



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102013033112-0 A2

(22) Data do Depósito: 20/12/2013

(43) Data da Publicação: 05/04/2016

(RPI 2361)



(54) Título: APARATO E MÉTODO DE CRIAÇÃO DE LARVAS DE INSETOS EM LABORATÓRIO

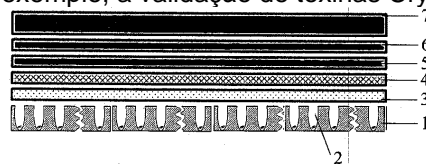
(51) Int. Cl.: A01K 1/03

(73) Titular(es): EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

(72) Inventor(es): MARIA FÁTIMA GROSSI DE SÁ, MARIA CRISTINA MATTAR DA SILVA, FERNANDO CAMPOS DE ASSIS FONSECA, LEONARDO LIMA PEPINO DE MACEDO, ISABELA TRISTAN LOURENÇO, ÉRIKA VALÉRIA SALIBA ALBUQUERQUE FREIRE

(74) Procurador(es): ISABEL CRISTINA VINHAL FREITAS

(57) Resumo: APARATO E MÉTODO DE CRIAÇÃO DE LARVAS DE INSETOS EM LABORATÓRIO. Aparato e método de criação de larvas de primeiro instar de insetos com dieta artificial líquida, destinado à experimentação e condução de bioensaios de laboratório. O método de criação se inicia pela coleta de fêmeas de insetos adultos em gaiola de oviposição. Os ovos viáveis são dispostos individualmente dentro de cada micropoço (2) de uma placa (1), e sob esta uma estrutura para absorção da dieta líquida é constituída de materiais dispostos na seguinte ordem: papel absorvente (3), tecido de náilon (4), tecido esponjoso (5) embebido em dieta líquida, material isolante (6), e tampa (7). Todo o conjunto desta estrutura juntamente com a placa são fixados e a posição preferencial do aparato é invertida. A invenção proporcionou sobrevivência de até 75% das larvas produzidas e menor contaminação das mesmas, possibilitando a seleção de larvas saudáveis, em número suficiente e criadas em menor tempo para a realização de bioensaios diversos, como por exemplo, a validação de toxinas Cry.



APARATO E MÉTODO DE CRIAÇÃO DE LARVAS DE INSETOS EM LABORATÓRIO

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção refere-se ao campo da entomologia: um aparato e o método de criação de larvas de insetos em laboratório, preferencialmente larvas de primeiro ínstar da ordem Lepidoptera.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[2] O setor sucroalcooleiro é um dos principais segmentos do agronegócio brasileiro, tornando o Brasil uma referência para os demais países produtores de açúcar e álcool (NEVES, M.F.; CONEJERO, M.A. 2007. Sistema agroindustrial da cana: cenários e agenda estratégica. Economia Aplicada, v.11, p.587-604.). O país é hoje o maior produtor mundial dessa matéria-prima, com produção estimada em torno de 600 milhões de toneladas, sendo que 50,42% serão destinados para a produção de açúcar e 49,58% para a produção de etanol. (CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. 2012. Acompanhamento da Safra Brasileira, cana-de-açúcar safra 2012/2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>). Com a pressão ambientalista em todo o mundo para implementação do uso de combustíveis de fontes renováveis e não poluentes em substituição aos combustíveis fósseis, cresce a visibilidade do Brasil, que detém posição privilegiada para atender às necessidades de maiores importações, tanto de açúcar quanto de álcool anidro para fins combustíveis.

[3] A broca gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*) é o principal inseto-praga que afeta os canaviais das regiões Norte e Nordeste do Brasil, chegando a contribuir com cerca de 10-20% das perdas. Já foram encontradas áreas infestadas com essa lagarta na região Sudeste, indicando que este inseto-praga pode se disseminar para outras regiões, onde anteriormente não era encontrado (ALMEIDA, L.C.D. et al. 2007. Primeira ocorrência de *Telchin licus* (Drury, 1773), a broca gigante da cana-de-açúcar, no estado de São Paulo. Revista de Agricultura, v.82, p.223-225.).

[4] A utilização de produtos químicos no controle deste inseto praga é ineficiente, principalmente porque a fase mais importante a ser controlada é a fase larval, que se encontra protegida no interior da cana. O custo para controle é muito alto, já que a broca gigante da cana-de-açúcar possui um ciclo de vida longo, podendo durar até 110 dias, sendo necessárias várias aplicações de inseticidas ao longo do ano (MENDONÇA, A.F. 1996. A broca gigante da cana-de-açúcar. In: MENDONÇA, A.F. Ed. Pragas da cana-de-açúcar. Maceió: Insetos & Cia, pp.133-167.). O controle mecânico através de coletas, tem sido muito limitado, pois dispende-se muito tempo para percorrer toda a extensão de um canavial, apresentando baixa eficiência e um custo elevado com a mobilização de mão-de-obra. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas abordagens para o controle deste inseto-praga.

[5] A utilização de ferramentas biotecnológicas aplicada à transformação genética de plantas, empregadas desde a década de 80, surgiu como estratégia promissora para a geração de cultivares mais produtivas e resistentes à insetos-praga, contribuindo fortemente para a redução dos custos de produção. Em países como EUA, Canadá, China e Índia, a adoção de cultivares expressando toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) reduziu em cerca de 50 a 80% o uso de inseticidas (CHRISTOU, P., et al. 2006. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. Trends in Plant Science, v.11, p.302-308.). Considerando a importância da broca gigante da cana-de-açúcar e a carência de métodos eficientes para o seu controle, se faz necessária a busca de moléculas com potencial entomotóxico para este inseto-praga e que possam ser utilizadas em programas de melhoramento genético, via transgenia.

[6] A maioria das pesquisas relatadas sobre a prospecção de agentes entomotóxicos contra a broca gigante da cana-de-açúcar baseia-se na utilização de larvas coletadas diretamente dos canaviais. A utilização de larvas de diferentes tamanhos e em diferentes fases de desenvolvimento dificulta a padronização, a reprodutibilidade e a comparação entre os bioensaios. A dificuldade de estudos in vitro com a broca gigante da cana-de-açúcar se deve, principalmente, ao seu longo ciclo de vida, o que acarreta dificuldade de se obter, em campo, larvas de 1º e 2º ínstars em quantidades necessárias para a montagem de bioensaios.

[7] O desenvolvimento de bioensaios entomológicos é facilitado através de insetos criados em laboratório, uma vez que independem da planta hospedeira e há um suprimento contínuo de insetos padronizados, criados em condições físicas, químicas e biológicas conhecidas. Além disso, os meios artificiais possibilitam certos tratamentos da dieta como esterilização e antibióticos, a fim de evitar contaminações por micro-organismos.

[8] Na literatura científica o processo de estabelecimento das colônias de lepidópteros, coleópteros e pentatomídeos pode ser feito obtendo-se posturas, larvas, pupas ou até mesmo adultos de campo em suas referidas plantas hospedeiras (SHMIDT, F.G.V. et al., 2001. Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos. Circular Técnica 11, 20p.).

[9] Para a criação de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, Lepidoptera: Noctuidae), ou comumente chamada Lagarta da Soja, relatou-se no documento de Shmidt et al. (2001) que os adultos devem ser mantidos em “gaiolas” de acrílico ou monocril de 0,5cm de espessura, com orifícios para ventilação, e contendo uma folha de papel branco comum (sulfite) entre a tampa e as paredes laterais da gaiola, com umidade em torno de 80% para acasalamento e oviposição. Para a eclosão dos ovos, estes devem ser retirados diariamente do papel da gaiola, esterilizados e distribuídos em fitas de papel estéril juntamente com a dieta em cubos em um copo de plástico descartável com tampa de acrílico. Para a criação das lagartas a umidade deve ser mantida a no máximo 70% para evitar a ocorrência de patógenos e outros contaminantes da dieta e com fotoperíodo de 14 horas.

[10] Para a criação de *Spodoptera frugiperda* (Smith, Lepidoptera: Noctuidae), ou lagarta do cartucho do milho, a técnica é praticamente a mesma relatada para *Anticarsia gemmatalis*. As técnicas relatadas em Shmidt et al. (2001) para criação de insetos são com a utilização de dietas artificiais sólidas. Cada espécie de inseto exige condições de criação específicas para seu melhor desenvolvimento.

[11] A literatura patentária apresenta documentos relacionados. Por exemplo, o documento de patente CN85100223 com data de prioridade de 01/04/1985 cita uma placa de oviposição e desenvolvimento de vespas de *Trichogramma* sp., a qual é composta de

uma placa com membrana polimérica de camada dupla, sendo que uma das camadas contém concavidades que possuem a dieta artificial posicionada entre a membrana de cobertura e a membrana da tampa, servindo para que vespas adultas preferencialmente da espécie *Trichogramma* ovipositem nas concavidades da placa e para o desenvolvimento completo das vespas por meio de incubação.

[12] O documento de patente CN201976612 com data de prioridade de 28/02/2011 cita uma típica gaiola de criação de insetos, a qual descreve uma caixa transparente com uma abertura em uma das extremidades para eclosão de insetos, e uma tampa ligada de forma móvel sobre uma abertura destinada à alimentação dos insetos. Outros documentos se referem a dietas artificiais e métodos de produção das mesmas, como o pedido de patente US2009149633, com data de prioridade de 19/05/2006 o qual cita em sua unidade de invenção uma dieta artificial para lepidópteros e método para sua produção contendo uma etapa de desengorduramento utilizando-se de micro-organismo.

[13] As técnicas existentes para criação de larvas de primeiro ínstar de insetos da espécie *Telchin licus licus* não permitem a produção de grande quantidade de larvas viáveis em laboratório, e os experimentos com dieta líquida poderiam resultar em afogamento das larvas. Além disso, devido a característica frágil dos ovos e das larvas, a manipulação pode ser um fator determinante, resultando em alta taxa de inviabilidade dos ovos ou mortalidade das larvas recém eclodidas.

[14] Na presente invenção o aparato permite um método para a criação das larvas de primeiro instar, de modo que cada ovo seja disposto individualmente sem manipulação manual, evitando problemas recorrentes em muitas espécies como hábitos de canibalismo e contaminação dos ovos. Além disso, o aparato contém uma estrutura de materiais absorventes permitindo que tratamentos com dieta artificial líquida sejam administrados às larvas neonatas com alta porcentagem de sobrevivência e maior eficiência. No caso da espécie *Telchin licus licus* administrar a dieta líquida a larvas de primeiro ínstar é essencial para a criação com sucesso das larvas neonatas, diminuindo o manuseio das larvas durante a troca de dieta, maior eficiência alimentar das larvas e facilidade de identificação se a larva está apta a ser submetida aos bioensaios.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[15] A invenção é utilizada para criação de larvas de insetos, permitindo a maior obtenção de larvas saudáveis, preferencialmente das famílias da Ordem Lepidoptera, para experimentos em laboratório. O aparato e a metodologia para criação das larvas envolvem as seguintes etapas: coleta de fêmeas adultas de insetos; acondicionamento em gaiola contendo uma tela para a oviposição; separação dos ovos viáveis; manutenção dos ovos viáveis em ambiente com temperatura e umidade adequadas à espécie; individualização dos ovos em placa (1) de material resistente contendo micropoços (2) de formato em U, V ou plano; distribuição dos ovos nos micropoços preferencialmente sem manipulação manual; após a distribuição individual dos ovos dentro de cada micropoço, é colocado pelo menos uma folha de papel absorvente (3) contendo orifícios correspondentes a cada micropoço da placa (1); acima do papel absorvente (3) são dispostos dois tipos de tecido, um tecido de náilon (4) e um tecido esponjoso (5) embebido na dieta líquida a ser ministrada à larva; sobre o tecido esponjoso (5) é colocado um material isolante (6), maleável e impermeável e por cima deste uma tampa (7). Os componentes desta estrutura podem ser fixados com elásticos, de modo que haja uma pressão suficiente para que a dieta passe do tecido esponjoso (5) ao papel (3). Após a montagem conforme as etapas descritas, a posição preferencial do aparato é invertida. A dieta líquida deve ser repostada no aparato sempre que necessário pelas laterais, não sendo necessária a desmontagem das camadas fixadas acima da placa (1). As larvas são mantidas no aparato até estarem aptas à condução de bioensaios, na qual a identificação é feita pela coloração do intestino, que deve ser clara. O aparato e o método de criação são adaptáveis a qualquer espécie de insetos, mas a invenção abrange preferencialmente insetos que necessitam ser individualizados.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[16] Figura 1: Aparato para criação de larvas de insetos constituído de placa (1) com micropoços (2), demonstrando os ovos individualizados no interior de cada micropoço

(2), folha de papel absorvente (3), tecido de náilon (4), tecido esponjoso (5), material isolante (6) e tampa (7).

[17] Figura 2: Vista superior da placa (1) com micropoços (2). As dimensões utilizadas na invenção não são limitantes à sua concretização podendo ser adaptadas desde que sejam suficientes para a criação das larvas de primeiro ínstar e manutenção até o momento da realização do bioensaio. As distâncias entre os centros dos micropoços (x e y) podem ser variáveis.

[18] Figura 3: Vista lateral da trama do tecido de náilon (4).

[19] Figura 4: Vista superior da placa (8) para distribuição individual dos ovos sem manipulação manual nos micropoços da placa (1).

[20] Figura 5: Vista superior do maior diâmetro do orifício em forma de micro-funil (9), para encaixe do ovo do inseto, da placa (8).

[21] Figura 6: Vista superior do menor diâmetro do orifício em forma de micro-funil (9), para encaixe do ovo do inseto, da placa (8).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS DO ANEXO

[22] Figura 1A: Gaiola com fundo telado para oviposição de fêmeas adultas de insetos coletadas em campo, utilizada em concretização da invenção.

[23] Figura 2A: Etapas de preparação do bioensaio com *Telchin licus licus*. A: Ovos de *Telchin licus licus* em câmara climatizada. Os ovos de coloração vermelha são inviáveis e não foram utilizados; B: Larva eclodida de *Telchin licus licus* submetida ao bioensaio: as larvas aptas são as que possuem intestino de coloração rosada; C: placa de 96 micropoços (1) com fundo em V; D: tecido esponjoso (5).

[24] Figura 3A: Aparato para oviposição e criação de larvas de insetos demonstrando a ordem de montagem da estrutura de materiais.

[25] Figura 4A: Trama do tecido de náilon (4).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[26] Na presente invenção foram desenvolvidos um aparato e um método para a criação de larvas de insetos em laboratório, permitindo a obtenção de uma grande quantidade de lagartas saudáveis e a padronização de insetos a fim de serem utilizados em bioensaios. O aparato é utilizado preferencialmente para eclosão e criação de larvas de insetos que necessitam de individualização, por exemplo os de hábitos canibais, e também para espécies de difícil estabelecimento de criação em laboratório.

[27] Em concretização desta invenção o aparato e o método foram aplicados para a espécie *Telchin licus licus*. Esta espécie apresenta grande dificuldade de adaptação e sobrevivência quando criada em laboratório, e os ovos devem ser isolados pelo fato das larvas serem canibais. Com a utilização do método e aparato propostos, a sobrevivência das larvas de *Telchin licus licus* foi acima de 75%, permitindo assim a utilização de grande quantidade de larvas necessárias para uso em bioensaios. Entretanto, o aparato e o método podem ser aplicados para qualquer espécie de insetos que se adapte a métodos de criação a base de dieta líquida em seu estágio inicial, e preferencialmente aos insetos da Ordem Lepidoptera.

[28] O aparato para criação de larvas de insetos é composto de uma estrutura contendo uma sequência de materiais fixados sobre uma placa (1) com micropoços (2). Este modelo de placa é amplamente conhecido e utilizado para a realização de experimentos de laboratório, e pode ser adquirida comercialmente de várias marcas e modelos com tamanhos variáveis de poços, diâmetro, volume e formato do fundo (U, V ou plano). Sobre a placa (1) é colocada pelo menos uma folha de papel absorvente (2) contendo orifícios correspondentes a cada micropoço (2) da placa (1). Os orifícios feitos no papel são necessários para a aeração dos micropoços (2) da placa (1), e para possibilitar a ingestão da dieta líquida pelas larvas neonatas de modo mais eficiente.

[29] Acima do papel absorvente (3) é disposto um tecido de náilon (4) (Figura 4), ou qualquer tipo de poliamida, resistente à mastigação das larvas e possuir percentual de área aberta tal que a lagarta não atinja o tecido esponjoso (5) localizado sobre do tecido de náilon (4). O tecido de náilon pode possuir malha de 300 a 2000 micras de abertura. O tecido esponjoso (5), posicionado acima do tecido de náilon (4) pode ser constituído de material resistente ao dano pelas larvas, evitando sua evasão. O tecido preferencial contém 80% de viscose e 20% de poliéster, e espessura de aproximadamente 1-4 mm. O tecido de náilon (4) antes do tecido esponjoso (5) é essencial para evitar que a larva chegue ao tecido esponjoso (5), engolindo partes do tecido, ou se afogando na dieta artificial, o que causaria sua morte.

[30] Sobre o tecido esponjoso (5) é colocado um material isolante (6) maleável e impermeável (folha de PVC flexível, EVA ou material de características semelhantes), o qual permite fazer pressão sobre o tecido esponjoso (5) e induzir a transferência da dieta líquida para o papel absorvente (3) sem causar perda no volume da dieta. Por cima do material isolante (6) há uma tampa (7) para evitar a evaporação da dieta. Os componentes desta estrutura são fixados na placa (1) através de elásticos.

[31] Em concretização adicional desta invenção, as partes da estrutura podem ser fixadas através de acoplamento por encaixes na estrutura, como por exemplo uma bandeja deslizante na placa (1). As dimensões utilizadas na invenção não são limitantes à sua concretização podendo ser adaptadas desde que sejam suficientes para a criação das larvas de primeiro ínstar e manutenção até o momento da realização do bioensaio. As distâncias entre os centros dos micropoços (2) podem ser variáveis.

[32] O método de criação de larvas de primeiro estágio de insetos se constitui nas seguintes etapas: as fêmeas dos insetos são coletadas diretamente do campo e acondicionadas em gaiola de criação com fundo telado, permitindo oviposição e aeração.

[33] Esse tipo de gaiola de criação é de uso comum em laboratórios de entomologia, construído geralmente de plástico transparente, possibilitando a visualização em seu interior e possui furos para aeração. A gaiola pode conter opcionalmente uma “luva” constituída por um orifício contendo um tecido ou plástico na parte superior permitindo

assim que o operador possa colocar o braço em seu interior, permitindo a manipulação necessária. O formato da gaiola pode ser de tamanho e formato variáveis. O fundo da gaiola pode possuir uma tela que contenha orifícios que permitem a passagem dos ovos, de modo a facilitar a posterior separação dos outros resíduos.

[34] A tela pode ser constituídas de tecido, poliéster, polietileno, plástico. Sob a tela pode ser colocado recipiente para coletar o material que passa através da tela. Após a coleta dos ovos da tela da gaiola, ocorre a etapa de separação de ovos viáveis que devem ser mantidos em ambiente com temperatura controlada em condições ideais para a espécie escolhida. Este método envolve a individualização dos ovos em micropoços (2) contidos na placa (1). Esta individualização é necessária para espécies de hábitos canibais.

[35] Para facilitar a distribuição dos ovos individualmente em cada micropoço (2) da placa (1), a qual deve ser feita preferencialmente sem contato humano a fim de evitar a contaminação dos ovos por micro-organismos. Pode-se proceder à individualização através do uso de pinça ou com a utilização de uma placa de distribuição (8), de material rígido contendo orifícios em forma de funil (9). Os orifícios em forma de funil permitem o encaixe de apenas um único ovo verticalmente em cada micro-funil (9), e quando submetida a uma leve agitação permite o encaixe e a passagem do ovo individualmente para cada micropoço (2) da placa (1).

[36] Os micro-funis (9) na placa de distribuição (8) devem ser coincidentes em mesmo número e posição a cada um dos micropoços (2) da placa (1). Essas dimensões dos orifícios da placa de distribuição (8) dos ovos no interior dos micropoços (2) da placa (1) devem ser adaptadas à espécie de interesse, pois cada espécie de inseto possui tamanho e formato de ovo variáveis. Após a distribuição individual dos ovos viáveis na placa (1), pelo menos uma folha de papel absorvente (3), por exemplo papel filtro, de dimensões e orifícios correspondentes a cada micropoço da placa (1) é posicionado.

[37] Acima do papel (3) é colocado o tecido de náilon (4) e o tecido esponjoso (5). Deve-se pressionar este tecido (5) o suficiente para transferir a dieta até o papel absorvente (3) sem alterar a estrutura do sistema. A seguir é colocado na estrutura um material isolante (6) e uma tampa (7), prendendo a estrutura para não haver o desencaixe.

[38] Com a finalização da montagem do aparato contendo os ovos, o mesmo deve ser posicionado preferivelmente de forma invertida para que a larva assim que eclodir do ovo possa se alimentar da dieta líquida no papel (3). O aparato de criação deve ser monitorado constantemente, devendo-se manter o tecido esponjoso (5) sempre úmido.

[39] A dieta líquida deve ser administrada às larvas eclodidas no interior do micropoço (2) pelas laterais do aparato montado, opcionalmente através de uma pisseta, seringa, ou qualquer material que possa umedecer o tecido esponjoso (5) sem ser necessária a desagregação da estrutura do aparato. A manutenção das larvas no aparato se alimentando de dieta líquida deve ser feita em câmara com condições de temperatura, umidade e fotoperíodo ideais, variáveis de acordo às necessidades da larva. O aparato e o método de criação são adaptáveis a qualquer espécie de insetos, mas a invenção abrange preferencialmente a Ordem Lepidoptera.

[40] Os exemplos a seguir são descritos para melhor entender a invenção, não estando a mesma limitada às características colocadas nos exemplos concretizados.

EXEMPLO 1

[41] Em concretização da invenção, fêmeas adultas da espécie *Telchin licus licus* foram coletadas em campo cultivado com cana-de-açúcar. Os insetos foram acondicionados em gaiola com fundo telado: um cubo de acrílico transparente de dimensões 60 cm x 60 cm x 60 cm, onde podem ser colocadas até 200 mariposas. O fundo da gaiola foi coberto com tela de náilon de poros de cerca de 2 mm para permitir a passagem apenas dos ovos. Para a espécie selecionada constatou-se que não é necessária a colocação de papel sulfite entre a tampa e as paredes laterais da gaiola, para a oviposição, assim como é feito e relatado no estado da técnica para outras espécies.

[42] Os ovos depositados na tela foram separados em ovos viáveis (coloração acinzentada) e ovos inviáveis (coloração avermelhada). Os ovos viáveis foram mantidos juntos em placas de criação de polipropileno (6 cm de diâmetro e 2 cm de altura) em estufa incubadora tipo BOD, em temperatura regulada para $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70\pm 10\%$ de umidade relativa, até atingirem uma coloração esbranquiçada.

[43] Em seguida, os ovos foram individualizados em placa comercial de polipropileno (12,8 cm x 8,6 cm e 0,7 cm de diâmetro na abertura do micropoço (2)) contendo 96 poços (0,7 cm de diâmetro na abertura) com fundo em U, altura de 1,4 cm, tamanho considerado suficiente para a eclosão e desenvolvimento das larvas de *Telchin licus licus* até a montagem do bioensaio, período que durou de 45 a 60 dias. As dimensões da placa (1), assim como o restante da estrutura do aparato são adaptáveis de acordo com as necessidades da espécie a ser escolhida para o bioensaio.

[44] A distribuição e individualização dos ovos nos micropoços (2) da placa (1) foram realizados sem contato manual com os ovos. Em concretização da invenção, para auxiliar na distribuição e individualização dos ovos em cada micropoço (2) utilizou-se uma placa de distribuição dos ovos (8) com micro-funil (9), contendo orifícios em forma de funil (Figuras 5, 6 e 7) correspondentes a cada micropoço da placa (1). Em concretização da invenção, a placa para distribuição de ovos de *Telchin licus licus* foi feita em acrílico transparente, sendo o maior diâmetro da abertura do micro-funil (9) de 5,1 mm (Figura 6) e o menor de 2,7 mm (Figura 7).

[45] Com a agitação da placa apenas um ovo de *Telchin licus licus* conseguia se encaixar em cada micro-funil (9). Inicialmente, os ovos foram despejados sobre a superfície da placa de acrílico (8) e esta foi coberta com uma tampa transparente para evitar dispersão e perda dos ovos. A placa de acrílico com os micro-funil (9) contendo os ovos foi colocada sobre um homogeneizador do tipo vórtex, e a população de ovos foi agitada levemente e espalhada para se acomodar dentro de cada orifício da placa (8). Em seguida, os ovos foram dispensados individualmente dentro de cada poço. Esta individualização dos ovos é uma característica essencial da metodologia, uma vez que as larvas de *Telchin licus licus* possuem hábitos canibais, e assim que eclodem podem devorar umas às outras, quando em contato no mesmo local.

[46] Sobre a placa (1) contendo as larvas dentro dos micropoços (2), depositou-se uma folha de papel absorvente (3) (papel filtro de 12,2 cm x 8 cm). Dessa forma, o papel (3) criou uma capilaridade que puxa a dieta de um tecido esponjoso (4) deixando-o úmido e permitindo que as larvas suguem a dieta líquida, isso impede que a dieta invada o poço e afogue os insetos.

[47] Para que as larvas neonatas não sejam sufocadas após a sua eclosão, orifícios foram feitos na folha de papel absorvente (3), correspondente a posição de cada micropoço (2) da placa (1), permitindo, dessa forma a passagem do ar. Sobre a folha de papel absorvente (3), coloca-se um tecido de náilon (5) de modo que se obtenha condições ideais de porosidade, possibilitando a passagem da dieta artificial líquida para o papel absorvente (3) e suficientemente flexível permitindo fazer pressão sobre o papel absorvente. O tecido de náilon (4) utilizado foi o utilizado comumente na fabricação de cadeira de praia, e sua trama possuía em torno de 1 mm de abertura (Figura 3 e Figura 4A). O náilon foi utilizado por o material foi resistente à mastigação das larvas, e evitou que as larvas evadissem a placa e mastigassem o tecido esponjoso (5).

[48] Sobre a tela de náilon (4), adicionou-se um tecido esponjoso (5) com 80% viscose e 20% poliéster, embebido de dieta líquida em quantidade suficiente para deixá-lo úmido. Esse tecido esponjoso (5) possui uma boa capacidade de absorção, além de ser resistente à mastigação pelas larvas. Sobre o tecido esponjoso (5) é colocado um material isolante (6) de poliestireno (13,5 cm x 9 cm) cobrindo toda a área da placa com 96 micropoços, pressionando com as mãos o suficiente para transferir a dieta até o papel absorvente (3), sem alterar a estrutura do sistema e também reduzindo a dessecação do tecido esponjoso (4).

[49] Finalmente, uma tampa (7) de material acrílico (13 cm e largura 8,5 cm) foi colocada sobre o material isolante (6) de poliestireno e todo o sistema foi preso e fixado com auxílio de ligas elásticas. Um desenho esquemático e uma ilustração do sistema podem ser visualizados na Figura 1 e na Figura 3A. Após a montagem do sistema de criação, o aparato é posicionado de forma invertida (fundo do poço da placa para cima), a fim de se evitar o acúmulo de gotículas de água no interior dos micropoços (2) devido à evaporação da dieta. Isso permite tanto que as larvas não se afoguem como também atrasa a contaminação da dieta por microorganismos. O sistema foi mantido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa, de forma a simular uma câmara úmida.

[50] A cada dois dias o sistema de criação foi monitorado para se controlar qualquer tipo de contaminação e para realizar a reposição de dieta ao tecido esponjoso (4). Uma quantidade suficiente de dieta, para manter todo o tecido esponjoso (4) úmido foi

despejada pelas laterais do aparato, com auxílio de uma pisseta de plástico. Este procedimento evitou a desmontagem do sistema para monitoramento e adição de dieta, resultando em economia de tempo e redução da manipulação durante o período de execução do experimento. Aproximadamente uma semana após a sua eclosão, as larvas que se alimentaram puderam ser diretamente utilizadas nos experimentos de bioensaios ou senão, transferidas para novas placas de micropoços.

[51] O procedimento pode ser repetido para manutenção e crescimento das larvas, até o momento de uso nos bioensaios. A seleção de larvas da espécie *Telchin licus licus* para uso nos bioensaios deve ser realizada de acordo com o aspecto do intestino: se apresentar coloração escura indica que a larva não se alimentou da dieta líquida, enquanto que a coloração clara indica que o inseto se alimentou da dieta líquida, tendo já eliminado o conteúdo oriundo da nutrição das reservas energéticas do período embrionário.

EXEMPLO 2

[52] Em concretização da presente invenção de acordo com o Exemplo 1, a dieta artificial (Tabela 1) ministrada às larvas de *Telchin licus licus* foi modificada a partir da dieta utilizada para a criação da espécie *Diatraea saccharalis* (adaptada de HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A.M. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. Journal of Economic Entomology, v.61, p.1742-1743.). A composição final da dieta para larvas de broca gigante da cana-de-açúcar foi estabelecida a partir de alterações graduais de cada um dos componentes da dieta usada para *Diatraea saccharalis*, tendo sido administrada às larvas da broca gigante e estas monitoradas até que atingissem o estágio de pupa no menor tempo possível.

Tabela 1. Composição da dieta líquida para *Telchin licus licus*.

Ingredientes	Quantidade
Caseína	20g
Extrato de levedura	10g
Açúcar branco	60g
Ácido ascórbico	10g
Solução vitamínica	11mL
Sais de Wesson	7,5g
Colesterol	0,3g
Benzoato de Sódio	0,3g*

Ampicilina	80mg
Nistatina	800.000 UI
Cloreto de Colina (50%)	2mL
Água	800mL

[53] As larvas de *Telchin licus licus* que conseguiram se alimentar da dieta da Tabela 1 mudaram de coloração de escuro para claro (Figura 2A).

EXEMPLO 3

[54] O sistema de criação de larvas de *Telchin licus licus* estruturado no Exemplo 1 permitiu a realização de bioensaios para validação das toxinas recombinantes na presença da larva da broca gigante da cana-de-açúcar. Um exemplo de concretização foi o bioensaio in vitro testando as toxinas recombinantes de interesse diluídas em série e adicionadas em dieta líquida artificial quanto às suas atividades entomotóxicas a larvas de primeiro instar de *Telchin licus licus* criadas conforme o Exemplo 1 com a dieta líquida preparada conforme o Exemplo 2.

[55] Para realização do bioensaio as larvas saudáveis, obtidas conforme o objeto desta invenção, foram selecionadas quanto à coloração clara do intestino (Figura 2A). O aparato de criação de larvas de primeiro instar (Figura 1) foi desmontado e as larvas foram transferidas para outra placa com micropoços com tampa, com fundo de formato V, contendo em seu interior 0,4 cm² de tecido esponjoso composto de 80% de viscosse e 20% de poliéster embebidas em dieta artificial contendo diferentes concentrações de toxinas Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1Aa e Cry2Aa: 4000, 2000, 1000, 500, 250 e 125 ng/mL. Larvas em sistema de criação contendo dieta artificial sem adição de toxina, foram usados como controle negativo dos experimentos. Cada dose de toxina recombinante foi testada para 12 larvas, em triplicata experimental, totalizando 36 larvas e, em seguida, em triplicatas biológicas.

[56] Os bioensaios montados de acordo com o sistema da presente invenção tiveram duração de 10 dias e foram realizados nas seguintes condições: as placas contendo as larvas se alimentando de dieta artificial contendo ou não toxinas Cry, foram incubadas na posição normal (fundo da placa para baixo) dentro de câmara insetária (tipo BOD).

Durante o tempo de execução do ensaio, para cada repetição foram contadas, a cada dois dias as larvas vivas e mortas.

[57] Em ordem decrescente, a maior toxicidade foi obtida para Cry1Ac recombinante, seguida de Cry1Ab, Cry1Aa e Cry2Aa. A aplicação das moléculas Cry recombinantes validadas significa uma estratégia para o controle da infestação de canaviais pelo inseto-praga, por meio do uso de pesticidas biológicos. Ademais, e de modo promissor, o controle mais sustentável por meio do desenvolvimento de plantas transgênicas de cana-de-açúcar expressando elevada concentração de toxinas. Relacionado à estratégia de transgenia tem-se a possibilidade de permanência maior da toxina no campo, maior probabilidade de absorção das proteínas pelos insetos já que as larvas possuem hábito endofítico por cerca de 6-10 meses; menor uso de defensivos químicos, reduzindo o impacto sobre o meio ambiente e no custo de produção.

REIVINDICAÇÕES

1. Aparato para criação de larvas de insetos caracterizado por compreender uma placa (1) com micropoços (2) e acima desta uma estrutura contendo os materiais na seguinte ordem: pelo menos uma folha de papel absorvente (3); pelo menos um tecido de náilon (4); pelo menos um tecido esponjoso (5); material isolante (6) e uma tampa (7).
2. Aparato de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela placa (1) ser constituída de polímero resistente e transparente.
3. Aparato de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelos micropoços (2) contidos na placa (1) possuírem formatos de fundo tipo U, V ou plano.
4. Aparato de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo papel absorvente (3) ser papel filtro de qualquer especificação.
5. Aparato de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo tecido de náilon (4) ser suficientemente resistente a possíveis estragos causados pelas larvas.
6. Aparato de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo tecido de náilon (4) possuir de 200 a 2000 micras de abertura.
7. Aparato de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo tecido esponjoso (5) ser fibra sintética artificial.
8. Aparato de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo tecido esponjoso (5) ser viscosa ou poliéster e/ou suas misturas.
9. Aparato de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo tecido esponjoso (5) conter preferencialmente 80% de viscosa e 20% de poliéster.
10. Aparato de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo material isolante (6) ser plástico maleável e impermeável.
11. Aparato de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo material isolante (6) ser EVA.
12. Método para criação de larvas de insetos caracterizado por compreender as seguintes etapas:
 - i) coleta de fêmeas adultas de insetos;
 - ii) acondicionamento das fêmeas adultas coletadas na etapa i) em gaiola de criação com fundo telado;

- iii) separação dos ovos viáveis;
 - iv) individualização dos ovos em micropoços;
 - v) administração da dieta líquida às larvas de primeiro ínstar; e
 - vi) manutenção das larvas em câmara com condições de temperatura, umidade e fotoperíodo reguláveis.
13. Método para criação de larvas de insetos de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela etapa iv) ser feita preferencialmente em aparato contendo estrutura com placa com micropoços, papel absorvente, tecido de náilon, tecido esponjoso, material isolante e tampa.
 14. Método para criação de larvas de insetos de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela etapa v) ser feita através da embebição do tecido esponjoso (5).
 15. Método para criação de larvas de insetos de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por ser aplicável a insetos da Ordem Lepidoptera.
 16. Método para criação de larvas de insetos de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por ser aplicável a larvas canibais.
 17. Método para criação de larvas de insetos de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por ser aplicável para a espécie *Telchin licus licus*.
 18. Método para criação de larvas de insetos de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por ser destinado a bioensaios de validação para toxinas Cry.

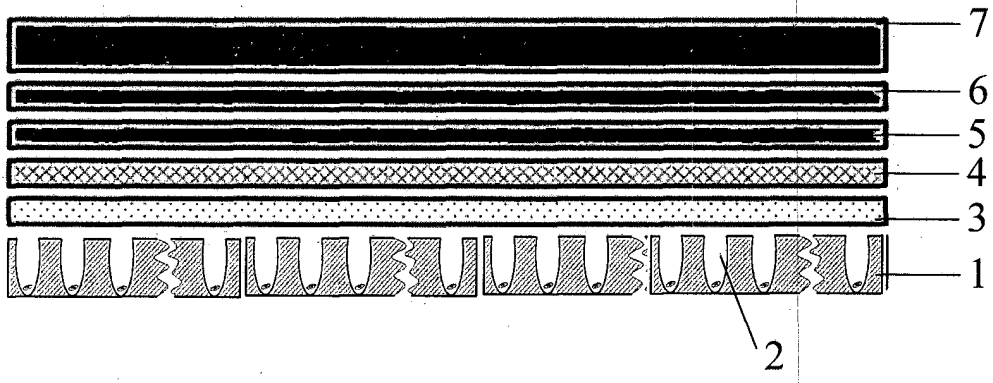


FIGURA 1

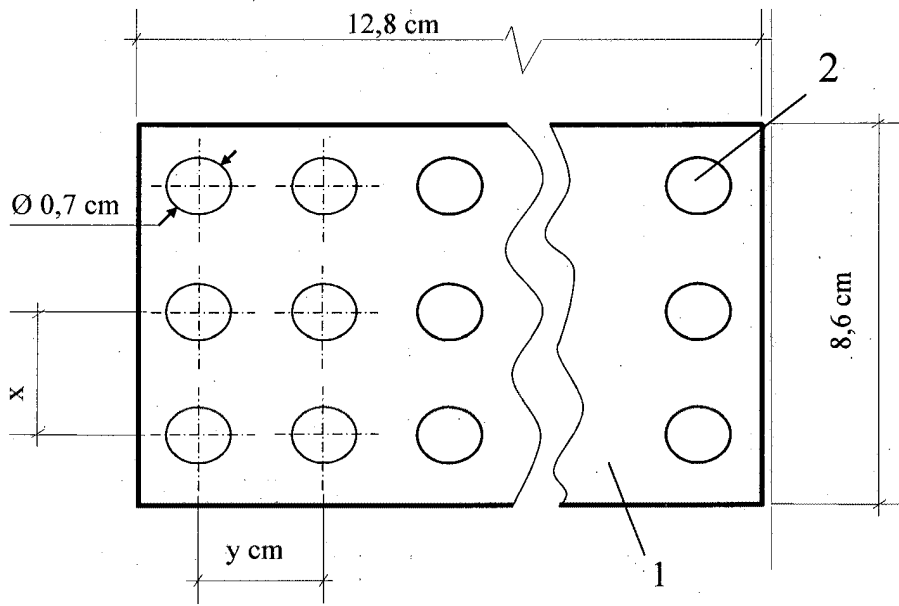


FIGURA 2



FIGURA 3

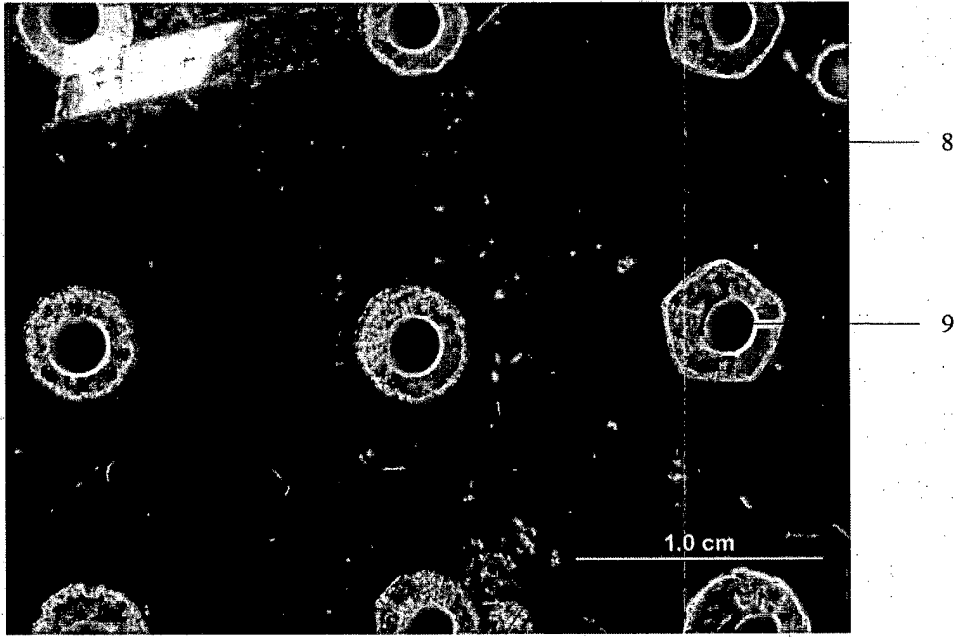


FIGURA 4

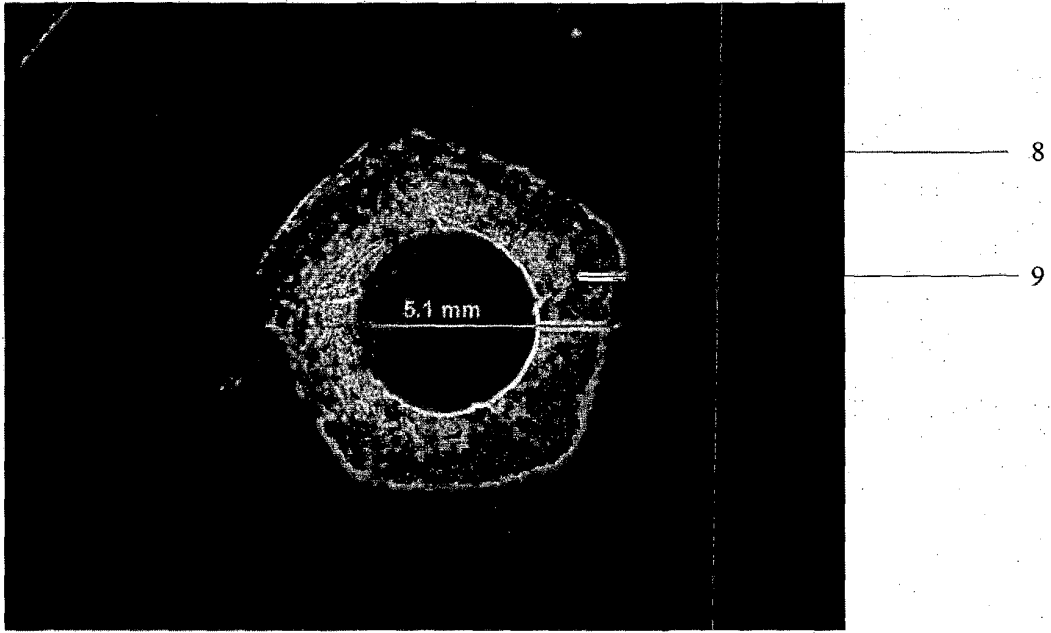


FIGURA 5

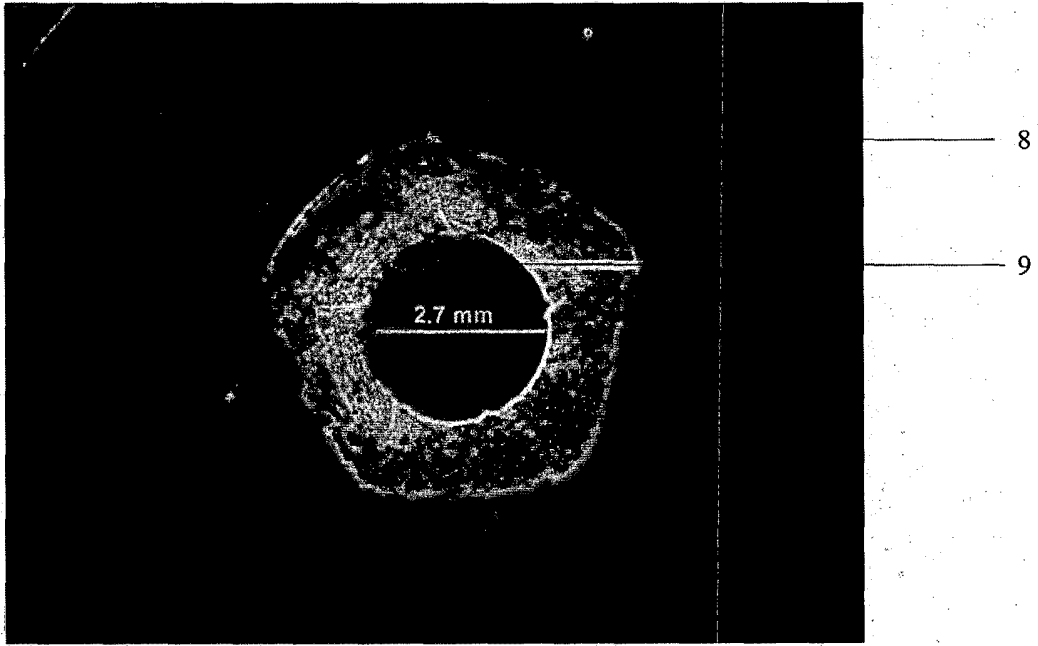
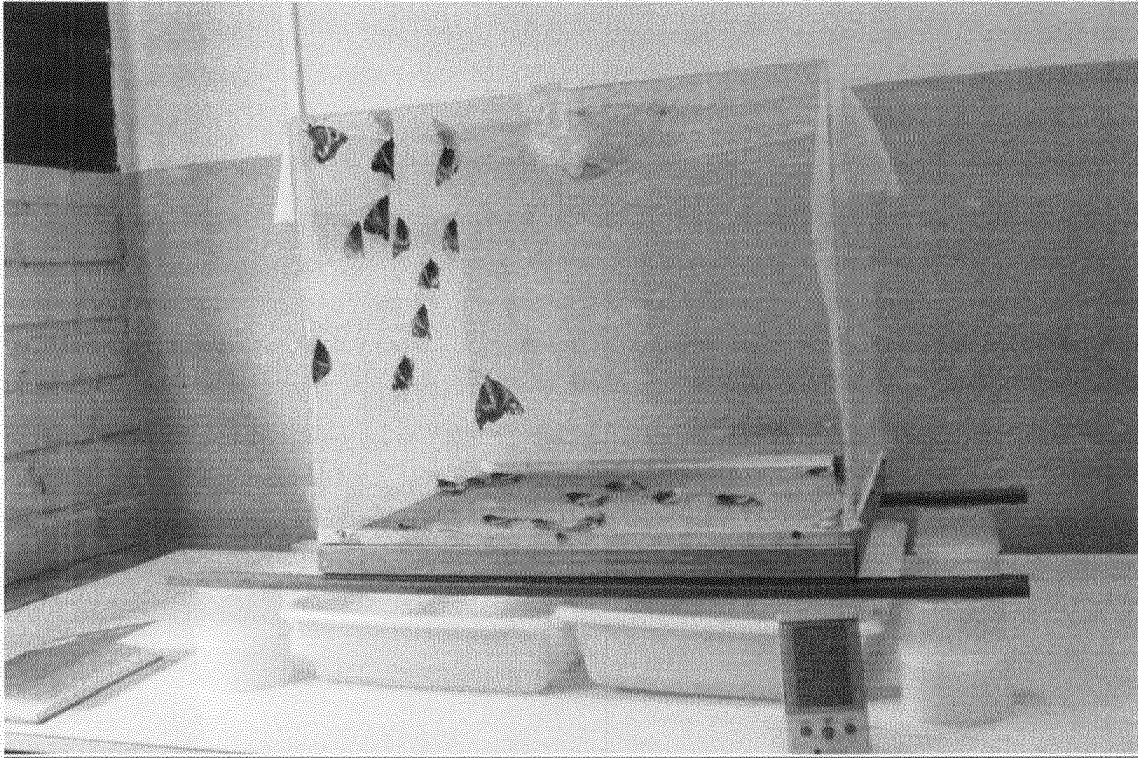


FIGURA 6

ANEXO I

“MÉTODO E APARATO DE CRIAÇÃO DE LARVAS DE INSETOS EM
LABORATÓRIO”



5

FIGURA 1A

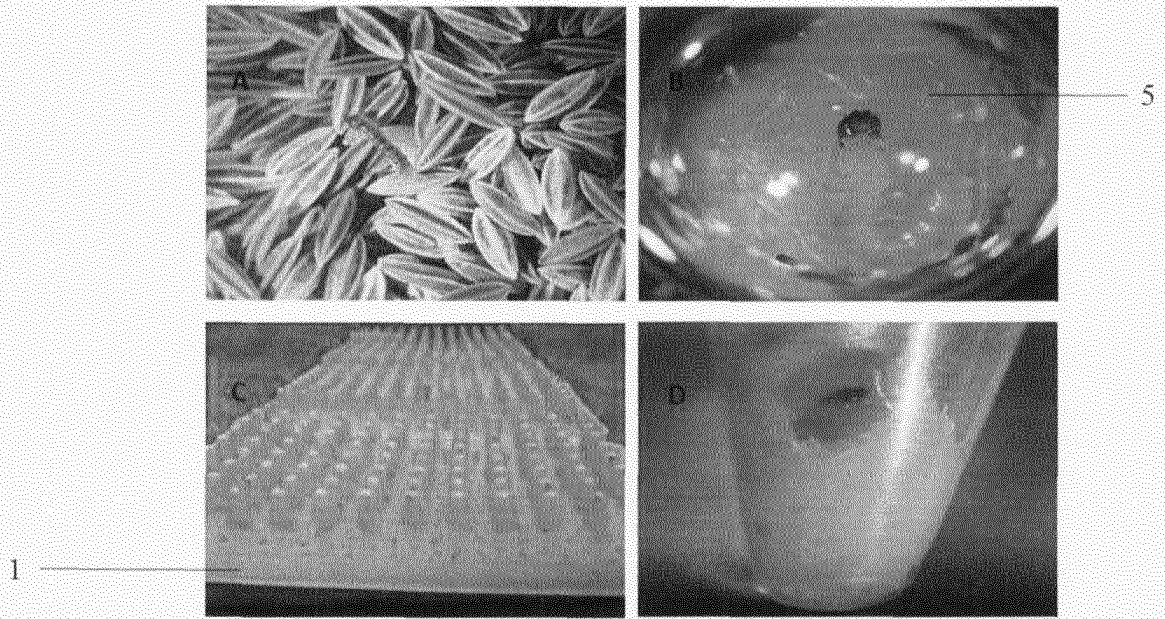


FIGURA 2A

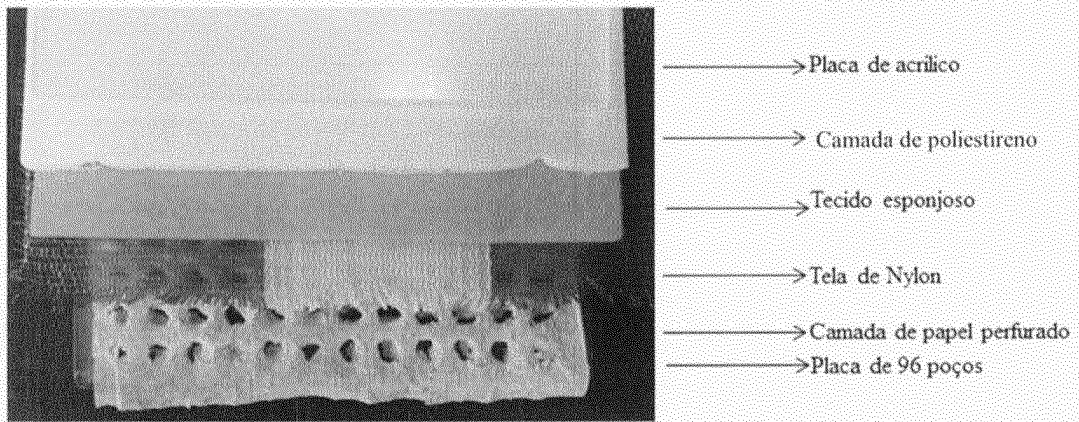


FIGURA 3A

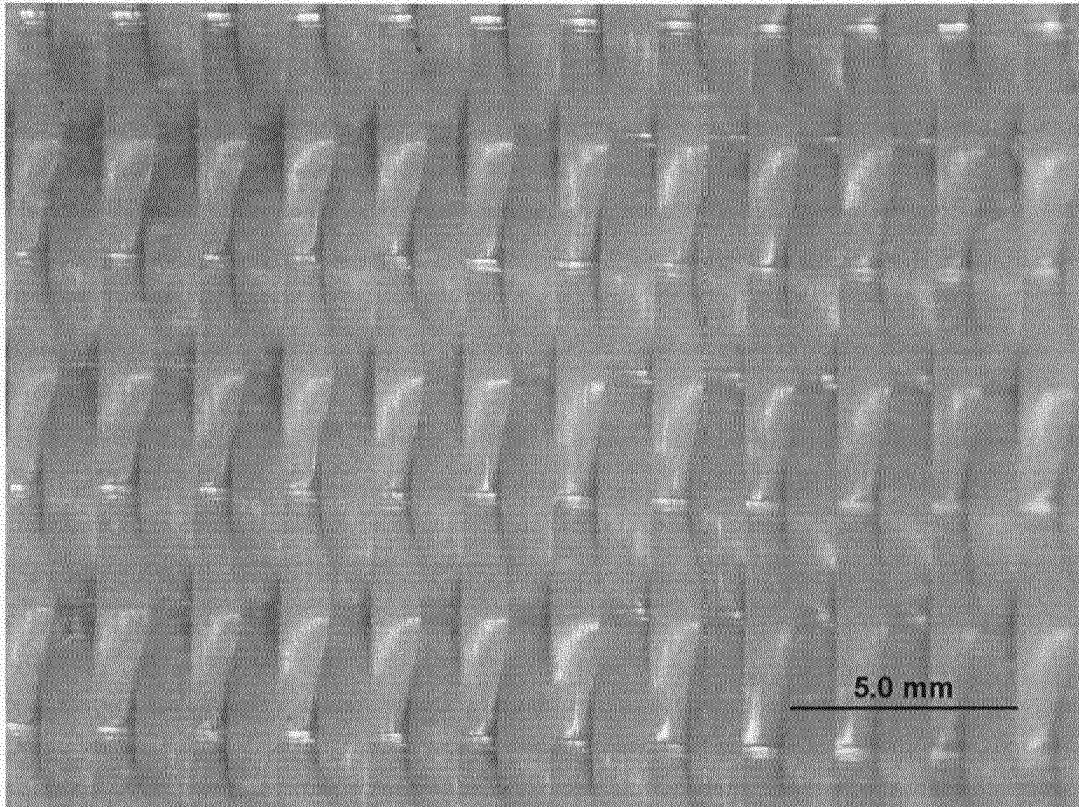


FIGURA 4A

RESUMO

APARATO E MÉTODO DE CRIAÇÃO DE LARVAS DE INSETOS EM LABORATÓRIO. Aparato e método de criação de larvas de primeiro instar de insetos com dieta artificial líquida, destinado à experimentação e condução de bioensaios de laboratório. O método de criação se inicia pela coleta de fêmeas de insetos adultos em gaiola de oviposição. Os ovos viáveis são dispostos individualmente dentro de cada micropoço (2) de uma placa (1), e sob esta uma estrutura para absorção da dieta líquida é constituída de materiais dispostos na seguinte ordem: papel absorvente (3), tecido de náilon (4), tecido esponjoso (5) embebido em dieta líquida, material isolante (6), e tampa (7). Todo o conjunto desta estrutura juntamente com a placa são fixados e a posição preferencial do aparato é invertida. A invenção proporcionou sobrevivência de até 75% das larvas produzidas e menor contaminação das mesmas, possibilitando a seleção de larvas saudáveis, em número suficiente e criadas em menor tempo para a realização de bioensaios diversos, como por exemplo, a validação de toxinas Cry.