de *Microbacterium arborescens* cultivado em lufenuron como única fonte de carbono

O conteúdo intracelular do isolado *M. arborescens* cultivado em meio contendo lufenuron como única fonte de carbono foi capaz de causar mortalidade de 95,4 ± 1,9% em lagartas de 3º ínstar de *S. frugiperda*, ao passo que, o conteúdo intracelular do isolado cultivado em meio TSB causou mortalidade de apenas 3,8 ± 1,5%. Esses dados contribuem com os resultados anteriores quanto à presença de lufenuron no conteúdo intracelular do simbionte de *S. frugiperda* resistente a esse inseticida.

## 3.4. Discussão

O estudo da degradação de chlropirifos ethyl, lambda-cyhalothrin, deltamethrin, spinosad e lufenuron por bactérias simbiontes de *S. frugiperda* resistente a esses inseticidas

revelou a existência de um mecanismo ainda pouco conhecido em bactérias associadas a insetos e que pode ter significativo impacto na resposta do hospedeiro a inseticidas. Dos cinco simbiontes analisados, todos foram capazes de metabolizar inseticidas, sendo que quatro apresentaram capacidade de acumular quantidades expressivas de inseticidas em suas células em comparação à quantidade presente no controle após 5 dias de cultivo. Essa constatação evidencia a bioacumulação como um mecanismo importante no processo de metabolização de inseticidas por bactérias simbiontes e levanta questionamentos quanto à participação desses organismos na capacidade do hospedeiro em tolerar agentes estressores, tal como os pesticidas.

A bioacumulação de inseticidas por bactérias simbiontes de insetos é pouco descrita na literatura, sendo os relatos voltados para bactérias exclusivamente isolados de água ou solo contaminados [30,31]. O processo de bioacumulação de lufenuron por *M. arborescens*, simbionte isolado do intestino de lagartas de *S. frugiperda* resistentes a esse inseticida, e suas implicações na capacidade de metabolização do inseticida pela associação hospedeiro/bactéria é um fato inédito na literatura. O presente estudo mostrou por meio de experimentos de íons precursores e redes de interações moleculares que o simbionte *M. arborescens* é capaz de bioacumular moléculas íntegras de lufenuron após cultivo dessa bactéria em meio com lufenuron como única fonte de carbono. O presente estudo mostrou ainda a comprovação prática da bioacumulação, onde células obtidas do cultivo de *M. arborescens* em lufenuron como única fonte de carbono foram capazes de causar mortalidade de *S. frugiperda* em ensaio *in vivo*, após sedimentação, lavagem e lise das células, comprovando a presença intracelular do inseticida em comparação com células obtidas do cultivo em meio TSB.

O estudo de possíveis produtos de degradação de lufenuron revelou que nenhum sinal relacionado à fração de fluorobenzoato da molécula de lufenuron foi detectado. Em contrapartida, a outra fração analisada, o grupo N-((2,5-Dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil)carbamoil) foi identificado em amostras do controle e conteúdo intracelular, caracterizando a capacidade de bioacumulação dessa molécula por *M. arborescens*. Com base nesses resultados, é possível inferir ainda que a bactéria simbionte *M. arborescens* pode ser capaz de bioacumular e degradar fluorobenzoato, utilizando-se desses produtos de degradação para seu metabolismo. Não existem relatos na literatura sobre degradação de fluorobenzoato por *M. arborescens*, embora a biotransformação de compostos com flúor por fungos, bactérias e leveduras tenha sido bastante estudada [32-34]. A revisão de Murphy [32] apresenta muitos exemplos de microrganismos capazes de degradar compostos com flúor através da clivagem enzimática específica de ligações C-F, discutindo processos de biotransformação desses compostos em condições aeróbicas e anaeróbicas.

Os pesticidas podem interferir no crescimento e na atividade de microrganismos, mas apesar da imprecisão quanto aos mecanismos de interação pesticida-microrganismos, dados disponíveis são consistentes com a ideia de que maioria das moléculas inseticidas interagem com a membrana microbiana [35]. Existem poucos relatos na literatura sobre as interações da membrana celular bacteriana com pesticidas. Essas interações são muito bem relatadas em estudos com hidrocarbonetos visando a biorremediação desses compostos em ambientes aquáticos [36]. Entretanto, os lisofosfolipídios (LPs) encontrados exclusivamente no conteúdo celular da bactéria em estudo pode indicar a existência de mecanismos de interações entre o inseticida lufenuron e a membrana celular de *M. arborescens* no processo de bioacumulação. Os LPs são mediadores lipídicos bioativos derivados da membrana que podem afetar funções celulares fundamentais como a proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração, adesão, invasão e morfogênese [37]. Desta forma, o presente estudo sugere que mediadores lipídicos estão envolvidos no processo de bioacumulação de lufenuron pela bactéria simbionte *M. arborescens*. Além disso, compostos fluorados, assim como o lufenuron, possuem propriedades físico-químicas capazes de afetar sua lipofilicidade, alterando a penetração da membrana celular e as interações com moléculas hidrofóbicas [32-34].

A análise da hidrólise de lufenuron por meio da investigação da presença do íon *m/z* 370 em amostras do controle, sobrenadante e conteúdo intracelular mostrou que a menor taxa de hidrólise presente em amostras com *M. arborescens* é diretamente relacionada à capacidade de absorção do inseticida no processo de bioacumulação e utilização dos metabólitos produtos da hidrólise do lufenuron pela bactéria. Como demonstrado nos estudos de quantificação desse inseticida, a hidrólise do lufenuron pela bactéria superou em 1,5 vezes a hidrólise natural desta molécula. Adicionalmente, a disponibilidade do inseticida no meio é reduzida mais pela absorção do que sua capacidade de hidrólise.

Portanto, o processo de bioacumulação de lufenuron por *M. arborescens* pode ser determinante na metabolização do produto por essa bactéria quando cultivada nesse inseticida como única fonte de carbono. Entretanto, ao se analisar o processo como um todo, é possível inferir a grande contribuição deste mecanismo na ecologia do inseto hospedeiro. Almeida (2013) [38] demonstrou que a colonização do trato digestivo de linhagem suscetível de *S. frugiperda* por *M. arborescens* resultou em $CL_{50}$ cerca de 10 vezes superior àquela da linhagem apossimbionte. Assim, bactérias simbiontes de *S. frugiperda* resistente a inseticidas com capacidade de bioacumulação dessas moléculas podem interferir ativamente na metabolização de xenobióticos pelo hospedeiro.

O mecanismo de bioacumulação envolvido no processo de desintoxicação de inseticidas relatado neste trabalho contribui para um melhor entendimento dos mecanismos que possam estar envolvidos na tolerância de insetos a inseticidas. Desta forma, a participação dos simbiontes de insetos na tolerância a inseticida se mostra relevante, principalmente no que diz respeito ao mecanismo microbiano de bioacumulação de xenobióticos presente no trato intestinal de insetos mastigadores.

### 3.5. Conclusões

- *Leclercia adecarboxylata, P. stutzeri, A. nicotinovorans* e *M. arborescens* hidrolisam e bioacumulam, respectivamente, chlorpyrifos ethyl, lambda-cyhalothrin, deltamethrin e lufenuron;

- *Pseudomonas psychrotolerans* hidrolisa spinosad, mas não bioacumula este inseticida;

- *Microbacterium arborescens* bioacumula o grupo N-((2,5-Dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil)carbamoil) resultante da degradação do lufenuron.

### Referências

1. Scott C, Pandey G, Hartley CJ, Jackson CJ, Cheesman MJ, Taylor MC, et al. The enzymatic basis for pesticide bioremediation. Indian Journal of Microbiology. 2008;48:65-79.

2. Ahmad I, Khan MSA, Aqil F, Singh M. Microbial applications in agriculture and the environment: a broad perspective. In: Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J. Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications. New York: Springer, 2011. p. 1-28

3. Chen M, Xu P, Zeng G, Yang C, Huang D, Zhang J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. Biotechnology Advances. 2015;33:745-755.

4. Stark JD, Banks JE. Selective Pesticides: are they less hazardous to the environment?. BioScience. 2001;51:980.

5. Gill HK, Garg H. Pesticide: environmental impacts and management strategies. Pesticides-Toxic Effects. 2014;188-230.

6. Theiling KM, Croft BA. Pesticide side-effects on arthropod natural enemies: a database summary. Agriculture, Ecosystems & Environment. 1988;21:191-218.

7. Devine GJ, Furlong MJ. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. Agriculture and Human Values. 2007;24:281-306.

8. Almeida LG, Moraes LAB, Trigo JR, Omoto C, Cônsoli FL. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: a potential source for biotechnological exploitation. Plos One. 2017;12(3):e0174754.

9. Ishikawa H. Insect symbiosis: an introduction. In: Bourtzis K, Miller A. Insect symbiosis. Florida: CRC Press; 2003. p. 368

10. Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Annual Reviews in Entomology. 2004;49:71-92.

11. Douglas A. The microbial dimension in insect nutritional ecology. Functional Ecology. 2009;23(1):38-47.

12. Feldhaar H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. Ecological Entomology. 2011;36(5):533-543.

13. Dowd PF. Symbiont-mediated detoxification in insect herbivores. In: Barbosa P, Krischik VA, Jones CG. Microbial mediation of plant-herbivore interactions. New York: Wiley; 1991. p. 411-440.

14. Boush GM, Matsumura F. Insecticidal degradation by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of the apple maggot. Journal of Economic Entomology. 1967;60:918–920.

15. Daughton CG, Hsieh DP. Parathion utilization by bacterial symbionts in a chemostat. Applied and Environmental Microbiology. 1977;34:175–184.

16. Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T. Symbiont-mediated insecticide resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109:8618–8622.

17. Ghanim M, Kontsedalov S. Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. Pest Management Science. 2009;65:939-942.

18. Chu CC, Spencer JL, Curzi MJ, Zavala JA, Seufferheld MJ. Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in the western corn rootworm. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2013;110:11917-11922.

19. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects diversity in structure and function. FEMS Microbiology Reviews. 2013;37:699-735.

20. Desprês L, David JP, Gallet C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. Trends in Ecology & Evolution. 2007;22:298-307.

21. Smagghe G, Tirry L. Insect midgut as a site for insecticide detoxification and resistance. In: Ishaaya I. Biochemical sites of insecticide action and resistance. Berlin: Springer; 2001. p. 293-321.

22. Zhang C, Bennett GN. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 2005;67:600-618

23. Russell RJ, Scott C, Jackson CJ, Pandey R, Pandey G, Taylor MC, et al. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. Evolutionary Applications. 2011;4:225-248.

24. Roe RM, Hodgson E, Rose RL, Thompson DM, Devorshak C, Anspaugh DD, et al. Basic principles and rationale for the use of insect genes in bioremediation: esterase, phosphotriesterase, cytochrome P 450 and epoxide hydrolase. Reviews in Toxicology. 1998;2:169-178.

25. Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. Applied Microbiology and Biotechnology. 2002;59:143-152.

26. Alcalde M, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. Biocatalysis and Biotransformation. 2007;25:113-113.

27. Sambrook J, Russell D. Molecular cloning. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

28. Kasten P, Precetti AA, Precetti CM, Parra, JRP. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificias e substrato natural. Revista de Agricultura. 1978;53:68-78.

29. Parra JRP. Criação de insetos para estudo com patôgenos. In: Alves SB. Controle microbiano de insetos, Editora Manole: São Paulo; 1986. p. 348-373.

30. Megharaj M, Madhavi D, Sreenivasulu C, Umamaheswari A, Venkateswarlu K. Biodegradation of methyl parathion by soil isolates of microalgae and cyanobacteria. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1994;53(2):292-297.

31. Atterby H, Smith N, Chaudhry Q, Stead D. Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminated environments. Pesticide Outlook. 2018;13(1):9-13.

32. Murphy C. Biodegradation and biotransformation of organofluorine compounds. Biotechnology Letters. 2009;32(3):351-359.

33. Lewandowski G, Meissner E, Milchert E. Special applications of fluorinated organic compounds. Journal of Hazardous Materials. 2006;136:385-391.

34. Smart BE. Fluorine substituent effects (on bioactivity). In: International symposium on fluorinated bioactive compounds. Brussels: Belgium; 1999. p. 3-11.

35. Baughman GL, Paris DF, Hodson RE. Microbial bioconcentration of organic pollutants from aquatic systems - A critical review. CRC Critical Reviews in Microbiology. 1981;8(3):205-228.

36. Hickey W. Bioremediation: principles and applications. Journal of Environment Quality. 1999;28(3):1042.

37. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. Annual Review of Biochemistry. 2004;73(1):321-354.

38. Almeida, LG. Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) [dissertação]. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2013.

# 4. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIONTES DA FORMIGA CORTADEIRA *Acromyrmex coronatus* (FABRICIUS, 1804) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E O SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A DESCOBERTA DE MOLÉCULAS INSETICIDAS

**Resumo**

Apesar das divergências quanto à sua origem e funções, a relação de formigas com simbiontes, suas implicações ecológicas e potencial biotecnológico para descoberta de moléculas bioativas despertam grande interesse na comunidade científica, uma vez que os simbiontes de formigas estão envolvidos em muitos processos essenciais para a sobrevivência de seus hospedeiros, principalmente quando relacionados à nutrição e defesa. Assim, no presente trabalho, investigou-se a diversidade de bactérias cultiváveis associadas à formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae), bem como a diversidade de metabólitos produzidos e o seu potencial para descoberta de compostos inseticidas. Foram identificados 46 filotipos pertencentes a *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. *Acromyrmex coronatus* mostrou ser um nicho adequado para a seleção direcionada de microrganismos com capacidade de produção de compostos com atividade inseticida, se revelando uma alternativa à busca por maior diversidade de microrganismos e novos compostos bioativos. Além disso, diferenças expressivas na atividade inseticida entre extratos orgânicos produzidos com diferentes solventes e entre isolados do mesmo filotipo demonstram o grande potencial dos microrganismos associados a esses insetos em contribuir com compostos bioativos de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Inseto; Microbiota; Metabólitos; Bioatividade; Biotecnologia

**Abstract**

Despite the divergences regarding their origin and functions, the interaction of ants with symbionts, the ecological implications and biotechnological potential of ant-associated symbionts for the discovery of bioactive molecules has been of great interest to the scientific community. Ant symbionts are involved in many processes essential for the survival of their hosts, especially when related to nutrition and defense. We investigated the diversity of culturable bacteria associated with the cuticle of the ant *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae), and determined the diversity of metabolites produced and their potential for the discovery of insecticidal compounds. Forty-six phylotypes were identified associated with the cuticle of *A. coronatus* distributed in *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. These phylotypes produced a large variety of metabolites and bioassays demonstrated several of these isolates produced molecules with insecticide activity against *S. frugiperda. Acromyrmex coronatus* was a suitable source for the selection of microorganisms with the capacity to produce compounds with insecticidal activity. We also demonstrated significant differences in insecticidal activity when using organic extracts produced with different solvents and between isolates of the same phylotipe, highligthing the great potential of ant-associated microorganisms to contribute with bioactive compounds of biotechnological interest.

Keywords: Insect; Microbiota; Metabolites; Bioactivity; Biotechnology

## 4.1. Introdução

A história da vida na Terra tem sido moldada principalmente por microrganismos. O mais antigo relato da existência de vida, há 3,5 bilhões de anos, evidencia um microrganismo como o ancestral comum que originou as mais diversas formas de vida do planeta, sendo posteriormente fundamental em processos que ajudaram a biosfera a ser mais hospitaleira para novas formas de vida [1,2]. Neste período, com origem há cerca de 420 milhões de anos, os insetos se tornaram o grupo mais diverso e abundante de animais na Terra, habitando quase todos os nichos existentes [3]. Grande parte deste sucesso evolutivo se deu pela associação com microrganismos. Essas associações evoluíram em relações bastante específicas com seus hospedeiros, as quais também foram fundamentais para sua especiação [4-6].

Estima-se que a microbiota possa ser responsável por 1-10% da biomassa do inseto, implicando que o inseto pode ser considerado um multiorganismo [7]. Devido a existência de estilos de vida e comportamentos alimentares especializados, os insetos são frequentemente propensos a contaminação por microrganismos. Na vida em grandes comunidades, como a de insetos sociais, em particular, o fornecimento de nutrientes para a prole e a construção de câmaras de incubação são ameaçadas por espécies invasoras e predatórias. Como resposta a essas ameaças, muitos insetos desenvolveram estratégias defensivas, incluindo defesa mecânica e comportamental, sistemas imunológicos complexos e o uso de metabólitos secundários bioativos produzidos por mutualistas [8-11].

O mutualismo entre formigas e microrganismos é um exemplo clássico da complexidade das relações resultantes da simbiose. As formigas vivem em mutualismo com fungos, os quais são cultivados como sua fonte de alimento. Porém, esse bem estabelecido mutualismo pode ser ameaçado por fungos parasitas especializados, que atacam o fungo alimento das formigas. Para defender sua fonte de nutrientes contra a infecção por fungos parasitas, as formigas estão associadas a bactérias que produzem antibióticos e inibem o parasita invasor [12]. A relação de formigas com bactérias simbiontes e as implicações ecológicas dessas interações despertam grande interesse na comunidade científica, já que essa associação pode afetar substancialmente diversos processos essenciais para a sobrevivência de seus hospedeiros, especialmente quando relacionados à nutrição e defesa [13,14], ou como fonte de novas moléculas com potencial biotecnológico [15-17].

Apesar dos produtos naturais representarem os casos mais bem-sucedidos na descoberta de moléculas inovadoras para agricultura [18,19], muitas pesquisas diminuíram a prospecção por compostos bioativos nas últimas décadas devido a crescente redução no número

de compostos bioativos descobertos [20]. Como alternativa, as pesquisas se concentraram intensamente na exploração de microrganismos associados a novos habitats como fonte de recursos com potencial biotecnológico [20-24].

A diversidade de microrganismos associada a insetos, juntamente com a pressão de seleção existente nesta relação devido à variedade de ambientes habitados, desperta grande interesse da comunidade científica na avaliação de simbiontes como um recurso inexplorado para aplicações biotecnológicas, incluindo o próprio controle de pragas [24-26]. Assim, nesse trabalho avaliamos a diversidade da microbiota cultivável associada ao tegumento da formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae) e o potencial inseticida de grupos selecionados voltado à descoberta de moléculas bioativas, utilizando-se de sistemas *in vivo* e *in vitro* de avaliação.

## 4.2. Material e métodos

### 4.2.1. Material biológico

Adultos de *Acromyrmex coronatus* foram coletados de seu ninho no tronco de um abacateiro junto ao Campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba, estado de São Paulo (Brasil). Os insetos foram trazidos para o laboratório e imediatamente processados para o isolamento bacteriano.

O estudo também utilizou lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) da linhagem suscetível de referência, disponibilizada pelo Laboratório de Manejo de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), e mantida em nossos laboratórios por mais de 10 anos sem qualquer introdução de material genético externo. Essa linhagem é definida como uma referência à suscetibilidade em bioensaios, pois não foi selecionada para resistência e se mantém livre da pressão de seleção por xenobióticos. Os insetos foram criados em dieta artificial à base de feijão [27], seguindo os procedimentos de criação descritos por Parra [28].

### 4.2.2. Isolamento e cultivo

Grupos de 10 formigas foram selecionados aleatoriamente e enxaguados em 10 mL de solução salina estéril com auxílio de um vortex. Alíquotas de 50 μL da solução de lavagem

foram amostradas e plaqueadas nos seguintes meios de cultura: SM3 [29], TSA (Acumedia™), ISP2 [30], ISP4 [30] e quitina [31]. As placas contendo os meios de cultivo foram incubadas a 28ºC por 24 h ou até que o crescimento da colônia pudesse ser visualizado. As colônias obtidas foram agrupadas (morfotipo) de acordo com suas características morfológicas (tamanho, cor e formato) e de crescimento, sendo que pelo menos três colônias (isolados) de cada morfotipo foram reisoladas para posterior caracterização molecular por meio de PCR-RFLP e análises de sequenciamento. Cada isolado foi cultivado em meio líquido e uma alíquota das células em cultivo foi preservada em 20% glicerol e depositada na Coleção de Simbiontes de Insetos do Laboratório de Interações em Insetos, mantida a -80ºC. Amostras de cada clone também foram mantidas no meio de cultura correspondente e utilizadas para a realização dos ensaios propostos.

### 4.2.3. Caracterização molecular

Os morfotipos selecionados foram cultivados a 28° C durante 24 h sob agitação constante (120 rpm) em 1 mL do meio de cultura utilizado no isolamento inicial. As células foram sedimentadas por centrifugação (2000*g* x 5 min) e utilizadas para extração de DNA genômico [32]. A qualidade e integridade do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v), contendo 0,5 µg /mL de brometo de etídio, a 70 V durante 1 h em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7,2) e análise padrão por espectrofotometria verificando a razão A260/280 [33, 34]. As amostras de DNA foram submetidas à amplificação por PCR, sendo o gene 16S do rRNA selecionado como marcador molecular para a identificação putativa dos isolados. As reações de PCR utilizaram 10-20 ng de DNA genômico e o conjunto de iniciadores universais 8f (5'-AGA GTT TGA TGC CTC AG-3 ') e 1491r (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3 ') [35] em tampão de enzima (1x), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador e 0,625 U de Taq polimerase (Promega), em reação com volume final de 25 µL. As amplificações foram conduzidas em termociclador programado a 95ºC por 4 min (1 ciclo); 95ºC por 1 min, 55ºC por 1 min e 72ºC por 2 min (35 ciclos); e 72ºC por 10 min (1 ciclo). O produto da reação foi revelado em gel de agarose a 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, via eletroforese em voltagem constante de 100 V em tampão TAE, assim como descrito anteriormente.

Antes de serem submetidos ao sequenciamento, os amplicons produzidos foram tratados com 1 U de fosfatase alcalina e 1 U exonuclease (Promega) para a remoção dos iniciadores remanescentes, dNTPs e DNA de fita simples, e submetidos a análise de

polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP – "Restriction Fragment Length Polymorphism"), via digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI, *Rsa* e *Dde*I (Promega). Uma alíquota de 4 µL de cada produto de PCR foi digerida em uma mistura de reação de 10 µL (0,5 µL da enzima – 5 U, 1 µL de tampão e 4,5 µL de água), de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Em seguida, a reação foi incubada a 37ºC por 4 h. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, assim como descrito anteriormente. O tamanho dos fragmentos de restrição foi estimado graficamente usando o programa GelQuant (DNR Bio-Imaging Systems Ltd.) e o marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) como referência. Amostras com padrões de digestão idênticos, quando pertencendo ao mesmo morfotipo, foram reunidas em um mesmo grupo e três isolados de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para sequenciamento do 16S rDNA amplificado.

Os amplicons purificados foram submetidos ao sequenciamento bidirecional junto ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP, em um analisador de DNA ABI 3730 usando o protocolo de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1. As sequências do 16S rDNA obtidas foram visualizadas no programa FinchTV v1.4.0 (Geospiza Inc.) e montadas com auxílio da ferramenta BLAST. Aproximadamente 1.350 pb do amplicon do marcador 16S rDNA foram obtidos via sequenciamento com os iniciadores empregados na reação original de amplificação e montagem dos sequenciamentos senso e antissenso. As sequências obtidas foram comparadas àquelas disponíveis junto aos bancos de dados do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e do servidor e-EzTaxon (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/) [36], utilizando as ferramentas de busca disponibilizadas nos mesmos para a identificação putativa dos isolados obtidos. Todas as sequências obtidas foram depositadas em GenBank sob os números de acesso KX380875-KX380920.

### 4.2.4. Análise filogenética

As sequências de 16S rDNA obtidas foram alinhadas com a ferramenta ClustalW disponível no programa MEGA 7.0, utilizando-se de parâmetros padrão (penalidade de "gap" = 15, extensão de "gap" = 9) [37]. Relações filogenéticas foram inferidas por meio do teste de neighbor-joining [38] para a obtenção da árvore filogenética. O modelo Kimura 2-parameter [39] foi utilizado para gerar um processo evolutivo e obtenção da matriz de distâncias. O método de bootstrap foi utilizado para testar a significância estatística para cada ramo da árvore gerada obtido por análise com 1000 iterações [40]. Sequências do marcador 16S rDNA de

bactérias mais próximas aos isolados foram obtidas junto aos bancos de dados do NCBi/e-EzTaxon e utilizadas para a reconstrução da árvore filogenética.

### 4.2.5. Obtenção dos extratos brutos para análise química e biológica

Morfotipos obtidos do tegumento de *A. coronatus* foram selecionados aleatoriamente, inoculados em 1,5 L de meio líquido de ISP2 e mantidos sob agitação constante (130 rpm) por 7 dias a 28ºC. As amostras foram submetidas a filtração ou centrifugação (3000*g* x 10 min x 25°C) para remoção de células. O sobrenadante obtido foi submetido à extração líquido-líquido 1:1 com acetato de etila (Synth) e com hexano (Synth), de acordo com procedimentos padrões de extração líquida [41]. Os extratos brutos obtidos foram concentrados em rotoevaporador (Tecnal) (40 rpm; 45ºC) e acondicionados em recipientes escuros de 2,5 mL (Sun Sri) a -20°C até a análise.

### 4.2.6. Análise química para extratos brutos obtidos com acetato de etila

Os perfis químicos dos extratos brutos obtidos por meio de extração com solvente hexano foram analisados por inserção direta (DI-ESI). Todas as análises foram realizadas em um Espectrômetro de Massa XevoTM TQ-S (Waters Corporation), acoplado à Cromatografia Líquida Ultra Alta Performance AcquityTM (UPLCTM - Waters). A ionização das amostras foi realizada usando fonte de ionização Z-spray operando em modos positivo (DI-ESI+) e negativo de análise (DI-ESI-), sendo a taxa de fluxo de 0,100 mL/min. A eluição isocrática utilizada foi de 0,1% de ácido fórmico em metanol a 90% durante 2 min. O volume de injeção foi de 2 μL e a concentração dos extratos brutos utilizada de 10 μg/mL. A tensão capilar e a tensão de pulverização foram ajustadas para 3,3 kV e 70 V, respectivamente, e a temperatura de dessolvatação fixada em 300°C em todas as análises.

### 4.2.7. Análise química para extratos brutos hexânicos

Os extratos brutos obtidos por meio de extração com o solvente hexano foram analisados por cromatografia gasosa-espectrometria de massas em cromatógrafo gasoso Varian 3900, equipado com a coluna cromatográfica Zebron ZB-1 (30 mx 25 mm, 25 μm), Phenomenex, acoplada ao espectrômetro de massa Varian Saturno 2100 T. A temperatura da

fonte de íons utilizada foi de 250°C e o programa de temperatura do forno de 4 minutos a 80°C a 320°C em 10 min, aumentando a 15°C/min. O tempo total de análise foi de 30 min, em modo não dividido (*splitless*). O espectrômetro de massa operou com alcance de *m/z* 30-650 Da e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. Os extratos brutos foram derivatizados com N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida (BSA, 95% de pureza) (Sigma-Aldrich) e clorortrimetilsilano (TMCS, 97% de pureza) (Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo do fabricante.

### 4.2.8. Potencial inseticida dos extratos brutos

Um conjunto de extratos brutos foi selecionado aleatoriamente e submetido a bioensaios de atividade inseticida contra lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda.* Os experimentos foram conduzidos em placa plástica de 24 poços para o cultivo de células (Costar®, Cambridge, Massachusetts, EUA). Cada um dos poços da placa foi preenchido com 1,25 mL de dieta artificial e as placas mantidas em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta até a geleificação da dieta para evitar a contaminação superficial da mesma. Uma vez geleificada, a superfície da dieta no interior de cada poço da placa recebeu 20 µL do extrato bruto (25 µg/µL), correspondendo a uma dose de 260 µg/cm$^2$. Para a secagem completa do solvente, todas as placas foram mantidas abertas no interior de uma capela de fluxo laminar durante 1 h. Esse procedimento não comprometeu a qualidade da dieta artificial e sua aceitação pelas lagartas.

Após a completa evaporação do solvente, cada célula foi inoculada com 10 neonatos (0-24 h de idade) para a exposição de larvas à dieta artificial tratada superficialmente. Todas as placas foram seladas com filme plástico (Parafilm), contendo pequenos orifícios para garantir a ventilação. Como controle negativo, foram utilizados os solventes hexano e acetato de etila. As placas foram vedadas e mantidas em condições controladas (25±2ºC; 60±10% UR; fotofase de 14 h) para avaliação da mortalidade após 120 h do início do experimento. Foram considerados mortos, os indivíduos que ao serem tocados com a ponta de um estilete nos últimos segmentos abdominais não responderam com movimentos coordenados, ou que tiveram o crescimento comprometido, sem a troca de ínstar.

### 4.2.9. Análise de mortalidade por bioensaio *in vitro*

Os extratos de isolados que apresentaram capacidade inseticida nos ensaios *in vivo* de toxicidade também tiveram sua toxicidade avaliada em ensaio *in vitro*. Ensaios *in vitro* foram utilizados para avaliar a sua eficiência como método alternativo ao tradicional ensaio *in vivo* para a identificação de moléculas com atividade entomotóxica, o que facilitaria a condução de estudos posteriores visando à caracterização do modo de ação dessas moléculas. O ensaio de atividade inseticida *in vitro* foi conduzido com células de *S. frugiperda* da linhagem Sf9 (ThermoFisher Scientific), clones da linhagem celular parental Sf21 (IPLBSF-21) derivadas do tecido ovariano de pupas. Essas células foram cultivadas em meio livre de soro Sf-900 (ThermoFisher Scientific) e ajustadas para concentração padrão de $10^6$ células/mL por meio da técnica de contagem de células em câmara de Neubauer e visualização em microscópio óptico, onde a diferenciação entre células viáveis e não viáveis foi possível por meio do método de coloração com o corante Azul de Tripan a 0,4% (Sigma). Para avaliação da mortalidade de células adotou-se o ensaio fluorimétrico utilizando o corante resazurina como indicador da atividade celular. Este corante atua como um receptor de elétrons na cadeia transportadora de elétrons da célula onde a redução irreversível de resazurina em resorufina é diretamente proporcional à atividade de respiração aeróbica [42]. A redução desse corante emite fluorescência que pode ser determinada por fluorimetria nos comprimentos de onda 530-560 nm (excitação) e 590 (emissão), sendo capaz de indicar uma relação diretamente proporcional entre a fluorescência e a atividade celular. Assim, amostras de extrato bruto ou frações do extrato bruto dos isolados selecionados foram secos em cabeça de nitrogênio ($N_2$) e ressuspensas em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%, diluído em água ultrapura (Milli-Q). O ensaio foi realizado em placas de cultivo de células com 96 poços, onde cada poço foi preenchido com 190 µL de meio Sf-900, 100 µL de meio Sf-900 contendo $10^5$ células Sf9 e 10 µL do extrato/fração de interesse (100 µg/poço). Para o controle negativo foram utilizados 190 µL de meio Sf-900, 100 µL de meio Sf-900 contendo $10^5$ células Sf9 e 10 µL de DMSO 5%. A concentração final de DMSO no bioensaio foi inferior a 3,5%. Para o controle positivo foram utilizados 190 µL de meio Sf-900, 100 µL de meio Sf-900 contendo $10^5$ células Sf9 e 10 µL de solução com formaldeído a 20%. Após o tratamento, as placas foram incubadas a 25ºC sob agitação constante (60 rpm) por 24 h. Em seguida, 10 µL do corante resazurina (2%) foi adicionado a cada poço e a placa incubada por 120 min sob proteção da luz. Após esse período, a fluorescência foi medida no fluorímetro de placa Synergy H1 Multi-Mode Reader (BioTek).

O corante resazurina foi preparado em uma solução estoque a 1 mg/mL protegido por papel alumínio para evitar sua fotodegradação, utilizando-se água ultrapura como diluente.

## 4.3. Resultados

### 4.3.1. Isolamento de bactérias simbiontes de *Acromyrmex coronatus*

Os diferentes meios de cultivo utilizados se mostraram adequados ao isolamento de bactérias associadas a superfície cuticular de *A. coronatus*, totalizando 106 morfotipos isolados. O meio ISP4 foi o mais apropriado para o isolamento (n = 39), enquanto que os meios SM3, TSA, ISP2 e quitina foram responsáveis pelo isolamento de 26, 23, 11 e 7 morfotipos, respectivamente.

### 4.3.2. Caracterização molecular e diversidade de simbiontes de *Acromyrmex coronatus*

A análise das sequências parciais do 16S rDNA (550 pb), para cada padrão de PCR-RFLP observado para cada morfotipo obtido, resultou na seleção de 46 isolados para o completo sequenciamento. As sequências do gene 16S rRNA utilizadas para a caracterização molecular foram de 1350 pb. Assim, as sequências completas dos 46 isolados selecionados foram comparadas com aquelas disponíveis junto ao banco de dados do NCBi e do servidor e-EzTaxon, obtendo a identificação das mesmas por similaridade (Tabela 3.1).

A análise filogenética realizada utilizando as sequências do 16S rDNA (1350 pb) obtidas para isolados selecionados mostrou que quase todos os isolados foram agrupados em ramos bem definidos e em clados altamente sustentados com seus correspondentes mais próximos, com exceção dos filotipos IIL-Asp39, IIL-Asp51, IIL-Asp64 e IIL-Asp74, que resolveram em um único clado com outras quatro espécies estreitamente relacionadas, *Streptomyces nojiriensis* (GenBank Accession N° AJ781355), *Streptomyces colombiensis* (GenBank Accession N° DQ026646), *Streptomyces spororaveus* (GenBank Accession N° AJ781370) e *Streptomyces xanthophaeus* (GenBank Accession N° JOFT01000080) (Figura 3.1). Apesar das claras diferenças morfológicas entre esses filotipos, todos eles se agruparam em um único clado (Figura 3.1).

Tabela 3.1. Identificação putativa dos isolados associados a *Acromyrmex coronatus* pela análise da similaridade do marcador molecular utilizado (16S rDNA - 1350 pb em tamanho). Identidade dada por comparação com sequências depositadas no banco de dados do NCBi e no servidor e-EzTaxon.

| | Isolado* | Similaridade | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Correspondente mais próximo | Nº Acesso GenBank | Id (%)** | Diff / Total*** |
| *Actinobacteria* | IIL-Asp82[e] | *Arthrobacter koreensis* | AY116496 | 99,5 | 7/1350 |
| | IIL-Asp17[a] | *Gordonia terrae* | BAFD01000032 | 99,8 | 3/1350 |
| | IIL-Asp67[d] | *Kitasatospora gansuensis* | AY442265 | 99,2 | 12/1350 |
| | IIL-Asp83[e] | *Microbacterium aurantiacum* | AM182159 | 96,1 | 50/1273 |
| | IIL-Asp21[a] | *Microbacterium ginsengiterrae* | EU873314 | 98,8 | 16/1350 |
| | IIL-Asp41[d] | *Microbacterium trichothecenolyticum* | JYJA01000006 | 99,3 | 9/1350 |
| | IIL-Asp06[a] | *Mycobacterium mucogenicum* | AY457074 | 99,8 | 2/1350 |
| | IIL-Asp05[a] | *Nocardia niigatensis* | BAGC01000015 | 98,0 | 27/1350 |
| | IIL-Asp25[a] | *Nocardia asteroides* | BAFO01000006 | 100,0 | 0/1350 |
| | IIL-Asp20[a] | *Nocardia harenae* | DQ282122 | 98,5 | 20/1350 |
| | IIL-Asp79[c] | *Rhodococcus fascians* | JMEN01000010 | 98,7 | 17/1346 |
| | IIL-Asp54[d] | *Streptomyces amritsarensis* | GQ906975 | 99,5 | 6/1348 |
| | IIL-Asp63[d] | *Streptomyces antibioticus* | AB184184 | 98,6 | 19/1349 |
| | IIL-Asp73[d] | *Streptomyces bungoensis* | AB184696 | 99,6 | 6/1349 |
| | IIL-Asp51[d] | *Streptomyces colombiensis* | DQ026646 | 99,5 | 7/1349 |
| | IIL-Asp77[d] | *Streptomyces drozdowiczii* | AB249957 | 100,0 | 0/1349 |
| | IIL-Asp72[d] | *Streptomyces eurocidicus* | AY999790 | 99,0 | 14/1349 |
| | IIL-Asp39[c] | *Streptomyces nojiriensis* | AJ781355 | 100,0 | 0/1350 |
| | IIL-Asp48[d] | *Streptomyces novaecaesareae* | JNWQ01000181 | 99,7 | 4/1348 |
| | IIL-Asp95[e] | *Streptomyces olivochromogenes* | AB184737 | 99,0 | 13/1348 |
| | IIL-Asp97[e] | *Streptomyces pratensis* | JQ806215 | 99,8 | 2/1329 |
| | IIL-Asp70[d] | *Streptomyces recifensis* | AB184165 | 99,9 | 1/1349 |
| | IIL-Asp91[e] | *Streptomyces resistomycificus* | JOBA01000220 | 99,0 | 13/1349 |
| | IIL-Asp64[d] | *Streptomyces spororaveus* | AJ781370 | 100,0 | 0/1350 |
| | IIL-Asp53[d] | *Streptomyces virginiae* | JOAK01000082 | 99,6 | 5/1346 |
| | IIL-Asp74[d] | *Streptomyces xanthophaeus* | JOFT01000080 | 99,4 | 10/1349 |
| | IIL-Asp66[d] | *Streptomyces zaomyceticus* | AB184346 | 100,0 | 0/1350 |
| *Firmicutes* | IIL-Asp34[b] | *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* | CP000560 | 99,9 | 1/1350 |
| | IIL-Asp07[a] | *Bacillus cereus* | AE016877 | 100,0 | 0/1350 |
| | IIL-Asp32[b] | *Bacillus circulans* | AY724690 | 99,6 | 6/1349 |
| | IIL-Asp27[b] | *Bacillus ginsengihumi* | AB245378 | 100,0 | 0/1350 |
| | IIL-Asp01[a] | *Sporosarcina koreensis* | DQ073393 | 99,7 | 4/1350 |
| | IIL-Asp36[b] | *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* | AB233327 | 100,0 | 0/1349 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *Proteobacteria* | IIL-Asp31[b] | *Acinetobacter beijerinckii* | APQL01000005 | 97,9 | 28/1350 |
| | IIL-Asp69[d] | *Amaricoccus kaplicensis* | U88041 | 98,4 | 20/1289 |
| | IIL-Asp103[c] | *Brevundimonas bullata* | D12785 | 99,5 | 7/1343 |
| | IIL-Asp08[a] | *Burkholderia gladioli* | BBJG01000151 | 99,9 | 1/1350 |
| | IIL-Asp15[a] | *Mesorhizobium australicum* | AGIX01000002 | 99,4 | 8/1349 |
| | IIL-Asp09[a] | *Mesorhizobium huakuii* | D12797 | 98,4 | 22/1345 |
| | IIL-Asp87[e] | *Methylobacterium oryzae* | AB175634 | 99,9 | 2/1350 |
| | IIL-Asp23[a] | *Novosphingobium lindaniclasticum* | ATHL01000125 | 99,3 | 9/1350 |
| | IIL-Asp88[c] | *Pseudomonas soli* | HF930598 | 99,9 | 1/1346 |
| | IIL-Asp84[c] | *Ralstonia pickettii* | JOVL01000020 | 99,9 | 1/1350 |
| | IIL-Asp42[d] | *Rhizobium massiliae* | AF531767 | 100,0 | 0/1350 |
| | IIL-Asp29[b] | *Sphingomonas echinoides* | JH584237 | 99,8 | 3/1349 |
| | IIL-Asp35[b] | *Sphingomonas leidyi* | AJ227812 | 99,5 | 7/1350 |

* Letras sobrescritas indicam o meio de cultivo utilizado no isolamento: a) SM3, b) ISP2, c) TSA, d) ISP4, e) quitina; ** Identidade; ***Diferença de nucleotídeos em relação ao total de nucleotídeos alinhados.

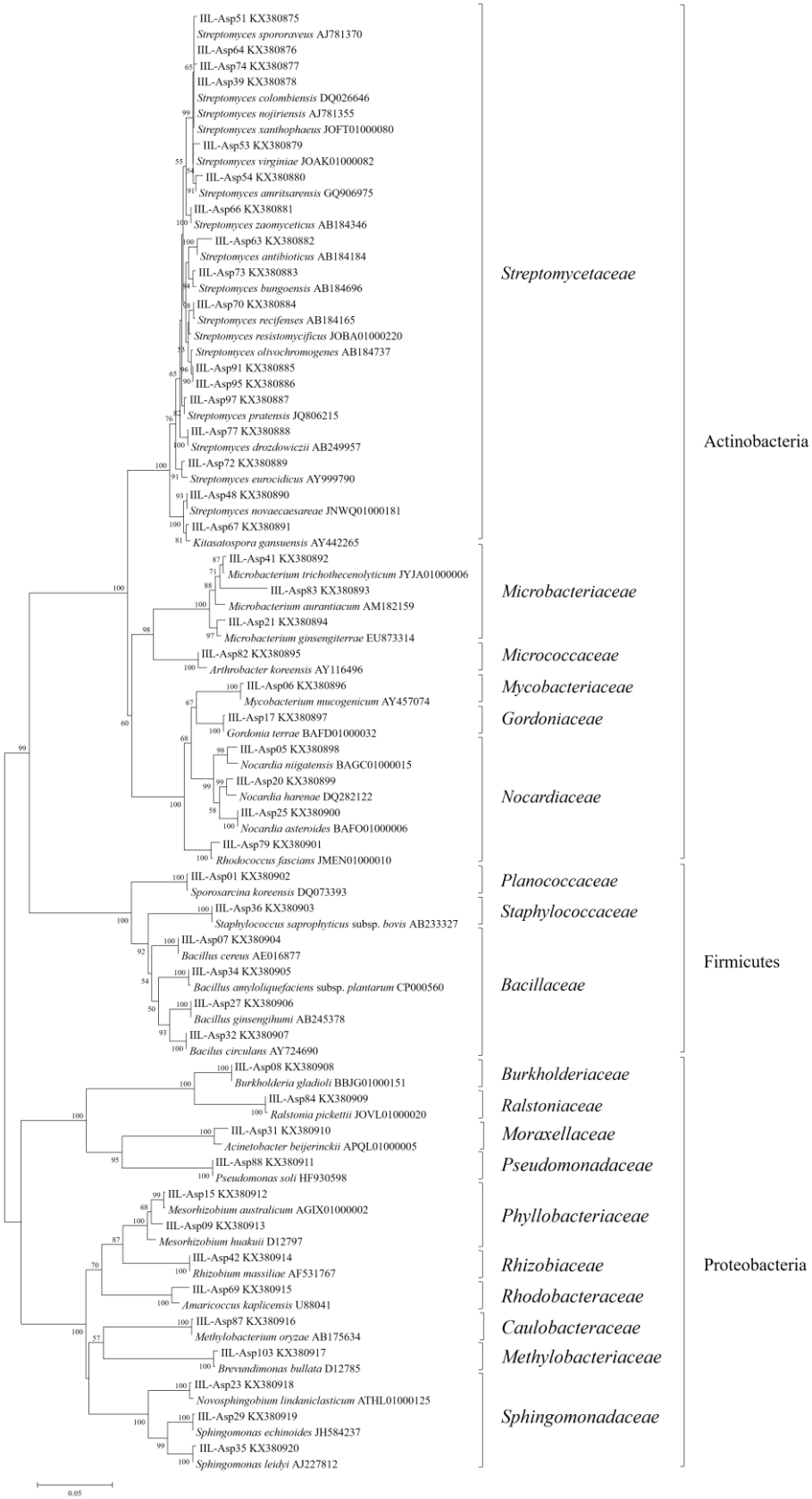


Figura 3.1. Árvore filogenética construída a partir das sequências da região 16S rDNA (1350 pb) de bactérias isoladas da superfície cuticular de *Acromyrmex coronatus*, pelo método de *neighbor-joining*. Os valores nos diferentes ramos correspondem aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo.

As análises das sequências atribuíram os isolados a três filos distintos: *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. *Actinobacteria* foi o mais diverso e abundante, correspondendo a 70% de todos os morfotipos obtidos, sendo representado por espécies das famílias *Streptomycetaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Nocardiaceae*, *Gordoniaceae* e *Mycobacteriaceae* (Figura 3.1). *Streptomycetaceae* também produziu o maior número de morfotipos para cada filotipo identificado (52 morfotipos para 16 filotipos). As espécies de *Streptomycetaceae* foram as mais abundantes, especialmente isolados semelhantes a *Streptomyces novaecaesareae* (GenBank N° JNWQ01000181) e *Streptomyces nojiriensis* (GenBank Accession N° AJ781355), correspondentes a 15% e 14%, respectivamente, de todos os morfotipos. *Firmicutes* correspondeu a 12% de todos os morfotipos obtidos nos meios de cultura testados e 13% dos filotipos identificados. *Firmicutes* foi representado por espécies das famílias *Planococcaceae*, *Staphylococcaceae* e *Bacillaceae* (Figura 3.1).

As três principais classes de *Proteobacteria* (18% de todos os morfotipos e 29% de todos os filótipos) foram representadas associadas à superfície da cutícula de *A. coronatus*. A classe α-*Proteobacteria* apresentou-se como a mais diversificada, sendo representada por espécies das famílias *Phyllobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Methylobacteriaceae*, *Caulobacteraceae* e *Sphingomonadacea*. Já as classes β-Proteobacteria e γ-Proteobacteria foram representadas por espécies das famílias *Burkholderiaceae* e *Ralstoniaceae*, e *Moraxellaceae* e *Pseudomonadaceae*, respectivamente (Figura 3.1).

### 4.3.3. Potencial inseticida de simbiontes de *Acromyrmex coronatus*

A avaliação da atividade inseticida dos extratos brutos em acetato de etila e em hexano obtidos da fermentação de diversos filotipos e diferentes isolados de uma mesmo filotipo, demonstrou grande variação inter e intra-filotipo quanto à atividade inseticida a lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda* (Tabela 3.2). Também foi observada grande variação na atividade inseticida nos diferentes extratos obtidos para o fermentado produzido para um mesmo isolado. Dos 25 isolados testados, não foi detectada nenhuma atividade inseticida em três isolados para os dois extratos testados. Cinco isolados produziram atividade inseticida apenas no extrato em acetato de etila, enquanto dois isolados apenas no extrato em hexânico (Tabela 3.2). A maioria dos isolados (15) testados produziu moléculas que resultaram em atividade inseticida em ambos os extratos produzidos.

A mortalidade encontrada entre os extratos em acetato de etila e hexano foi muito variável para a maioria dos isolados em que ambos os extratos foram ativos contra lagartas de

*S. frugiperda*. Em apenas dois isolados (IIL-Asp43 e IIL-Asp45) a atividade inseticida do extrato em acetato de etila foi comparável àquela do extrato hexânico. Para três isolados (IIL-Asp39, IIL-Asp54 e IIL-Asp77) a atividade inseticida foi superior no extrato obtido em aceto de etila quando comparada àquela do extrato em hexano. Porém, para a maioria dos isolados (10) testados, a atividade inseticida do extrato em hexano foi, normalmente, muito superior àquela obtida em tratamentos com extratos em aceto de etila (Tabela 3.2).

Dentre os isolados que apresentaram atividade inseticida, o extrato em acetato de etila do isolado IIL-Asp77 foi o que resultou na maior mortalidade nominal de lagartas de *S. frugiperda* (80%) nesse solvente (Tabela 3.2). Apesar da elevada mortalidade observada em extratos hexânicos de muitos dos isolados testados, com oito isolados produzindo extratos hexânicos que causaram mortalidade acima de 90% em lagartas de *S. frugiperda* (Tabela 3.2), a pequena massa obtida nesses extratos limitou o avanço das investigações para a identificação dos ativos na escala de fermentação utilizada em nossas análises. Dessa forma, o isolado IIL-Asp77, putativamente identificado como *Streptomyces drozdowiczii*, foi selecionado para novas análises visando ao isolamento e à caracterização do composto inseticida (ver capítulo 5).

Tabela 3.2. Mortalidade de lagartas (%) de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial tratadas superficialmente com extratos brutos produzidos por bactérias simbiontes da formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus*, obtidos por extração líquido:líquido com acetato de etila ou hexano.

| Identidade putativa | Código | Mortalidade (%)* | |
|---|---|---|---|
| | | Acetato de etila | Hexano |
| *Streptomyces nojiriensis* | IIL-Asp101 | 0 | 0 |
| *Microbacterium trichothecenolyticum* | IIL-Asp41 | 0 | 66,7 ± 8,6 |
| *Streptomyces spororaveus* | IIL-Asp38 | 0 | 0 |
| *Arthrobacter koreensis* | IIL-Asp82 | 0 | 0 |
| *Kitasatospora gansuensis* | IIL-Asp67 | 0 | 14,2 ± 3,1 |
| *Microbacterium aurantiacum* | IIL-Asp83 | 2,5 ± 1,3 | 99,2 ± 0,83 |
| *Streptomyces antibioticus* | IIL-Asp63 | 3,6 ± 6,4 | 96,7 ± 0,5 |
| *Streptomyces eurocidicus* | IIL-Asp72 | 4,2 ± 1,6 | 96,7 ± 0,5 |
| *Nocardia harenae* | IIL-Asp20 | 4,2 ± 2,0 | 15,0 ± 3,2 |
| *Streptomyces olivochromogenes* | IIL-Asp40 | 4,2 ± 1,2 | 0 |
| *Streptomyces olivochromogenes* | IIL-Asp95 | 6,7 ± 3,1 | 91,7 ± 3,2 |
| *Streptomyces recifensis* | IIL-Asp70 | 30,8 ± 5,7 | 100 |
| *Streptomyces novaecaesareae* | IIL-Asp47 | 31,7 ± 6,8 | 78,3 ± 7,9 |
| *Streptomyces zaomyceticus* | IIL-Asp66 | 37,7 ± 4,6 | 91,7 ± 1,9 |
| *Streptomyces amritsarensis* | IIL-Asp54 | 38,3 ± 12,4 | 20,8 ± 4,2 |
| *Streptomyces virginiae* | IIL-Asp53 | 39,2 ± 10,0 | 90,0 ± 3,9 |
| *Streptomyces novaecaesareae* | IIL-Asp68 | 49,2 ± 7,9 | 90,0 ± 3,5 |
| *Methylobacterium oryzae* | IIL-Asp87 | 49,2 ± 9,0 | 0 |
| *Streptomyces novaecaesareae* | IIL-Asp45 | 59,2 ± 10,1 | 61,7 ± 7,2 |
| *Streptomyces xanthophaeus* | IIL-Asp74 | 61,7 ± 6,6 | 0 |
| *Streptomyces zaomyceticus* | IIL-Asp61 | 64,2 ± 10,7 | 0 |
| *Streptomyces nojiriensis* | IIL-Asp39 | 70,8 ± 8,4 | 3,8 ± 5,8 |
| *Streptomyces novaecaesareae* | IIL-Asp48 | 75,0 ± 9,2 | 0 |
| *Streptomyces colombiensis* | IIL-Asp43 | 75,8 ± 9,3 | 72,5 ± 6,9 |
| *Streptomyces drozdowiczii* | IIL-Asp77 | 80,8 ± 7,9 | 39,2 ± 5,6 |

* valores obtidos considerando a mortalidade observada para o controle (± EP).

Adicionalmente ao potencial de produção de princípios ativos com atividade inseticida pela microbiota associada à formiga *A. coronatus*, nossos ensaios também demonstraram a grande variação existente entre isolados de um mesmo filotipo (Tabela 3.2). As diferenças na

atividade inseticida de isolados do mesmo filotipo ocorreu para os isolados IIL-Asp40 e IIL-Asp95, ambos identificados como *S. olivochromogenes*. Neste caso, extratos brutos obtidos por extração com acetato de etila não causaram mortalidade, enquanto que o extrato hexânico do isolado IIL-Asp95 causou 91,7% de mortalidade (Tabela 3.2). O perfil químico do extrato hexânico obtido pela análise de GC-MS evidenciou diferenças entre estes isolados do mesmo filotipo (Figura 3.2).

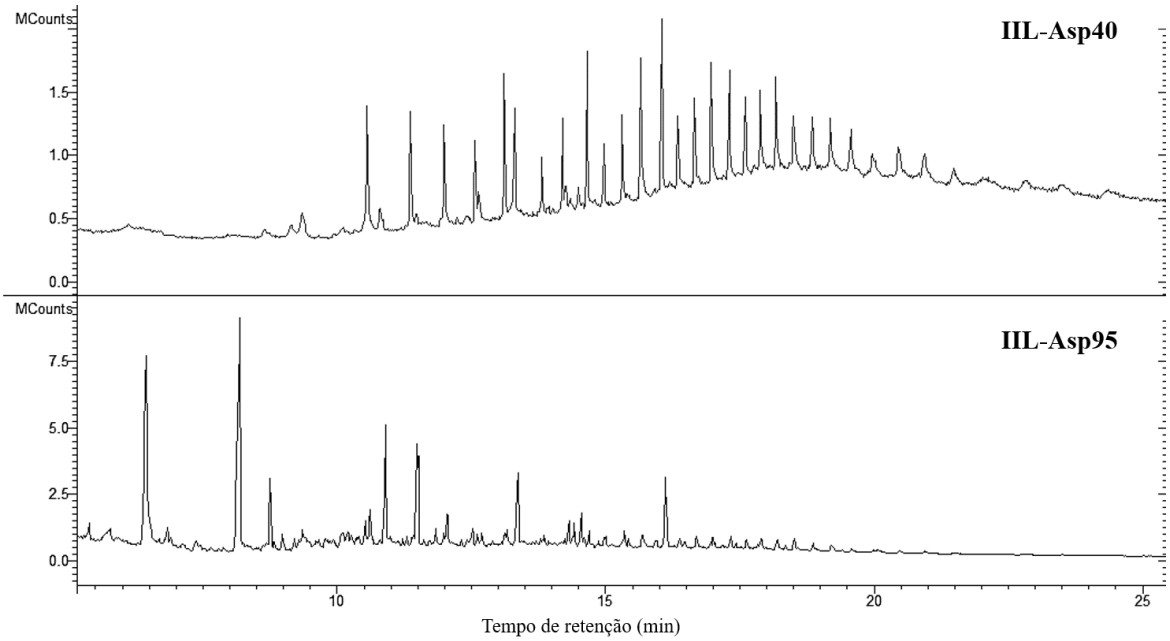


Figura 3.2. Perfil GC-MS dos extratos brutos dos morfotipos IIL-Asp40 e IIL-Asp95 do filotipo *Streptomyces olivochromogenes*, obtidos da superfície da cutícula de *Acromyrmex coronatus*.

Os isolados IIL-Asp39 e IIL-Asp101, identificados putativamente como *S. nojiriensis*, produziram extratos em acetato de etila com atividade inseticida distinta a *S. frugiperda*. Enquanto o extrato do isolado IIL-Asp101 não causou mortalidade, o extrato do isolado IIL-Asp39 induziu 70,8% de mortalidade larval em *S. frugiperda* (Tabela 3.2). Os perfis químicos obtidos por DI-ESI(+)MS (Figura 3.3) demonstram a diversidade química dos extratos testados.

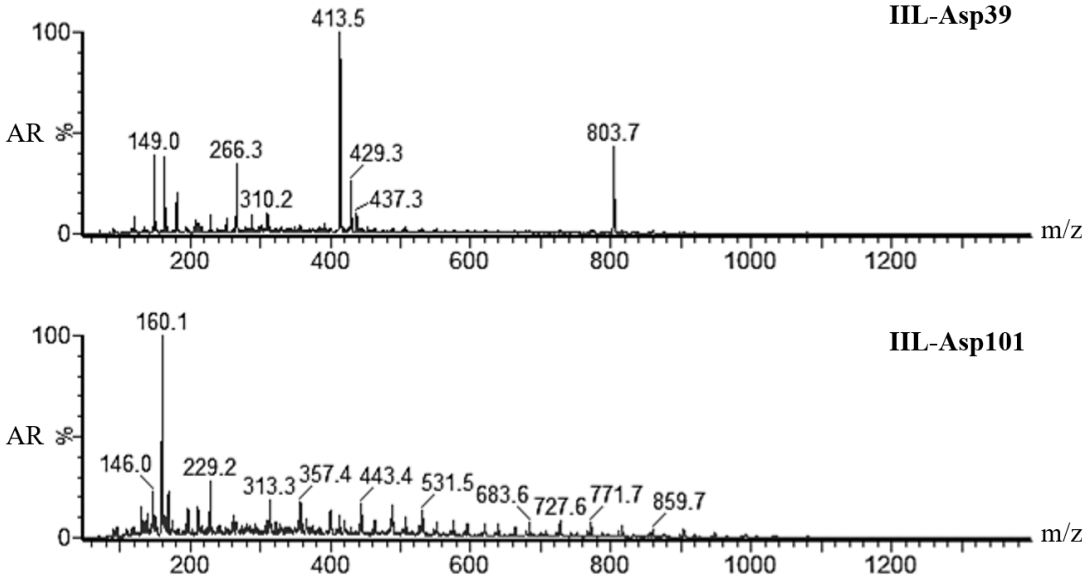


Figura 3.3. Perfil químico obtido por espectrometria de massa em modo positivo (DI-ESI+) dos extratos brutos em acetato de etila dos morfotipos IIL-Asp39 e IIL-Asp101b do filotipo *Streptomyces nojiriensis*, obtidos da superfície da cutícula de *Acromyrmex coronatus*. Abundância relativa (%) por massa sobre carga (*m/z*).

Os extratos dos isolados IIL-Asp45, IIL-Asp47, IIL-Asp48 e IIL-Asp68, todos identificados putativamente como *S. novaecaesareae*, resultaram em atividade inseticida extremamente diversa a *S. frugiperda*, variando de 31,7% (IIL-Asp47) a 75,8% (IIL-Asp48) de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*, para os extratos em acetato de etila, e de 0% (IIL-Asp48) a 90% (IIL-Asp68), para os extratos em hexano (Tabela 3.2).

A análise inicial da diversidade de compostos por meio dos perfis químicos dos extratos em acetato de etila desses isolados, obtidos por DI-ESI(+)MS, demonstram a presença de muitos íons em comum, mas com diferenças nas suas intensidades, sendo evidente, porém, a diferença no perfil obtido para o isolado IIL-Asp68 quando comparado aos demais (Figura 3.4).

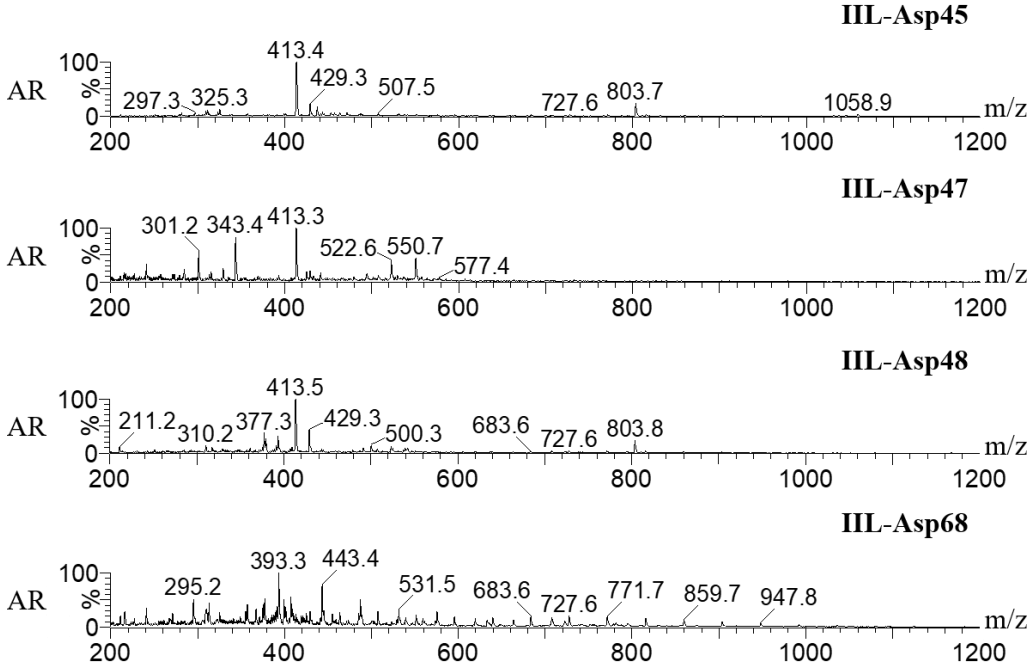


Figura 3.4. Perfil químico obtido em modo positivo (DI-ESI+) por espectrometria de massa para extratos brutos em acetato de etula dos morfotipos IIL-Asp45, IIL-Asp47, IIL-Asp48 e IIL-Asp68 do filotipo *Streptomyces novaecaesareae*, obtidos da superfície da cutícula de *Acromyrmex coronatus*.

### 4.3.4. Análise de mortalidade por bioensaio *in vitro*

Nossos estudos resultaram em respostas completamente distintas quando a atividade inseticida *in vivo* dos extratos foi comparada à sua atividade tóxica em ensaios *in vitro.* A atividade inseticida a lagartas de *S. frugiperda* observada para inúmeros isolados testados *in vivo* não reproduziu o efeito citotóxico esperado em ensaios *in vitro*, demonstrando que o método *in vitro* não reproduz a mortalidade observada em testes *in vivo*, sendo, assim, inadequado para a substituição do método *in vivo* para a identificação de compostos com atividade inseticida em nosso modelo de estudo (Tabela 3.3). Interessante foi observar que frações de isolados selecionados que induziram mortalidade *in vivo*, estimularam o crescimento de células de *S. frugiperda*. Também foi identificada inibição ou indução do crescimento celular em ensaios *in vitro* que não apresentaram qualquer atividade biológica *in vitro* (Tabelas 3.3, 3.4, 3.5).

Tabela 3.3. Bioensaios *in vivo* e *in vitro* para análise da atividade tóxica de extratos brutos produzidos por bactérias simbiontes da formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus*, obtidos por extração líquido:líquido com acetato de etila. Mortalidade de lagartas (%) de *Spodoptera frugiperda* (*in vivo*) e razão de emissão de fluorescência (590nm) do tratamento em relação ao controle (*in vitro*).

| Identidade putativa | | *In vivo* | *In vitro* |
|---|---|---|---|
| | Extrato bruto | Mortalidade (%)* | EmT / EmC** |
| *Streptomyces amritsarensis* | IIL-Asp54 | 38,3 ± 7,4 | 1,62 |
| *Streptomyces zaomyceticus* | IIL-Asp66 | 38,3 ± 8,2 | 1,43 |
| *Streptomyces virginiae* | IIL-Asp53 | 39,2 ± 9,4 | 1,40 |
| *Streptomyces xanthophaeus* | IIL-Asp74 | 61,7 ± 6,6 | 1,37 |
| *Streptomyces nojiriensis* | IIL-Asp39 | 70,8 ± 8,4 | 1,32 |
| *Streptomyces colombiensis* | IIL-Asp43 | 78,3 ± 9,9 | 1,30 |
| *Streptomyces drozdowiczii* | IIL-Asp77 | 80,8 ± 7,9 | 0,89 |

* valores obtidos considerando a mortalidade observada para o controle (± EP);
** emissão de fluorescência (590 nm) do tratamento em relação ao controle.

O fracionamento do extrato produzido a partir do fermentado do isolado IIL-Asp66 apresentou grande diversidade de compostos com potencial inseticida conforme ensaio *in vivo*, sendo também observada ação citotóxica devido ao decréscimo no crescimento celular no ensaio *in vitro* (Tabela 3.4). A fração 19 resultou na maior mortalidade no ensaio *in vivo*, mas foi a que menor efeito causou no crescimento celular no ensaio *in vitro* (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Análise do potencial inseticida de frações do extrato bruto produzido pelo isolado IIL-Asp66 *Streptomyces zaomyceticus*, simbiontes da formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus*, obtidos por extração líquido:líquido com acetato de etila. Mortalidade de lagartas (%) de *Spodoptera frugiperda* (*in vivo*) e razão de emissão de fluorescência (590nm) do tratamento em relação ao controle (*in vitro*).

| Frações do isolado IIL-Asp66 | In vivo | In vitro |
|---|---|---|
| | Mortalidade (%)* | EmT / EmC** |
| 1 | 35,8 ± 9,7 | 0,81 |
| 2 | 54,2 ± 9,8 | 0,85 |
| 3 | 0 | 0,90 |
| 4 | 0 | 0,89 |
| 5 | 0 | 0,88 |
| 6 | 0 | 0,88 |
| 7 | 0 | 0,83 |
| 8 | 0 | 0,90 |
| 9 | 0 | 0,86 |
| 10 | 16,6 ± 11,2 | 0,91 |
| 11 | 0 | 0,93 |
| 12 | 0 | 0,91 |
| 13 | 0 | 0,86 |
| 14 | 0 | 0,89 |
| 15 | 60,8 ± 9,8 | 0,88 |
| 16 | 60,8 ± 10,9 | 0,85 |
| 17 | 46,6 ± 8,2 | 0,83 |
| 18 | 34,2 ± 10,8 | 0,89 |
| 19 | 82,5 ± 8,4 | 0,97 |
| 20 | 75,8 ± 8,9 | 0,86 |
| 21 | 56,6 ± 9,8 | 0,80 |
| 22 | 40,0 ± 11,8 | 0,85 |
| 23 | 5,0 ± 3,4 | 0,79 |
| 24 | 23,3 ± 10,6 | 0,86 |
| 25 | 38,3 ± 11,3 | 0,84 |

* valores obtidos considerando a mortalidade observada para o controle (± EP); ** emissão de fluorescência (590 nm) do tratamento em relação ao controle.

O fracionamento do extrato produzido a partir do fermentado dos isolados pertencentes ao filotipo *S. novaecaesareae* mostrou, além de grande diversidade de compostos com potencial inseticida, grandes diferenças em sua toxicidade nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Essas diferenças podem ser observadas inicialmente pela complexidade dos extratos brutos, apresentando um

maior número de frações no extrato bruto de IIL-Asp45 e menor no extrato bruto de IIL-Asp48. Quanto a atividade inseticida, foi possível identificar frações ativas contra lagartas de *S. frugiperda* em todos os isolados analisados, onde as frações 9, 3, 1 e 4 dos isolados IIL-Asp45, IIL-Asp47, IIL-Asp48 e IIL-Asp68 causaram mortalidade máxima de aproximadamente 29, 88, 25 e 37%, respectivamente. Foi possível identificar também que algumas frações estimularam o crescimento de células *in vitro*, apesar de causarem mortalidade no ensaio *in vivo*. As frações 3 do isolado IIL-Asp47 e 8 do isolado IIL-Asp68, que causaram, respectivamente, 87,5 e 10,8% de mortalidade às lagartas de *S. frugiperda* (Tabela 3.5), apresentaram, ambas, grande atividade estimuladora da multiplicação celular em ensaios *in vitro*, resultando no crescimento celular de 5 a 7 vezes maior no tratamento em relação ao controle. Essa atividade estimuladora apareceu de maneira discreta nas frações do isolado IIL-Asp45 ou não apareceu nas frações do isolado IIL-Asp48. Quanto à inibição do crescimento celular no ensaio *in vitro*, foi possível identificar frações ativas no ensaio *in vivo* que possuem efeito citotóxico em células de *S. frugiperda*, como ocorre nas frações 10 e 11 do isolado IIL-Asp45 e 1 e 4 do isolado IIL-Asp48 (Tabela 3.5). Estes dados corroboram com as diferenças encontradas nos perfis químicos desses isolados, onde apesar de pertencerem a um mesmo filotipo, possuem grandes diferenças em seus extratos brutos quanto a resposta biológica.

Tabela 3.5. Análise do potencial inseticida de frações do extrato bruto produzido pelos morfotipos IIL-Asp45, IIL-Asp47, IIL-Asp48 e IIL-Asp68 do filotipo *Streptomyces novaecaesareae*, simbiontes da formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus*, obtidos por extração líquido:líquido com acetato de etila. Mortalidade de lagartas (%) de *Spodoptera frugiperda* (*in vivo*) e razão de emissão de fluorescência (590nm) do tratamento em relação ao controle (*in vitro*).

| Frações | IIL-Asp45 | | IIL-Asp47 | | IIL-Asp48 | | IIL-Asp68 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *In vivo* | *In vitro* | *In vivo* | *In vitro* | *In vivo* | *In vitro* | *In vivo* | *In vitro* |
| 1 | 1,7 ± 1,1 | 1,0 | 10,8 ± 4,2 | 2,9 | 25,0 ± 7,9 | 0,8 | 4,2 ± 1,9 | 1,4 |
| 2 | 5,8 ± 2,3 | 1,3 | 0 | 2,3 | 5,0 ± 2,9 | 1,4 | 3,3 ± 1,9 | 1,2 |
| 3 | 5,0 ± 2,3 | 1,6 | 87,5 ± 6,5 | 5,1 | 15,0 ± 6,1 | 1,0 | 4,2 ± 2,3 | 1,1 |
| 4 | 2,5 ± 1,2 | 0,9 | 25,0 ± 9,2 | 1,3 | 22,5 ± 5,4 | 0,9 | 36,7 ± 9,8 | 1,0 |
| 5 | 2,5 ± 1,7 | 0,8 | 0 | 0,8 | 5,0 ± 2,3 | 0,8 | 11,7 ± 4,1 | 1,4 |
| 6 | 0 | 0,5 | 0 | 1,0 | 6,7 ± 4,3 | 0,8 | 5,0 ± 1,9 | 4,6 |
| 7 | 0,8 ± 0,2 | 0,6 | 0 | 0,7 | - | - | 16,7 ± 4,8 | 1,1 |
| 8 | 5,8 ± 3,3 | 0,9 | 0 | 2,3 | - | - | 10,8 ± 3,1 | 7,7 |
| 9 | 29,2 ± 3,3 | 1,2 | 3,3 ± 1,9 | 1,2 | - | - | 1,7 ± 1,1 | 1,9 |
| 10 | 24,2 ± 4,3 | 0,7 | 5,8 ± 2,3 | 1,2 | - | - | 0 | 1,6 |
| 11 | 15,0 ± 3,1 | 0,9 | 3,3 ± 2,2 | 1,2 | - | - | 0 | 1,1 |
| 12 | 5,8 ± 2,6 | 0,9 | 0 | 1,2 | - | - | 0 | 1,2 |
| 13 | 0 | 1,3 | - | - | - | - | - | - |
| 14 | 0 | 1,7 | - | - | - | - | - | - |

*In vivo* - Mortalidade (%): valores obtidos considerando a mortalidade observada para o controle (± EP);
*In vitro* - EmT / EmC: emissão de fluorescência (590 nm) do tratamento em relação ao controle.

### 4.4. Discussão

A diversidade de bactérias associadas à superfície da cutícula de adultos de *Acromyrmex coronatus* foi elevada, demonstrando a rica associação existente a formigas cortadeiras, assim como relatado para outras espécies do grupo [12,14,43,44]. Adicionalmente, também demonstramos o potencial que a diversidade de microrganismos associados a esse inseto tem para a produção de um diverso conjunto de metabólitos. A diversidade de metabólitos não é exclusivamente restrita aos diferentes filotipos encontrados, mas também se estende à variação fenotípica existente em um mesmo filotipo. A busca por compostos bioativos com atividade inseticida junto à comunidade de bactérias associadas a *A. coronatus* permitiu a

identificação de vários extratos com alta atividade inseticida, comprovando o potencial biotecnológico dessa comunidade de microrganismos. Adicionalmente, demonstramos que o sucesso na identificação de extratos bioativos pode ser variável com o solvente utilizado na extração dos metabólitos dos fermentados. Finalmente, também demonstramos que os resultados de testes *in vivo* e *in vitro* diferem quanto a atividade biológica encontrada nas diversas frações de três dos extratos produzidos.

A simbiose de formigas cortadeiras com microrganismos é um assunto bastante discutido na literatura, onde duas possibilidades são debatidas quanto a essa associação. Alguns pesquisadores relatam que a associação verdadeira de formigas cortadeiras com microrganismo é dada somente por uma única e exclusiva espécie de bactéria associada à cutícula, pertencente ao gênero *Pseudonocardia* [45,46], mas outro grupo de pesquisadores argumenta que a contribuição é dada pela comunidade associada à formiga cortadeira, a qual é altamente diversificada e pode ser manipulada de acordo com a necessidade do inseto [47]. Trabalhos realizados anteriormente com a microbiota associada a *Acromyrmex subterraneus* demonstraram a incapacidade de *Pseudonocardia* de controlar o fungo parasita do fungo alimento dessa formiga, enquanto inúmeros outros isolados pertencentes a grupos diferentes de *Pseudonocardia* foram altamente eficazes em eliminar *Escovopsis*, o parasita do jardim de alimento de *Acromyrmex* [43], adicionando aos argumentos de que a diversidade da microbiota associada é a responsável pela diversidade química necessária para lidar com os vários desafios enfrentados pelas formigas na defesa de seu alimento [48,49]. Apesar de não avaliarmos o potencial fungicida aos fungos parasitas do fungo simbionte das formigas cortadeiras, também demonstramos a grande diversidade química associada às bactérias do tegumento de *A. coronatus*.

A diversidade de espécies associadas a *A. coronatus* juntamente com a diversidade de metabólitos encontrados indicam que a formiga apresenta associação com bactérias que formam uma comunidade diversa e que podem fornecer uma quantidade de metabólitos suficientes para suprir as necessidades do hospedeiro quanto à sua defesa, protegendo-o de infecções. Estes fatos justificam a exploração biotecnológica dessas bactérias para prospecção de novos compostos inseticidas. Assim, além da diversidade de simbiontes e metabólitos encontrados, foi possível constatar a grande capacidade desses isolados associados a *A. coronatus* em causar mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*.

O ensaio *in vivo* se mostrou mais eficiente na bioprospecção de novos compostos inseticidas, revelando que espécies do gênero *Streptomyces* possuem grande potencial para este fim devido a expressiva quantidade de isolados encontrados com esta capacidade. Isolados

como IIL-Asp77 – *S. drozdowiczii* e IIL-Asp66 – *S. zaomyceticus* se destacaram quanto a atividade entomotóxica de seus metabólitos e devem ser investigados para a identificação das moléculas inseticidas. Apesar dos ensaios *in vitro* não corresponderem à atividade encontrada *in vivo*, ensaios dessa natureza podem evidenciar características indesejáveis às moléculas de interesse, como, por exemplo, atividade mutagênica, apesar ainda da exigência de testes adicionais.

A análise conjunta do perfil químico e o ensaio *in vivo* dos extratos obtidos para os isolados de *S. olivochromogenes* (IIL-Asp40 e IIL-Asp95) e *S. nojiriensis* (IIL-Asp39 e IIL-Asp101) deixaram claro que isolados pertencentes ao mesmo filotipo, obtidos de uma mesma fonte e ao mesmo tempo, são capazes de produzir diferentes compostos, inclusive quando cultivados sob condições nutricionais e ambientais idênticas. Além disso, a atividade inseticida dos extratos produzidos por esses isolados, obtidos com diferentes solventes, também indicaram diferenças no metabolismo desses isolados. Os solventes utilizados na extração dos metabólitos produzidos por bactérias possuem características químicas distintas, podendo explicar as diferenças encontradas no presente estudo.

Com relação aos dados encontrados para os isolados de *S. novaecaesareae*, a atividade inseticida para IIL-Asp48 esteve presente apenas no extrato de acetato de etila, enquanto que a atividade inseticida dos outros três isolados (IIL-Asp45, IIL-Asp47 e IIL-Asp68) foi maior em extratos de hexano. Neste caso, a diferença entre esses isolados não parece ser qualitativa, mas sim quantitativa, visto que todos apresentaram mortalidade nos seus extratos em acetato, ocorrendo apenas variação na intensidade da mortalidade, o que pode ser devido a variações no potencial de produção da molécula ativa. Entretanto, o fracionamento dos extratos brutos desses isolados, obtidos pela extração com acetato de etila, evidenciou grandes diferenças qualitativas dos extratos quanto a sua complexidade, mortalidade no ensaio *in vivo* e toxicidade no ensaio *in vitro*.

Desta forma, além de revelar que os simbiontes associados com formigas são altamente diversificados e fornecem uma quantidade substancial de metabólitos com bioatividade para exploração biotecnológica, incluindo compostos com atividade inseticida, o estudo também questiona a abordagem tradicional de isolamento e identificação de moléculas bioativas ao demonstrar a gama de metabólitos que os isolados do mesmo filotipo podem produzir em condições idênticas de isolamento e cultivo. Esses dados desafiam a busca de novos metabólitos bioativos baseados exclusivamente em características morfológicas e moleculares, ao mesmo tempo em que fornecem suporte para a utilidade da análise química em bioensaios de atividade. Portanto, nossos dados indicam que práticas comuns em laboratórios,

como agrupamento de morfotipos pertencentes ao mesmo gênero ou agrupamento de filotipos, podem levar à perda de informações importantes e interferir na descoberta de todo o potencial de metabólitos que um determinado filotipo pode fornecer.

### 4.5. Conclusões

- *Acromyrmex coronatus* se mostrou um nicho adequado para prospecção de bactérias que produzem metabólitos com atividade inseticida;

- A microbiota associada ao tegumento de *Acromyrmex coronatus* é formada por *Actinobacteria, Firmicutes* e *Proteobacteria*, sendo *Actinobacteria* o mais diverso e abundante;

- O ensaio *in vivo* se mostrou mais eficiente na bioprospecção de compostos com atividade inseticida do que o ensaio *in vitro*.

## Referências

1. Margulis L, Symbiosis in cell evolution: life and its environment on the early earth. San Francisco, W. H. Freeman and Co. 1981, p. 419.

2. Westall F. Life on the early earth: a sedimentary view. Science. 2005;308(5720):366-367.

3. Glenner H, Thomsen P, Hebsgaard M, Sorensen M, Willerslev E. The origin of insects. Science. 2006;314(5807):1883-1884.

4. Moran N, McCutcheon J, Nakabachi A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. Annual Review of Genetics. 2008;42(1):165-190.

5. Feldhaar H, Gross R. Insects as hosts for mutualistic bacteria. International Journal of Medical Microbiology. 2009;299(1):1-8.

6. Feldhaar H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. Ecological Entomology. 2011;36(5):533-543.

7. Douglas A. Multiorganismal Insects: Diversity and function of resident microorganisms. Annual Review of Entomology. 2015;60(1):17-34.

8. Brownlie J, Johnson K. Symbiont-mediated protection in insect hosts. Trends in Microbiology. 2009;17(8):348-354.

9. Kaltenpoth M. Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects?. Trends in Microbiology. 2009;17(12):529-535.

10. Douglas A. Lessons from studying insect symbioses. Cell Host & Microbe. 2011;10(4):359-367.

11. Kuhlisch C, Pohnert G. Metabolomics in chemical ecology. Natural Product Reports. 2015;32(7):937-955.

12. Little A, Currie C. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. Biology Letters. 2007;3(5):501-504.

13. Boursaux-Eude C, Gross R. New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. Microbiological Research. 2000;151(7):513-519.

14. Zhang MM, Poulsen M, Currie CR. Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. The ISME journal. 2007;1(4):313-320.

15. Ramadhar T, Beemelmanns C, Currie C, Clardy J. Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery. The Journal of Antibiotics. 2013;67(1):53-58.

16. Zucchi TD, Almeida LG, Moraes LAB, Consoli FL. Albocycline, the main bioactive compound from *Propionicimonas* sp. ENT-18 against *Sclerotinia sclerotiorum*. Industrial Crops and Products. 2014;52:264-268.

17. Martinez AFC, de Almeida LG, Moraes LAB, Cônsoli FL. Tapping the biotechnological potential of insect microbial symbionts: new insecticidal porphyrins. BMC Microbiology. 2017;17(1):143

18. Dayan F, Cantrell C, Duke S. Natural products in crop protection. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2009;17(12):4022-4034.

19. Cantrell C, Dayan F, Duke S. Natural products as sources for new pesticides. Journal of Natural Products. 2012;75(6):1231-1242.

20. Beemelmanns C, Guo H, Rischer M, Poulsen M. Natural products from microbes associated with insects. Beilstein Journal of Organic Chemistry. 2016;12:314-327.

21. Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. Natural Product Reports. 2009;26(3):338-362.

22. Pye C, Bertin M, Lokey R, Gerwick W, Linington R. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017;114(22):5601-5606.

23. Traxler M, Kolter R. Natural products in soil microbe interactions and evolution. Natural Product Reports. 2015;32(7):956-970.

24. Crawford JM, Clardy J. Bacterial symbionts and natural products. Chemical Communications. 2011;47(27):7559-66.

25. Brachmann AO, Bode HB. Identification and bioanalysis of natural products from insect symbionts and pathogens. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. 2013;135:123-55.

26. Douglas AE. Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. Trends in Biotechnology. 2013;25(8):338-42.

27. Kasten P, Precetti AA, Precetti CM, Parra, JRP. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificias e substrato natural. Revista de Agricultura. 1978;53:68-78.

28. Parra JRP. Criação de insetos para estudo com patôgenos. In: Alves SB. Controle microbiano de insetos, Editora Manole: São Paulo; 1986. p. 348-373.

29. Tan GYA, Ward AC, Goodfellow M. Exploration of amycolatopsis diversity in soli using genus specific primers and novel selective media. Systematic and Applied Microbiology. 2006;29:557-569.

30. Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterizations of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1966;16:313-340.

31. Hsu SC, Lockwood JL. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. Journal of Applied Microbiology. 1975;29(3):422-426.

32. Sunnucks P, Hales DF. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). Molecular Biology and Evolution. 1996;13(3):510-524.

33. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001.

34. Gallagher SR, Desjardins PR. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. Current Protocols in Protein Science. 2006;76(1):A-3D.

35. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 1991;173(2):697-703.

36. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2012;62:716-721.

37. Sudhir K, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution. 2016.

38. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 1987;4(4):406-425.

39. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Molecular Biology and Evolution. 1980;16:111-120.

40. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 1985;39(4):783-791.

41. Melo IS, Sanhueza RMV. Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: manual técnico: Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 1995.

42. González-Pinzón R, Haggerty R, Myrold D. Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences. 2012;117(G3).

43. Zucchi TD, Guidolin AS, Cônsoli FL. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). Microbiological Research. 2011;166(1):68–76.

44. Cafaro MJ, Currie CR. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. Canadian Journal of Microbiology. 2005;51(6):441-446.

45. Poulsen M, Cafaro M, Boomsma JJ, Currie CR. Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. Molecular Microbiology. 2005;14(11):3597-3604.

46. Andersen SB, Hansen LH, Sapountzis P, Sorensen SJ, Boosma JJ. Specificity and stability of the *Acromyrmex–Pseudonocardia* symbiosis. Molecular Ecology. 2013;22:4307–21.

47. Mueller UG. Symbiont recruitment versus ant-symbiont co-evolution in the attine ant–microbe symbiosis. Current Opinion in Microbiology. 2012;15(3):269-277.

48. Haeder S, Wirth R, Herz H, Spiteller D. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106(12):4742-4746.

49. Mattose TC, Moreira DDO, Samuels RI. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. Biology Letters. 2012;8(3):461–4.

# 5. IIL-ASP77, UM SIMBIONTE DE *Acromyrmex coranatus*, FONTE DE DOIS COMPOSTOS NATURAIS COM ATIVIDADE INSETICIDA ÀS LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

**Resumo**

Cerca de 15% da safra de alimentos do mundo é perdida por causa do ataque por insetos, cujo controle tem sido feito, predominantemente, com uso de defensivos químicos. Esses produtos são altamente tóxicos e de amplo espectro de ação, com consequências graves ao homem e ambiente. O uso contínuo e inadequado desses produtos também facilita a seleção de insetos resistentes, levando a falhas nas táticas de manejo de pragas. A utilização de inseticidas sintéticos de amplo espectro se torna cada vez mais restrita, pois existe hoje uma grande pressão da sociedade para técnicas alternativas de controle de pragas que sejam mais seguras aos organismos não-alvo e ao ambiente. Nesse contexto, o uso de novos compostos bioativos naturais tem se tornado uma alternativa ecologicamente viável. Plantas e microrganismos são fontes reconhecidas de moléculas naturais que podem ter aplicação biotecnológica. No presente estudo, foi investigado o potencial biotecnológico de um simbionte isolado da formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae) para a identificação de moléculas naturais com potencial para o controle de insetos-pragas. O estudo da atividade inseticida do extrato orgânico do fermentado produzido pelo isolado IIL-Asp77, putativamente identificado como *Streptomyces drozdowiczii*, resultou na descoberta de duas frações que resultaram em alta mortalidade de lagartas de 1º ínstar de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em testes de ingestão. As duas frações ativas foram isoladas e a atividade inseticida foi atribuída para duas classes químicas diferentes: um composto pirrolobenzodiazepino ($CL_{50}$ = 62,73 µg/cm²) e um alcaloide ($CL_{50}$ = 170,56 µg/cm²). Hipóteses do modo de ação dessas substâncias são oferecidas na discussão, juntamente com sua caracterização química. O desenvolvimento de estudos adicionais para a caracterização do modo de ação dessas moléculas contribuirão para análises do seu potencial inseticida a outras espécies de insetos-pragas e a possibidade de sua utilização em escala comercial, especialmente no combate de insetos mastigadores.

Palavras-chave: Bioprospecção; Caracterização; Pirrolobenzodiazepino; Alcaloide; Manejo

**Abstract**

Nearly 15% of the world's food production is lost because of attack by insect pests. Insect pests are predominantly controlled by chemical pesticides. Pesticides are highly toxic and most have a broad spectrum of action, with serious consequences for humans and the environment. The continuous and inappropriate use of these products also facilitates the selection of insecticide resistant pests, leading to failures in pest management tactics. The use of broad-spectrum synthetic insecticides is becoming increasingly restricted, as there is strong social pressure for the use of alternative pest control techniques that are safer to non-target organisms and the environment. In this context, the use of new natural bioactive compounds has become an ecologically viable alternative. Plants and microorganisms are recognized sources of natural molecules that may have biotechnological applications. In here we investigated the biotechnological potential of a bacterial isolate from the ant *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae) for the identification of natural molecules with potential for insect-pest control. Assays of the insecticidal activity of the organic extract of the fermetation products of the isolate IIL-Asp77, putatively identified as *Streptomyces drozdowiczii*, resulted in the discovery of two fractions that resulted in high

mortality of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera : Noctuidae). These fractions were isolated and the insecticidal activity was assigned to two different chemical classes: a pyrrolobenzodiazepine compound ($LC_{50}$ = 62.73 μg / cm²) and an alkaloid ($LC_{50}$ = 170.56 μg / cm²). Hypotheses of the mode of action of these substances are offered along with their chemical characterization. The development of additional studies to characterize the mode of action of these molecules will contribute to the analysis of their insecticidal potential to other species of insect pests and the possibility of their use at a commercial scale, especially in the fight against chewing insects.

Keywords: Bioprospecting; Characterization; Pyrrolobenzodiazepine; Alkaloid; Management

### 5.1. Introdução

O crescimento contínuo da população humana tem exigido cada vez mais o desenvolvimento de estratégias inovadoras ou de novas pesquisas que venham a auxiliar na aplicação de técnicas sustentáveis de produção agrícola. O atendimento da demanda crescente de alimentos tem levado à prática de sistemas intensivos de cultivo agrícola, sendo que o uso de novas tecnologias tem permitido a prática agrícola de modo a atender às necessidades de produção. Mas ao mesmo tempo em que a produção aumenta, surgem problemas associados ao manejo de pragas que podem ter consequências sociais e ambientais indesejadas. Assim, abordagens multissistêmicas e multidisciplinares são importantes para a geração de novas informações e para a produção de novas tecnologias que venham a permitir a prática de uma agricultura moderna sustentável [1-4].

Os organismos nocivos, principalmente insetos e fitopatógenos, são as principais ameaças à produção de alimentos e estabilidade dos agroecossistemas. Com a intensificação da produção agrícola nas últimas décadas, a dependência de defensivos agrícolas aumentou. No entanto, a maior utilização de defensivos tem causado efeitos indesejáveis, como a evolução da resistência nos organismos-alvo e os efeitos nocivos causados ao homem e ambiente, entre outros. Além disso, o custo crescente de defensivos e a demanda de consumidores por alimentos isentos de agentes tóxicos têm levado à busca de alternativas para o combate aos organismos nocivos por meio da descoberta de novas moléculas bioativas na natureza [5-9].

Os insetos são o grupo mais diversificado de organismos multicelulares que habita uma variedade de habitats e abriga uma série de associações com simbiontes microbianos [10,11]. A rica diversidade da microbiota associada a insetos se mostra como uma fonte promissora de novos compostos bioativos, dado o potencial que bactérias apresentam em produzir substâncias com atividade biológica de interesse ao homem [12]. Apesar da grande diversidade de

microrganismos, a demanda por novas moléculas naturais vem sofrendo com o declínio na descoberta de novas moléculas desde 1970 [13]. Para solucionar a redundância de moléculas existentes na exploração de microrganismos, pesquisadores se voltaram para a exploração de microrganismos associados a novos nichos, em casos extremos, como as profundezas dos oceanos, e a microbiota associada aos artrópodes, principalmente os insetos [14,15]. Actinobactérias têm sido intensamente exploradas na busca por compostos naturais bioativos [16-21], sendo que dos quase 23.000 metabólitos secundários conhecidos até o momento, cerca de 10.000 deles é produzida por actinobactérias [22]. Estima-se ainda, que só o gênero *Streptomyces* seja responsável pela produção de mais da metade das moléculas bioativas descritas, sendo responsável por quase 60% dos compostos isolados de actinobactérias [21, 23]. Os compostos naturais bioativos isolados desses microrganismos são utilizados para as mais diversas finalidades, apresentando propriedades enzimáticas, inseticidas, fungicidas, antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, entre outras [24-27]. Além disso, de todas as moléculas com propriedades de interesse biotecnológico conhecidas, quase a metade são produzidas por espécies pertencentes a Actinobacteria [21].

Actinobactérias também são associados comuns de formigas cortadeiras [28-30]. Diversos isolados de actinobactéria foram obtidos do tegumento da formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae), assim como apresentado no capítulo anterior. Uma dessas linhagens, a IIL-Asp77, putativamente identificada como sendo *Streptomyces drozdowiczii*, não apresenta qualquer relato sobre o potencial biotecnológico de seus metabólitos, incluindo a atividade inseticida. Assim, dado potencial de produção de metabólitos bioativos por actinobactérias, a sua diversidade em associação a *A. coronatus* e o potencial que insetos apresentam como um novo nicho de exploração de microrganismos e/ou de novos compostos, buscamos avaliar o potencial do isolado IIL-Asp77 para a produção de moléculas inseticidas utilizando *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) como modelo de estudo.

## 5.2. Material e métodos

### 5.2.1. Material biológico

Para o estudo foi utilizado o isolado IIL-Asp77, simbionte da formiga cortadeira *A. coronatus* isolado da superfície cuticular desse inseto, e identificado putativamente como *Streptomyces drozdowiczii*.

O estudo também utilizou lagartas de uma linhagem suscetível de referência de *S. frugiperda*, obtida junto ao Laboratório de Manejo de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP). Os insetos foram criados em dieta artificial à base de feijão [31], seguindo os procedimentos de criação descritos por Parra [32].

### 5.2.2. Cultivo, extração e fracionamento dos metabólitos produzidos por IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*

O isolado IIL-Asp77 foi inoculado em 1,5 L do meio ISP2 [33] e cultivado sob agitação constante (130 rpm) por 7 dias a 28ºC. O fermentado obtido foi submetido ao processo de filtração para remoção de células e extração líquido-líquido 1:1 com acetato de etila (Synth), de acordo com procedimentos padrões de extração líquida [34]. O extrato bruto obtido foi concentrado em rotoevaporador (Tecnal) (40 rpm; 45ºC) e acondicionado em recipiente escuro de 2,5 mL (Sun Sri) a -20°C até sua purificação. O extrato bruto produzido (80 mg) foi purificado por meio de uma coluna SephadexTM LH-20 (300x20 mm) com tamanho de partículas entre 27-163 μm (GE Healthcare, Suécia) utilizando metanol (HPLC grade – JT Baker) como o eluente. O fracionamento foi realizado com a coleta de uma fração inicial de 30 mL, seguida pela coleta de frações (14) de 12 mL e uma fração final de 50 mL. Os compostos eluídos foram monitorados por cromatografia em placas de camada delgada, utilizando os solventes hexano e acetato de etila em diferentes razões (1:1 e 3:7) como solvente de arraste, sendo a leitura dos compostos realizada sob luz UV a $\lambda$=254 e $\lambda$=356 nm. Assim, as frações obtidas puderam ser agrupadas de acordo com suas similaridades de perfil cromatográfico, resultando em um número menor de amostras (6 frações) para análises posteriores.

### 5.2.3. Análise química por inserção direta (DI-ESI-MS)

Os perfis químicos do extrato bruto e de todas as frações foram analisados por inserção direta em espectrômetro de massas. As análises foram realizadas em um Espectrômetro de Massa XevoTM TQ-S (Waters Corporation), acoplado ao Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Performance AcquityTM (UPLCTM – Waters). A ionização das amostras foi realizada usando fonte de ionização Z-spray operando em modos positivo (DI-ESI+) e negativo (DI-ESI-), com fluxo de 0,100 mL/min. A eluição isocrática utilizada foi de 0,1% ácido fórmico em metanol 90% durante 2 min. O volume de injeção foi de 2 μL e a concentração dos extratos brutos utilizada de 10 μg/mL. A tensão capilar e a tensão de pulverização foram ajustadas para 3,3 kV e 70 V, respectivamente, e a temperatura de dessolvatação fixada em 300°C em todas as análises. As frações (6) foram concentradas e ressuspensas em 1 mL de metanol para análise química. O intervalo de massa analisado foi de 100 a 1850 Da (*m/z*) em experimento de varredura completa.

### 5.2.4. Detecção das frações ativas por bioensaio

Todas as frações coletadas foram submetidas a bioensaios para a identificação da fração com atividade inseticida a lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda*. Os experimentos foram conduzidos em placa plástica com 24 poços para o cultivo de células (Costar®, Cambridge, Massachusetts, EUA). Cada um dos 24 poços da placa foi preenchido com 1,25 mL de dieta artificial e as placas mantidas em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta até a geleificação da dieta para evitar a contaminação superficial da mesma. Uma vez geleificada, a superfície da dieta no interior de cada poço da placa recebeu 20 μL de cada fração obtida (25 μg/μL), correspondendo a uma dose de 260 μg/cm$^2$, utilizando acetato de etila como controle negativo. Com a evaporação completa do solvente cada célula da placa recebeu 10 lagartas neonatas (0-24 h de idade) de *S. frugiperda*. As placas foram vedadas com filme plástico (Parafilm) com aberturas para ventilação, mantidas em condições de laboratório (25±2ºC; 60±10% UR; fotofase de 14 h) e avaliadas após 120h, considerando indivíduos mortos pela ausência de resposta ao estímulo nos últimos segmentos abdominais ou pelo comprometimento do crescimento, sem a troca de ínstar.

### 5.2.5. Determinação da curva dose-resposta das frações com atividade inseticida

Para determinação da curva dose-resposta dos compostos inseticidas selecionados, extrato obtido de fermentação em 4,5 L de meio ISP2 foi sujeito ao fracionamento, assim como descrito anteriormente, para a obtenção de massa adequada para a condução dos ensaios de toxicidade. As diferentes concentrações das frações ativas selecionadas foram obtidas mediante diluição do ingrediente ativo em metanol contendo 0,1% (v/v) do surfactante Tween 20. Foram testadas as seguintes concentrações: 261, 167, 94, 52, 29 e 9 µg/cm² para a primeira fração ativa selecionada e 293, 167, 94, 52, 29 e 16 µg/cm² para a segunda fração ativa selecionada. Os dados de mortalidade obtidos foram utilizados para a determinação da curva resposta via análise de Probit utilizando o programa R [35] com as extensões *ExpDes.pt* [36] e *ecotoxicology* [37]. A partir dessa análise, foram estimados os valores das concentrações letais medianas ($CL_{50}$).

### 5.2.6. Identificação dos compostos bioativos por análise química (MS/MS)

Para a identificação dos compostos bioativos, as frações ativas foram analisadas por inserção direta em espectrômetro de massa operando em modo positivo (ESI+). A caracterização dos compostos foi obtida por experimento de dissociação induzida por colisão (CID). Para a determinação da energia de colisão, vários testes foram realizados (20-70V) antes da seleção de 50V como energia de colisão.

### 5.2.7. Análise cromatográfica LC-UV

O perfil cromatográfico do extrato bruto e das frações foram obtidos por cromatografia líquida em um sistema de cromatografia líquida Ultra High Performance (UHPLC Accela 600 Thermo Scientific), equipado com um detector de matriz de diodos, um amostrador automático e uma coluna ACE 5 (250x4,6 mm; 5 µm). A primeira fração ativa foi monitorada a λ=320 nm e a segunda na faixa de 240 a 400 nm. As amostras foram eluídas usando um gradiente de 0,1% de ácido fórmico (fase A) e metanol/ácido fórmico a 0,1% (fase B). O gradiente começou com 60% de fase B e aumentou linearmente para 95% em 10 min, com uma retenção adicional de 15 minutos em 95% da fase B. A purificação do componente de cada fração foi feita utilizando uma coluna ACE 5 (250x7,75 mm, 5 µm), sob o mesmo gradiente de eluição e fluxo de 1,4 mL/min.

## 5.3. Resultados

### 5.3.1. Potencial inseticida do isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*

O estudo do potencial inseticida do isolado IIL-Asp77 *S. drozdowiczii* resultou na descoberta de duas frações ativas após o fracionamento do extrato bruto e análise de mortalidade por bioensaio com lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda*. As frações 3 (38,3 ± 7,5%) e 5 (45,8 ± 3,8%) corresponderam à quase totalidade da mortalidade observada no extrato bruto (80,8 ± 7,9%).

Tabela 4.1. Mortalidade de lagartas de 1º ínstar de *Spodoptera frugiperda* expostas às frações purificadas da linhagem IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii* isolada de *Acromyrmex coronatus* para identificação das frações ativas.

| Frações IIL-Asp77 | Mortalidade (%)* |
|---|---|
| 1 | 2,5 ± 1,8 |
| 2 | 6,7 ± 3,9 |
| 3 | 38,3 ± 7,5 |
| 4 | 1,7 ± 1,1 |
| 5 | 45,8 ± 3,8 |
| 6 | 10,8 ± 3,1 |
| Extrato bruto | 80,8 ± 7,9 |

* valores obtidos considerando a mortalidade observada para o controle.

### 5.3.2. Caracterização química de compostos inseticidas produzidos pelo isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*

O perfil químico do extrato bruto do isolado IIL-Asp77 foi obtido por inserção direta nos modos positivo e negativo. Nas duas análises, não foram observados sinais de alto valor molecular, maiores do que 1000 Da (Figura 4.1).

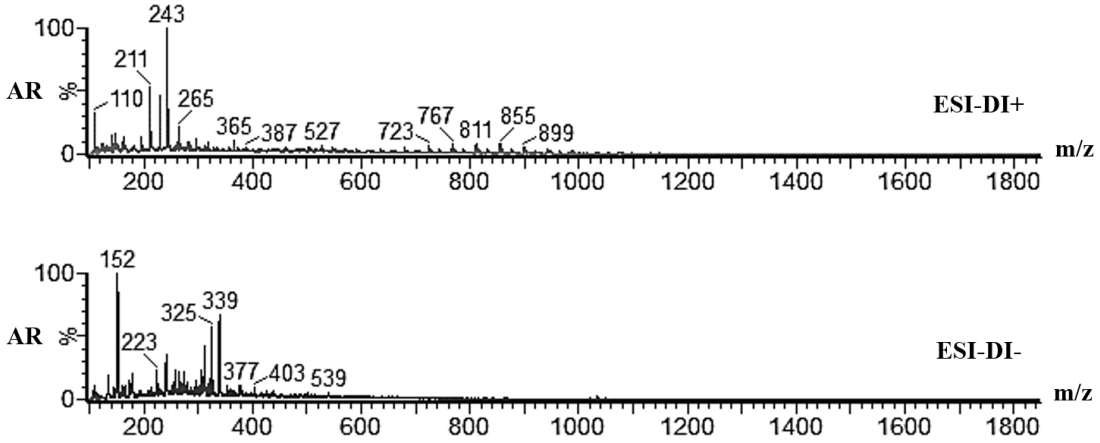


Figura 4.1. Perfil químico do extrato bruto do isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii* obtido em modo positivo (DI-ESI+) e negativo (DI-ESI-) por inserção direta em espectrometria de massa. AR: abundância relativa.

O perfil químico para todas as frações do isolado IIL-Asp77 foi obtido por inserção direta em modos positivo e negativo, sendo as frações ativas (3 e 5) as que apresentaram melhor ionização em modo positivo (DI-ESI+) (Figura 4.2).

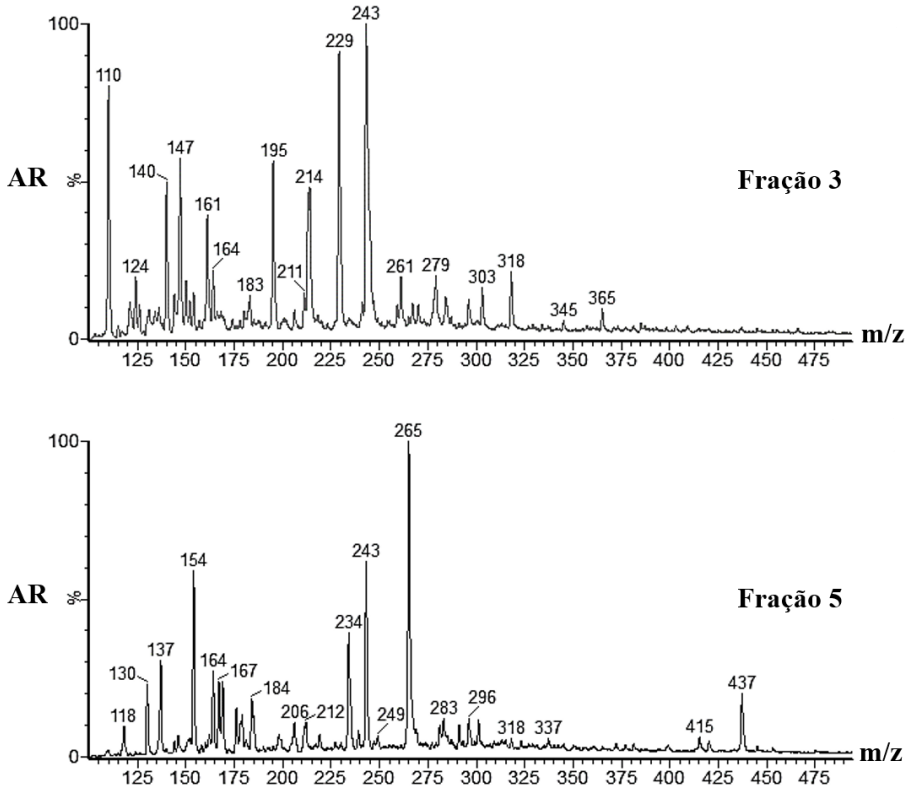


Figura 4.2. Perfil químico das frações ativas 3 e 5 do isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii* obtido em modo positivo (DI-ESI+) por inserção direta em espectrometria de massa. AR: abundância relativa.

O perfil cromatográfico em UHP-LC e HPLC-UV mostrou que a fração 3 possui dois picos de intensidade equivalente (Figura 4.3). Os dois picos da fração 3 foram observados no tempo de retenção entre 13 e 15 minutos e correspondem aos sinais de *m/z* 229 e *m/z* 243. Experimentos de CID revelaram que os compostos pertencem à classe das pirrolobenzodiazepinas usabamicina. Os espectros (MS/MS) para os sinais *m/z* 229 e 243 estão apresentados na Figura 4.4.

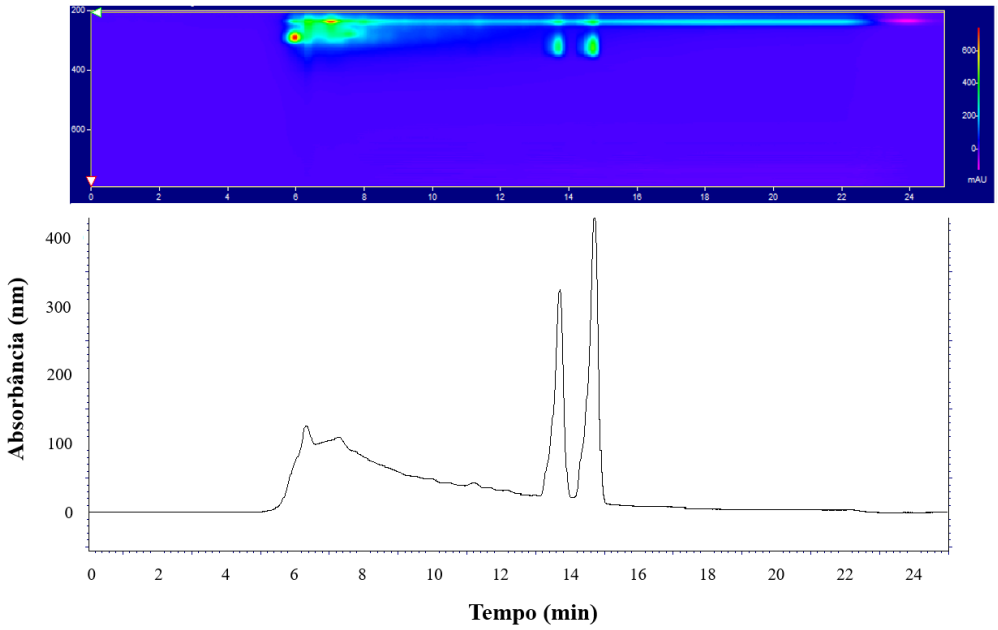


Figura 4.3. Perfil cromatográfico e análise de caracterização pelo método semi-preparativo HPLC-UV da fração 3 obtida do extrato bruto produzido pelo isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*.

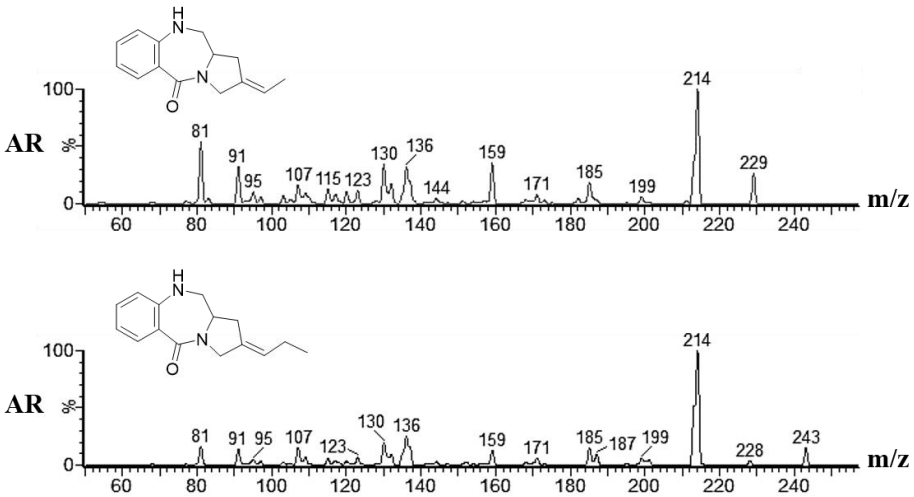


Figura 4.4. Análise química (MS/MS) para identificação dos picos ativos (*m/z* 229 e 243) da fração 3 obtida do extrato bruto produzido pelo isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*. Caracterização dos compostos obtida por experimento de dissociação induzida por colisão (CID). AR: Abundância relativa.

Com relação a fração 5, a análise do seu perfil cromatográfico em UHP-LC e HPLC-UV mostrou a existência de pico majoritário e três picos minoritários (Tabela 4.5). O pico majoritário foi observado no tempo de retenção em torno de 7 minutos e corresponde ao sinal de *m/z* 265. O experimento de CID revelou que o íon *m/z* 265 se tratava de um alcaloide, sendo identificado como sendo uma perlolirina (Figura 4.6).

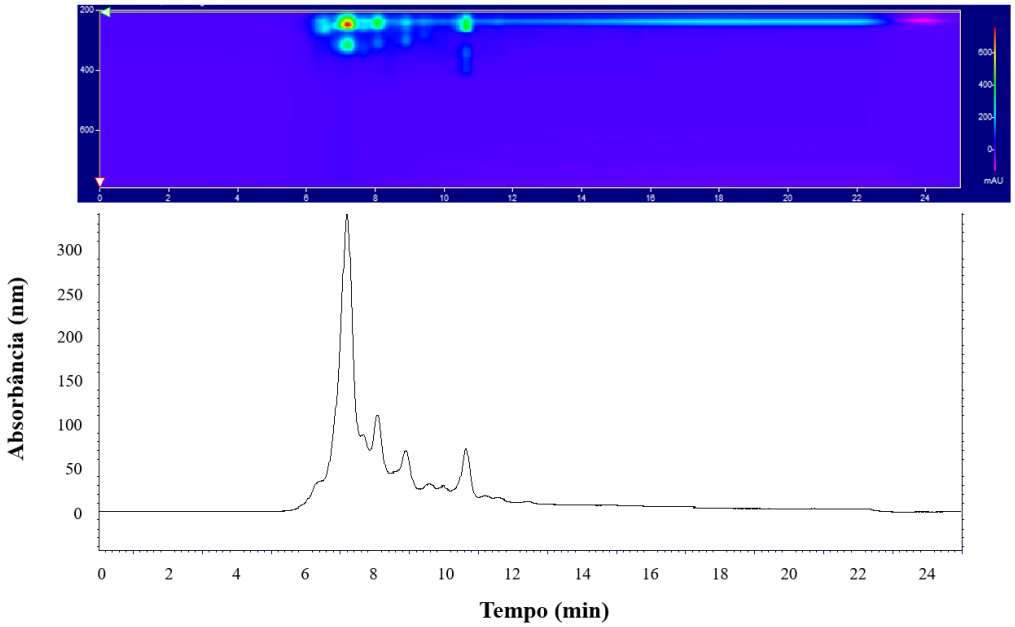


Figura 4.5. Perfil cromatográfico UHP-LC e análise de caracterização pelo método semi-preparativo HPLC-UV da fração 5 obtida do extrato bruto produzido pelo isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*.

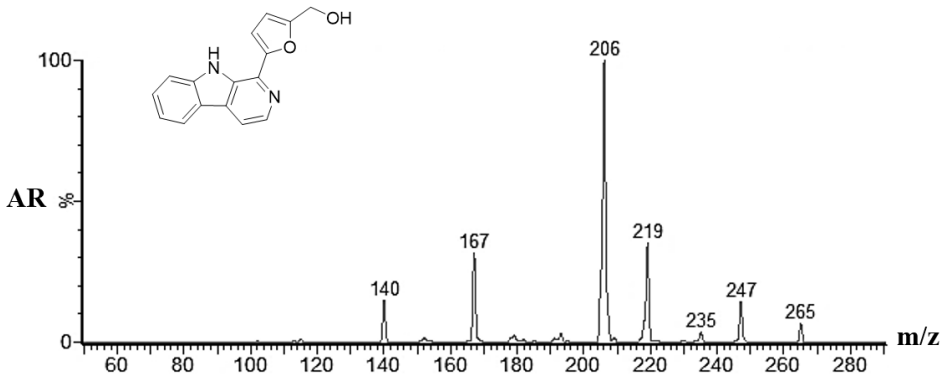


Figura 4.6. Espectro MS/MS do ion *m/z* 265 isolado da fração 5 obtida do extrato bruto produzido pelo isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*. Caracterização do composto obtida por experimento de dissociação induzida por colisão (CID). AR: Abundância relativa.

### 5.3.3. Curva dose-resposta de compostos inseticidas produzidos pelo isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*.

Em análise preliminar, a aplicação de 260 µg/cm² na dieta da fração 3 em bioensaio por ingestão, resultou na morte de 93,3% de lagartas de *S. frugiperda* de 1° ínstar, enquanto que a aplicação de 160 µg/cm² da fração 5 na dieta resultou na mortalidade de 41,7% das lagartas testadas. A partir destes dados, obteve-se as curvas dose-resposta às diferentes concentrações das frações 3 e 5 contra lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda* utilizando-se o método de ingestão. A análise de probit indicou $CL_{50}$ estimada em 62,73 µg/cm² para a fração 3, com coeficiente angular (± erro padrão) de 1,59 (± 0,28) ($\chi^2$ = 21,34; *gl* = 4), enquanto para a fração 5 indicou uma $CL_{50}$ de 170,56 µg/cm², com coeficiente angular (± erro padrão) de 2,23 (± 0,38) ($\chi^2$ = 19,69, *gl* = 4) (Tabela 4.2, Figura 4.7).

Tabela 4.2. Resposta de concentração-mortalidade de *Spodoptera frugiperda* das frações 3 e 5 obtidos do extrato bruto produzido pelo isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*. Dados obtidos por meio de bioensaio de ingestão e utilizando o programa de estatística R.

| Amostra | n[1] | Coeficiente angular (±EMP)[2] | CL50 (IC95%)[3] | CL90 (IC95%)[4] | $X^2$ (g.l.)[5] | p-valor[6] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Fração 3 | 720 | 1,59 ± 0,28 | 62,73 (50,52 - 77,38) | 403,2 (280,24 – 683,52) | 21,34 (4) | 0,9997 |
| Fração 5 | 720 | 2,23 ± 0,38 | 170,56 (143,1 - 211,5) | 641,1 (455,87 - 1060,9) | 19,69 (4) | 0,9994 |

1. número de indivíduos testados; 2. Erro padrão da média; 3. Dose letal 50 (µg/cm²) intervalo de confiança a 95%; 4. Dose letal 90 (µg/cm²) intervalo de confiança a 95%; 5. Qui-quadrado calculado e grau de liberdade; 6. Probabilidade de significância

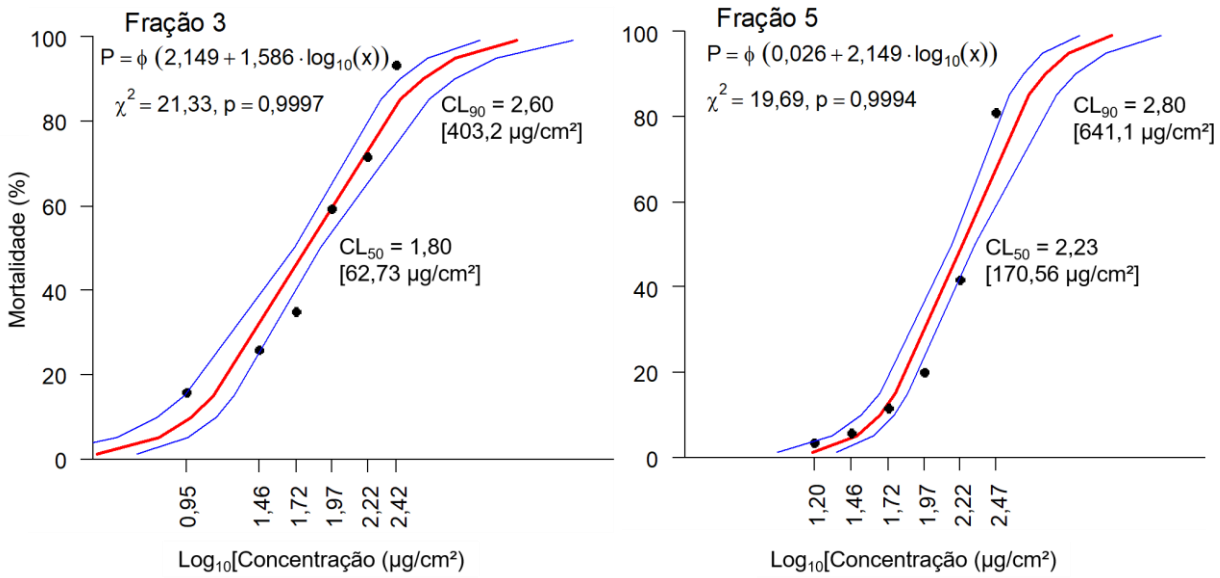


Figura 4.7. Curva concentração-mortalidade das frações ativas 3 e 5 obtidas do extrato bruto do isolado IIL-Asp77 *Streptomyces drozdowiczii*. Dados obtidos por meio de bioensaio de ingestão e utilizando o programa de estatística R.

### 5.4. Discussão

O potencial para se encontrar novos compostos na natureza é enorme e os microrganismos são considerados uma excelente fonte natural de compostos bioativos. Dentre os microrganismos produtores de metabólitos bioativos de importância comercial, os actinomicetos têm a capacidade de produzir enormes variedades de metabólitos secundários com atividades biológicas diversas, em particular, o gênero *Streptomyces*. Além dos antibióticos que representam o maior grupo, os metabolitos secundários desse gênero revelam várias outras atividades biológicas, atuando como agentes antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários e antivirais, agentes farmacológicos que apresentam atividades antitumorais, imunomoduladoras e inibidores enzimáticos e agentes agrobiológicos compreendendo os pesticidas e herbicidas (38).

Com relação aos inseticidas, a classe Actinobacteria é a fonte de uma das moléculas mais ativas e seletivas ainda em uso atualmente, as espinosinas, que foram obtidas de duas espécies isoladas do solo pertencente ao gênero *Saccharopolyspora* [39,40]. Já para o gênero *Streptomyces*, sua importância pode ser evidenciada pelo grupo das avermectinas, produzida a partir da fermentação de *Streptomyces avermitilis*. Esses metabólitos e seus derivados são ativos contra certos nematoides em doses extremamente baixas, além de apresentar baixa toxicidade aos mamíferos, apresentando também alta eficiência contra ácaros, carrapatos e outros ectoparasitos e endoparasitos de equinos, bovinos, suínos e ovinos [41-43].

O isolado IIL-Asp77 *S. drozdowiczii*, associado externamente ao tegumento da formiga cortadeira *A. coronatus*, produziu dois compostos com atividade inseticida a lagartas de 1º ínstar de *S. frugipera,* um pirrolobenzodiazepino, usabamicina ($CL_{50}$ = 62,73 µg/cm²), e um alcaloide, perlolirina ($CL_{50}$ = 170,56 µg/cm²).

A usabamicina foi caracterizada pela primeira vez após o estudo dos metabólitos secundários produzidos por uma bactéria isolada de uma amostra de sedimento marinho japonês, identificada como pertencente ao gênero *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. NPS853), mostrando atividade citotóxica contra células cancerigenas humanas 5-HT2B14 e atividade inibitória da absorção de serotonina (5-hidroxitripamina) [44]. A usabamicina é considerada uma molécula análoga ao antibiótico antramicina, sendo classificada em três diferentes classes (A, B e C) com aplicações em diversas áreas do conhecimento, principalmente na medicina devido à sua propriedade antibiótica e antitumoral [45]. Os mesmos padrões de fragmentação para o íon *m/z* 243 encontrado no presente trabalho, já foram relatados na literatura, caracterizado como usabamicina C [44]. No entanto, os padrões de fragmentação para o sinal *m/z* 229 evidenciam que se trata de um análogo inédito.

Perlolirinas são alcaloides do grupo das β-carbolinas, sendo identificados mais de 140 alcaloides deste grupo derivados de bactérias, algas, fungos, plantas, insetos e tecido animal, incluindo humanos [46]. Alguns deles exibiram atividade biológica em estudos para descoberta de medicamentos farmacêuticos potentes para tratamento de células cancerígenas, Alzheimer, *Leishmania*, *Herpes*, *Influenza* e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) [46]. Algumas β-carbolinas foram descritas como alucinógenas a seres humanos devido à sua ligação a receptores de serotonina do tipo 5-HT2 [47]. Esses receptores são considerados o sítio-alvo de ligação das β-carbolinas para o desencadeamento do seu mecanismo de ação [48]. Perlolirina foi inicialmente relatada como produto do metabolismo de diferentes isolados de *Streptomyces* (B1848, B6005 e Bio215) obtidos do ambiente marinho [49].

Apesar dos relatos de isolamento e potencial biotecnológico das moléculas de usabamicina e perlolirina em diversas áreas do conhecimento, a capacidade dessas moléculas em causar mortalidade em insetos e serem utilizadas como inseticidas era desconhecido. A capacidade dessas moléculas atuarem como inibidores da absorção (usabamicina) ou agonistas (perlolirina) do receptor da serotonina [44,47,48], e induzirem mortalidade em níveis elevados em *S. frugiperda*, demonstram a importância da regulação da serotonina em insetos, tornando essas moléculas naturais uma alternativa aos inseticidas sintéticos disponíveis que atuam no sistema serotonérgico, como parte dos organofosforados [50-52].

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é uma molécula de sinalização intracelular encontrada em todos os organismos com sistema nervoso central. A descoberta do 5-HT como um importante neuromodulador envolveu uma abordagem multidisciplinar de vários grupos de pesquisa [53-60]. Atualmente, o papel do 5-HT é estabelecido na regulação de muitos processos humanos importantes, como o apetite, humor e emoção, sono, atividade sexual, dor e habilidades de aprendizado. Em insetos, processos comparáveis demonstraram ser afetados pelo 5-HT [50], podendo interferir em diversas funções fisiológicas como período de sono [61], ciclo circadiano [62], alimentação [63-66], contração muscular [67], aprendizagem e memória [68,69] e comportamento gregário [70] ou agressivo [71]. Além disso, o 5-HT pode atuar como hormônio diurético, sendo produzido logo após o início da alimentação, estimulando a rápida secreção dos túbulos de Malpighi [72,73].

Muitos dos efeitos que o 5-HT exercem na fisiologia dos insetos se dá pela interação com proteínas receptoras de membrana específicas (proteína G), envolvidas na transdução de sinais celulares e associadas à receptores GPCR. Os receptores de 5-HT em insetos pertencentes principalmente à família das GPCRs (“Rhodopsin-like”) das classes 5-HT1, 5-HT2 e 5-HT7 [74-77].

Embora a farmacologia dos receptores de mamíferos seja minuciosamente estudada (e as drogas que afetam a ligação do receptor de amina biogênica estejam entre as mais importantes no arsenal da farmacologia moderna), a especificidade dessas drogas contra os insetos nunca foi exaustivamente testada e estudos de caracterização de receptores 5-HT em insetos são escassos. A fraca afinidade e seletividade de inseticidas sintéticos com receptores de insetos, inicialmente projetados com base em receptores de mamíferos indicam a importância de buscar agentes de controle que visam tipos mais específicos de receptores de insetos. Embora os receptores de 5-HT estejam envolvidos em muitos processos-chave da vida dos insetos, nenhum inseticida que visam esse grupo de receptores está disponível para o manejo de pragas agrícolas [50,78,79].

A reconhecida atividade inibitória do 5-HT por moléculas de usabamicina e afinidade de perlolirina por receptores do 5-HT por moléculas juntamente com o potencial inseticida encontrado no presente estudo, evidencia duas classes de moléculas inseticidas com diferentes modos de ação e com possível atuação na serotonina de insetos. Entretanto, dada à diversidade de funções que a serotonina pode desempenhar no funcionamento dos insetos, a completa caracterização do modo de ação necessita de novos experimentos afim de investigar e identificar possíveis efeitos no comportamento alimentar do inseto, como a diminuição da ingestão do alimento, a regulação da sensibilidade de quimiorreceptores, principalmente os

gustativos, a regulação do mecanismo da nutrição, principalmente pela ação na produção de peptídeos do tipo insulina [50]. Além do comportamento, devido à característica neurotransmissora e neuromoduladora da serotonina, possíveis efeitos na regulação do sistema nervoso e na diurese do inseto também devem ser investigados.

Desta forma, o estudo demonstrou o potencial dos simbiontes microbianos de insetos em produzir novas moléculas inseticidas com atividade contra *S. frugiperda*, descrevendo duas moléculas com esta capacidade. Também foi demonstrada análise detalhada das estruturas e o isolamento guiado por bioensaio de compostos ativos a partir de extratos brutos complexos, podendo resultar no isolamento de novas moléculas ativas. Usabamicina e perlolirina são moléculas de duas classes químicas interessantes, descritas na literatura com atividade biológica em outras áreas do conhecimento, mas não relacionadas à atividade inseticida. Assim, os resultados obtidos indicam que essas moléculas podem ser usadas para controle de insetos e com modo de ação com características inéditas e inovadoras.

### 5.5. Conclusões

- Os metabólitos do simbionte de *Acromyrmex coronatus,* a actinobactéria IIL-Asp77 *S. drozdowiczii*, apresentam atividade inseticida a lagartas de *Spodoptera frugiperda*;

- Usabamicina e um novo análogo foram identificados como metabólitos do isolado IIL-Asp77 *S. drozdowiczii* de *Acromyrmex coronatus* com atividade inseticida a lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda*;

- Perlolirina foi identificada como metabólito do isolado IIL-Asp77 *S. drozdowiczii* de *Acromyrmex coronatus* com atividade inseticida a lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda*;

- Nova atividade biológica foi identificada para usabamicinas e perlolirinas – a atividade inseticida.

**Referências**

1. Altieri MA. Agroecology: the science of sustainable agriculture. CRC Press, 2018. p. 448.

2. Ramankutty N, Mehrabi Z, Waha K, Jarvis L, Kremen C, Herrero M et al. Trends in global agricultural land use: implications for environmental health and food security. Annual Review of Plant Biology. 2018;69(1):789-815.

3. Commoner, B. The closing circle: nature, man, and technology. New York: Knopf; 1971.

4. Davis K, Gephart J, Emery K, Leach A, Galloway J, D'Odorico P. Meeting future food demand with current agricultural resources. Global Environmental Change. 2016;39:125-132.

5. Cook R. Advances in plant health management in the twentieth century. Annual Review of Phytopathology. 2000;38(1):95-116.

6. Stark, J.D., Banks, J.E. 2001. "Selective" pesticides: are they less hazardous to the environment. *Bioscience*, 51:980-982.

7. Pretty J, Bharucha Z. Sustainable intensification in agricultural systems. Annals of Botany. 2014;114(8):1571-1596.

8. Damalas, CA. Safe food production with minimum and judicious use of pesticides. In: Food Safety. Cham: Springer; 2016. p. 43-55.

9. Praça L, Batista A, Martins E, Siqueira C, Dias D, Gomes A et al. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2004;39(1):11-16.

10. Moran N. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104:8627-8633.

11. Yun JH, Roh SW, Whon TW, Jung MJ, Kim KS, Park DS et al. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. Applied and Environmental Microbiology. 2014;80(17):5254-5264.

12. Poulsen M, Oh DC, Clardy J, Currie CR. Chemical analyses of wasp-associated Streptomyces bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. Plos One. 2011;6(2):e16763.

13. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of natural products. 2007;70(3):461-477.

14. Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. Natural Product Reports. 2009;26(3):338-362.

15. Challinor VL, Bode HB. Bioactive natural products from novel microbial sources. Annals of the New York Academy of Sciences. 2015;1354(1):82-97.

16. Õmura S, Crump A. The life and times of ivermectin - a success story. Nature Reviews Microbiology. 2004;2(12):984-989.

17. von Bubnoff A. Seeking new antibiotics in nature's backyard. Cell. 2006;127(5):867-869.

18. Clardy, J, Fishback, MA, Walsh, CT. New antibiotics from bacterial natural products. Nature Biotechnology. 2006;24:1541-1550.

19. Guimarães L, Peixoto-Nogueira S, Michelin M, Rizzatti A, Sandrim V, Zanoelo F et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiology. 2006;37(4):474-480.

20. Van Wezel G, Krabben P, Traag B, Keijser B, Kerste R, Vijgenboom E et al. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. Applied and Environmental Microbiology. 2006;72(10):6863-6863.

21. Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. The Journal of Antibiotics. 2005;58(1):1-26.

22. Sharma M. Actinomycetes: source, identification, and their applications. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2014;3:801-32.

23. Anderson A, Wellington E. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2001;51(3):797-814.

24. Kaur T, Vasudev A, Sohal S, Manhas R. Insecticidal and growth inhibitory potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16 on major pest of India, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). BMC Microbiology. 2014;14(1):227-235.

25. Alvarez A, Saez J, Davila Costa J, Colin V, Fuentes M, Cuozzo S et al. Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. Chemosphere. 2017;166:41-62.

26. Zucchi TD, Almeida LG, Moraes LAB, Consoli FL. Albocycline, the main bioactive compound from *Propionicimonas* sp ENT-18 against *Sclerotinia sclerotiorum*. Industrial Crops and Products. 2014;52:264-268.

27. Martinez AFM, Almeida LGA, Moraes LAB, Cônsoli FL. Tapping the biotechnological potential of insect microbial symbionts: new insecticidal porphyrins. BMC Microbiology. 2017;17(1):143.

28. Zhang MM, Poulsen M, Currie CR.Symbiont recognition of mutualistic bacteria by Acromyrmex leaf-cutting ants. The ISME Journal. 2007;1(4):313.

29. Barke J, Seipke RF, Grüschow S, Heavens D, Drou N, Bibb MJ et al. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant Acromyrmex octospinosus. BMC biology. 2010;8(1):109.

30. Zucchi TD, Guidolin AS, Cônsoli FL. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). Microbiological Research. 2011;166(1):68-76.

31. Kasten P, Precetti AA, Precetti CM, Parra, JRP. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificias e substrato natural. Revista de Agricultura. 1978;53:68-78.

32. Parra JRP. Criação de insetos para estudo com patôgenos. In: Alves SB. Controle microbiano de insetos, Editora Manole: São Paulo; 1986. p. 348-373.

33. Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterizations of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1966;16:313-340.

34. Melo IS, Sanhueza RMV. Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: manual técnico: Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 1995.

35. Team, R. Core. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria; 2014. 2017.

36. Ferreira, EB, Cavalcanti, PP, Nogueira, DA. ExpDes.pt: experimental design package. R package version 1.1.2, 2013.

37. Gama, J. Ecotoxicology: methods for ecotoxicology. R package version 1.0.1, 2015.

38. Rashad F, Fathy H, El-Zayat A, Elghonaimy A. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. Microbiological Research. 2015;175:34-47.

39. Kirst H. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. The Journal of Antibiotics. 2010;63(3):101-111.

40. Waldron C, Madduri K, Crawford K, Merlo DJ, Treadway P, Broughton MC, et al. A cluster of genes for the biosynthesis of spinosyns, novel macrolide insect control agents produced by *Saccharopolyspora spinosa*. Antonie van Leewenhoek. 2000;78(3-4):385-390.

41. Omura S, Crump A. Timeline: The life and times of ivermectin - A success story. Nature Reviews Microbiology. 2004;2(12):984-989.

42. Clardy J, Fischbach M, Walsh C. New antibiotics from bacterial natural products. Nature Biotechnology. 2006;24(12):1541-1550.

43. Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001;98(21):12215-12220.

44. Sato, S, Iwata, F, Yamada, S, Kawahara, H, Kayama, M. Usabamycins A–C: new anthramycin-type analogues from a marine-derived actinomycete. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2011;21:7099-7101.

45. Leimgruber W, Stefanović V, Schenker F, Karr A, Berger J. Isolation and characterization of anthramycin, a new antitumor antibiotic. Journal of the American Chemical Society. 1965;87(24):5791-5793.

46. Nikam TD, Nitnaware KM, Ahire ML. Alkaloids derived from tryptophan: harmine and related alkaloids. In: Natural produts, Berlin: Springer; 2013. p. 553-574.

47. Glennon R, Dukat M, Grella B, Hong S, Costantino L, Teitler M et al. Binding of β-carbolines and related agents at serotonin (5-HT2 and 5-HT1A), dopamine (D2) and benzodiazepine receptors. Drug and Alcohol Dependence. 2000;60(2):121-132.

48. Grella B, Dukat M, Young R, Teitler M, Herrick-Davis K, Gauthier C et al. Investigation of hallucinogenic and related β-carbolines. Drug and Alcohol Dependence. 1998;50(2):99-107.

49. Shaaban MO, Schroder D, Shaaban KA, Helmke E, Grun-Wollny I, Wagner-Dobler I, et al. Flazin, perlolyrin, and other beta-carbolines from marine-derived bacteria. Revista Latinoamericana de Química. 2007;35(3):58.

50. Vleugels R, Verlinden H, Vanden Broeck J. Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. Neurotransmitter. 2015;2:1-14.

51. Aldridge J, Seidler F, Meyer A, Thillai I, Slotkin T. Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: effects during different critical periods. Environmental Health Perspectives. 2003;111(14):1736-1743.

52. Slotkin T, Tate C, Ryde I, Levin E, Seidler F. Organophosphate insecticides target the serotonergic system in developing rat brain regions: disparate effects of diazinon and parathion at doses spanning the threshold for cholinesterase inhibition. Environmental Health Perspectives. 2006;114(10):1542-1546.

53. Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. The Journal of Biological Chemistry. 1948;176:1243-1251.

54. Rapport MM, Green AA, Page IH. Crystalline serotonin. Science. 1948;108:329-330.

55. Rapport MM. Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. The Journal of Biological Chemistry. 1949;180:961-969.

56. Erspamer V, Asero B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. Nature. 1952;169:800-801.

57. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. Annual Review of Medicine. 2009;60:355-366.

58. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development-for functional GI disorders. Gastroenterology. 2007;132:397-414.

59. Twarog BM, Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. American Journal of Physiology. 1953;175:157-161.

60. Woolley DW, Shaw E. Some neurophysiological aspects of serotonin. British Medical Journal. 1954;2:122-126.

61. Yuan Q, Joiner WJ, Sehgal A. A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor 1A. Current Biology. 2006;16:1051-1062.

62. Yuan Q, Lin F, Zheng X, Sehgal A. Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. Neuron. 2005;47:115-127.

63. Neckameyer WS. A trophic role for serotonin in the development of a simple feeding circuit. Developmental Neuroscience. 2010;32:217-237.

64. Dacks AM, Nickel T, Mitchell BK. An examination of serotonin and feeding in the flesh fly *Neobellieria bullata* (Sarcophagidae: Diptera). Journal of Insect Behavior. 2003;16:1-21.

65. Novak MG, Rowley WA. Serotonin depletion affects blood-feeding but not host-seeking ability in *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 1994;31:600-606.

66. Novak MG, Ribeiro JMC, Hildebrand JG. 5-Hydroxytryptamine in the salivary-glands of adult female *Aedes aegypti* and its role in regulation of salivation. Journal of Experimental Biology. 1995;198:167-174.

67. French AS, Simcock KL, Rolke D, Gartside SE, Blenau W, Wright GA. The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee. Journal of Insect Physiology. 2014;61:8-15.

68. Sitaraman D, Laferriere H, Birman S, Zars T. Serotonin is critical for rewarded olfactory short-term memory in *Drosophila*. Journal of Neurogenetics. 2012;26:238-244.

69. Sitaraman D, Zars M, Laferriere H, Chen YC, Sable-Smith A, Kitamoto T, et al. Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105:5579-5584.

70. Anstey ML, Rogers SM, Ott SR, Burrows M, Simpson SJ. Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts. Science 2009;323:627-630.

71. Dierick HA, Greenspan RJ. Serotonin and neuropeptide F have opposite modulatory effects on fly aggression. Nature Genetics. 2007;39:678-682.

72. Donini A, O'Donnell MJ, Orchard I. Differential actions of diuretic factors on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. Journal of Experimental Biology. 2008;211:42-48.

73. Maddrell SH, Herman, WS, Mooney RL, Overton JA. 5-Hydroxytryptamine: a second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*. Journal of Experimental Biology. 1991;156:557-566.

74. Verlinden H, Vleugels R, Zels S, Dillen S, Lenaerts C, Crabbé K et al. Receptors for neuronal or endocrine signalling molecules as potential targets for the control of insect pests. Advances in Insect Physiology. 2014;46:167-303.

75. Huang J. Molecular pharmacology and physiology of insect biogenic amine receptors. In: Advances in agrochemicals: ion channels and G protein-coupled receptors (GPCRs) as targets for pest control: Volume 2: GPCRs and ion channels. 2017. p.127-138.

76. Peroutka SJ, Howell TA. The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. Neuropharmacology. 1994;33:319-324.

77. Tierney AJ. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. Comparative Biochemistry and Physiology A. 2001;128:791-804.

78. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacol Biochem Behav 2002;71:533-554.

79. Troppmann B, Balfanz S, Baumann A, Blenau W. Inverse agonist and neutral antagonist actions of synthetic compounds at an insect 5-HT1 receptor. British Journal of Pharmacology. 2010;159:1450-1462.