

EFEITOS DE ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTOS ISOLADOS SOBRE PARÂMETROS HISTOFISIOLÓGICOS, HISTOQUÍMICOS, IMUNOHISTOQUÍMICO, NUTRICIONAIS E EMBRIOLÓGICOS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

CAROLINA ARRUDA GUEDES

(Sob Orientação do Professor Professora Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE)

RESUMO

A presente pesquisa teve por objetivos: (i) analisar os efeitos dos compostos limoneno e trans-anethole, isolados ou associados, por diferentes vias de aplicação, a fim de verificar efeitos histológicos, histoquímicos, e de apoptose no intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda*; (ii) investigar efeitos subletal e letal dos compostos isolados, geraniol e citronelal sobre parâmetros bioquímicos e reprodutivos de *S. frugiperda*; (iii) avaliar a composição química do óleo de *Piper marginatum*; estabelecer as CLs₃₀ e CLs₅₀ deste óleo e do composto geraniol, bem como examinar os efeitos deste óleo e do geraniol sobre o desenvolvimento embrionário de *S. frugiperda* através da microscopia de luz e eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram que limoneno e trans-anethole interferiram na histologia do tecido epitelial, nos teores de polissacarídeos neutros e proteínas após 48 e 96 h, e diferentes modos de aplicação. Porém, não promoveram apoptose. Trans-anethole apresentou maior eficiência isolado ou associado, quando aplicado por ingestão. Geraniol e citronelal ocasionaram redução na concentração de proteínas e açúcares em ambas as concentrações. Não houve alteração na concentração de lipídios. No entanto, citronelal aumentou o teor de glicogênio para as DLs₃₀ e DLs₅₀. O período de oviposição e a

quantidade de ovos foram reduzidos. A composição química do óleo de *P. marginatum* revelou 44 compostos. As CLs ₃₀ e ₅₀ foram estimadas em 32,32 e 152,95 ppm, para o óleo e para o geraniol, 0,98 e 3,58 ppm, respectivamente. A avaliação em microscopia de luz e eletrônica de varredura revelaram que o óleo, o composto geraniol, azadiractina e deltametrina afetaram o desenvolvimento embrionário e a morfologia dos ovos, em ambas as concentrações, no entanto, o óleo e o composto proporcionaram danos mais expressivos mesmo nas menores concentrações. Infere-se, portanto, que os compostos e óleo utilizados são eficientes para o controle de *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta-do-cartucho, imunohistoquímica, histoquímica, constituintes nutricionais, óleos essenciais, compostos isolados, embriologia

EFFECTS OF ESSENTIAL OIL AND COMPOUNDS ISOLATED ON
HISTOPHYSIOLOGICAL, HISTOCHEMICAL, IMUNOHYSTOKYMIC, NUTRITIONAL
AND EMBRYOLOGICAL PARAMETERS OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

CAROLINA ARRUDA GUEDES

(Under the Direction of Professora Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE)

ABSTRACT

The present research had the following objectives: (i) to analyze the effects of limonene and trans-anethole compounds, isolated or associated, by different routes of application, in order to verify histological, histochemical and apoptosis effects on the midgut of *Spodoptera frugiperda*; (ii) to investigate the sublethal and lethal effects of the isolated, geraniol and citronellal compounds on biochemical and reproductive parameters of *S. frugiperda*; (iii) to evaluate the chemical composition of *Piper marginatum* oil; establish LCs 30 and 50 of this oil and the geraniol compound, as well as histologically examine the embryonic development of *S. frugiperda* through light microscopy and scanning electron. The results demonstrated that limonene and trans-anethole interfered in the histology of epithelial tissue, the levels of neutral polysaccharides and proteins in 48 e 96 h, and different modes of application. However, they did not promote apoptosis. Trans-anethole presented greater isolated or associated efficiency when applied by ingestion. Geraniol and citronellal caused a reduction in the concentration of proteins and sugars in both concentrations. There was no change in lipid concentration. However,

citronellal increased the glycogen for LDs₃₀ and LDs₅₀. The oviposition period and the number of eggs were reduced. The chemical composition of *P. marginatum* oil identified 44 compounds. LCs₃₀ and LCs₅₀ were estimated at 32.32 and 152.95 ppm, for oil and geraniol, 0.98 and 3.58 ppm, respectively. Light and scanning electron microscopy showed that oil, geraniol, azadirachtin and deltamethrin affected the embryonic development and egg morphology at both concentrations, however, the oil and compound were more efficient because of damage more expressive even at the lowest concentrations. It is inferred, therefore, that the compounds and oil used are efficient for the control of *S. frugiperda*.

KEY WORDS: Fall armyworm, immunohistochemistry, histochemistry, nutritional constituents, essential oils, isolated compounds, embryology

EFEITOS DE ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTOS ISOLADOS SOBRE PARÂMETROS
HISTOFISIOLÓGICOS, HISTOQUÍMICOS, IMUNOHISTOQUÍMICO, NUTRICIONAIS E
EMBRIOLÓGICOS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

CAROLINA ARRUDA GUEDES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2017

EFEITOS DE ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTOS ISOLADOS SOBRE PARÂMETROS
HISTOFISIOLÓGICOS, HISTOQUÍMICOS, IMUNOHISTOQUÍMICO, NUTRICIONAIS E
EMBRIOLÓGICOS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

CAROLINA ARRUDA GUEDES

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

José Vargas de Oliveira – UFRPE

EFEITOS DE ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTOS ISOLADOS SOBRE PARÂMETROS
HISTOFISIOLÓGICOS, HISTOQUÍMICOS, IMUNOHISTOQUÍMICO, NUTRICIONAIS E
EMBRIOLÓGICOS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

CAROLINA ARRUDA GUEDES

Orientador: _____
Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Examinadores: _____
Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

José Vargas de Oliveira – UFRPE

Glaucilane dos Santos Cruz – PNPD/CAPES

Franklin Magliano Cunha – FAFIRE

A minha mãe,
Maria José Arruda Guedes,
A minha irmã,
Leila Fernanda Arruda Guedes
Ao meu esposo,
Fernando Antônio Rodrigues,
Por todo amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Meu Deus e meu Tudo, por toda força que me proporcionou para a conclusão dessa pesquisa.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola pela oportunidade de realização deste curso.

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

Ao Centro de Apoio a Pesquisa (Cenapesq) por permitir a utilização de equipamentos para a pesquisa.

À minha orientadora, Prof^a. Valéria Wanderley Teixeira, pela imensa contribuição na minha formação acadêmica, e por todo apoio, dedicação e paciência.

Ao meu Co-orientador, Prof. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, por toda contribuição e paciência.

Aos pesquisadores Luiz Carlos Alves e Fábio André Brayner, por toda colaboração no desenvolvimento dessa pesquisa, e pelo uso da infra-estrutura do Laboratório de Inmunopatologia Keiso Asami - LIKA.

Aos técnicos, Jana Sandes e Rafael Padilha e doutorando Olávio do LIKA pela inestimável ajuda no processamento de material e captação de imagens.

Ao Prof. Franklin Magliano da Cunha, por toda ajuda no desenvolvimento dessa pesquisa.

À Prof^a. Alicely Araújo Correia, pela ajuda e disponibilidade na identificação das imagens de cortes semifinos.

Ao Prof. José Vargas de Oliveira, pelo exemplo de dedicação e incentivo.

À Prof^a. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro, pela contribuição na identificação do óleo essencial de *Piper marginatum*.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, pelos ensinamentos transmitidos.

À técnica Maria Edna Gomes Barros, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, pela ajuda na captação de imagens fluorescentes para apoptose.

À Dra. Glaucilane dos Santos Cruz, pelos longos anos de amizade, e por toda contribuição na elaboração da tese.

À Doutoranda Kamilla de Andrade Dutra pela amizade, e pelas longas horas de convívio no laboratório, além da colaboração nas extrações e identificações do óleo essencial.

À Doutoranda Caroline Guimarães D'assunção, pela ajuda nos procedimentos de apoptose.

Ao Doutorando, Clóvis José Cavalcanti Lapa Neto, pela ajuda nos abstracts, bem como na tradução do primeiro artigo.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de insetos, Aline Cristina, Andrezo Adenilton, Cristiane Thalita, Glaucilane Cruz, Hilton Nobre e Kamilla Dutra, por toda ajuda e boa convivência.

À minha mãe, Maria José Arruda Guedes, por todo amor. Agradeço por me apoiar em todos os momentos da minha vida

À minha irmã, Leila Fernanda Arruda Guedes, por todo amor e incentivo na minha vida acadêmica.

Ao meu esposo, Fernando Antônio Rodrigues, por todo amor e companheirismo.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	11
2 EFEITOS DO TRANS-ANETHOLE E LIMONENO SOBRE A HISTOFISIOLOGIA, HISTOQUÍMICA E APOPTOSE CELULAR NO INTESTINO MÉDIO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS.....	25
DISCUSSÃO.....	27
AGRADECIMENTOS.....	31
LITERATURA CITADA.....	32
3 EFEITOS DOS COMPOSTOS GERANIOL E CITRONELAL SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E REPRODUTIVOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	44
RESUMO	45

	ABSTRACT	46
	INTRODUÇÃO	47
	MATERIAL E MÉTODOS	48
	RESULTADOS	51
	DISCUSSÃO.....	51
	AGRADECIMENTOS.....	55
	LITERATURA CITADA.....	56
4	AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE <i>Piper marginatum</i> JACQ. (PIPERACEAE) E DO GERANIOL SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM COMPARAÇÃO A PRODUTOS FORMULADOS	65
	RESUMO	66
	ABSTRACT	67
	INTRODUÇÃO	68
	MATERIAL E MÉTODOS	70
	RESULTADOS	74
	DISCUSSÃO.....	78
	AGRADECIMENTOS.....	81
	LITERATURA CITADA.....	82
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O crescente aumento populacional nas últimas décadas gerou uma demanda na produção agrícola, e para atender a essa demanda o Brasil investe em inovações e tecnologias, que vão desde a preparação do solo até a colheita, como o desenvolvimento de biotecnologia, monitoramento das lavouras, bem como proteção de sementes e cultivos contra pragas, plantas daninhas e doenças (MAPA 2016). Dentre as principais culturas produzidas no Brasil o milho, *Zea mays* L. se consolida como uma das mais expressivas, representando cerca de 82 milhões de toneladas de grãos produzidos em uma área de aproximadamente 15 mil hectares em 2016/2017. Desse total, cerca de 77% da área plantada e 92% da produção concentram-se nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, e a região Nordeste representa 7% da produção nacional (CONAB 2016).

A cultura do milho representa relevância mundial, podendo ser encontrada nas mais variadas condições de clima e manejo. A safra mundial de milho 2016/2017 foi estimada em 1.011,07 bilhão de toneladas, representando 4,36% de aumento com relação à safra anterior. Os principais produtores mundiais são os Estados Unidos, China e Brasil, os quais representam 65,2% da produção (USDA 2016).

Todavia, diversos entraves afetam a produção do milho como o ataque de pragas, com destaque para a lagarta do cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Esta praga apresenta ampla distribuição geográfica (Schmidt 2002, Duarte *et al.* 2006), ocasionando danos em todos os estágios fenológicos da cultura, durante todo o ano, inclusive no período “safrinha”, que também oferece boas condições para seu desenvolvimento (Lima *et al.* 2006, Castro *et al.* 2006).

Além do milho a lagarta alimenta-se de diferentes hospedeiros, como sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.). Ataca e causa danos também a culturas como alfafa (*Medicago sativa* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), batata doce (*Ipomoea batatas* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), espinafre (*Spinacea oleracea* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), couve (*Brassica oleracea* L.), abóbora (*Cucurbita pepo* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), entre outras (Cruz 1995).

Todos os instares larvais da praga ocasionam perdas que podem ser superiores a 30% (Oliveira *et al.* 2007, Dequech *et al.* 2007). Nos estágios iniciais as lagartas “raspam” os tecidos verdes; enquanto que nos estágios finais ocasionam injúrias maiores acarretando furos nas folhas, destruindo-as completamente. Podem também dirigir-se até a região da espiga, atacando o pedúnculo e impedindo a formação de grãos (Cruz 1995, Nakano *et al.* 2002).

As lagartas recém-eclodidas apresentam coloração esbranquiçada, cabeça mais larga que o corpo, apresentam mais cerdas que as lagartas mais velhas, medem cerca de 1,9 mm de comprimento e a cápsula cefálica cerca de 0,3 mm de largura. Já as lagartas de último ínstar apresentam coloração marrom-acinzentada no dorso, esverdeada na parte ventral e subventral, que também apresentam manchas de coloração marrom-avermelhada. O corpo mede cerca de 50 mm de comprimento e a largura da cápsula cefálica varia de 2,7 a 2,78 mm (Cruz 1995).

Ao fim do período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas. No início do período pupal a coloração varia de verde-clara com o tegumento transparente. Nesta fase o corpo é frágil e sensível a injúrias, depois de alguns minutos a pupa torna-se alaranjada e depois marrom-avermelhada; e quando próximo à emergência, torna-se escura, quase preta. O comprimento é de cerca de 13 a 16 mm e largura de 4,5 mm de diâmetro (Cruz 1995).

O adulto é uma mariposa de 35 mm de envergadura e o comprimento do corpo de 15 mm, com coloração cinza. Os machos apresentam nas asas anteriores manchas mais claras, enquanto nas fêmeas são mais escuras, sendo desprovidas de manchas. As asas posteriores de ambos os sexos são mais claras e circundadas por linhas marrons (Cruz 1995).

Os ovos apresentam formato esférico, coloração que varia do cinza-azulado a esverdeado nos ovos recém-colocados ao castanho-avermelhado a cor verde no final do desenvolvimento embrionário (Cônsoi *et al.* 1999). Quando próximo à eclosão das lagartas, tornam-se escuros pelo fato de poder ser visualizado através do córion a cabeça negra da lagarta. São dispostos em camadas sobrepostas, na parte superior das folhas, nas porções inferior e mediana da planta (Beserra *et al.* 2002). A massa de ovos é coberta por uma camada fina de escamas, colocada pela fêmea por ocasião da postura (Cônsoi *et al.* 1999).

Estudando aspectos biológicos de lagartas alimentadas em folhas de milho e em dieta artificial Giolo *et al.* (2002) demonstraram que o desenvolvimento embrionário foi de dois e três dias, o desenvolvimento larval durou de 14,10 e 16,45 dias, a fase pupal foi de 10,65 e 12,72 dias, e ciclo total de 31,94 e 31,56 dias, respectivamente, a uma temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 15\%$ e fotofase de 14h. Contudo, Busato *et al.* (2004) verificaram parâmetros biológicos a uma temperatura de 28°C , umidade relativa de $70 \pm 15\%$ e fotofase de 14h, em dieta artificial. As lagartas obtiveram uma maior eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido e custo metabólico, e conseqüentemente consumiram uma menor quantidade de alimento, e apresentaram redução da duração da fase larval.

O controle de *S. frugiperda* não se tem sido uma tarefa fácil. Normalmente, são realizadas de 10 a 14 aplicações de agrotóxicos na cultura do milho no Brasil, cuja escolha nem sempre leva em consideração o grau de seletividade aos agentes de controle biológico (Valicente & Tuelher 2009, Toscano *et al.* 2012). Os inseticidas com frequência tem apresentado falhas de controle,

isso se deve ao aumento de insetos resistentes no campo, em consequência da pulverização de inseticidas com mesmo mecanismo de ação. Os problemas com esse inseto-praga foram agravados na medida em que houve evolução da resistência aos inseticidas. Com a intensificação da agricultura, os cultivos sucessivos possibilitam a sobrevivência de elevadas populações de *S. frugiperda* e o fluxo contínuo de mariposas entre culturas hospedeiras, que ocasionam grandes infestações da praga, independentemente da fase de desenvolvimento das plantas e época de cultivo (Omoto *et al.* 2013).

Essas questões tem contribuído para aumentar os problemas econômicos e ecológicos, despertando o interesse de pesquisadores e empresas em lançar no mercado produtos com menor impacto ambiental, os quais incluem os produtos naturais, com destaque para os de origem vegetal (Vendramim & Castiglioni 2000). Os estudos sobre as propriedades inseticidas de espécies vegetais tem crescido bastante nos últimos anos, tornando-se uma forma promissora na descoberta de novas espécies como agentes de controle de pragas, devido a menor persistência no ambiente, e nos alimentos, menor toxicidade a mamíferos e maior seletividade aos inimigos naturais (Corrêa & Salgado 2011).

Das plantas que apresentam defesas químicas contra herbívoros podem ser extraídos óleos essenciais, os quais vem sendo bastante utilizados no controle de diversas pragas (Koul *et al.* 2008). Estes são obtidos do metabolismo secundário das plantas (Rai & Carpinella 2006), e são armazenados em células secretoras e em sistemas de condução das plantas presentes em diferentes órgãos, como flores, folhas, caules, raízes, rizomas, frutos e sementes, podendo ser extraídos por vários métodos, como hidrodestilação e destilação por arraste de vapor (Regnault-Roger *et al.* 2012).

Vários compostos voláteis constituem quimicamente os óleos essenciais, os quais podem ser apresentados em maiores ou menores quantidades (Jemâa *et al.* 2012). Em algumas plantas,

um determinado componente pode predominar, a exemplo do manjeriço, *Ocimum basilicum* L., que apresenta cerca de 75% de metil chavicol. No entanto, há espécies que podem conter um grande número de compostos. Na maioria das vezes, os compostos majoritários são responsáveis pela variabilidade das atividades biológicas dos óleos extraídos de diferentes espécies de plantas (Shasany *et al.* 2000, Ngmano *et al.* 2007, Ilboudo *et al.* 2010), e suas concentrações podem ser determinantes para a toxicidade. Para os óleos de eucalipto, *Eucalyptus citriodora* Hook e citronela-de-java, *Cymbopogon nardus* L. Gusmão *et al.* (2013), através de análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massa encontram que *E. citriodora* apresenta como constituintes principais o citronelal, citronelol, acetato e 1,8-cineol; eucalipto, *Eucalyptus staigeriana* F. é constituído principalmente por limoneno, geranial e neral; citronela, *Cymbopogon winterianus* Jowitt compõe-se de geraniol e citronelal; e erva-doce, *Foeniculum vulgare* Mill. apresenta como componentes majoritários o limoneno, (E)-anethole e α -pinene. O óleo de *C. winterianus* apresenta como compostos majoritários o citronelal e o citronelol (Labinas & Crocomo 2002). O safrol destaca-se como constituinte majoritário do óleo de pimenta-longa, *Piper hispidinervum* C. DC. (Lima *et al.* 2009). Os óleos que apresentam uma alta porcentagem de um único composto, podem ser usados para a obtenção do composto isolado (Jemâa *et al.* 2012).

Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa de compostos orgânicos, principalmente monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C) e fenilpropanóides (Isman 2000). Os terpenos podem ser formados a partir da via de biossíntese do mevalonato, formados por unidades de isopreno de cinco carbonos (De La Rosa *et al.* 2010). Um exemplo de um terpeno é o citronelal, encontrado em citronela, *C. nardus* (Zaridah *et al.* 2003). Os fenilpropanóides são formados por um esqueleto carbônico com um anel aromático ligado a uma cadeia de três carbonos (Croteau *et al.* 2000). Estes originam-se a partir da via do ácido chiquímico. Como exemplo pertencente a essa classe tem-se o eugenol, obtido de botões florais do cravo-da-índia,

Syzygium aromaticum (L.) o trans-anetol, presente no óleo de *F. vulgare* e o metil-eugenol, presente no óleo de melaleuca, *Melaleuca bracteata* F. Muell (Cruz *et al.* 2016).

Os óleos essenciais de plantas apresentam diversas atividades contra insetos praga. Podem atuar como inseticidas e inibidores de crescimento, como o eugenol, timol e citronelal que foram tóxicos para a lagarta-do-cartucho Asiática *Spodoptera litura* Fabricius (Hummelbunner & Isman 2001). Como inibidores de crescimento Govindaraddi (2005) e Walia (2005) verificaram que folhas de açafão ricas em felandreno inibiram o crescimento de *Spodoptera obliqua* (Walker) e *Plutella xylostella* (L.). Os monoterpenos são muito utilizados como fumigantes de insetos de grãos armazenados. Os compostos timol, 1,8-cineol, carvacrol, terpineol e linalol, além do trans-anetole, um fenilpropanoide foram avaliados como fumigantes para *Tribolium castaneum* (H.) (Koul *et al.* 2007).

São comumente encontrados trabalhos que demonstram a atividade inseticida e repelência de óleos essenciais e constituintes químicos sobre lepidópteros, como os desenvolvidos por Niculau *et al.* (2013), que verificaram os efeitos dos óleos de pelargônio, *Pelargonium graveolens* L'Herit e erva-cidreira, *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown e dos seus compostos terpênicos majoritários sobre *S. frugiperda* por meio de aplicação tópica, os quais apresentaram atividade inseticida para lagartas de terceiro ínstar, bem como os compostos geraniol, linalol, carvona e citral presentes como componentes majoritários dos óleos em questão. Também foram encontrados trabalhos que incorporam o óleo essencial na dieta artificial de lagartas como é o caso do trabalho elaborado por Menezes (2015), que verificou a toxicidade do óleo de alfavaquinha, *Ocimum selloi* Benth e do constituinte químico estragol sobre *S. frugiperda*, causando mortalidade de 73,2% das lagartas. Porém, trabalhos que abordem efeitos de óleos essenciais e compostos isolados sobre aspectos fisiológicos do intestino médio não são comuns, bem como

não é comumente realizados trabalhos que verifiquem efeitos fisiológicos, quando a aplicação se dá por ingestão.

Em *S. frugiperda* alguns óleos já foram testados como *C. winterianus*, erva-carpinteira, *Achillea millefolium* L. e tomilho, *Thymus vulgaris* L., demonstrando ação inseticida e repelente, atratividade ou deterrência alimentar (Castro *et al.* 2006). O óleo de *P. hispidinervum* causou redução alimentar e mortalidade (Lima *et al.* 2009). Estudando o mesmo óleo além do cravo-da-índia, *Syzygium aromaticum* Thunb Cruz *et al.* (2014) verificaram que os mesmos afetaram a espermatogênese e histoquímica dos ovariolos, porém os efeitos do primeiro óleo foram mais expressivos.

Cruz *et al.* (2016), estudando os óleos de *F.vulgare*, *Ocimum gratissimum* L. e *Eucaliptus staigeriana* F. Muell. verificaram que os óleos de *F.vulgare* e *E. staigeriana* nas DL₂₀ e DL₄₀ interferiram na biologia de *S. frugiperda*. Contudo, o óleo de *O. gratissimum* apresentou um melhor resultado por alterar diversos parâmetros biológicos e reprodutivos, em todas as DL's. Sendo assim, esses óleos apresentaram resultados promissores no controle de *S. frugiperda*. Os mesmos autores também identificaram os componentes majoritários dos respectivos óleos. O óleo de *F. vulgare* apresentou como constituintes o limoneno (41,82%), (E)-anethole (17,91%) e α -pinene (11,13%). O óleo de *O. gratissimum* apresentou como principais constituintes o (E)-anethole (34,95%), limoneno (15,63%) e eugenol (9,07%). Por fim, o óleo de *E. staigeriana* apresentou como constituintes abundantes o limoneno (23,73%), geranial (15,20%) e o neral (12,16%).

Com o propósito de avaliar os efeitos sobre a fisiologia dos insetos, pesquisas relacionadas com o sistema digestório torna-se uma importante ferramenta nas pesquisas que visam controlar o ataque de pragas, pois possibilita uma grande interface entre o meio interno e o ambiente (Levy *et al.* 2004, Chapman 2013). Considerado uma barreira física e química eficaz contra agentes

patogênicos, potencialmente invasivos que são ingeridos na alimentação (Gallo *et al.* 2002, Levy *et al.* 2004, Gullan & Cranston 2008), o trato digestivo é constituído por um tubo simples dividido em três regiões distintas, intestino anterior, intestino médio e intestino posterior, sendo a região do intestino médio a que ocorre a absorção dos nutrientes e a síntese e secreção de enzimas e hormônios (Gallo *et al.* 2002, Gullan & Cranston 2008).

O lúmen do intestino contém uma matriz peritrófica, a qual funciona como um mecanismo de defesa com função de proteção contra danos mecânicos, exercendo uma barreira contra toxinas e substâncias prejudiciais ao inseto. As células que constituem o intestino são do tipo colunares e células regenerativas, as quais são agrupadas em ninhos na base do epitélio. Além destas, outras células encontradas no intestino são as caliciformes, responsáveis pelo transporte ativo de íons potássio da hemolinfa para o lúmen ventricular em larvas de Lepidoptera (Lehane 1997).

Eventos fisiológicos como crescimento e desenvolvimento de insetos, podem ser alterados caso o canal alimentar seja atingido na região do intestino médio, como observado por Correia *et al.* (2009), onde verificaram alterações morfológicas no intestino médio de *S. frugiperda* quando tratadas com o inseticida botânico nim. Com relação à utilização de óleo essencial de citronela, Silva (2014) verificou o efeito subletal de *C. winterianus* sobre o canal alimentar de *S. frugiperda*, o qual apresentou alterações no epitélio, com presença de protusões citoplasmáticas, extrusões de células colunares, núcleos picnóticos e aumento de grânulos PAS positivos.

A absorção pelo intestino médio pode ser comprometida afetando a assimilação dos principais constituintes nutricionais como proteínas, lipídeos e carboidratos, os quais são obtidos na fase imatura da maioria dos insetos, e posteriormente serão necessitados na fase reprodutiva (Jevis & Ferns 2004, Milano *et al.* 2010). As proteínas apresentam funções estruturais, enzimáticas, no transporte e armazenamento de moléculas e como receptores. Os lipídeos são importantes fontes energéticas para os insetos, participando de funções estruturais e metabólicas,

os quais podem ser armazenados no corpo gorduroso na forma de triglicerídeos. Os carboidratos são importantes fontes energéticas, podendo ser convertidos em lipídios e participar da síntese de aminoácidos (Chapman 2013). O glicogênio é um outro carboidrato armazenado no corpo gorduroso, podendo também ser encontrado nos músculos, intestino e outros tecidos (Oliveira & Cruz-Ladim 2003, Gillott 2005).

Estudos realizados por Sharma *et al.* (2011) demonstraram que inseticidas botânicos podem causar alterações nos teores dos lipídios, proteínas e carboidratos. Com relação à utilização de óleos essenciais sobre parâmetros bioquímicos Silva *et al.* (2016) verificaram que o óleo de citronela em dose subletal afeta o perfil bioquímico de lagartas de *S. frugiperda*, revelando redução de proteínas, lipídeos e açúcares totais, e aumento de glicogênio.

Uma outra fase de desenvolvimento dos insetos que podem ser tomadas ações de controle é a fase embrionária (Monnerat *et al.* 2002). Os ovos são constituídos pelo córion, o qual é uma estrutura complexa formada por duas camadas, o exocóron, mais externa, coberta por uma camada mucosa e descontínua, e o endocóron, mais interna, fina e que contém carboidratos (Cônsoi *et al.* 1999, Chapman 2013). De acordo com estudos a blastoderme é formada no período de ativação da célula-ovo e que dará origem as outras células da larva em formação. O vitelo ocupa grande parte do ovo, fornecendo nutrição para o embrião em desenvolvimento (Tojo & Machida 1998). Existem relatos de que inseticidas químicos, bem como botânicos afetam o desenvolvimento embrionário dos insetos. Correia *et al.* (2013), estudando o efeito de um inseticida regulador de crescimento (lufenuron) e um botânico (azadiractina) verificaram que os mesmos interferiram na formação e desenvolvimento embrionário de *S. frugiperda*, tornando o ovo inviável.

Trabalhos no sentido de verificar os efeitos de inseticidas sintéticos, óleos essenciais e seus constituintes químicos sobre ovos, são restritos apenas a observar a eclosão das lagartas,

porém estudos mais aprofundados dessa fase embrionária podem ser desenvolvidos através da microscopia eletrônica, visto ser um instrumento importante na observação de microestruturas.

Outros efeitos fisiológicos causados pelos inseticidas pode-se incluir a apoptose (Turrens 2003). A apoptose pode ser definida como sendo a morte celular programada, onde células desnecessárias, danificadas ou potencialmente perigosas são eliminadas durante o desenvolvimento e homeostase tecidual ou sob alguma condição atípica do organismo, como doenças (Ashe & Berry 2003). Os fatores que desencadeiam a apoptose são inúmeros como, danos no DNA, radiação ionizante, choque térmico, baixa quantidade de nutrientes, entre outros. No processo de apoptose a célula encolhe-se, o núcleo se dispersa, a cromatina é condensada, subseqüentemente a célula é fragmentada em estruturas membranosas compactas chamadas de corpos apoptóticos, e então são fagocitadas por macrófagos e removidas do tecido sem causar reação inflamatória (Ashe & Berry 2003).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (extracelular) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A primeira é desencadeada por ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana. A segunda via é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Três moléculas estão envolvidas nas vias de ativação da apoptose, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas (Grivicich *et al.* 2007).

Um outro tipo de morte celular é a necrose, que diferentemente da apoptose é a morte patológica ou acidental da célula, isto é, quando a célula é impedida de manter suas funções vitais devido a fatores externos como produtos tóxicos, radiação e temperatura. Nesse processo o núcleo não sofre alterações significativas, mas a célula incha e as organelas, em especial as mitocôndrias são danificadas (Turrens 2003).

Alguns trabalhos utilizando inseticidas sintéticos demonstraram que células do intestino médio de *Drosophila melanogaster* Meigen e *Apis mellifera* L. entraram no processo de apoptose (Grupta *et al.* 2010, Gregore & Ellis 2011). Contudo, se torna relevante estudos com óleos essenciais e seus constituintes a nível celular para elucidar os efeitos causados por esses compostos.

Diante disso, o presente estudo teve por objetivo verificar o efeito dos constituintes químicos limoneno e trans-anethole por diferentes vias de aplicação, ingestão e contato tópico sobre a histofisiologia, histoquímica e imunohistoquímica (apoptose) no intestino médio; o efeito de geraniol e citronelal sobre parâmetros nutricionais e reprodutivos; bem como o efeito de óleo de *P. marginatum* e do composto geraniol sobre o desenvolvimento embrionário de *S. frugiperda*.

Literatura Citada

- Ashe, P.C. & M.D. Berry. 2003.** Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 199-214.
- Beserra, E.B., C.T.S. Dias & J.R.P. Parra. 2002.** Distribution and natural parasitism of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs at different phenological stages of corn. *Fl. Neotrop. Entomol.* 85: 588-593.
- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia, F.P. Giolo & F.A. Martins. 2004.** Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. *Neotrop. Entomol* 31: 525-529.
- Castro, D.P., M.G. Cardoso, J.C. Moraes, N.M. Santos & D.P Baliza. 2006.** Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. *Rev. Bras. Plantas Med.* 8: 27–32.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Conab (Companhia Nacional de Abastecimento). 2016.** Acompanhamento da safra brasileira: grãos. 140p.
- Cônsoli, F.L., E.W. Kitajima & J.R.P. Parra. 1999.** Ultrastructure of the natural and factitious host eggs of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28: 211-229.

- Corrêa, J.C.R. & H.R.N. Salgado. 2011.** Atividade inseticida de plantas e aplicações: revisão. Rev. Bras. Pl. Med. 13: 500-506.
- Correia, A.A., W. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2009.** Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. Neotrop. Entomol. 38: 83-91.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, G.G.A. Gonçalves, M.G.S. Cavalcanti, F.A. Brayner & L.C. Alves. 2013.** Microscopic analysis *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) embryonic development before and after treatment with azadirachtin, lufenuron, and deltamethrin. J. Econ. Entomol. 106: 747-755.
- Croteau, R., T.M., Kutchan & N.G. Lewis. 2000.** Natural products (secondary metabolites), p. 1250-1318. In B. Buchanam, W. Gruissem & R. Jones (eds.), Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, 1367p.
- Cruz, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45p. (Circular Técnica 21).
- Cruz, G.S., V.W. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, M.O. Breda, T.J. Souza, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, K.A. Dutra & D.M.F.A. Navarro. 2014.** Bioactivity of *Piper hispidinervum* (Piperales: Piperaceae) and *Syzygium aromaticum* (Myrtales: Myrtaceae) oils, with or without formulated Bta on the biology and Immunology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 107:144-153.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.S.C. Lopes, D.R.S. Barbosa, M.O. Breda, K.A. Dutra, C.A. Guedes, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Sublethal effects of essential oils from *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 109: 660-666.
- Dequech, S.T.B., L.M. Fiuza, R.F.P. Silva & R.C. Zumba. 2007.** Histopatologia de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) infectadas por *Bacillus thuringiensis aizawai* e com ovos de *Campoletis flavicincta* (Hym., Ichneumonidae). Cienc. Rural 37: 273-276.
- De La Rosa, L.A., E. Alvarez-Parrilla & G.A. Gonzalez-Aguilar. 2010.** Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability. Iowa, Estados Unidos, Wiley-Blackwell, 382p.
- Duarte, J.O., J.C. Cruz, J.C. Garcia & M.J. Cardoso. 2006.** Embrapa Sistemas de Produção. Disponível em: www.embrapa.br. Acesso em: 23/03/2016
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, S., R.P.L. Carvalho, G.C. Batista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ/USP, 920p.

- Gillott, C. 2005.** Entomology. Dordrecht, Springer, 834p.
- Giolo, F.P., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia & G.R. Busato. 2002.** Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. Rev. Bras. Agrociênc. 8: 219-224.
- Govindaraddi, k. 2005.** Antifeedant. Propities of essential oils of turmeria (*Curcuma longa* L.) against diamond back moth *Plutella xylostella* (L.). Dissertação de Mestrado, CCS Haryana Agricultural University, Hisar, 82p.
- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2008.** Os insetos: um resumo de Entomologia. São Paulo, Roca, 440p.
- Gusmão, N.M.S., J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, K.A. Dutra, W.A. Silva & M.J.A. Wanderley. 2013.** Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus staigeriana* F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare* Mill. essential oils in the management of *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). J. Stored Prod. Res. 54: 41-47.
- Gregorc, A. & J.D. Ellis. 2011.** Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. Pestic. Biochem. Physiol. 99: 200-207.
- Grivicich, I., A. Regner & A.B. Rocha. 2007.** Morte celular por apoptose. Rev. Bras. Cancerol. 53: 335-343.
- Grupta, S.C., M. Mishra, A. Sharma, T.G. Deepak Balgi, R. Kumar, R.K. Mishra & D.K. Chowdhuri. 2010.** Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. Exotoxicol. Environ. 73: 1415-1423.
- Hummelbrunner, L.A. & M. B. Isman. 2001.** Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). J Agr Food Chem. 49: 715-720.
- Ilboudo, Z., L.C.B. Dabiré, R.C.H. Nébié, I.O. Dicko, S. Dugravot, A.M. Corteserom & A. Sanon. 2010.** Biological activity and persistence of four essential oils towards the main pest of stored cowpeas, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). J. Stored Prod. Res. 46: 124-128.
- Isman, M. B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protec. 19: 603-608.
- Jemâa, J.M.B., S. Haquel, M. Bouaziz & M.L. Khouja. 2012.** Seasonal variations in chemical composition and fumigant activity of five Eucalyptus essential oils against three moth pests of stored dates in Tunisia. J. Stored Prod. Res. 48: 61-67.

- Jervis, M.A. & P.N. Ferns. 2004.** The timing of egg maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and of resource allocation. *Oikos* 107: 449-460.
- Koul, O., G. Singh, R. Singh & J. Singh, 2007.** Mortality and reproductive performance of *Tribolium castaneum* exposed to anethole vapours at high temperature. *Biopestic. Int.* 3: 126-137.
- Koul, O., S. Walia & G.S. Dhaliwal. 2008.** Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic. Int.* 4: 63-84.
- Labinas, M.A. & W.B. Crocomo. 2002.** Effect of java grass (*Cymbopogon winteranus*) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1979) (Lepidoptera, Noctuidae). *Acta Scient.* 24: 1401-1405.
- Lehane, M.J. 1997.** Peritrophic matrix structure and function. *Ann. Rev. Entomol.* 42: 525-550.
- Levy, S.M., A.M.F. Falleiros, E.A. Gregório, N.R. Arrebola & L.A. Toledo. 2004.** The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz. J. Biol.* 64:633-638.
- Lima, F.W.N., O.S. Ohashi, F.R.S. Souza & F.S. Gomes. 2006.** Avaliação de acessos de milho para resistência a *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. *Acta Amaz.* 36: 147-150.
- Lima, R.K. M.G. Cardoso, J.C. Moraes, B.A. Melo, V.G. Rodrigues & P.L. Guimarães. 2009.** Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amaz.* 39: 377-382.
- MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária). 2016.** Disponível em: www.agricultura.gov.br/
Acesso em: 11/01/2017.
- Menezes, C.W.G. 2015.** Análise química por CG-EM e toxicidade do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. e estragol para *Spodoptera frugiperda* e *Zabrotes ubfasciatus*. Tese de Doutorado, UFLA, Lavras-MG, 95p.
- Milano, P., E. Berti-Filho, J.R.P. Parra, M.L. Oda, & F.L CÔnsoli. 2010.** Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade de espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae. *Neotrop. Entomol.* 39: 172-180.
- Monnerat, A.T., M.P. Machado, B.S. Vale, M.J. Soares, J.B. Lima, H.L. Leni & D. Valle. 2002.** *Anopheles albitarsis* embryogenesis: morphological identification of major events. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 589-596.
- Nakano, O., N.S. Silveira, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Entomol. Agric.* 10: 920-925.

- Ngamo, T.S.L., A. Goudoum, M.B. Ngassoum, P.M. Mapongmestsem, G. Lognay, F. Malaisse & T. Hance. 2007.** Chronic toxicity of essential oils of 3 local aromatic plants towards *Sitophilus zeamais* Motsch.(Coleoptera:Curculionidae). Afr. J. Agric. Res. 2:164-167.
- Niculau, E.S., P.B. Alves, P.C.L. Nogueira & V.R.S. Moraes. 2013.** Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit e *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Quim. Nova 36: 1391-1394.
- Oliveira, V.T.P. & C. Cruz-Landim. 2003.** Morphology and function of insect fat body cells: a review. Biociência 11: 195-205.
- Oliveira, M.S.S., A.R. Roel, E.J. Arruda & A.S. Marques. 2007.** Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith,1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Ciênc. Agrotec. 31: 326-331.
- Omoto, C., O. Bernardi, S. Eloisa & J.R. Farias. 2013.** Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas e plantas Bt. IRAC, ESALQ/SP.
- Rai, M. & M.C. Carpinella. 2006.** Naturally occurring bioactive compounds. United Kingdom, Oxford Elsevier, 514p.
- Reganult-Roger, C., C.Vincent & J.T. Arnason. 2012.** Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. Annu. Rev. Entomol. 57: 405-424.
- Schmidt, F.B. 2002.** Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron na cultura do milho. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP, São Paulo, 63p.
- Sharma, P., L. Mohan, K.K. Dua & C.N. Srivastava. 2011.** Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. Asian Pac. J. Trop. Med. 4:301-304.
- Shasany, A.K., R.K. Lal, N.K. Patra, M.P. Darokar, A. Garg, S. Kumar & S.P.S. Khanuj. 2000.** Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. Genet. Resour. Crop. Evol. 47: 553-559.
- Silva, C.T.S. 2014.** Efeito do óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus* JOWITT) sobre a histofisiologia digestiva e reprodutiva de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação de Mestrado, UFRPE, Recife, 83p.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. Acta Histochem. 118: 347-352.

- Tojo, K. & R. Machida. 1998.** Early embryonic development of the mayfly *Ephemera pajonica* McLachlan (Insecta: Ephemeroptera, Ephemeridae). *J. Morph.* 238: 327-335.
- Toscano, L.C., G.C. Calado Filho, A.M. Cardoso, W.I. Maruyama & G.V. Tomquelski. 2012.** Impacto de inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho safrinha cultivado em Cassilândia e Chapadão do Sul, MS. *Arq. Inst. Biol.* 79: 223-231.
- Turrens, J.F. 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 55: 335–344.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2016.** Disponível em: <https://www.usda.gov/> Acesso em: 11/01/2017.
- Valicente, F.H. & E.S. Tuelher. 2009.** Controle biológico da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda*, com baculovírus. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 14p. (Circular Técnica 114).
- Vendramim, J.D. & E. Castiglioni. 2000.** Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas. p. 113-128 In J.C. Guedes, I. Drester Da Costa & E. Castiglioni. Bases e Técnicas do Manejo de insetos. Santa Maria, UFSM/CCR/DFS, 248p.
- Walia, S. 2005.** Allelochemicals as Biopesticide. p. 19-32. In O. Koul, G.S. Dhaliwal, A. Shankar, D. Raj & V.K. Koul (eds.), Souvenir Conference on Biopesticides: Emerging Trends, Society of Biopesticide Sciences, India, Jalandhar.
- Zaridah, M.Z., M.A. Azah, A. Abu Sad & Z.P. Mohd Faridz. 2003.** Larvicidal prepeties of citronellal and *Cymbopogon nardus* essential oils from two different localities. *Trop. Biomed.* 20: 169-174.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DO TRANS-ANETHOLE E LIMONENO SOBRE A HISTOFISIOLOGIA,
HISTOQUÍMICA E APOPTOSE NO INTESTINO MÉDIO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E.
SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)¹

CAROLINA A. GUEDES¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA², ÁLVARO A.C. TEIXEIRA²

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.

Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco,

Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

¹Guedes, C.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira & F.M. Cunha.. Efeitos do trans-anethole e do limoneno associados ou não sobre a histofisiologia, histoquímica e apoptose celular no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Submetido a Journal of Insect Physiology.

RESUMO - A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é praga chave da cultura do milho e seu controle é realizado pelo uso contínuo de inseticidas, entretanto, vem crescendo o estudo por métodos alternativos de menor impacto ambiental, dos quais se destacam a utilização de óleos essenciais, oriundos do metabolismo secundário das plantas e têm ação inseticida comprovada em diversos insetos praga. Assim, objetivou-se analisar os efeitos dos compostos químicos limoneno e trans-anethole, isolados ou associados, por diferentes vias de aplicação, a fim de verificar efeitos histológicos, histoquímicos, e de apoptose no intestino médio de lagartas de *S. frugiperda*. Para o trans-anethole utilizou-se DL₅₀ de 0,027 (0,021 - 0,032) mg/g, para o limoneno DL₅₀ de 32,24 (27,73 - 36,55) mg/g, e para o trans-anethole + limoneno foi utilizada a proporção 1:1. No controle utilizou-se acetona pura. Para as vias tópica e ingestão (dieta artificial) aplicou-se 1,0 µL dos respectivos compostos. Os resultados demonstraram que as alterações ocasionadas no intestino médio de lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda* pelos compostos químicos interferiram na histologia do tecido epitelial, nos teores de polissacarídeos neutros e proteínas após 48 e 96h, bem como nos diferentes modos de aplicação. Porém, não se observou apoptose. Contudo, o composto que apresentou maior eficiência foi o trans-anethole isolado ou associado quando aplicado por ingestão. Esses resultados indicam que esse composto poderá influenciar em parâmetros indispensáveis a sobrevivência desta praga, o que pode ser importante no que se refere ao controle de suas populações.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta-do-cartucho, imunohistoquímica, inseticidas botânicos, nutrição, histoquímica

EFFECTS OF TRANS-ANETHOLE AND LIMONENE ON HISTOPHYSIOLOGY,
HISTOCHEMICAL AND APOPTOSIS CELL IN MIDGUT *Spodoptera frugiperda* (J.E.
SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT – The armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is a key pest of corn crops and its control is often achieved by continuous insecticide use, thus, the study for alternative methods with less environmental impact has grown, among which are the use of essential oils. These oils origin from plants secondary metabolism and their insecticidal activity has been widely demonstrated in many insect pests. The objective was to analyze the effects of chemical compounds limonene and trans-anethole, independent and associated, in different application ways, to determine histological effects, histochemical, and apoptosis in midgut of larvae of *S. frugiperda*. For the trans-anethole was used LD₅₀ of 0,027 (0,021-0,032) mg/g and for limonene LD₅₀ of 32,24 (27,73 - 36,55) mg/g, and for trans-anethole + limonene the ratio of 1: 1 was used. The results showed that caterpillars treated topically or by ingestion showed more significant changes with structural disorganization and elongation of the midgut columnar cells in 48 hours range with the compounds in isolation. Whereas after 96 hours there was an epithelial regeneration. At 48h after ingestion limonene reduces the content of neutral polysaccharides and proteins, and topical application reduction was caused by trans-anethole. There was no cell apoptosis. This way, the three tested oils showed promising results in the control of *S. frugiperda*.

KEY WORDS: armyworm, botanical insecticides, chemical compounds

Introdução

Dentre as formas de utilização de plantas inseticidas, os óleos essenciais vêm ganhando destaque e podem ser considerados como uma tática importante no controle de grandes pragas, por possuírem atividade inseticida de diversas maneiras, a saber: deterrência, repelência, mortalidade, inibição do crescimento e deformações em diferentes estágios de desenvolvimento dos insetos, entre outros. Além de apresentarem baixa toxicidade a mamíferos e baixa persistência no ambiente (Isman 2006).

Os óleos essenciais contêm diversos constituintes, que podem ser encontrados em maior ou menor quantidade, os quais são identificados através de análises cromatográficas acopladas a espectrometria de massas. Cruz *et al.* (2016), com o objetivo de avaliar a composição química e atividade inseticida de óleos de *F. vulgare*, *O. gratissimum* e *E. staigeriana*, verificaram que todos apresentaram uma atividade inseticida para *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e obtiveram como constituintes em comum o limoneno, o metil chavicol e o trans-anethole, sendo este último o constituinte que obteve maior atividade, alcançando uma Dose Letal de 50% na concentração de 0,027 mg/g de inseto. Com base nesses resultados, Cruz *et al.* (2017) estudaram, via aplicação tópica, os efeitos do limoneno e trans-anethole sobre parâmetros bioquímicos, aspectos reprodutivos, bem como apoptose testicular, aos quais demonstraram alterações em todos os parâmetros estudados.

São comumente encontrados trabalhos que demonstram a atividade inseticida e repelência de óleos essenciais e constituintes químicos sobre lepidópteros, como os desenvolvidos por Niculau *et al.* (2013), que verificaram os efeitos dos óleos de *Pelargonium graveolens* L'Herit e *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown e dos seus compostos terpênicos majoritários sobre *S. frugiperda* por meio de aplicação tópica, os quais apresentaram atividade inseticida para lagartas de terceiro ínstar, bem como os compostos geraniol, linalol, carvona e citral como componentes majoritários dos óleos em

questão. Também são encontrados trabalhos que incorporam o óleo essencial na dieta artificial de lagartas como é o caso do trabalho elaborado por Menezes (2015) que verificou a toxicidade do óleo de *Ocimum selloi* Benth e do constituinte químico estragol sobre *S. frugiperda*, causando mortalidade de 72,3% das lagartas.

Dentre os diversos efeitos fisiológicos causados pelos inseticidas pode-se incluir a apoptose (Turrens 2003). Alguns trabalhos utilizando inseticidas sintéticos demonstraram que células do intestino médio de *Drosophila melanogaster* Meigen e *Apis mellifera* L. entraram no processo de apoptose (Grupta *et al.* 2010, Gregore & Ellis 2011). Contudo, se torna relevante estudos com óleos essenciais e seus constituintes a nível celular para verificar se tal efeito também é observado quando se utiliza esses compostos.

Nesse contexto, são necessários trabalhos que abordem a interferência de compostos isolados ou associados sobre a histofisiologia, histoquímica e apoptose no intestino médio de *S. frugiperda*, uma vez que o canal alimentar representa uma área de contato entre os insetos e o ambiente, e alterações que ocorrem nesta região podem ser capazes de afetar o crescimento e desenvolvimento dos insetos (Levy *et al.* 2004, Chapman 2013). Também são necessários a realização de trabalhos que enfoquem os efeitos fisiológicos causados pelos óleos essenciais e compostos quando aplicados via ingestão e por contato tópico com o intuito de melhor avaliar a sua eficiência. Assim, o presente trabalho objetivou investigar os efeitos dos compostos químicos limoneno e trans-anethole, isolados e associados, em diferentes vias de aplicação, a fim de verificar efeitos histológicos, histoquímicos, e de apoptose no canal alimentar (intestino médio) de *S. frugiperda*.

Material e Métodos

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Entomologia Agrícola do Departamento de Agronomia, Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, bem como no Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção e Criação dos Insetos. Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* obtidas da criação estoque do Laboratório de Entomologia Agrícola do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), mantidas à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h, e alimentadas com dieta artificial de Greene modificada, recomendada para a espécie (Busato *et al.* 2006).

Obtenção dos Constituintes Químicos. Os compostos limoneno (183164) e trans-anethole (1178870) foram obtidos da Sigma-Aldrich® com pureza de 99%.

Bioensaio por Contato Tópico. O bioensaio foi realizado com lagartas de terceiro ínstar (10 dias de idade), com peso médio de 78 mg. Os tratamentos consistiram na diluição dos compostos em acetona nas DL₅₀ previamente estimadas por Cruz *et al.* (2016). Para o composto trans-anethole utilizou-se a DL₅₀ de 0,027 (0,021 – 0,032) mg/g, para o limoneno utilizou-se a DL₅₀ de 32,24 (27,73 – 36,55) mg/g, para trans-anethole + limoneno foi utilizado a proporção 1:1 (32,28 mg) e para o controle acetona pura. Na região protorácica foi aplicado 1,0 µL dos respectivos compostos, com o auxílio de uma seringa Hamilton™ 50 µL. As lagartas foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato e vedados com plástico filme. Para alimentação utilizou-se dieta artificial de Greene modificada, recomendada para a espécie (Busato *et al.* 2006). Para cada composto foram utilizadas cinco repetições com 10 lagartas por repetição, totalizando 50 lagartas por tratamento. O experimento foi realizado à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h. Após 48 e 96 h realizou-se a extração do canal alimentar das lagartas sobreviventes.

Bioensaio por Ingestão. O bioensaio prosseguiu-se utilizando as mesmas doses/concentrações do bioensaio anterior, as quais foram estimadas previamente por Cruz *et al.* (2016). Consistiu na aplicação de 1,0 µL dos respectivos compostos, com o auxílio de uma seringa Hamilton™ 50 µL em fragmentos de 1cm³ de dieta artificial. Lagartas de terceiro ínstar (10 dias) foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato e vedados com plástico filme, e para a alimentação foi utilizada a dieta artificial tratada. Foram utilizadas 5 repetições com 10 lagartas cada, totalizando 50 lagartas por tratamento. Após 48 e 96 h realizou-se a extração do canal alimentar das lagartas sobreviventes.

Análise Histológica e Histoquímica do Intestino Médio. As lagartas submetidas aos tratamentos com as DL₅₀ dos compostos trans-anethole, limoneno e trans-anethole + limoneno, nas duas vias de aplicação (tópica e ingestão) foram utilizadas no intervalo de 48 e 96h após os tratamentos para as análises histológicas e histoquímica do intestino médio. As lagartas foram imobilizadas à temperatura de 4°C, dissecadas sob estereomicroscópio para retirada do canal alimentar de 10 intestinos. Estes foram fixados em formol 10% por 24h, e conservados em álcool 70%. Os intestinos médio foram clivados e desidratados em banhos crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%), por 15 minutos cada, embebidos em álcool+historesina (1:1) por 24h e posteriormente incluído em historesina Leica©. Secções de cortes de 3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo Leica© 2035. Os cortes foram submetidos às técnicas de coloração pela hematoxilina – eosina (H-E) para análise morfológica do tecido. Com relação às análises histoquímicas foram utilizados o ácido periódico de Schiff (P.A.S.) para detecção de polissacarídeos neutros (Junqueira & Junqueira 1983) e Xylidine Ponceau para detecção de proteínas totais (Pearse 1960). As análises histológicas e histoquímicas foram realizadas utilizando-se microscópio de luz da marca OLYMPUS BX-49, e fotografado em fotomicroscópio Leica© DM 500 e OLYMPUS BX-51. As imagens foram capturadas e digitalizadas pelo software LAS Leica Image.

Quantificação Média de Polissacarídeos Neutros e Proteínas Totais. Foram utilizadas quatro secções da região mediana do intestino médio de lagartas para cada tratamento, através do programa editor de imagens GIMP 2.8 (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms). O programa converte imagens digitais para uma escala de cinza, o que permite a mensuração dos valores de pixels referentes à marcação selecionada no tecido (Solomon 2009). Para cada tratamento utilizou-se 3 lâminas de indivíduos diferentes, sendo mensurados 4 campos de cada lâmina, totalizando 12 campos por grupo.

Análises Estatísticas. A análise estatística foi realizada pelo programa SAS. Os resultados dos teores de proteína e glicogênio e as médias foram submetidas ao teste de normalidade e homogeneidade. Para comparar os tratamentos como os modos de aplicação foi utilizado fatorial e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (SAS Institute 2001).

Apoptose por Imunofluorescência do Intestino Médio de *Spodoptera frugiperda*. Lagartas de terceiro ínstar submetidas, por contato tópico e ingestão, nos intervalos de 48 e 96h, a DL₅₀ de trans-anethole, limoneno e trans-anethole + limoneno foram imobilizadas à temperatura de 4°C, dissecadas sob estereomicroscópio para extração do intestino médio. Utilizou-se o método TUNEL como indicador de apoptose, usando-se kit comercial (ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit – S7165 – Millipore Corporation). Os intestinos coletados foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 h. Após esse período foram desidratados em banhos crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%), por 20 minutos cada, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Em um micrótomo tipo Minot (LEICA RM 2035), secções de cortes de 5 µm de espessura foram colocados em banho-maria e coletados com lâminas silanizadas. Os procedimentos seguiram com os cortes sendo desparafinados, hidratados e incubados em Tampão fosfato-salino – PBS (pH 7,4 e 0,2 M) à temperatura ambiente. Para a recuperação antigênica utilizou-se a Proteinase K (20 mg/mL). Em seguida, os cortes foram lavados em PBS (pH 7,4 e 0,2 M) e receberam o tampão de

equilíbrio para posterior incubação com a enzima TdT a 37 °C por 1 h em câmara úmida. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com a anti-digoxigenina conjugada à Rodamina por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente, foram enxaguadas em PBS (pH 7,4 e 0,2 M) e montadas utilizando o meio de montagem antifading associado ao corante azul fluorescente diamidino-2-fenilindole (DAPI), para marcação dos núcleos das células. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência com varredura a laser (Modelo LSM 700 Carl Zeiss), com câmera acoplada e Software Zen integrado. As fotografias foram tiradas com a resolução de 1.048 x 1.048, com o filtro de 415 (azul) nm e de 735 (vermelho) nm.

Resultados

Análise Histológica do Intestino Médio. O intestino médio de lagartas de terceiro ínstar do tratamento controle de *S. frugiperda* apresentou histologia típica, sendo revestido externamente por duas camadas musculares: uma camada mais externa, formada por feixes espaçados, dispostos longitudinalmente, e uma camada mais interna, disposta circularmente. Internamente, o intestino médio foi constituído por tecido epitelial simples, apresentando três tipos celulares, a saber: células colunares, caliciformes e regenerativas. As células colunares encontraram-se em abundância apresentando núcleo na porção mediana, bem como microvilos à luz do órgão. As células caliciformes encontraram-se entre as células colunares, estas possuem cavidade globosa, com núcleo basal e achatado. As células regenerativas foram observadas em menor número, as quais encontraram-se na região basal do epitélio, com núcleo esférico e central. A matriz peritrófica foi encontrada revestindo internamente o órgão, envolvendo o material digerido, o qual encontra-se disposto no lúmen do órgão (Figs. 1A-B, 2A-B).

Análise Histológica do Intestino Médio por Contato Tópico. As lagartas de *S. frugiperda* tratadas topicamente com os compostos limoneno, trans-anethole e limoneno + trans-anethole

apresentaram alterações histológicas que variaram de intensidade de acordo com o tempo de exposição. Após 48 h foi observado que o tratamento com os compostos promoveram desorganização estrutural no epitélio com alongamento das células colunares e deslocamento do núcleo para a região apical (Fig. 1C e 1E). Essas alterações foram de menor intensidade no epitélio das lagartas submetidas ao limoneno + trans-anethole, entretanto foi verificado nesse epitélio liberação de fragmentos celulares para o lúmen e células calciformes bem desenvolvidas (Fig. 1G). No intervalo de 96 h as alterações no intestino médio foram menos expressivas para os tratamentos com os compostos isolados, sendo observada uma regeneração ou reorganização do epitélio (Fig. 1D e 1F). Porém com a associação dos compostos as alterações no epitélio foram mantidas mesmo após 96h (Fig. 1H).

Análise Histológica do Intestino Médio por Ingestão. No tratamento por ingestão, no intervalo de 48 h foi observado que apenas os compostos isolados promoveram desorganização estrutural semelhante à observada nesse mesmo intervalo para o tratamento tópico (Fig. 2C, 2E e 2G). No entanto, com 96 h observou-se alterações em todos os tratamentos com os compostos, sendo evidenciada uma degeneração das células colunares e maior desenvolvimento das células calciformes, porém não foi verificada a presença da matriz peritrófica no tratamento com a associação (Fig. 2D, 2F e 2H).

Análise Histoquímica Para Polissacarídeo Neutro no Intestino Médio por Contato Tópico e Ingestão. As análises estatísticas realizadas para avaliar os efeitos dos compostos isolados ou associados sobre a histoquímica de *S. frugiperda* demonstraram que 48 h após aplicação tópica o trans-anethole e limoneno + trans-anethole ocasionaram redução no teor de polissacarídeos neutros e após 96 h somente o trans-anethole. No tratamento por ingestão os compostos isolados ou não reduziram o teor de polissacarídeos neutros após os dois tempos de avaliação, porém após 96 h a associação foi quem ocasionou a maior redução. Comparando-se as vias de administração

dos compostos verificou-se que com 48 h o limoneno ocasionou a menor redução por ingestão e o trans-anethole por via tópica. Porém, com 96 h somente a associação ocasionou redução no teor de polissacarídeo neutros por ingestão (Tabela 1).

Análise Histoquímica Para Proteínas no Intestino Médio por Contato Tópico e Ingestão.

Analisando-se o teor de proteínas após 48 h por contato tópico verificou-se que não houve redução significativa. Entretanto, no tratamento por ingestão o limoneno e a associação promoveu redução. Após 96 h verificou-se que houve redução significativa ocasionada pelo trans-anethole no contato tópico, enquanto para ingestão todos os tratamentos com os compostos reduziram, sendo maior na associação. Comparando-se as vias de tratamentos com os compostos observou-se no contato tópico após 48 h que o trans-anethole causou maior redução, já por ingestão foi a associação dos compostos. Porém com 96 h o contato tópico não promoveu redução e por ingestão a associação promoveu redução (Tabela 2).

Apoptose por Imunofluorescência no Intestino Médio de *Spodoptera frugiperda*. Todos os grupos apresentaram seus núcleos emitindo fluorescência azul, o que caracteriza-os como não apoptóticos, na qual emitem fluorescência vermelha (Figs. 3, 4, 5 e 6).

Discussão

A morfologia da região do intestino médio de *S. frugiperda* seguiu os padrões para a espécie de acordo com os relatos de Correia *et al.* (2009) e Silva (2014), bem como mostraram aspectos semelhantes com outras espécies de lepidópteros, como em *S. exigua* (Rost-Roszkoska *et al.* 2008) e *Anticarsia gemmatalis* (Levy *et al.* 2004). A literatura aponta quatro tipos básicos celulares para lepidópteros, são eles: colunares, regenerativas, caliciformes e endócrinas (Cavalcante & Cruz-Landim 1999, Pinheiro *et al.* 2003). Com exceção das células endócrinas, por

não serem facilmente identificadas por microscopia de luz (Sousa *et al.* 2009, Scudeler & Santos 2014), todas as outras foram encontradas no intestino médio de lagartas de *S. frugiperda*.

Na presente pesquisa verificou-se que a associação dos compostos foi mais expressiva quando aplicados por via ingestão, revelando que os compostos associados são mais eficientes em promover um desequilíbrio no tecido epitelial do intestino médio, o que provavelmente interferirá na absorção de nutrientes e conseqüentemente refletir no crescimento e desenvolvimento desse inseto. Foi possível observar também que a aplicação por ingestão promoveu um maior dano no epitélio quando comparado com a via tópica. Efeitos similares foram obtidos com outros produtos derivados de plantas como em *Azadirachta indica* (Correia *et al.* 2009) e com o óleo de *C. winterianus* administrados via ingestão (Silva *et al.* 2016).

Sharma *et al.* (2011) afirmaram que os inseticidas botânicos possuem um perfil químico que pode ocasionar alterações nutricionais através de mudança nos teores de lipídios, proteínas e carboidratos. Ainda com relação à utilização de óleos essenciais sobre parâmetros bioquímicos, Silva *et al.* (2016) verificaram que o óleo de citronela em dose subletal afetam o perfil bioquímico de lagartas de *S. frugiperda*, revelando redução de proteínas, lipídeos, açúcares totais e aumento de glicogênio. Os autores sugerem que essa alteração foi promovida pelo composto citronelal, principal constituinte deste óleo.

Dentre os constituintes nutricionais, os polissacarídeos são macromoléculas complexas de carboidratos formados por milhares de monossacarídeos unidos entre si por ligações glicosídicas. Os carboidratos são requeridos em diversos processos metabólicos; funcionam como principal fonte energética; são responsáveis por inúmeras funções metabólicas e estruturais; atuam na formação da quitina através de longas cadeias de N- acetilglucosamina; podem ser convertidos em lipídeos, além de participarem da síntese de aminoácidos (Arrese *et al.* 2010, Chapman 2013). Segundo Parra (1999), o aumento no teor de carboidratos propicia um alongamento na

longevidade dos insetos, e conseqüentemente sua diminuição, reduz a sobrevivência desses organismos.

Assim, como os polissacarídeos, as proteínas são de fundamental importância para a sobrevivência dos insetos, por participarem de processos estruturais, enzimáticos e no transporte de moléculas. E alterações nos níveis proteicos ocasionam efeitos deletérios no metabolismo, afetam diretamente a vitelogênese, já que proteínas como vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica, catepsina B e lipoforina são produzidas e secretadas pelo corpo gorduroso e incorporadas aos ovócitos em desenvolvimento, e sua redução acarreta efeitos negativos na reprodução (Panizzi & Parra 2009, Guizzo *et al.* 2012, Rosas-Mejía *et al.* 2015). De acordo com Senthilkumar *et al.* (2009), a redução de proteínas deve-se provavelmente a interferência ocasionada por compostos presentes nos inseticidas botânicos que atuam nos hormônios que regulam a síntese proteica.

As alterações ocasionadas no intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* pelos compostos químicos interferiram nos teores de polissacarídeos neutros e proteínas nos diferentes períodos de tempo estudados, bem como nos diferentes modos de aplicação. O trans-anethole, quando utilizado de forma isolada ou associada, apresentou maior eficiência na redução do teor de polissacarídeos neutros e proteínas no intestino médio de lagartas de *S. frugiperda*. Esses resultados corroboram com os encontrados por Souza *et al.* (2015), os quais observaram que óleos essenciais e compostos voláteis em lagartas de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth), via ingestão promoveram alterações bioquímicas, devido à redução nutricional. Os autores afirmaram ainda que dentre os compostos voláteis o trans-anethole foi mais eficiente.

Outros fatores que podem interferir no quantitativo dos constituintes nutricionais são o modo de aplicação e o tempo de avaliação. Segundo Estrela *et al.* (2006) a eficiência de um composto depende do método de exposição a qual o inseto é submetido. Lima *et al.* (2009)

também estudaram o modo de aplicação e tempo de avaliação em *S. frugiperda* com o óleo essencial de *P. hispidinervum* em lagartas de 1º e 3º ínstars. Os resultados demonstraram que houve diferença na toxicidade quando submetidas à ingestão e tópico, o mesmo ocorreu para os diferentes tempos estudados (24, 48 e 96 h). Esses resultados corroboram com os encontrados na presente pesquisa, por haver diferença nos modos de aplicação e tempo de avaliação, sendo a aplicação por ingestão a mais efetiva e o tempo de 96 h o mais eficiente, para o inseto-praga em questão.

Uma provável hipótese para o limoneno ter apresentado melhor resultado quanto à redução no teor de polissacarídeos neutros e proteínas por via de ingestão após 48 h de avaliação, deve-se provavelmente ao fato deste monoterpene possuir atividade como inibidor ou retardador de crescimento e supressor do apetite, podendo levar os insetos à morte por inanição ou toxicidade direta, assim, a redução na atividade alimentar acarreta a redução desses constituintes nutricionais. Além disso, os monoterpenos penetram com extrema facilidade nos tecidos e células, possuindo uma poderosa ação solvente de lipídeos, esta facilidade deve-se ao tamanho reduzido dessas moléculas. Esses lipídeos são em grande parte armazenados no corpo gorduroso, onde também encontra-se armazenado os carboidratos, podendo também ser afetado (Viegas Júnior 2003). Já o trans-anethole demonstrou mais eficiência via contato tópico. Esta facilidade de penetração e ação via cuticular do inseto deve-se a propriedade lipofílica do composto possuindo afinidade com a cutícula do inseto. Esta propriedade lipofílica faz com que o trans-anethole sofra partição da fase aquosa para dentro da membrana celular conduzindo à expansão da membrana, aumentando a fluidez e a permeabilidade da célula, permitindo a liberação dos componentes intracelulares vitais a sobrevivência dos organismos (Romero *et al.* 2012).

Pesquisas relacionadas com o processo apoptótico em geral são realizadas verificando o efeito de inseticidas químicos sintéticos, sendo escassos trabalhos nesse contexto que utilizam

compostos extraídos de plantas. Os constituintes químicos dos óleos essenciais não induziram apoptose celular no intestino de lagartas de *S. frugiperda*, sugerindo, portanto que a degeneração epitelial deu-se por um processo necrótico. De acordo com Grivicich *et al.* (2007) a necrose é um processo descontrolado e passivo que normalmente afeta grandes áreas de células, enquanto que apoptose é um processo controlado e dependente de energia e podem afetar grupos de células. As lesões celulares necróticas podem ser mediadas por dois mecanismos, interferência com o fornecimento de energia das células e danos diretos a membranas celulares. Entretanto, estudos realizados por Qi *et al.* (2011) demonstraram morte celular com lise da membrana plasmática e vacuolização do citoplasma no epitélio intestinal de *Mythimna separata* Walker quando tratados com um componente inseticida extraído de *Celastrus angulatus* Maxim.

Os resultados obtidos na presente pesquisa demonstraram que todos os compostos químicos estudados interferiram no intestino médio de *S. frugiperda*, assim como alteraram o perfil bioquímico, influenciando em parâmetros indispensáveis a sobrevivência desta praga, o que pode ser importante no que se refere ao controle de suas populações, contudo o que apresentou maior eficiência foi o trans-anethole de forma isolada ou associada quando aplicado por ingestão. Portanto, os óleos essenciais que possuem em sua constituição química os compostos limoneno e trans-anethole são eficazes no controle de *S. frugiperda*.

Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa. Ao DMFA-UFRPE (Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal) pela realização dos bioensaios. Ao CENAPESQ (Centro de Pesquisa da UFRPE). A Sigma-Aldrich® pela obtenção dos constituintes químicos.

Literatura Citada

- Arrese, E.L., A.D. Howard, R.T. Patel, O.J. Rimoldi & J.L. Soulages. 2010.** Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. *Insect Biochem. Mol. Biol* 40: 91-99.
- Busato, G.R., M.S. Garcia, A.E. Loeck, M. Zart, A.M. Nunes, O. Bernardi & F.S. Andersson. 2006.** Adequação de uma dieta artificial para os biótipos “milho” e “arroz” de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bragantia*, 65: 317-323.
- Cavalcante, V.M. & C. Cruz-Landim. 1999.** Types of cells presente in the midgut of the insects: a review. *Naturalia* 24: 19-40.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2009.** Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. *Neotrop. Entomol.* 38: 83-91.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.S.C. Lopes, D.R.S. Barbosa, M.O. Breda, K.A. Dutra, C.A. Guedes, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Sublethal effects of essential oils from *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 109: 660-666.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D’assunção, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa & M.O. Breda. 2017.** Effect of trans-anethole, limonene and your combination in nutritional componentes and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Biol. Interact.* 263: 74-80.
- Estrela, J.L.V., M. Fazolin, C. Valdomiro, M.R. Alécio & M.S. Lima. 2006.** Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. *Pesq. Agropec. Bras.* 41: 217-222.
- Gregorc A. & J. Ellis. 2011.** Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pest. Biochem. Physiol.* 99: 200-207.
- Grivicich, I., A. Regner & A.B. Rocha. 2007.** Apoptosis: Programmed Cell Death. *Rev. Bras. Cancerol* 53: 335-343.
- Grupta, S.C., M. Mishra, A. Sharma, T.G. Deepak Balgi, R. Kumar, R.K. Mishra & D.K. Chowdhuri. 2010.** Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicol. Environ.* 73: 1415-1423.

- Guizzo, M.G., L. Abreu, A. Masuda, C. Logullo & I.S.V. Junior. 2012.** Metabolism of Biomolecules in the Embryogenesis of the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Acta Sci Vet.* 40: 1010-1022.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira, 1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Guanabara Koogan, 123p.
- Levy, S.M., A.M.F. Falleiros, E.A. Gregório, N.R. Arrebola & L.A. Toledo. 2004.** The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz. J. Biol.* 64: 633-638.
- Lima, R.K., M.G. Cardoso, J.C. Moraes, B.A. Melo, V.G. Rodrigues & P.L. Guimarães. 2009.** Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amaz.* 39: 377-382.
- Menezes, C.W.G. 2015.** Análise química por CG-EM e toxicidade do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. e estragol para *Spodoptera frugiperda* e *Zabrotes subfasciatus*. Tese de Doutorado, UFLA, Lavras-MG, 95p.
- Niculau, E.S., P.B. Alves, P.C.L. Nogueira & V.R.S. Moraes. 2013.** Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit e *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) *Quim. Nova* 36: 1391-1394.
- Panizzi, A.R., J.R.P. Parra, 2009.** Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas. Brasília, Embrapa. 1169p.
- Parra, J.R.P. 1999.** Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba, FEALQ. 137p.
- Pearse, A.G.E. 1960.** Histochemistry: Theoretical and Applied. London, J & A Churchill LTD. 998p.
- Pinheiro, D.O., R.J. Silva, I. Quagio-Grassiotto & E.A. Gregório. 2003.** Morphometric study of the midgut epithelium in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). *Neotrop. Entomol.* 32: 453-459.
- Qi, Z., B. Shi, Z. Hu, Y. Zhang & W. Wu. 2011.** Ultrastructural effects of Celangulin V on midgut cells of the oriental armyworm, *Mythimna separate* walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotox. Environ. Safe* 74: 439-444.
- Romero, A.L., R.B. Romero, E.L. Silva, R.R. Oliveira & J.B. Vida. 2012.** Caracterização e avaliação da atividade antifitopatogênica do trans-anetol obtido de *Illicium verum*. *SBQ* 14: 231.

- Rosas-Mejía, M., A. Correa-Sandoval, C.S. Venegas-Barrera & J.V. Horta-Veja. 2015.** Preferências entre cinco carboidratos em *Pheidole bilimeki* (Hymenoptera: Formicidae). Acta Zool. Mex 31: 291-297.
- Rost-Roskoska, M., I. Poprawa, J. Klag, P. Migula, J. Mesjasz-Prybyłowicz & W. Prybyłowicz. 2008.** Degeneration of the midgut epithelium in *Epilachna cf. nylanderi* (Insecta, Coccinellidae): apoptosis, autophagy and necrosis. Can. J. Zool. 86: 1179-1188.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Scudeler E.L. & D.C. Santos. 2014.** Side effects of nem oil on the midgut endocrine cells of the green lacewing *Ceraeochrysa claveri* (Navás) (Neuroptera: Chrysopidae). Neotrop. Entomol. 43: 154-160.
- Senthilkumar, N., P. Varma & G. Gurusubramanian. 2009.** Larvidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the Malarial Vector, *Anopheles stephensi* (Liston) Parasitol. Res. 104: 237-244.
- Silva, C.T.S. 2014.** Efeito do óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus* JOWITT) sobre a histofisiologia digestiva e reprodutiva de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação de Mestrado, UFRPE, Recife, 83p.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1979) treated with citronella oil (*Cymbopogon wintwrianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. Acta Histochem. 118: 347-352.
- Sharma, P., L. Mohan, K.K. Dua & C.N. Srivastava. 2011.** Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. Asian Pac. J. Trop. Med. 4: 301-304.
- Solomon, R.W. 2009.** Free and open source software for manipulation of digital images. AJ. Am. J. Roentgenol 192: 330–334.
- Sousa, M.E.C., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A.A. Siqueira, F.A.B. Santos & L.C. Alves. 2009.** Ultrastructure of the *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. Micron 40: 743–749.
- Souza, R.M., J.S. Rosa, L. Oliveira, A. Cunha & M. Fernandes-Ferreira. 2015.** Activities of Apiaceae essential oils and volatile compounds on hatchability, development, reproduction and nutrition of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). Ind. Crop. Prod. 63: 226–237.
- Turrens, J.F. 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 55: 335–344.

Viegas Júnior, C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova* 26: 390-400.

Tabela 1. Média (\pm D.P.) do número de pixels da análise histoquímica para polissacarídeos neutros marcados com P.A.S. em intestinos médios de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* submetidas a componentes químicos isolados ou associados. Temperatura: $25,2 \pm 1,4$ °C. RH: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12h.

Tempo	Tratamentos	Ingestão	Tópico
48h	Controle	269,9 \pm 2,45 Aa	262,6 \pm 5,39 Aa
	Limoneno	199,2 \pm 14,31 Ab	274,3 \pm 20,29 Ba
	Trans-Anethole	181,9 \pm 14,76 Ab	146,6 \pm 4,09 Bc
	Limoneno + Trans-Anethole	183,9 \pm 12,31 Ab	198,8 \pm 10,25 Ab
96h	Controle	305,2 \pm 28,69 Aa	289,9 \pm 1,35 Aa
	Limoneno	218,4 \pm 13,71 Ab	212,8 \pm 18,05 Aa
	Trans-Anethole	163,5 \pm 12,68 Abc	138,7 \pm 4,94 Ab
	Limoneno + Trans-Anethole	147,1 \pm 13,10 Ac	179,9 \pm 9,15 Bab

¹Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey $p < 0,05$

²Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey $p < 0,05$.

Tabela 2. Média (\pm D.P.) do número de pixels da análise histoquímica para proteínas marcados com Xilidina em intestinos médios de lagartas de terceiro instar de *Spodoptera frugiperda* submetidas a componentes químicos isolados ou associados.

Tempo	Tratamentos	Ingestão	Tópico
48h	Controle	249,4 \pm 4,73 Aa	220,9 \pm 3,52 Ab
	Limoneno	187,6 \pm 16,65 Bb	309,9 \pm 17,55 Aa
	Trans-Anethole	234,1 \pm 10,38 Aa	173,6 \pm 18,33 Bb
	Limoneno + Trans-Anethole	138,7 \pm 9,19 Bc	232,8 \pm 18,08 Ab
96h	Controle	289,5 \pm 2,56 Aa	244,0 \pm 1,40 Aa
	Limoneno	213,9 \pm 16,11 Ab	216,7 \pm 14,17 Aab
	Trans-Anethole	224,8 \pm 13,99 Ab	190,2 \pm 30,20 Ab
	Limoneno + Trans-Anethole	121,4 \pm 12,17 Ac	232,6 \pm 18,08 Bab

¹Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey $p < 0,05$

²Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey $p < 0,05$.

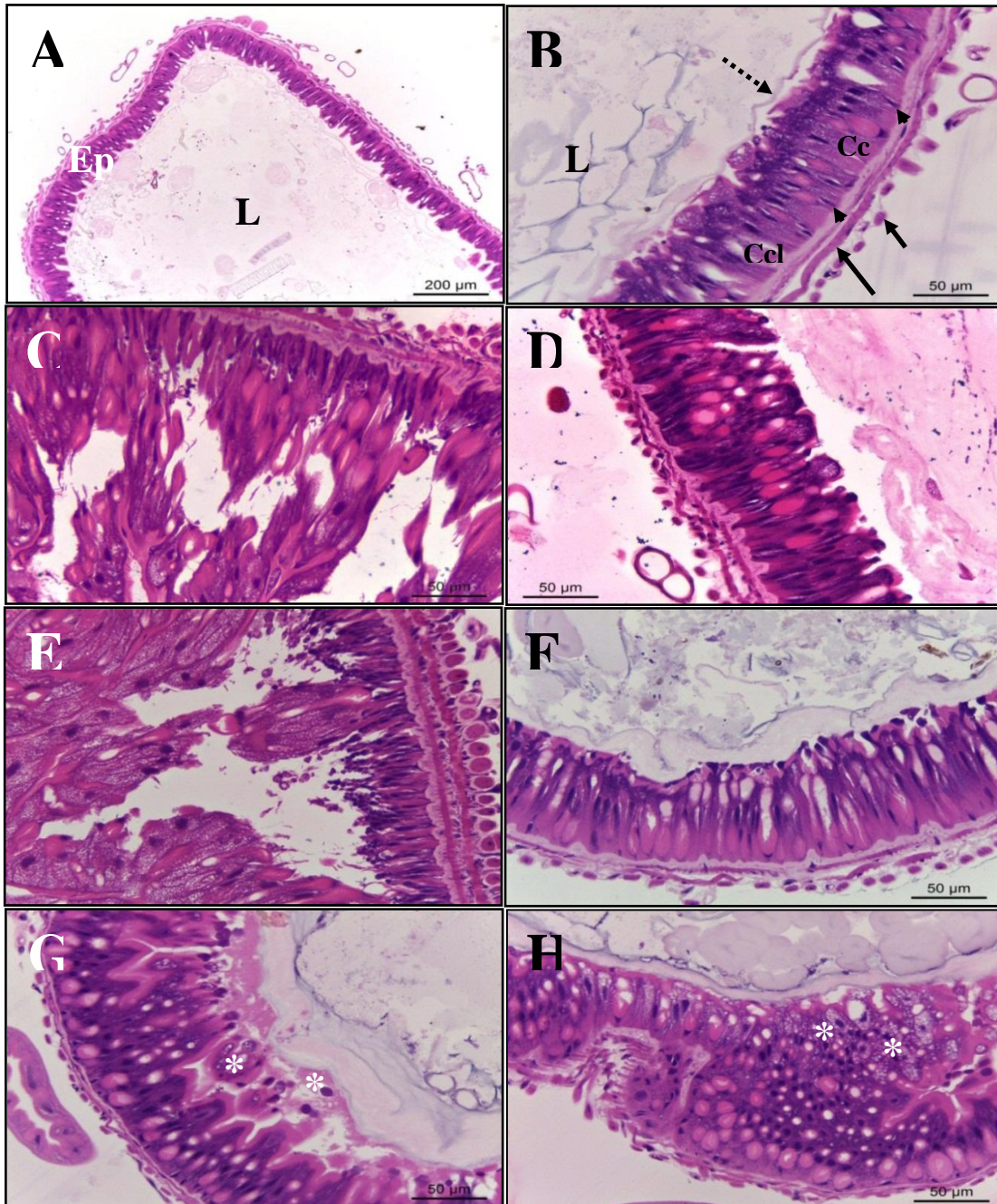


Figura 1. Cortes transversais do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar submetidas à aplicação tópica de Limoneno, Trans-Anethole e Limoneno + Trans-Anethole. A – Controle (aspecto geral); B – Controle (detalhe do epitélio); C – Limoneno 48h; D – Limoneno 96h; E – Trans-Anethole 48h; F - Trans-Anethole 96h; G - Limoneno + Trans-Anethole 48h e H - Limoneno + Trans-Anethole 96h. Ep – Epitélio, L – Lúmen, Seta curta – Músculo longitudinal, Seta longa – Músculo Circular, Seta pontilhada – Matriz peritrófica, Ccl – Células Caliciformes, Cc – Célula colunar, Ponta de seta – Células regenerativas, Asteriscos – Fragmentos celulares.

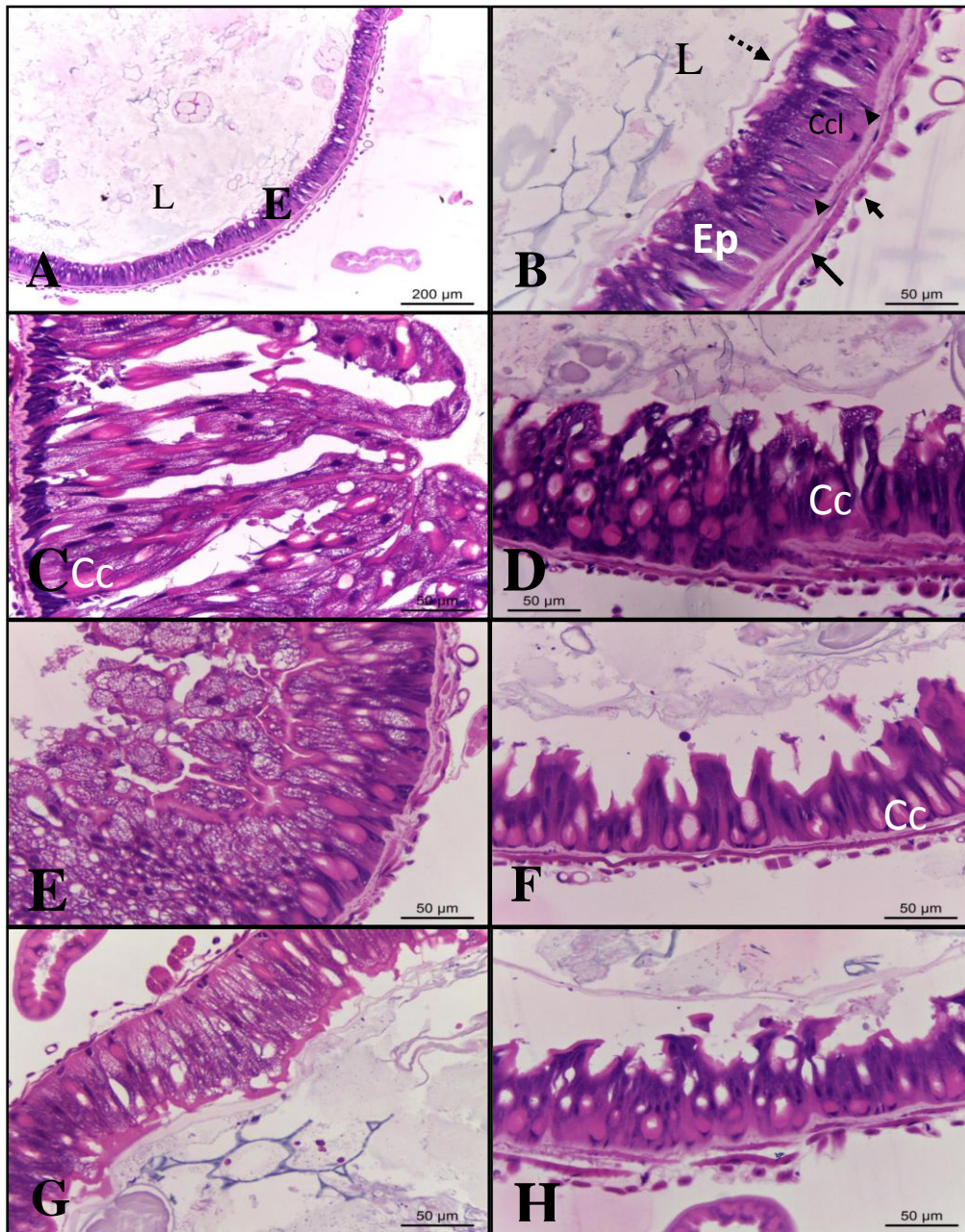


Figura 2. Cortes transversais do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar submetidas a aplicação na dieta de Limoneno, Trans-Anethole e Limoneno + Trans-Anethole. A – Controle (aspecto geral); B – Controle (detalhe do epitélio); C – Limoneno 48h; D – Limoneno 96h; E – Trans-Anethole 48h; F - Trans-Anethole 96h; G - Limoneno + Trans-Anethole 48h e H - Limoneno + Trans-Anethole 96h. Ep – Epitélio, L – Lúmen, Seta curta – Músculo longitudinal, Seta longa – Músculo Circular, Seta pontilhada – Matriz peritrófica, Ccl – Células Caliciformes, Cc – Célula colunar, Ponta de seta – Células regenerativas, Asteriscos – Fragmentos celulares.

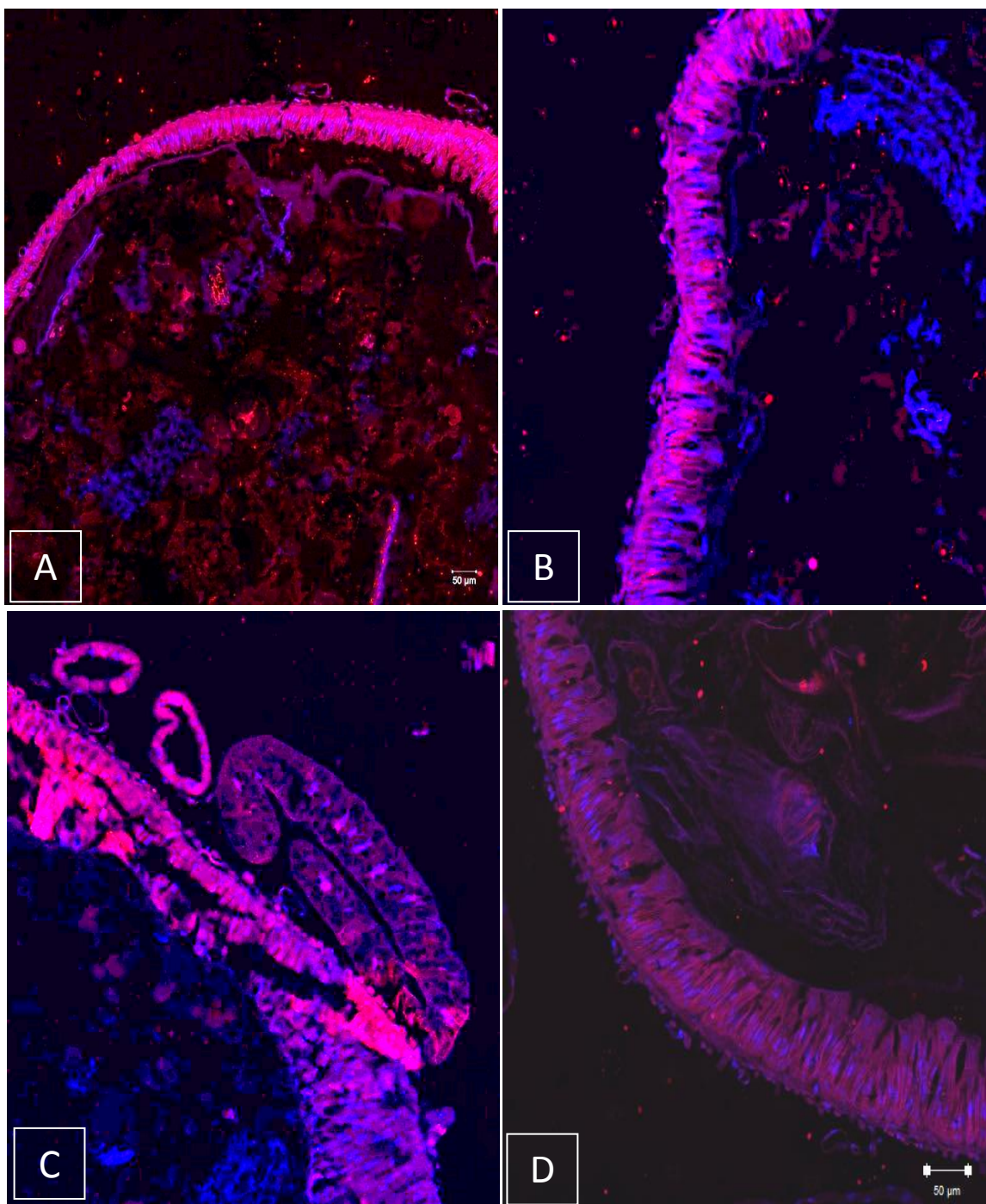


Figura 3. Imunofluorescência para detecção de apoptose no intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar submetidas à aplicação tópica dos compostos. A – Controle; B – Limoneno 48h; C – Trans-Anethole 48h; D - Limoneno + Trans-Anethole 48h. Observar núcleos normais emitindo fluorescência azul em todos os grupos.

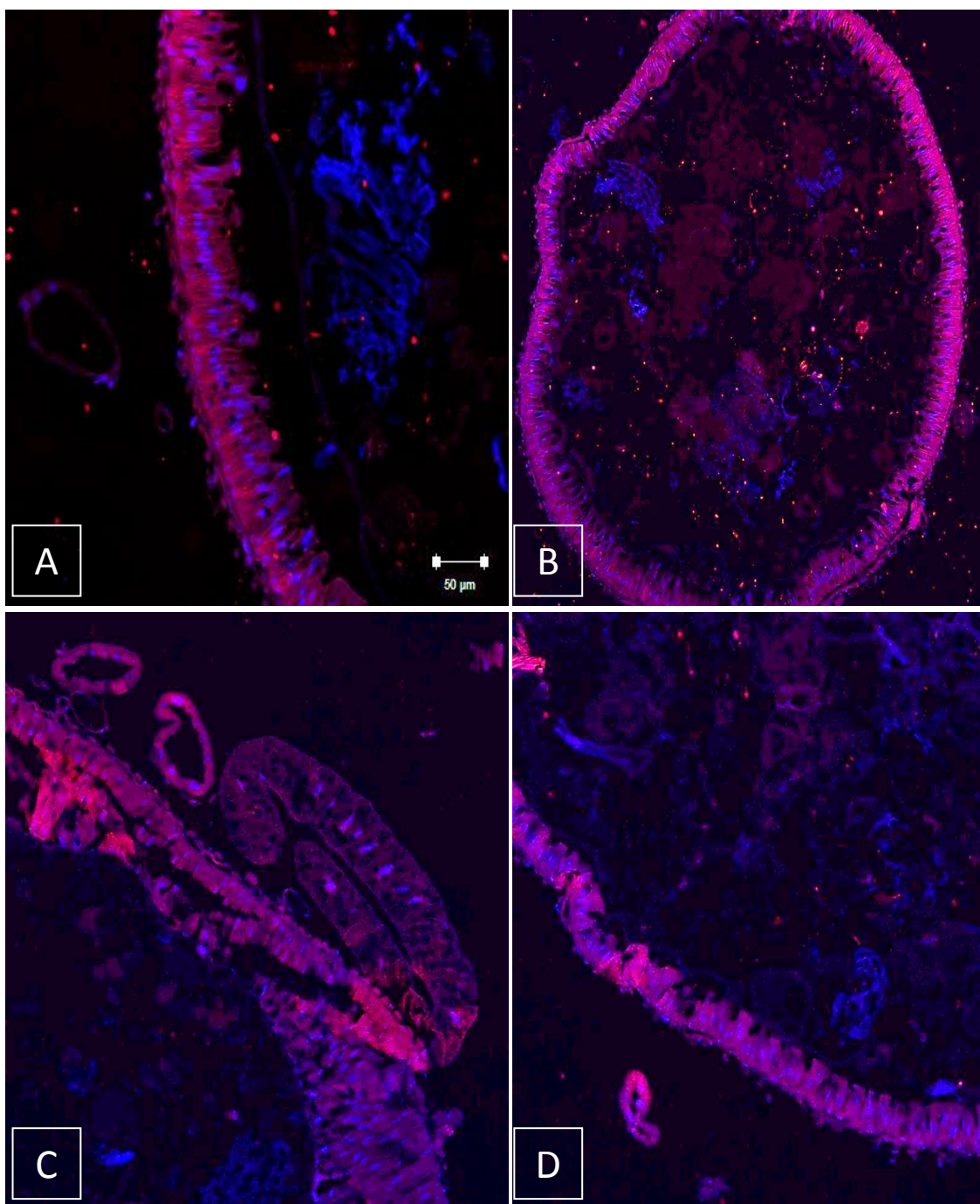


Figura 4. Imunofluorescência para detecção de apoptose no intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar submetidas à aplicação tópica dos compostos. A – Controle; B – Limoneno 96 h; C – Trans-Anethole 96 h; D - Limoneno + Trans-Anethole 96 h. Observar núcleos normais emitindo fluorescência azul em todos os grupos.

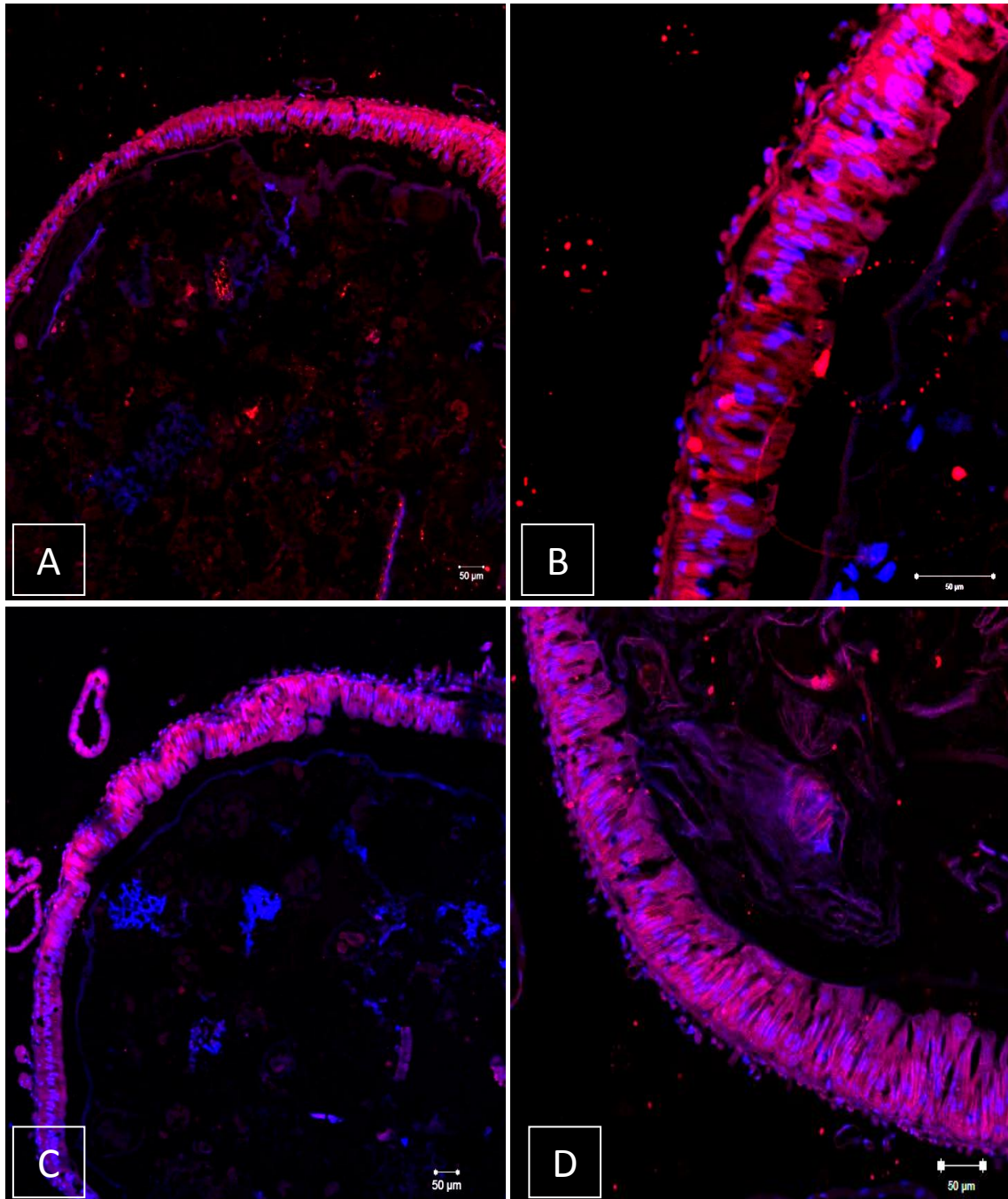


Figura 5. Imunofluorescência para detecção de apoptose no intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar submetidas a ingestão dos compostos. A – Controle; B – Limoneno 48 h; C – Trans-Anethole 48 h; D - Limoneno + Trans-Anethole 48 h. Observar núcleos normais emitindo fluorescência azul em todos os grupos.

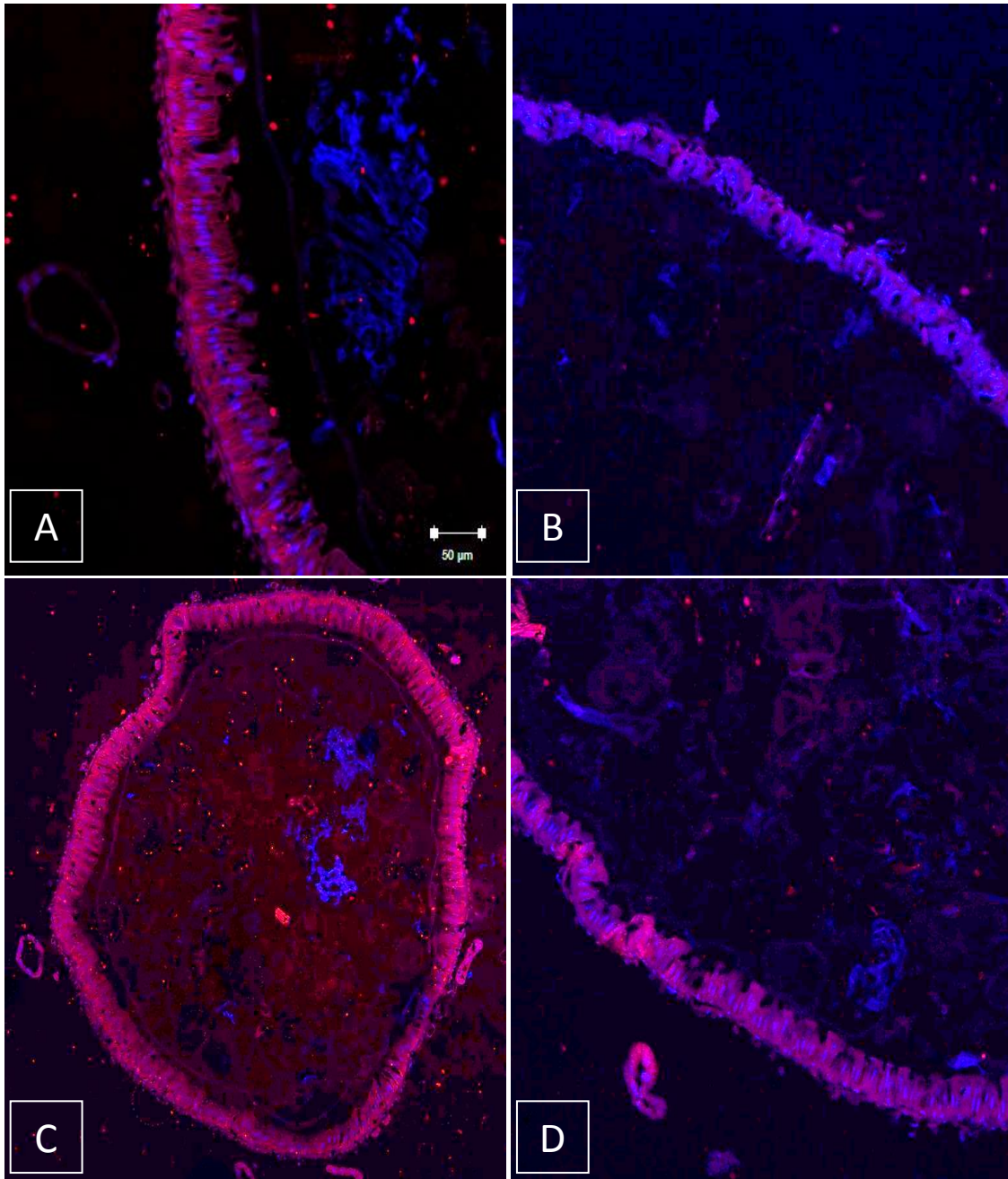


Figura 6. Imunofluorescência para detecção de apoptose no intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar submetidas a ingestão dos compostos. A – Controle; B – Limoneno 96 h; C – Trans-Anethole 96 h; D - Limoneno + Trans-Anethole 96 h. Observar núcleos normais emitindo fluorescência azul em todos os grupos.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DOS COMPOSTOS GERANIOL E CITRONELAL SOBRE PARÂMETROS

BIOQUÍMICOS E REPRODUTIVOS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)

(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)¹

CAROLINA A. GUEDES¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA², ÁLVARO A.C. TEIXEIRA²

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.

Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco,

Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

¹Guedes, C.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira & J.V. Oliveira. Efeitos dos compostos geraniol e citronelal sobre parâmetros bioquímicos e reprodutivos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)(Lepidoptera: Noctuidae). A ser submetido.

RESUMO - Os óleos essenciais de plantas são constituídos por diversos compostos voláteis, em diferentes concentrações, podendo ser determinantes para a sua toxicidade. Assim, neste trabalho, investigou-se os efeitos subletal e letal dos compostos geraniol e citronelal sobre parâmetros bioquímicos e reprodutivos de *Spodoptera frugiperda*. Para o composto geraniol utilizou-se as DL₃₀ de 9,42 mg/g e DL₅₀ de 13,65 mg/g, enquanto que para o citronelal as DL₃₀ foram de 0,06 mg/g e DL₅₀ de 0,08 mg/g. No controle utilizou-se acetona pura. Lagartas de terceiro ínstar foram tratadas topicamente na região protorácica, aplicando-se 1 µL dos respectivos compostos, com uma seringa HamiltonTM 50 µL. Após 48 h as lagartas foram maceradas em tampão fosfato de sódio em uma proporção de 4 lagartas/ 5 mL do tampão; quantificou-se os níveis de proteína total, açúcar total, lipídeo e glicogênio. Foram avaliadas a postura diária, a fim de determinar os períodos de pré-oviposição, oviposição, pós-oviposição e quantidade de ovos. Os resultados mostraram redução na concentração de proteínas e açúcares para ambos os compostos e concentrações estudadas. Não houve alteração na concentração de lipídios. Citronelal aumentou o teor de glicogênio para ambas concentrações. O período de oviposição e a quantidade de ovos foram reduzidos. No entanto, não houve diferença para os períodos de pré-oviposição e pós-oviposição. Assim, infere-se, que os compostos geraniol e citronelal ocasionam alterações nos parâmetros bioquímicos e que refletem na reprodução de *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta-do-cartucho, compostos isolados, constituintes nutricionais, reprodução

EFFECTS OF GERANIOL AND CITRONELLAL COMPOUNDS ON BIOCHEMICAL
AND REPRODUCTIVE PARAMETERS OF *Spodoptera frugiperda* (J.E.
SMITH)(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT – The essential oils of plants are composed of several volatile compounds, which may have different concentrations and may be determinant for their toxicity. Thus, in this work, sublethal and lethal effects of the compounds, geraniol and citronellal on the biochemical and reproductive parameters of *Spodoptera frugiperda* were investigated. For the geraniol compound the LD30 of 9.42 mg/g and LD50 of 13.65 mg/g was used, while for the citronellal LD30 of 0.06 mg / g and LD50 of 0.08 mg/g. Pure acetone was used in the control. Third instar caterpillars were treated topically in the prothoracic region by applying 1 µl of the respective compounds with a Hamilton™ 50 µL syringe. After 48 h the caterpillars were macerated in sodium phosphate buffer at a ratio of 4 caterpillars/5 ml of the buffer, the levels of total protein, total sugar, lipid and glycogen. The daily posture was evaluated in order to determine the periods of pre-oviposition, oviposition, post-oviposition and egg quantity. The results showed a reduction in the concentration of proteins and sugars for both compounds and concentrations studied. There was no change in lipid concentration. Citronellal increased the concentration of glycogen for both concentrations. The oviposition period and the number of eggs were reduced. However, there was no difference for the pre-oviposition and post-oviposition periods. Thus, it is inferred that the geraniol and citronellal compounds cause alterations in the biochemical parameters and that reflect in the reproduction of *S. frugiperda*.

KEY WORDS: armyworm, isolated compounds, nutritional constituents, reproduction

Introdução

A alta produtividade do milho pode ser obtida controlando-se eficientemente sua principal praga, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Porém, no Brasil a predominância de inseticidas sintéticos ainda é recorrente, os quais são utilizados sem levar em consideração os princípios do Manejo Integrado de Pragas. Assim, a adoção de inseticidas de baixo impacto ambiental é fundamental para o sucesso do controle de pragas, como a utilização de plantas com atividade inseticida (Diéz-Rodríguez & Omoto 2001).

Uma das classes de compostos derivados de plantas, que vem se destacando no controle de insetos, são os óleos essenciais, que já fazem parte de formulações de agrotóxicos, capazes de matar e repelir insetos (Isman 2000). Alguns óleos essenciais já foram avaliados para *S. frugiperda*, como citronela, *Cymbopogon winterianus* Jowitt ocasionando deterrência alimentar e mortalidade (Labinas & Crocomo 2002). Outros como erva-doce, *Foeniculum vulgare* (Mill.), alfavaca, *Ocimum gratissimum* L. e eucalipto staigeriana, *Eucalyptus staigeriana* F. Muell., em doses subletais interferiram em parâmetros biológicos e *O. gratissimum* alterou também parâmetros reprodutivos (Cruz *et al.* 2017).

Os óleos essenciais são constituídos por diversos compostos voláteis, os quais podem apresentar diferentes concentrações, podendo ser determinantes para sua toxicidade (Jemâa *et al.* 2012). Gusmão *et al.* (2013) e Silva *et al.* (2016), através de análises cromatográficas acopladas a espectrometria de massas, verificaram que o óleo de *C. winterianus* apresenta como constituintes principais o geraniol e o citronelal. Esses compostos químicos também foram encontrados por Cruz *et al.* (2016) no óleo de *O. gratissimum*, além disso o citronelal também esteve presente nos óleos de *F. vulgare*, *E. staigeriana* e *E. citriodora*. O geraniol e o citronelal são compostos terpenos que vem apresentando interesse agrícola, podendo atuar como repelentes, inseticidas e inibidores de crescimento (Isman 2000, Hummelbunner & Isman 2001, Isman 2006, Chen & Viljoen 2010).

Trabalhos que abordem a interferência de compostos químicos isolados sobre parâmetros bioquímicos são relevantes, uma vez que pesquisas tem demonstrado que inseticidas botânicos podem interferir na absorção e metabolização de constituintes nutricionais de insetos (Sharma *et al.* 2011). Alterações que ocorrem nesse sentido podem ocasionar consequências negativas no ciclo biológico dos insetos. Silva *et al.* (2016) verificaram que o óleo de *C. winterianus* em dose subletal afeta o perfil bioquímico de lagartas de *S. frugiperda*, provocam redução de proteínas, lipídeos e açúcares totais, e aumento de glicogênio.

Em se tratando de compostos químicos isolados ou associados, Cruz *et al.* (2017) verificaram que os compostos químicos limoneno, trans-anethole e limoneno + trans-anethole reduziram a quantidade de lipídeos, proteína, açúcares totais e glicogênio, apresentando maior expressividade quando os compostos foram associados, com exceção do glicogênio. Portanto, outros compostos químicos de óleos essenciais importantes no controle de *S. frugiperda* podem ser explorados para uma melhor elucidação de seus efeitos sobre a praga. Assim, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos subletal e letal de geraniol e citronelal sobre parâmetros bioquímicos e reprodutivos de *S. frugiperda*.

Material e Métodos

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção e Criação dos Insetos. Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* obtidas da criação estoque do Laboratório de Entomologia Agrícola do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), mantidas à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h, e alimentadas com dieta artificial de Greene modificada, recomendada para a espécie (Busato 2006).

Obtenção dos Constituintes Químicos. Os compostos químicos foram obtidos da Sigma-Aldrich® com pureza de 99%.

Extração e Quantificação de Proteínas Solúveis Totais. Para a realização dos experimentos foram utilizadas lagartas de terceiro ínstar (10 dias de idade), com peso médio de 78 mg. Os tratamentos consistiram na diluição dos compostos em acetona nas DL₃₀ e DL₅₀ previamente estimadas por Cruz *et al.* (2016). Para o composto geraniol utilizou-se as DL₃₀ de 9,42 mg/g (7,38 – 10,92) e DL₅₀ de 13,65 (11,34 – 15,97) mg/g, enquanto que para o citronelal as DL₃₀ 0,06 (0,05 - 0,07) mg/g e DL₅₀ de 0,08 (0,07 - 0,08) mg/g. No controle utilizou-se acetona pura. Na região protorácica foi aplicado 1,0 µL dos respectivos compostos, com o auxílio de uma seringa Hamilton™ 50 µL. As lagartas foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato e vedados com plástico filme. Para alimentação utilizou-se dieta artificial. Cada amostra foi composta de quatro lagartas, e para cada tratamento foram obtidas 10 amostras, totalizando 40 lagartas/tratamento. Para determinação das proteínas solúveis utilizou-se o método de Bradford (1976). O processamento ocorreu após 48 h da instalação dos experimentos. As lagartas foram imobilizadas à temperatura de 4 °C e, posteriormente maceradas em tampão fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,1 M) na proporção de quatro lagartas/5 mL do tampão. Retirou-se com uma pipeta 1,0 mL da mistura (lagartas+tampão) e armazenado em um microtúbulo devidamente etiquetado. O procedimento foi efetuado em baixa temperatura para evitar a oxidação das amostras. Estas foram centrifugadas por 3 minutos a 3.000 rpm. Após a centrifugação foram retirados 100 µL de cada amostra e colocados em tubos de vidro para centrifugação e adicionado 5 mL do corante Bradford (0,01% de Comassie Blue G-250; 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol). Os tubos foram homogeneizados em agitador tipo vórtex e, ficaram em repouso por 2 minutos. Em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. A unidade utilizada foi

µg/mL. Os resultados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o ProcGLM do SAS (SAS Institute 2001).

Análises de Lipídeo, Açúcar Total e Glicogênio. Lagartas de 3º instar foram maceradas em tampão fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,1M) em uma proporção de 4 lagartas/5 mL do tampão. Cada amostra constou de quatro lagartas e para cada tratamento foram obtidas 10 amostras, totalizando 40 lagartas/tratamento. O conteúdo de lipídeo, açúcar total e glicogênio foram avaliados, utilizando o método de Van Handel (1985a, b), onde 200 µL do homogeneizado foi acrescido de 200 µL de sulfato de sódio mais 800 µL de metanol e clorofórmio (1:1), e centrifugado a 2000 rpm durante 2 minutos. O precipitado foi usado para a análise de glicogênio, e o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio onde foram separados o lipídeo e o açúcar. O lipídeo foi analisado espectrofotometricamente, usando o método de ácido fosfórico-vanilina, enquanto que o açúcar total e o glicogênio, usando o método de ácido sulfúrico-antrona. A absorbância foi lida a 625 nm. Os resultados dos teores de lipídeos, açúcares e glicogênio foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade do SAS (SAS Institute 2001).

Efeito dos Compostos na Reprodução de *S. frugiperda*. Lagartas de 3º instar foram submetidas às DLs₃₀ e DLs₅₀ dos compostos geraniol e citronelal através do contato tópico. Em seguida foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato, alimentadas diariamente com dieta artificial específica até a formação de pupas. Essas foram sexadas e após a emergência dos adultos, foram formados casais, sendo dois por gaiola com cinco repetições por tratamento. Os casais foram acondicionados em gaiola de PVC com dimensões de 10 cm x 15 cm (diâmetro e altura) revestida internamente com papel sulfite, como substrato para oviposição. As mariposas foram alimentadas com solução de mel a 10% e mantidas em câmara climatizada. Todos os experimentos foram realizados à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, $67 \pm 0,7\%$ de UR e fotofase de 12 h. As posturas foram

coletadas diariamente, contabilizadas e acondicionadas em placas de Petri com dimensões de 10 cm de diâmetro e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, foi avaliado o período de pré-oviposição, oviposição, número total de ovos e pós-oviposição. As análises foram submetidas ao teste de tukey a 5% de probabilidade pelo SAS (SAS Institute, 2002). Para assumir normalidade os dados foram transformados em $(x+1)^{1/2}$.

Resultados

Quantificação de Proteínas Solúveis Totais. Os testes bioquímicos de extração e quantificação de proteínas totais solúveis demonstraram que as lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* tratadas com as DL₃₀ e DL₅₀ dos compostos geraniol e citronelal apresentaram uma redução no seu teor (Figura 1).

Análise de Lipídeo, Açúcar Total e Glicogênio. Com relação às análises lipídicas ambos os compostos e doses utilizadas não causaram interferência na quantidade de lipídeo quando comparadas ao controle (Figura 2). Para as análises de açúcar total houve redução significativa nas lagartas de ambos os tratamentos e concentrações (Figura 3). Geraniol na DL₃₀ não interferiu no teor de glicogênio, enquanto que na DL₅₀ induziu redução. Todavia, para o composto citronelal em ambas as doses ocasionou aumento desse constituinte (Figura 4).

Efeito dos Compostos na Reprodução de *S. frugiperda*. Os compostos geraniol e citronelal nas DL₃₀ e DL₅₀ causaram redução significativa no período de oviposição e na quantidade de ovos de adultos oriundos de lagartas de 3º instar tratadas, por contato tópico. No entanto, não houve alteração nos períodos de pré-oviposição e pós-oviposição (Tabela 1).

Discussão

Geraniol e citronelal causaram redução em alguns parâmetros bioquímicos, como proteína e açúcares. De acordo com Sharma *et al.* (2011) e Yazdani *et al.* (2013) parâmetros nutricionais

podem sofrer interferências ocasionadas por inseticidas botânicos, fato este que está em consonância com os resultados da presente pesquisa. As proteínas participam de inúmeros processos relacionados à sobrevivência dos insetos, e alterações nos níveis protéicos pode ocasionar efeitos negativos na reprodução, por afetarem diretamente a vitelogênese (Panizzi & Parra 2009, Guizzo *et al.* 2012, Rosas-Mejía *et al.* 2015), como verificado na pesquisa em questão. De acordo com Senthilkumar *et al.* (2009) a redução de proteínas deve-se provavelmente a interferência ocasionada por compostos presentes nos inseticidas botânicos que atuam nos hormônios que regulam a síntese protéica. Muitos dos inseticidas têm propriedades deterrentes e reduzem a eficiência de alimentação em insetos, o que por sua vez reduz alguns componentes vitais como proteínas no corpo. Os compostos podem ter inibido a alimentação das larvas e como resultado a diminuição da proteína poderia ser devido ao estresse por fome (Etebari *et al.* 2006).

A redução nos teores de carboidratos pode comprometer a sobrevivência dos insetos (Parra 1999), pelo fato desses constituintes funcionarem como fonte energética, além de serem responsáveis por inúmeras funções metabólicas e estruturais, e na formação da quitina; podem ser convertidos em lipídeos, além de participarem da síntese de aminoácidos (Chapman 2013, Arrese *et al.* 2010).

Nos insetos, os lipídios desempenham importantes funções, são constituintes de estruturas celulares, atuam como hormônios e formam importantes reservas energéticas de grande atividade metabólica como o vôo e a produção de ovos (Arrese *et al.* 2001). Apesar dos resultados obtidos nessa pesquisa não apresentarem alterações negativas para os lipídeos em ambos os compostos e concentrações estudadas, a oviposição e fecundidade apresentaram redução significativa. Esses resultados podem sugerir que os lipídios não foram metabolizados e/ou absorvidos de forma adequada para a produção de ovos em *S. frugiperda*.

Pode-se inferir, portanto, que compostos de óleos essenciais tem efeito sobre os índices nutricionais de larvas tratadas. Isso sugere uma redução da eficiência na utilização de alimentos ingeridos quando esses produtos foram utilizados (Etebari *et al.* 2006).

Em geral, estudos relacionados a alterações bioquímicas são realizados com extratos ou óleos essenciais, como os extratos de *Eucalyptus globulus* Labill., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Artemisia annua* L., *Justicia gendarussa* Burm F., *Myristica fragrans* Houtt, *Annona squamosa* L., e *Centella asiatica*, os quais reduziram taxas de proteína, carboidrato, lipídeo e alguns aminoácidos de larvas e adultos de *Anopheles stephensi* (Senthilkumar *et al.* 2009).

Segundo ensaios realizados por Nasr *et al.* (2015) o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. reduziu significativamente a proteína total e os triglicerídeos de lagartas de terceiro ínstar de *Plutella xylostella* L., em doses subletal e letal, corroborando com vários outros trabalhos que apontam as propriedades tóxicas dos óleos para insetos-praga. Esses autores sugerem que em estudos fisiológicos, a determinação da proteína total e de muitas macromoléculas químicas, tais como lipídios e carboidratos são muito importantes como fontes energéticas para os insetos. Etebari *et al.* (2006) reiteraram que muitos produtos têm propriedades antialimentares e reduzem a eficiência da alimentação em insetos, o que por sua vez reduz alguns componentes vitais, como proteínas.

No que se refere a compostos de óleos essenciais sobre as macromoléculas supracitadas, Cruz *et al.* (2017) relataram diminuição de proteínas, lipídios, açúcares e glicogênio em lagartas de *S. frugiperda*, quando tratadas com os compostos limoneno e trans-anethole, sendo esses resultados mais expressivos quando os compostos foram utilizados em associação. Além disso, os experimentos mostraram relações distintas com os níveis de glicogênio, uma vez que o composto citronelal ocasionou um aumento para esse constituinte nutricional, corroborando com os dados obtidos por Silva *et al.* (2016), que também observaram aumento de glicogênio ocasionados pelo

óleo de *C. winterianus*. Esses autores sugeriram que o aumento tenha sido ocasionado pelo composto majoritário citronelal presente neste óleo e objeto de nosso estudo.

Com relação aos aspectos reprodutivos é possível afirmar que os compostos geraniol e citronelal, apresentaram efeito negativo sobre a oviposição e fecundidade de *S. frugiperda*, o que confirma a correlação de que o sucesso reprodutivo dos insetos está relacionado aos nutrientes adquiridos na fase imatura (Souaa *et al.* 2015), visto que os recursos nutricionais são adquiridos para garantir o crescimento e reprodução. A vitelogênese e maturação de óvulos para que ocorra de modo satisfatório depende dos recursos energéticos que foram adquiridos. Uma redução na reprodução mostra que os compostos podem ter influenciado na não metabolização da maior parte dos constituintes nutricionais ou os mesmos não foram adquiridos eficientemente no período larval (Attardo *et al.* 2005, Milano *et al.* 2010, Chapman 2013).

Outros trabalhos abordam os efeitos de compostos e óleos essenciais sobre aspectos reprodutivos como Sharab *et al.* (2009), que verificaram que o composto eugenol e o óleo de *Mentha piperita* L., cada um na concentração de 0,01% causaram redução significativa na fecundidade de *Phthorimaea operculella* Zell. Os mesmos autores também testaram folhas, frutos ou sementes de 14 óleos essenciais e verificaram que os óleos de *Allium cepa* L., *Curcuma longa* L., *Clolocasia antiquorum* Schott, *Ocimum basilicum* L., *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. e *Thuja orientalis* L. causaram redução na deposição de ovos. Sousa *et al.* (2015) verificaram que os compostos (+) - fenchone e (-) - β - pineno reduziram significativamente o potencial de oviposição de fêmeas de *Pseudaletia unipuncta* Haworth, em 46% e 33%.

O presente estudo mostrou eficácia com relação aos compostos isolados, enquanto que Hummelbrunner & Isman 2001 verificaram que compostos isolados foram menos eficazes que inseticidas convencionais. Por outro lado, quando foram realizadas misturas de alguns compostos, essas mostraram-se mais eficazes que inseticidas botânicos como rotenona e neem. Esses mesmos

autores verificaram que uma mistura de R-terpineol, eugenol e óleo de tomilho foi 300 vezes menos tóxica para os peixes que azadiractina, rotenona e piretro. Isso pode ser atribuído às vias de metabolismo desintoxicantes e modo de ação de monoterpênicos (Koul *et al.* 2013). Vários compostos de óleos essenciais foram relatados como bloqueadores da octopamina, que é um neurotransmissor exclusivo para os insetos, por essa razão são menos tóxicos para os vertebrados (Hummelbrunner & Isman 2001). Os compostos de óleos essenciais podem ser considerados mais seguros para o meio ambiente que outros produtos químicos derivados de plantas, como a azadiractina, rotenona ou o piretro (Stroh *et al.* 1998). Em geral, acredita-se que os óleos essenciais por apresentarem um grande número de compostos e dessa forma aumentar o espectro de ação inseticida são mais eficazes do que os compostos puros. Contudo, há controvérsias em relação a eficácia dos compostos de óleos essenciais, pois diferentes espécies têm respostas diferentes a compostos individuais.

Portanto, pode-se concluir a partir do presente estudo que os compostos geraniol e citronelal ocasionam redução em parâmetros bioquímicos e reprodutivos de *S. frugiperda*, e dessa forma podem ser utilizados no seu controle em programas de manejo integrado com base ecológica. Ademais, a identificação dos compostos de óleos essenciais pode permitir o desenvolvimento de agentes de controle mais eficazes para a praga em questão.

Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa. Ao DMFA-UFRPE (Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal) pela realização dos bioensaios. A Sigma-Aldrich® pela obtenção dos constituintes químicos.

Literatura Citada

- Arrese, E.L., L.E. Canavoso, Z.E. Jouni, J.E. Pennington, K. Tsuchida & M.A. Ells. 2001.** Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 7-17.
- Arrese, E.L., A.D. Howard, R.T. Patel, O.J. Rimoldi & J.L. Soulages. 2010.** Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 91-99.
- Attardo, G.M., I.A. Hansen & A.S. Raikhel. 2005.** Nutricional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 661-675.
- Baydar, H. & N.G. Baydar. 2005.** The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.). *Ind. Crop. Prod.* 21: 251-255.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Busato, G.R., M.S. Garcia, A.E. Loeck, M. Zart, A.M. Nunes, O. Bernardi & F.S. Andersson. 2006.** Adequação de uma dieta artificial para os biótipos “milho” e “arroz” de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bragantia* 65: 317-323.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Chen, W. & A.M. Viljoen. 2010.** Geraniol – A review of commercially important fragrance material. *South Afr. J. Bot.* 76: 643-651.
- Coats, J.R., LL. Karr & C.D. Drewes. 1991.** Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. p. 306-316. In P.A. Hedin. (eds.), *Naturally Occurring Pest Bioregulators*. Washington DC, ACS Symposium Series 449, American Chemical Society, 456p.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.S.C. Lopes, D.R.S. Barbosa, M.O. Breda, K.A. Dutra, C.A. Guedes, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Sublethal effects of essential oils from *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 109: 660-666.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D’assunção, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa, M.O. Breda. 2017.** Effect of trans-anethole, limonene and your combination in nutritional componentes and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Biol. Interact.* 263: 74-80.

- Diéz-Rodrigues, G.I. & C. Omoto. 2001.** Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. Neotrop. Entomol. 30: 311-316.
- Etebari, K., A.R. Bizhannia, R. Sorati & L. Matindoost. 2006.** Biochemical changes in haemolymph of silkworm larvae due to pyriproxyphen residue. Pestic. Biochem. Physiol. 88: 14-19.
- Guizzo, M.G., L. Abreu, A. Masuda, C. Logullo & I.S.V. Junior. 2012.** Metabolism of Biomolecules in the Embryogenesis of the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Acta Sci. Vet. 40: 1010-1022.
- Gusmão, N.M.S., J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, K.A. Dutra, W.A. Silva & M.J.A. Wanderley. 2013.** Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus staigeriana* F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare* Mill. essential oils in the management of *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). J. Stored Prod. Res. 54: 41-47.
- Hummelbrunner, L.A. & M.B. Isman. 2001.** Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). J. Agr. Food. Chem. 49: 715-720.
- Isman, M.B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protec. 19: 603-608.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51: 45-66.
- Jemâa, J.M.B., S. Haquel, M. Bouaziz & M.L. Khouja. 2012.** Seasonal variations in chemical composition and fumigant activity of five Eucalyptus essential oils against three moth pests of stored dates in Tunisia. J. Stored Prod. Res. 48: 61-67.
- Koul, O., S. Walia & G.S. Dhaliwal. 2008.** Essential oils as green pesticides: potential and constraints. Biopestic. Int. 4: 63-84.
- Koul, O., R. Singh, B. Kaur & D. Kanda. 2013.** Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. Ind. Crop. Prod. 49: 428-436.
- Labinas, M.A. & W.B. Crocomo. 2002.** Effect of java grass (*Cymbopogon winterianus*) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1979) (Lepidoptera: Noctuidae). Acta Scient. 24: 1401-1405.
- Lee, S., R. Tsao & J.R. Coats. 1999.** Influence of dietary applied monoterpenoids and derivatives on survival and growth of the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 92: 56-67.

- Lenardão, E.J., G.V. Botteselle, F. Aambuja, G. Perin & R.G. Jacob. 2007.** Citronellal as key compound in organic synthesis. *Tetrahedron* 63: 6671-6712.
- Milano, P., E. Berti Filho, J.R.P. Parra, M. L. Oda & F.L. Cônsoli. 2010.** Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade de espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae. *Neotrop. Entomol.* 39: 172-180.
- Nasr, M., J.J. Sendi, S. Moharramipour & A. Zibae. 2015.** Evaluation of *Origanum vulgare* L. essential oil as a source of toxicant and an inhibitor of physiological parameters in diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Saudi Soc. Agr. Science.* In Press.
- Panizzi, A.R. & J.R.P. Parra, 2009.** Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas. Brasília, Embrapa. 1169p.
- Parra, J.R.P. 1999.** Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba, FEALQ, 137p.
- Rajeswara Rao, B.R., A.K. Bhattacharya, G.R. Mallavarapu & S. Ramesh. 2004.** Yellowing and crinkling disease and its impact on the yield and composition of the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). *Flavour. Frag. J.* 19: 344-350.
- Rice, P.J. & J.R. Coats. 1994.** Insecticidal properties of several monoterpenoids to the housefly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and southern corn root-worm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 1172-1179.
- Rosas-Mejía, M., A. Correa-Sandoval, C.S. Venegas-Barrera & J.V. Horta-Veja. 2015.** Preferências entre cinco carboidratos em *Pheidole bilimeki* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool. Mex.* 31: 291-297.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Senthilkumar, N., P. Varma & G. Gurusubramanian. 2009.** Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the Malarial Vector, *Anopheles stephensi* (Liston). *Parasitol. Res.* 104:237-244.
- Sharaby, A., H. Abdel-Rahman & S. Moawad. 2009.** Biological effects of some natural and chemical compounds on the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae). *Saudi J. Biol. Sci.* 16: 1-9.
- Sharma, P., L. Mohan, K.K. Dua & C.N. Srivastava. 2011.** Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4: 301-304.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E.

Smith, 1979) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. Acta Histochem. 118: 347-352.

Simon, D.Z., J. Beliveau & C. Aube. 1986. Extraction and hydrodiffusion of the essential oil of *Monarda fistulosa* grown in the province of Quebec: assay of geraniol in the hydrodiffused oil. Pharm. Biol. 24: 120-122.

Sousa, R.M., J.S. Rosa, L. Oliveira, A. Cunha & M. Fernandes-Ferreira. 2015. Activities of Apiaceae essential oils and volatile compounds on hatchability, development, reproduction and nutrition of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). Ind. Crop. Prod. 63: 226-237.

Stroh, J., M.T. Wan, M.B. Isman & D.J. Moul. 1998. Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific, *Coho salmon* and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60: 923-930.

Van Handel, E. 1985a. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1: 302-304.

Van Handel, E. 1985b. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1: 299-301.

Vargas, R.I., J.D. Stark, M.H. Kido, H.M. Ketter & L.C. Whitehand. 2000. Methyl-eugenol and cue lure traps for suppression of male oriental fruit flies and melon flies (Diptera: Tephritidae) in Hawaii: Effects of lure mixtures and eathering. J. Econ. Entomol. 93: 81-87.

Yazdani, E., J.J. Sendi, A. Aliakbar & S. Senthil-Nathan. 2013. Effect of *Lavandula angustifolia* essential oil against lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep: Pyralidae) and identification of its major derivatives. Pestic. Biochem. Physiol. 107: 250-257.

Zaridah, M.Z., M.A. Nor Azah, A. Abu Said & Z.P. Mohd. Faridz. 2003. Larvicidal properties of citronella and *Cymbopogon nardus* essential oils from two different localities. Trop. Biomed. 20: 169-174.

Tabela 1. Período de pré-oviposição, oviposição, período de pós-oviposição e número total de ovos de duas fêmeas de *Spodoptera frugiperda* cujas larvas foram tratadas com as DL₃₀ e DL₅₀ dos compostos geraniol e citronelal. Temperatura: 25,2 ± 1,4 °C. Umidade: 67 ± 0,7% e fotofase de 12h.

Tratamentos	Pré-oviposição (dias) ¹	Oviposição (dias) ¹	Pós-oviposição (dias) ¹	Número de ovos por gaiola ¹
Controle	2,4 ± 0,24a	7,6 ± 0,24a	2,6 ± 0,24a	2170,8 ± 197,02a
Geraniol DL ₃₀	3,6 ± 0,24a	5,0 ± 0,55b	2,2 ± 0,20a	704,2 ± 171,02b
Geraniol DL ₅₀	3,0 ± 0,32a	3,8 ± 0,37b	2,8 ± 0,86a	729,0 ± 257,02b
Citronelal DL ₃₀	2,6 ± 0,40a	3,4 ± 0,60b	3,6 ± 0,98a	598,4 ± 86,51b
Citronelal DL ₅₀	3,0 ± 0,32a	4,2 ± 0,37b	2,2 ± 0,58a	527,0 ± 88,95b

¹Dados originais, para análise foram transformados em $(x+1)^{1/2}$

¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

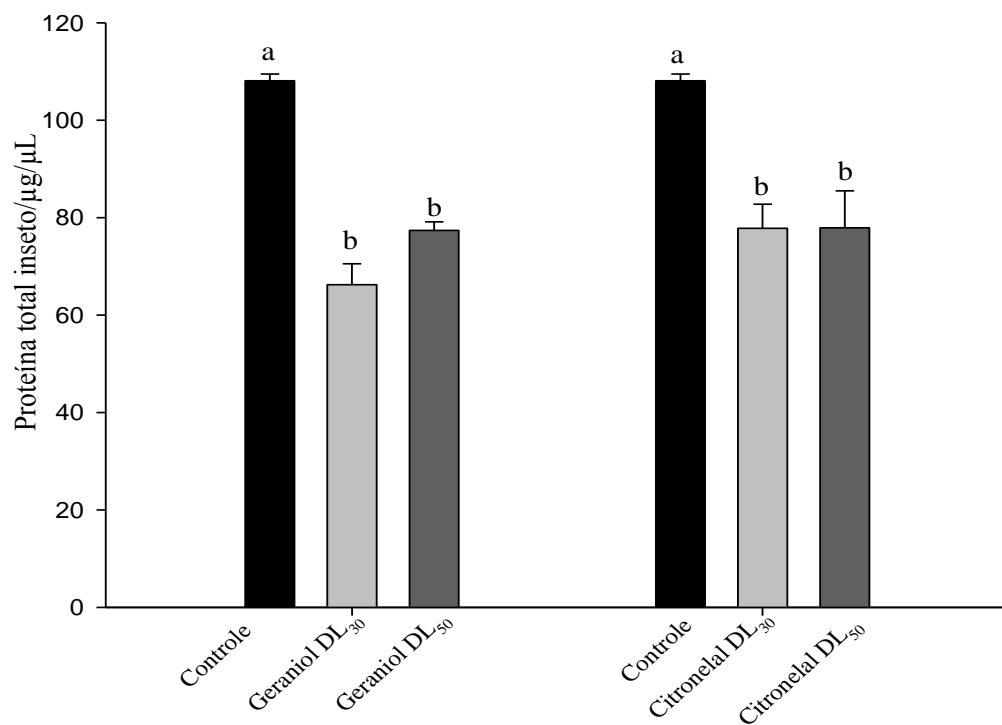


Figura 1. Quantidade de proteínas totais oriundas de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* submetidas às DL₃₀ e DL₅₀, por contato tópico dos compostos geraniol e citronelal.

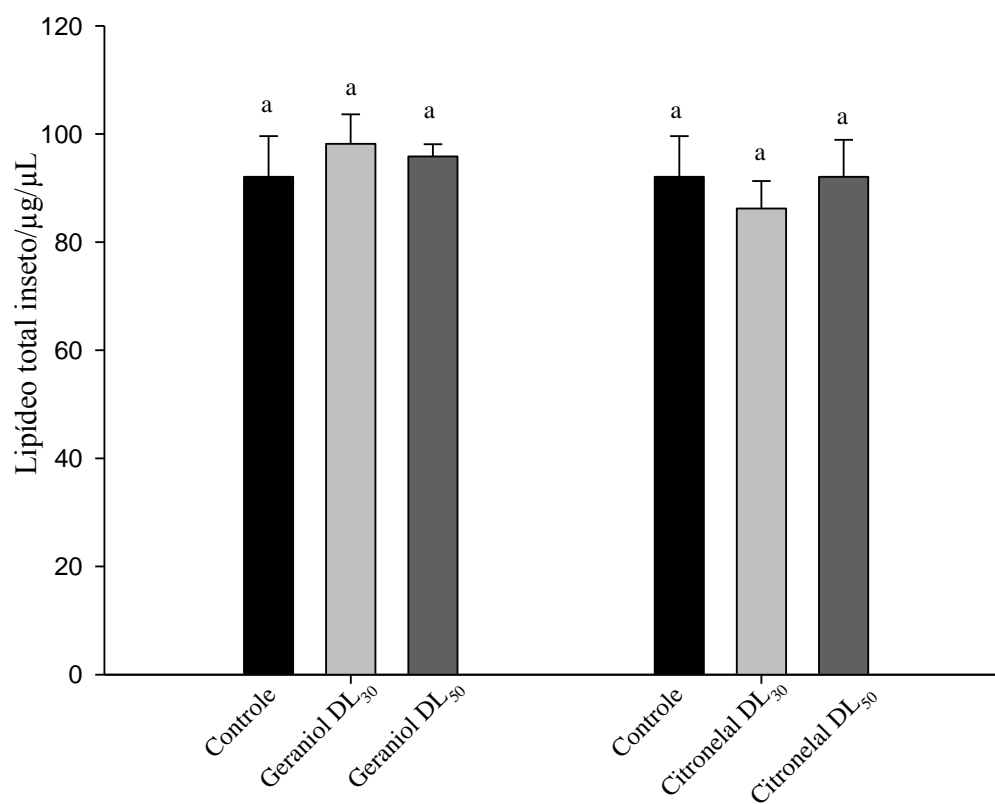


Figura 2. Quantidade de lipídeos totais oriundas de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* submetidas às DL₃₀ e DL₅₀, por contato tóxico dos compostos geraniol e citronelal.

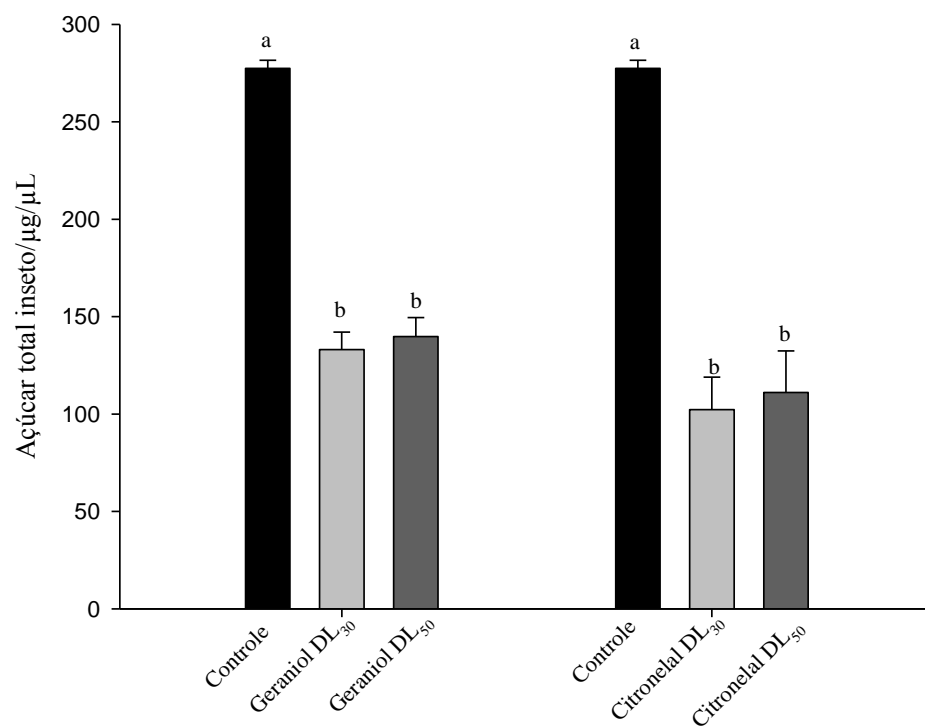


Figura 3. Quantidade de açúcar total oriundas de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* submetidas às DL₃₀ e DL₅₀, por contato tópico dos compostos geraniol e citronelal.

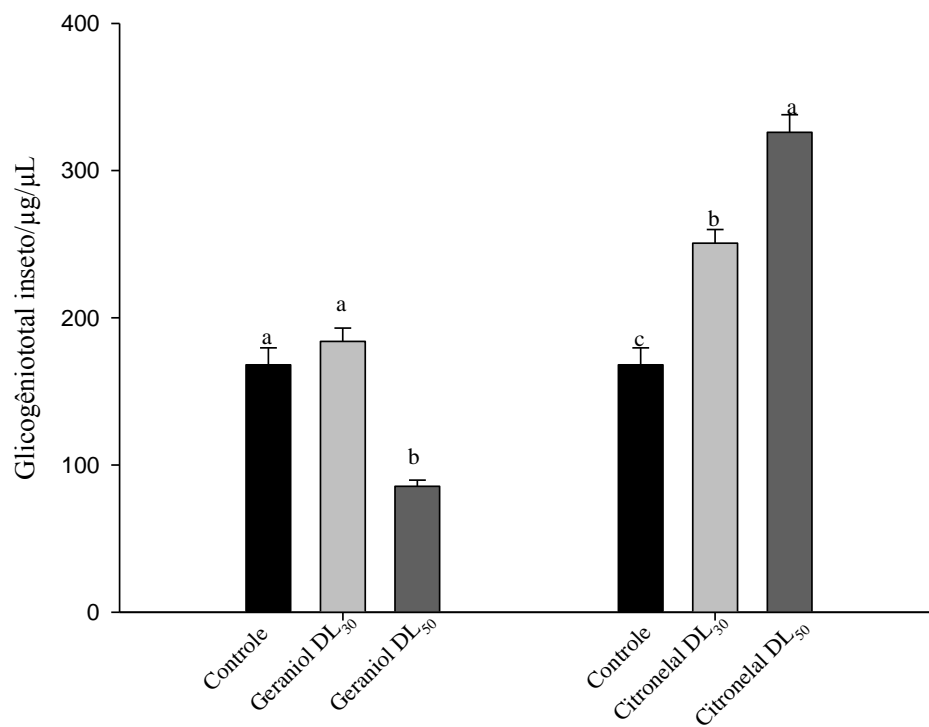


Figura 4. Quantidade de glicogênio total oriundo de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* submetidas às DL₃₀ e DL₅₀, por contato tópico dos compostos geraniol e citronelal.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE *Piper marginatum* JACQ. (PIPERACEAE) E DO GERANIOL SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM COMPARAÇÃO A PRODUTOS FORMULADOS¹

CAROLINA A. GUEDES¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA², ÁLVARO A.C. TEIXEIRA²

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

Guedes, C.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, A.A. Correia, F.A.B. Santos & L.C. Alves. Avaliação do óleo de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) e do geraniol sobre o desenvolvimento embrionário de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em comparação a produtos formulados. A ser submetido.

RESUMO - Os óleos essenciais e seus constituintes isolados vêm sendo constantemente estudados para o controle de insetos-praga. Assim, a presente pesquisa objetivou relatar a composição química do óleo de *Piper marginatum*; estabelecer as CLs₃₀ e ₅₀ deste óleo e do composto geraniol, examinar histologicamente o desenvolvimento embrionário de *Spodoptera frugiperda* através da microscopia de luz e eletrônica de varredura; bem como comparar com o inseticida botânico azadiractina e o inseticida sintético deltametrina, e acetona como controle negativo. A composição química do óleo de *P. marginatum* revelou 44 compostos, sendo os principais: exalatacina (9,12 %), α – pinene (8,45 %), α – phellandrene (6,97 %), β – pinene (6,51 %), < (E) > cariofileno (5,71 %), limoneno (4,98 %) e < (E) > asarone (3,53 %). As CLs₃₀ e ₅₀ foram estimadas em 32,32 e 152,95 ppm, para o óleo e para o geraniol, 0,98 e 3,58 ppm, respectivamente. Cortes semifinos dos ovos revelaram que o óleo, o composto geraniol, azadiractina e deltametrina afetaram o desenvolvimento embrionário em ambas as concentrações, no entanto, o óleo e o composto apresentaram maior eficiência por ocasionar danos mais expressivos mesmo nas menores concentrações. As análises em microscopia eletrônica de varredura revelaram que todos os produtos utilizados alteraram a morfologia dos ovos, modificando a estrutura do córion tornando-os inviáveis. Assim, este trabalho demonstra que os produtos naturais são eficientes no controle de *S. frugiperda* por resultar em danos embrionários mesmo nas menores concentrações.

PALAVRAS-CHAVE: lagarta-do-cartucho, óleos essenciais, constituintes isolados, embriologia, morfologia, microscopia eletrônica

EVALUATION OF *Piper marginatum* OIL JACQ. (PIPERACEAE) AND GERANIOL ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN COMPARISON OF PRODUCTS FORMULATED

ABSTRACT – Essential oils and their isolated constituents have been constantly studied for the control of insect pests. Thus, the present research aimed to report the chemical composition of *Piper marginatum* oil; establish CLs 30 and 50 of this oil and the geraniol compound, histologically examine the embryonic development of *Spodoptera frugiperda* through light microscopy and scanning electron microscopy, as well as compare with the insecticide azadirachtin and deltamethrin, and acetone for negative control. The chemical composition of the oil of *P. marginatum* identified 44 compounds, the main ones being exalatacin (9.12%), α - pinene (8.45%), phellandrene (6.97%), β -pinene (6.51%), (E) γ caryophyllene (5.71%), limonene (4.98%) and γ -Asarone (3.53%). LCs 30 and 50 were estimated at 32.32 and 152.95 ppm, for oil and geraniol, 0.98 and 3.58 ppm, respectively. Semifinous cuts of the eggs revealed that the oil, the geraniol compound, azadirachtin and deltamethrin affected the embryonic development in both concentrations, however, the oil and the compound presented higher efficiency because it caused more significant damages even in the lower concentrations. Scanning electron microscopy revealed that all the products used altered the morphology of the eggs, modifying the structure of the chorion, making them non-viable. Thus, this work demonstrates that natural products are efficient in the control of *S. frugiperda* because it results in embryonic damages even in the lowest concentrations.

KEY WORDS: fall armyworm, essential oils, isolated compounds, embryology, morphology, electron microscopy

Introdução

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith), também conhecida como lagarta-do-cartucho, é uma praga polífaga, atacando em especial à cultura do milho (*Zea mays* L.) (Schmidt 2002). Fêmeas dessa espécie depositam seus ovos em massas na parte superior das folhas, nas porções inferior e mediana da planta, os quais são dispostos em duas ou três camadas sobrepostas (Cônoli *et al.* 1999, Beserra *et al.* 2002).

A principal função dos ovos dos insetos em desenvolvimento é a proteção do embrião. Esse período de desenvolvimento dos insetos pode servir como uma etapa importante para estudar métodos apropriados para o controle de pragas, pois quando produtos fitossanitários são utilizados sobre ovos e penetram através do córion, esses poderão acarretar alterações que afetarão total ou parcialmente o desenvolvimento do embrião, o que irá fornecer informações importantes que podem ser empregadas para o manejo de pragas (Trougakos & Margaritis 2003).

Avanços no conhecimento sobre o processo de morfologia de ovos em insetos de importância agrícola tem sido feitas com a ajuda da microscopia eletrônica em *Samia cynthia ricini* (Donovan) (Kawaguchi *et al.* 2000), *Spodoptera exigua* Hubner (Skudlik *et al.* 2005), *Euproctis chrysorrhoea* (L.) (Candan *et al.* 2008), *Ariadne merione* (Crammer) (Srivastava & Kumar 2016), entre outros. Estes trabalhos concentraram-se no estudo basicamente da morfologia e estrutura dos ovos, todavia outros trabalhos focam nas alterações que o interior dos ovos podem sofrer quando produtos fitossanitários são utilizados. A exemplo, Pires *et al.* (2009) verificaram através de microscopia eletrônica de varredura e transmissão a patogenicidade e virulência de conídios de *Metharizium anisopliae* (Metsch.) Sorok em ovos de *Tuta absoluta* (Merick).

S. frugiperda tem sido amplamente estudada no estágio larval (Correia *et al.* 2009, Knaak *et al.* 2010, Cruz *et al.* 2014, Silva *et al.* 2016), no entanto, os estágios imaturos permanecem

pouco estudados em relação à morfologia e ultraestrutura, cujas informações se restringem basicamente aos trabalhos de Cònsoli *et al.* (1999) e Correia *et al.* (2013). Os primeiros autores dedicaram-se ao estudo da superfície e estrutura do córion de ovos em microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Enquanto que Correia *et al.* (2013) verificaram o desenvolvimento embrionário após tratamento dos ovos com inseticidas botânicos e reguladores de crescimento em baixas concentrações através da microscopia de luz e eletrônica de varredura. Contudo, nenhum enfoque tem sido dado ao estudo ultraestrutural do desenvolvimento embrionário dessa praga, principalmente após o tratamento com óleos essenciais e constituintes químicos isolados destes óleos. Portanto, investigações usando microscopia de luz e eletrônica de varredura podem ajudar a revelar alterações na embriogênese, quando os insetos são tratados com doses subletal e letal dos óleos essenciais e seus compostos.

Os óleos essenciais e seus constituintes isolados ou associados vêm sendo constantemente estudados para o controle de insetos-praga. Além disso, existem trabalhos mostrando que diferentes compostos podem causar efeitos sobre o potencial reprodutivo de fêmeas tratadas alterando assim a fecundidade de *S. frugiperda* (Alves *et al.* 2013, Cruz *et al.* 2014, Cruz *et al.* 2016, Silva *et al.* 2016, Cruz *et al.* 2017). O óleo essencial de *Piper hispidinervum* C. DC. já foi identificado como tóxico a praga em questão (Alves *et al.* 2013, Cruz *et al.* 2014) e o composto isolado geraniol pode atuar como repelente, inseticida e inibidor de crescimento (Chen & Viljoen 2010).

Desta forma, considerando a importância desta espécie, a presente pesquisa objetivou relatar a composição química do óleo essencial de *P. marginatum*; examinar histologicamente, através da microscopia de luz e eletrônica de varredura, os ovos de *S. frugiperda*; descrever o desenvolvimento embrionário após tratamento com concentrações subletal e letal do óleo de *P.*

marginatum e do composto geraniol; bem como comparar com o inseticida botânico azadiractina e o inseticida sintético da classe dos piretroides deltametrina, e acetona como controle.

Material e Métodos

A presente pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Química Fundamental (DQF-UFPE), Entomologia Agrícola do Departamento de Agronomia (DEPA-UFPE), bem como no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE).

Obtenção e Criação dos Insetos. Foram utilizados ovos de *S. frugiperda* obtidos da criação estoque do Laboratório de Entomologia Agrícola do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), mantidos à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h. As lagartas foram alimentadas com dieta artificial modificada de Greene, recomendada para a espécie (Busato 2006). Os adultos foram mantidos em gaiolas de tubos de PVC de 20 cm de altura x 15 cm de diâmetro, forradas internamente com papel sulfite branco para efetuarem as posturas. Na parte superior as gaiolas foram forradas com filme de PVC transparente e na parte inferior com uma tampa plástica também forrada com papel sulfite. No fundo das gaiolas foi colocado recipiente plástico contendo algodão embebido em solução de mel a 10% para alimentação.

Obtenção do Óleo, Geraniol, Inseticida Botânico e Inseticida Sintético. As folhas de *P. marginatum* Jacq. foram coletadas no Jardim Botânico do Recife, localizado no bairro do Curado, mais precisamente no Km 7 da BR232, na Cidade do Recife. O material vegetal foi autenticado por Jefferson Rodrigues Maciel e um voucher do espécime foi depositado no Herbário do Jardim Botânico de Recife com o número de identificação UFP-10826.

O composto geraniol foi obtido da Sigma-Aldrich® com pureza de 99%. Os inseticidas azadiractina (Azamax®) e deltametrina (Decis®) foram adquiridos nas revendas de agrotóxicos de Recife-PE.

Extração do Óleo Essencial de *P. marginatum*. O óleo essencial foi obtido a partir de folhas frescas por meio de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado e condensado. O material vegetal foi previamente triturado e mantido no sistema, sendo o processo acompanhado por três horas, coletando-se o óleo em seguida e tratando-o com sulfato de sódio anidro P.A. para retirar a água remanescente. O óleo foi mantido sob refrigeração a -24°C até a realização dos bioensaios e/ou análise cromatográfica.

Análises Cromatográficas em Fase Gasosa. O óleo de *P. marginatum* foi analisado qualitativamente por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series GC/EM (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0.25 mm d.i., 0,25 µm espessura da película). Uma solução de 2000 ppm do óleo essencial foi preparada em hexano e injetada 1µL em split 1:50, assim como a solução da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C8-C30, sendo esta solução hexânica composta por padrões comerciais da Sigma-Aldrich®. A temperatura do Cromatógrafo Gasoso (GC) foi ajustada em 60 °C por 3 min, sendo então aumentada em 2,5 °C min⁻¹ até alcançar 240 °C e mantida nesta temperatura por 10 min. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface do EM foi definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5 scan-s de m/z 20-350 (Santos *et al.* 2012). Os constituintes do óleo foram quantificados através da Cromatografia Gasosa em um sistema Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Trace GC Ultra gás equipado com um detector de ionização por chama (FID), com uma coluna HB-5 (30 m

x 0,25 mm d.i., 0,25 μm de espessura da película). A temperatura do forno foi mantida a 40 °C durante 2 min e depois aumentada a 4 °C min^{-1} para 230 °C. O injetor e o detector foram mantidos a 250 °C. Para realizar a quantificação, uma solução de 2000 ppm do óleo essencial foi preparada em hexano e injetada 1 μL em splitless. Esse procedimento foi realizado em triplicada para realizar o cálculo da média aritmética das porcentagens de cada composto e seu desvio padrão (Silva *et al.* 2016).

Identificação Química do Óleo Essencial. Com os tempos de retenção dos compostos na amostra do óleo essencial, do padrão de hidrocarboneto (C8-C30) e da combinação do óleo essencial com a mistura deste padrão foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Van den Dool & Kratz (1963). Os componentes do óleo essencial foram previamente identificados por similaridade dos valores dos índices de retenção e posteriormente confirmados por comparação dos respectivos espectros de massa com aqueles disponíveis na biblioteca do GC/EM: MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition e com os descritos por Adams (2009). A composição de cada componente foi expressa na forma de porcentagens da área total do pico conforme registrado por GC-FID.

Bioensaio para Determinação das Concentrações. Os tratamentos consistiram na diluição do óleo de *P. marginatum* e do composto geraniol em acetona, conforme metodologia de Prajapati *et al.* (2005). Foram obtidas as concentrações 1, 50, 500, 8000 e 1700 ppm para o óleo e 10, 50, 100, 1000 e 6000 ppm para o composto geraniol. As concentrações foram obtidas através de testes preliminares objetivando obter mortalidade em torno de 5% e 95% para o estabelecimento das concentrações definitivas. O bioensaio constituiu na imersão de cerca de 100 ovos em 3 mL de cada concentração durante 30 segundos e as massas de ovos foram acondicionadas em placas de Petri. Foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento. Os ovos do tratamento controle receberam

somente solução de acetona. Avaliou-se a inviabilidade dos ovos com a contagem de lagartas eclodidas após 72 h (período de incubação dos ovos de *S. frugiperda*) da instalação do experimento, utilizando a análise de probit pelo programa SAS PROC PROBIT (SAS Institute 2002).

Bioensaios para Avaliação Microscópica dos Ovos. Posturas de *S. frugiperda* de 0-12 h de idade foram imersas, aproximadamente por 30 segundos, em emulsões do óleo de *P. marginatum* e do composto geraniol nas CL₃₀ e CL₅₀. Para os controles positivos foram utilizadas emulsões de azadiractina (Azamax[®]) e deltametrina (Decis[®]) e como controle negativo acetona. Para estes foram utilizadas a concentração comercial e uma concentração menor (10% da dose comercial), obtida a partir de experimentos prévios, que consistiram das seguintes: inseticida botânico azadiractina (AzaMax[®] 0,6 mg/L e 0,06 mg/L), e o inseticida piretroide deltametrina (Decis[®] 12,5 mg/L e 0,125 mg/L). Para análise em microscopia de luz, ovos com 24 e 72 h após tratamentos foram pré-fixados em fixador Karnovsky (G.A. 2,5%, PFA 4%). Posteriormente foram realizadas três lavagens de Tampão Cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4. Em seguida, foram pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄) por duas horas, na ausência de luz, sob temperatura ambiente. Após esses procedimentos, realizou-se mais quatro lavagens em água destilada por 10 minutos. As amostras foram contrastadas em bloco com acetato de uranila a 2,5% (*overnight*). Posteriormente, foram feitas quatro lavagens em água destilada e submetidos à desidratações em ordem crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) por 30 minutos. A infiltração foi realizada em resina EPON-EMBED812/Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort ashington, PA) e acetona. O material foi emblocado e deixado para polimerizar a 70°C durante 72h. Os cortes semifinos foram obtidos em ultramicrotomo Reichert Ultracut, corados com azul de toluidina e analisados em microscópio óptico de luz.

Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura. Os ovos com 24 e 72 h após tratamentos foram pré-fixados em fixador Karnovisk (G.A. 2,5%, PFA 4%). Posteriormente foram realizadas três lavagens de Tampão Cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4. Em seguida, foram pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) por duas horas, na ausência de luz, sob temperatura ambiente. Os próximos passos incluíram quatro lavagens em água destilada e desidratações em séries crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) por 30 minutos cada. As amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico, usando CO_2 líquido, montadas em stubs e metalizadas com ouro coloidal durante um minuto e analisadas ao microscópio JEOL-5600LV.

Resultados

Composição Química do Óleo Essencial de *P. marginatum*. A composição do óleo de *P. marginatum* está apresentada na Tabela 1. Um total de 44 compostos foram revelados nas folhas de *P. marginatum*, representando 98,66 % do óleo. Os principais componentes identificados foram: exalatacina (9,12%), α – pinene (8,45%), α – phellandrene (6,97 %), β – pinene (6,51%), < (E) > cariofileno (5,71%), limoneno (4,98%) e < (E) > asarone (3,53%). Outros compostos também estão em processo de identificação, os quais representam 22,19% e 5,50%, respectivamente.

Efeito do Óleo de *P. marginatum* e do Composto Geraniol sobre o Desenvolvimento Embrionário de *S. frugiperda*. A avaliação nos ovos de 0-72h demonstrou que o óleo de *P. marginatum* apresentou uma CL_{30} de 32,32 ppm (27,16 – 38,05) e CL_{50} de 152,95 ppm (132,55 – 176,60), enquanto que o composto geraniol apresentou uma CL_{30} de 0,98 ppm (0,44 – 1,33) e CL_{50} de 3,58 ppm (3,24 – 4,09) (Tabela 2).

Análises em Microscopia de Luz. As análises em microscopia de luz realizadas em cortes semifinos demonstraram que ovos de *S. frugiperda* com 24h após a oviposição apresentaram

casca formada por córion espesso revestindo todo o ovo e apresentando em alguns pontos elevações. Notou-se também a formação do embrião, alongado e diferenciado, podendo ser visualizada a cápsula cefálica, bem como o desenvolvimento do intestino médio, contendo poucos grânulos de vitelo em seu interior. Os grânulos de vitelo também foram visualizados próximo ao embrião em formação, circundando-o no interior do ovo. Estes grânulos se concentravam formando esférulas, denominadas vitelófagos, que consistem de proteínas e lipídios. Delimitando todo o embrião foi verificada a membrana vitelínica (Fig. 1A-B). No período de 72h após oviposição completou-se o desenvolvimento do embrião, no qual encontrava-se bastante comprimido ocupando todo o volume do ovo, apresentando cápsula cefálica e córion bem definidos, além de membrana vitelínica circundando o embrião (Fig. 2A-B).

Após 24h de tratamento com *P. marginatum* na CL₃₀, os ovos apresentaram embrião mal formado, não sendo possível a identificação de órgãos ou apêndices. Verificou-se também córion com rompimento, membrana vitelínica desintegrada em algumas áreas, além de grande concentração de vitelo dispersos nas bordas do ovo (Fig. 1C). No tratamento com *P. marginatum* na CL₅₀, não houve formação do embrião, o córion se manteve desintegrado em algumas áreas, com conteúdo interno desprendido, além da presença de grânulos de vitelo com células amorfas, mas a membrana vitelínica encontrava-se formada e bem delimitada (Fig. 1D).

Nos ovos do tratamento geraniol na CL₃₀, após 24 h, evidenciou-se embrião com desenvolvimento incompleto, sem formação de órgãos, porém observou-se cápsula cefálica. O córion apresentou-se desintegrado em algumas áreas, assim como a membrana vitelínica que se manteve evidente em algumas áreas e em outras não. Evidenciaram-se lipídios distribuídos de forma heterogênea e grânulos de vitelo próximos à borda do ovo (Fig. 1E). Na CL₅₀, no intervalo de tempo de 24h, o conteúdo interno do ovo apresentou-se desprendido do córion, não havendo a formação do embrião, porém a membrana vitelínica encontrava-se evidente em grande parte do

ovo. Evidenciou-se também a presença de grande quantidade de vitelo junto com células amorfas (Fig. 1F).

No tratamento com azadiractina na concentração 0,06 mg/L, após 24h, os ovos mostraram-se com aspecto bem mais preservado, porém com desenvolvimento incompleto do embrião, córion rompido, e grânulos de vitelo muito dispersos, bem como presença de vacúolos (Fig. 1G). Para azadiractina na concentração 0,6 mg/L os ovos não originaram o embrião e apresentaram grânulos de vitelo muito dispersos, além de grande quantidade de lipídios (Fig. 1H).

Os ovos tratados com deltametrina na concentração 0,125 mg/L apresentaram mal formação do embrião, com córion desintegrado em algumas áreas, e com uma grande quantidade de lipídios distribuídos de forma heterogênea (Fig. 1I). Para deltametrina na concentração 12,5 mg/L, após 24h, observou-se também mal formação do embrião, além de uma grande quantidade de vitelo e vacúolos, e a membrana vitelínica desintegrada (Fig. 1J).

Após o intervalo de tempo de 72h de oviposição, comparados com os ovos não tratados (Fig. 2A-B), observou-se que os ovos tratados com *P. marginatum* na CL₃₀, após 72h de tratamento, apresentaram mal formação das células, sem o desenvolvimento do embrião, conteúdo interno desprendido do córion, que se apresentou fino e muitas vezes rompido, além da presença de vacúolos (Fig. 2C). Na CL₅₀ evidenciou-se a presença de diversas células deformadas e vários grânulos espalhados, além da desintegração do córion (Fig. 2D). No tratamento com geraniol na CL₃₀ houve desintegração do córion, não formação do embrião e enormes vacúolos contendo uma pequena quantidade de lipídios (Fig. 2E). Na CL₅₀, não houve formação do embrião, os ovos apresentaram vacúolos e grande quantidade de material amorfo (Fig. 2F).

Os ovos tratados com azadiractina na concentração 0,06 mg/L após 72h, não apresentaram a formação do embrião, os grânulos de vitelo dispuseram-se com células amorfas, e foi possível observar ainda a total desintegração do córion (Fig. 2G). Para azadiractina na concentração 0,6

mg/L não houve formação do embrião, os grânulos de vitelo encontravam-se muito dispersos com presença de vacúolos (Fig. 2H).

No tratamento com deltametrina na concentração 0,125 mg/L, após 72 h, os ovos de *S. frugiperda* apresentaram mal formação do embrião, com células alteradas e deformadas, além de uma enorme quantidade de grânulos de vitelo dispersos (Fig. 2I). Nos ovos tratados com deltametrina na concentração 12,5 mg/L, após 72h, o córion apresentou-se desintegrado, internamente, não originou-se o embrião mas foi possível observar diversos grânulos de vitelo com células amorfas. (Fig. 2J).

Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura. As análises dos ovos em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), no período de tempo de 24h, mostraram que os ovos tanto do controle quanto dos tratamentos não apresentaram diferenças significativas. Portanto serão descritas apenas as observações realizadas no período de 72h. Os ovos do controle apresentaram-se aglomerados em camadas múltiplas, cobertas com material peludo (densa camada de escamas), possuindo formato esférico, sendo ligeiramente achatado nos pólos (tamanho) (Fig. 3). O córion mostrou-se com sulcos, ranhuras e protuberâncias, tornando o ovo esculturado, porém a porção inferior não apresentou o mesmo formato, sendo, portanto, constituído por uma estrutura mais lisa.

Os ovos tratados com *P. marginatum*, geraniol, azadiractina (AzaMax[®]) e deltametrina (Decis[®]), em todas as concentrações estudadas, modificaram a estrutura e morfologia do córion. Fato evidenciado pela observação de ovos deformados, enrugados, “murchos” e muitas vezes com córion rompido, sendo possível observar a formação incompleta e/ou a não formação do embrião, corroborando com os resultados obtidos nas análises em microscopia de luz.

Discussão

Os principais grupos químicos dos compostos identificados no óleo essencial de *P. marginatum* pertencem aos monoterpenos e sesquiterpenos. Os monoterpenos estavam presentes em quantidades maiores, o que diferiram dos resultados obtidos por Autran *et al.* (2009) que encontraram os sesquiterpenos como a maioria dos majoritários. Além disso, a composição do óleo mostrou-se qualitativa e quantitativamente diferente da relatada pelos mesmos autores, os quais encontraram como principais compostos, (Z)-asarone (30,4 %), patchouli alcohol (16 %), elemol (9,7 %), bicychogermacrene (9,4), (E) – caryophyllene (7,5 %), (E) –asarone (6,4 %) e α – arcoradiene (5,1 %). A variabilidade na composição química dos óleos pode ser influenciada por diversos fatores como localização geográfica, época da coleta, temperatura e luminosidade, estágio de desenvolvimento, condições do solo, horário de coleta, entre outros (Morais 2009).

Com relação às análises da microscopia de luz, foi possível constatar que as estruturas verificadas nos ovos de *S. frugiperda* são similares às descritas na literatura para a espécie (Cônoli *et al.* 1999, Correia *et al.* 2013), assim como demonstraram estruturas semelhantes com outras espécies de lepidópteros (Chapman 2013), como em *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Jarjees & Merritt 2004). A estrutura que reveste o ovo, denominada de córion, é uma estrutura espessa, podendo apresentar duas camadas, uma mais interna e outra mais externa. O exocóron é a camada mais espessa, coberta por uma camada mucosa descontínua, enquanto que o endocóron é uma camada mais fina, que contém carboidratos em sua estrutura. Essa camada se situa acima da membrana vitelínica (Cônoli *et al.* 1999). No processo de sucessivas divisões forma-se a blastoderme, onde os núcleos migram para a periferia. No interior do ovo se concentra o vitelo, que é acumulado durante a ovogênese e a embriogênese de insetos holometábolos (Davis & Patel 2002). O vitelo tem como função principal a nutrição do embrião em desenvolvimento (Tojo & Machida 1998). Nos nossos resultados, onde verificamos a embriogênese a partir de 24 h, já foi

possível observar o embrião em formação, não sendo possível verificar a formação da blastoderme, visto que em embriões holometábolos, as divisões iniciais do material genético são bastante rápidas (Foe & Alberts 1983). Circundando o embrião encontra-se uma membrana extraembrionária, a membrana vitelínica, resultante de forças físicas que ocorrem durante a embriogênese (Cônsoli *et al.* 1999).

Os cortes semifinos dos ovos de *S. frugiperda* revelaram que o óleo de *P. marginatum*, o composto geraniol, azadiractina e deltametrina nas concentrações estudadas afetaram o desenvolvimento embrionário, os quais de um modo geral ocasionaram mal ou não formação do embrião, desintegração do córion, desintegração da membrana vitelínica, além de formação de vacúolos, contudo essas alterações tornaram-se mais evidentes no óleo de *P. marginatum* e no geraniol mesmo nas menores concentrações. Ambos os períodos estudados (24 e 72 h) após a oviposição interferiram no desenvolvimento, contudo o período de 72 h em ambas as concentrações estudadas ocasionou maiores interferências negativas impedindo a formação do embrião de *S. frugiperda*. Esses resultados corroboram com os encontrados por Correia *et al.* (2013), os quais verificaram a estrutura interna e o desenvolvimento embrionário de *S. frugiperda* após 0, 24, 48 e 72h de oviposição, tratados com lufenurum, azadiractina e deltametrina.

O gênero *Piper* apresenta vários componentes ativos como alcaloides, amidas, pironas, flavonoides, fenilpropanoides e lignanas, podendo ser utilizadas como agentes de controle de pragas (Souto *et al.* 2012). Autran *et al.* (2009) verificaram que o óleo essencial de folhas e caule de *P. marginatum* exibiu um efeito de inibição de oviposição a 50 e 100 ppm de *Aedes aegypti* (L.), resultando em uma diminuição da oviposição (<50%). A atividade deste óleo sobre a embriogênese demonstra seu uso potencial como inseticida natural. Assim, o isolamento e identificação dos componentes do óleo de *P. marginatum* podem potencializar esse efeito,

levando, inclusive, posteriormente ao desenvolvimento de inseticida com maior seguridade ambiental.

Outros óleos já foram estudados sobre a embriogênese de insetos, como trabalhos realizados por Tunc *et al.* (2000), os quais verificaram que a atividade fumigante do óleo de cominho, *Cuminum cyminum* L. foi 100% ativo contra embriões de *Ephestia kuehniella* Zeller e *Tribolium confusum* Jacquelin du Val. Os óleos essenciais de salsa apresentaram atividade inibitória de incubação nos ovos de *Plodia interpunctella* (Hubner) (74% de inibição a 24 µL/L) (Rafiei-Karahroodi *et al.* 2011). Sousa *et al.* (2015) mostraram que os óleos de *Anethum graveolens* L. e *C. cyminum*, além dos compostos carvona e cuminalde causaram dessecação nos ovos, bem como penetraram a casca do ovo, a micrópila e/ou aerópilas e atingiu o embrião alterando seu desenvolvimento.

O composto geraniol, que nesse estudo em todas as concentrações afetou a embriogênese de *S. frugiperda*, assim como os principais constituintes do óleo de *P. marginatum* também é um monoterpene importante que ocorre em diversos óleos essenciais de plantas aromáticas. É encontrado nos óleos de *C. winterianus* (Rajeswara Rao *et al.* 2004, Silva *et al.* 2016), no óleo de *O. gratissimum* (Cruz *et al.* 2016), entre outros. É conhecido por possuir propriedades inseticidas e repelentes e usado como um agente no controle de pragas exibindo baixa toxicidade ao meio ambiente (Chen & Viljoen 2010).

A azadiractina é um exemplo notável de um produto químico natural de origem vegetal com capacidade de modificar o comportamento dos insetos e várias funções fisiológicas. Este terpenoide tem sido descrito por sua ação reguladora do crescimento, podendo interromper a muda e a metamorfose e bloquear a reprodução em várias espécies (Isman & Akhtar 2007).

Assim como as análises de microscopia de luz as análises em microscopia eletrônica de varredura revelaram que o óleo de *P. marginatum*, geraniol, azadiractina e deltametrina também

alteraram a morfologia dos ovos de *S. frugiperda*, modificando a estrutura do córion tornando-os inviáveis. As análises também demonstram que os ovos de *S. frugiperda* possuem características inerentes à espécie, apresentando forma esférica, presença de escamas recobrimdo os ovos e superfície escultural. Todas essas peculiaridades que foram observadas nesse estudo através das análises em MEV concordam com os estudos de Cònsoli *et al.* 1999. As escamas identificadas em todas as massas de ovos de *S. frugiperda* de todos os tratamentos são comuns em várias famílias como em Noctuidae, Lymantriidae, Arctiidae, Geometriidae, entre outras, e estão relacionadas como uma barreira física contra predadores e parasitoides, condições climáticas, redução do risco de dessecação, entre outros (Rodriguez *et al.* 2004).

Assim é possível concluir que todas as substâncias utilizadas nesta pesquisa ocasionam danos no desenvolvimento embrionário de *S. frugiperda*, contudo o óleo e o composto apresentaram-se mais promissores por ocasionar danos mais expressivos mesmo nas concentrações menores, podendo ser utilizado no controle desta praga por se adequar aos princípios adotados pelo manejo integrado de praga, devido a algumas características como baixa persistência e maior segurança ambiental. Além de apresentar eficiência diretamente relacionada à reprodução, que na maioria dos casos, é uma das principais estratégias de rápido estabelecimento de uma praga dentro da cultura.

Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa. Ao DEPA-UFRPE (Departamento de Agronomia) pela realização dos bioensaios. Ao DQF – UFPE (Departamento de Química Fundamental) pela extração e identificação de *P. marginatum*. E ao LIKA-UFPE (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami) pela realização das análises microscópicas de luz e eletrônica de varredura.

Literatura Citada

- Adams, R.P. 2009.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, IL, Allured Publishing Co, 469p.
- Alves, T.J.S., G.S. Cruz, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, C.A.G. Câmara & F.M. Cunha. 2013.** Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. Biotech. Histochem. 11: 1-11.
- Autran, E.S., I.A. Neves, C.S.B. da Silva, G.K.N. Santos, C.A.G. da Câmara & D.M.A.F. 2009.** Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Biores Technol. 100: 2284-2288.
- Beserra, E.B., C.T.S. Dias & J.R.P. Parra. 2002.** Distribution and natural parasitism of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs at different phenological stages of corn. Fl. Entomol. 85: 588-593.
- Busato, G.R., M.S. Garcia, A.E. Loeck, M. Zart, A.M. Nunes, O. Bernardi & F.S. Andersson. 2006.** Adequação de uma dieta artificial para os biótipos “milho” e “arroz” de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Bragantia 65: 317-323.
- Candan, S., Z. Suludere & F. Bayrakdar. 2008.** Surface morphology of eggs of *Euproctis chrysorrhoea* (Linnaeus, 1758). Acta Zool-Stockholm 89: 133-136.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Chen, W. & A.M. Viljoen. 2010.** Geraniol – A review of commercially important fragrance material. South Afr. J. Bot. 76: 643-651.
- Cônsoli, F.L., E.W. Kitajima & J.R.P. Parra. 1999.** Ultrastructure of the natural and factitious host eggs of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 28: 211-229.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2009.** Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. Neotrop. Entomol. 38: 83-91.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, G.G.A. Gonçalves, M.G.S. Cavalcanti, F.A. Brayner & L.C. Alves. 2013.** Microscopic analyses of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) embryonic development before and after treatment with azadirachtin, lufenuron, and deltamethrin. J. Econ. Entomol. 106: 747-755.

- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, M.O. Breda, T.J.S. Alves, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, K.A. Dutra & D.M.A.F. Navarro. 2014.** Biactivity of *Piper hispidinervum* (Piperales: Piperaceae) and *Syzygium aromaticum* (Myrtales: Myrtaceae) oils, with or without formulated Bt on the biology and immunology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 107: 144-153.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.S.C. Lopes, D.R.S. Barbosa, M.O. Breda, K.A. Dutra, C.A. Guedes, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Sublethal effects of essential oils from *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 109: 660-666.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D'assunção, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa & M.O. Breda. 2017.** Effect of trans-anethole, limonene and your combination in nutritional componentes and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Biol. Interact.* 263: 74-80.
- Davis, G.K. & N.H. Patel. 2002.** Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 669-699.
- Foe, V.E. & B.M. Alberts. 1983.** Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J. Cell. Sci.* 61: 31-70.
- Isman, M.B. & Y. Akhtar. 2007.** Plant natural products as a source for developing environmentally acceptable insecticides. p. 235-248. In I. Ishaaya, R. Nauen & A.R. Horowitz. (eds.). *Insecticides design using advanced technologies*. Berlin, Springer-Verlag, 314p.
- Jarjees, E.A. & D.J. Merritt. 2004.** The effect of parasitization by *Trichogramma australicum* on *Helicoverpa armigera* host eggs and embryos. *J. Invertebr. Pathol.* 85: 1-8.
- Kawaguchi, Y., M. Ichida, T. Kusakabe & K. Koga. 2000.** Chorion morphology of the Eri-silkworm, *Samia Cynthia ricini* (Donovan) (Lepidoptera: Saturniidae). *Appl. Entomol. Zool.* 35: 427-434.
- Knaak, N., M.S. Tagliari & L.M. Fiuza. 2010.** Histopatologia da interação de *Bacillus thuringiensis* e extratos vegetais no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Arq. Inst. Biol.* 77:83-89.
- Morais, L.A.S. 2009.** Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hortic. Bras.* 27: 4050-4063.
- Pires, L.M., E.J. Marques, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teieira, L.C. Alves & E.S. B. Alves. 2009.** Ultrastructure of *Tuta absoluta* parasitized eggs and the reproductive potential of females after parasitism by *Metarhizium anisopliae*. *Micron* 40: 255-261.

- Prajapati, V., A.K. Tripathi, K.K. Aggarwal & S.P.S. Khanuja. 2005.** Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technol.* 96: 1749-1757.
- Rafiei-Karahroodi, Z., S. Moharramipour, H. Faramand & J. Karimadeh-Esfahani. 2011.** Insecticidal effect of six native, medicinal plants essential oil on Indian meal moth *Plodia interpunctella* Hübner (Lep.: Pyralidae). *Mun. Ent. Zool.* 6: 339-345.
- Rajeswara Rao, B.R., A.K. Bhattacharya, G.R. Mallavarapu & S. Ramesh. 2004.** Yellowing and crinkling disease and its impact on the yield and composition of the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). *Flavour. Frag. J.* 19: 344-350.
- Rodriguez, J., J.V. Hernández, L. Fornés, U. Lundberg, C.L.A. Piñango & F. Osborn. 2004.** External morphology of abdominal setae from male and female *Hlesia metabus* adults (Lepidoptera: Saturniidae) and their function. *Florida Entomol.* 87: 30-36.
- Santos, G.K.N., K.A. Dutra, R.A. Barros, C.A.G. Câmara, D.D. Lira, N.B. Gusmão & D.M.A.F. Navarro. 2012.** Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. *Ind. Crops Prod.* 40, 254–260.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schmidt, F.B. 2002.** Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron na cultura do milho. Piracicaba, Dissertação de Mestrado. ESALQ/USP, 63p.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1979) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. *Acta Histochem.* 118: 347-352.
- Skudlik, J., I. Poprawa & M.M. Rost. 2005.** The egg capsule of *Spodoptera exigua* Hubner, 1808 (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae): Morphology and ultrastructure. *Zool. Poloniae.* 50: 25-31.
- Souto, R.N., A.Y. Harada, E.H. Andrade & J.G. Maia. 2012.** Insecticidal activity of *Piper* essential oils from the Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop. Entomol.* 41: 510-517.
- Sousa, R.M.O.F., J.S. Rosa, L. Oliveira, A. Cunha & M. Fernandes-Ferreira. 2015.** Activities of Apiaceae essential oils and volatile compounds on hatchability, development, reproduction and nutrition of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ind. Crops Prod.* 63: 226-237.

- Srivastava, A.K. & K. Kumar. 2016.** Ultrastructure of egg chorion of castor butterfly *Ariadne merione* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae). Zool. Anz. 263: 1-5.
- Tojo, K. & R. Machida. 1998.** Early embryonic development of the mayfly *Ephemera japonica* McLachlan (Insecta: Ephemeroptera, Ephemeridae). J. Morphol. 238: 327-335.
- Tunç, I., B.M. Berger, F. Erler & F. Dagli. 2000.** Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored product insects. J. Stored Product Res. 36: 161-168.
- Trougakos, L.P. & L.H. Margaritis. 2003.** Novel morphological and physiological aspects of insect eggs. In M. Hilker & T. Meinert, (eds.), Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, Online library.
- Van Den Dool, H. & P.D.J.A. Kratz. 1963.** Generalization of the retention index system include linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J. Chromatogr. 11: 464-471.

Tabela 1. Identificação dos compostos do óleo essencial das folhas de *Piper marginatum*.

Número	Compostos ¹	Índices de retenção		Área (% do total ± σ)
		Calculado ²	Literatura ³	
1	α -Thujene	924	924	0,12±0,01
2	α -Pinene	930	932	8,45±1,05
3	Camphene	944	946	0,13±0,02
4	Sabinene	970	969	0,09±0,06
5	β -Pinene	973	974	6,51±0,69
6	Myrcene	990	988	1,36±0,16
7	α -Phellandrene	1002	1002	6,97±0,82
8	Carene < δ -3>	1008	1008	0,57±0,07
9	α -Terpinene	1014	1014	2,33±0,27
10	o-Cymene	1023	1022	0,95±0,11
11	Limonene	1026	1024	4,98±0,59
12	<(Z)- β -> Ocimene	1038	1032	0,69± 0,06
13	<(E)- β -> Ocimene	1048	1044	2,69±0,30
14	γ -Terpinene	1057	1054	0,09±0,02
15	Terpinolene	1087	1086	0,32±0,04
16	Metyl butyl isovalerate <2->	1109	1103	0,07±0,05
17	δ -Elemene	1338	1335	2,57±0,06
18	α -Copaene	1376	1374	1,00±0,04
19	β - Bourbonene	1385	1387	0,14±0,01
20	β -elemene	1392	1389	1,21±0,03
21	<(E)> Caryophyllene	1420	1417	5,71±0,16
22	Myrtal-4(12)-ene	1444	1445	0,25±0,01
23	α -Humulene	1455	1452	0,26±0,01
24	Croweacin	1461	1457	0,94±0,11
25	Ishwarane	1464	1465	1,93±0,07
26	α -Macrocarpene	1474	1470	0,13±0,03
27	γ -Muuroolene	1482	1478	0,09±0,03
28	β -Selinene	1487	1489	0,31±0,07
29	<(Z)- β -> Guaiene	1494	1492	0,38±0,06
30	Bicyclogermacrene	1498	1500	0,26±0,05
31	δ -Cadinene	1525	1522	0,25±0,06
32	Elemol	1550	1548	1,34±0,12
33	<(E)>-Nerolidol	1564	1561	1,53±0,12
34	γ -Asarone	1576	1572	0,38±0,03
35	Spathulenol	1579	1577	0,11±0,01
36	Caryophyllen oxide	1585	1582	0,14±0,02
37	Guaiol	1599	1600	0,49±0,04
38	<(Z)>-Asarone	1623	1616	2,55±1,02
39	CNI	1628		5,50±0,17
40	β -Eudesmol	1652	1649	0,05±0,03
41	Exalatacin	1659	1655	9,12±0,90

Tabela 1. Continuação				
42	Bulnesol	1670	1670	0,08±0,01
43	<(E)>-Asarone	1682	1675	3,53±0,34
44	CNI	1718		22,19±2,14
	Monoterpeno			36,25%
	Monoterpeno Oxigenado			0,07%
	Sesquiterpeno			14,49%
	Sesquiterpeno oxigenado			6,29%
	Fenilpropanoide			13,97%
	Composto não identificado (CNI)			27,69%
	Total identificado			71,07%
	Total			98,66%

¹ Constituintes listados em ordem de eluição na coluna apolar DB-5, detector GC-FID;

² Índices de retenção de Kratz calculados através dos tempos de retenção em relação aos da série de n-alcenos (C₈-C₂₅);

³ Índices de retenção de Kratz descritos na literatura (Adams, 2009).

Tabela 2. Curva concentração-mortalidade de ovos de *Spodoptera frugiperda* do óleo essencial de *Piper marginatum* e do composto geraniol. Temperatura: $25,2 \pm 1,4$ °C. RH: $67 \pm 0,7$ % e fotofase de 12 h.

Tratamentos	N ¹	GL ₂	Inclinação (±EP)	CL ₃₀ (IC 95%) ³	(RT ₃₀) ₄	CL ₅₀ (IC 95%) ³	(RT ₅₀) ₄	(χ^2) ⁵
<i>Piper marginatum</i>	500	5	0,06±0,02	32,32 (27,16 – 38,05)	-	152,95 (132,55 – 176,60)	-	6,44
Geraniol	500	5	0,04±0,01	0,98 (0,44 – 1,33)	32,98	3,58 (3,24 -4,09)	42,72	4,75

¹Número de ovos por tratamento. ²Grau de liberdade. ³Concentração letal 30/50. ⁴Razão de toxicidade. ⁵Qui-quadrado.

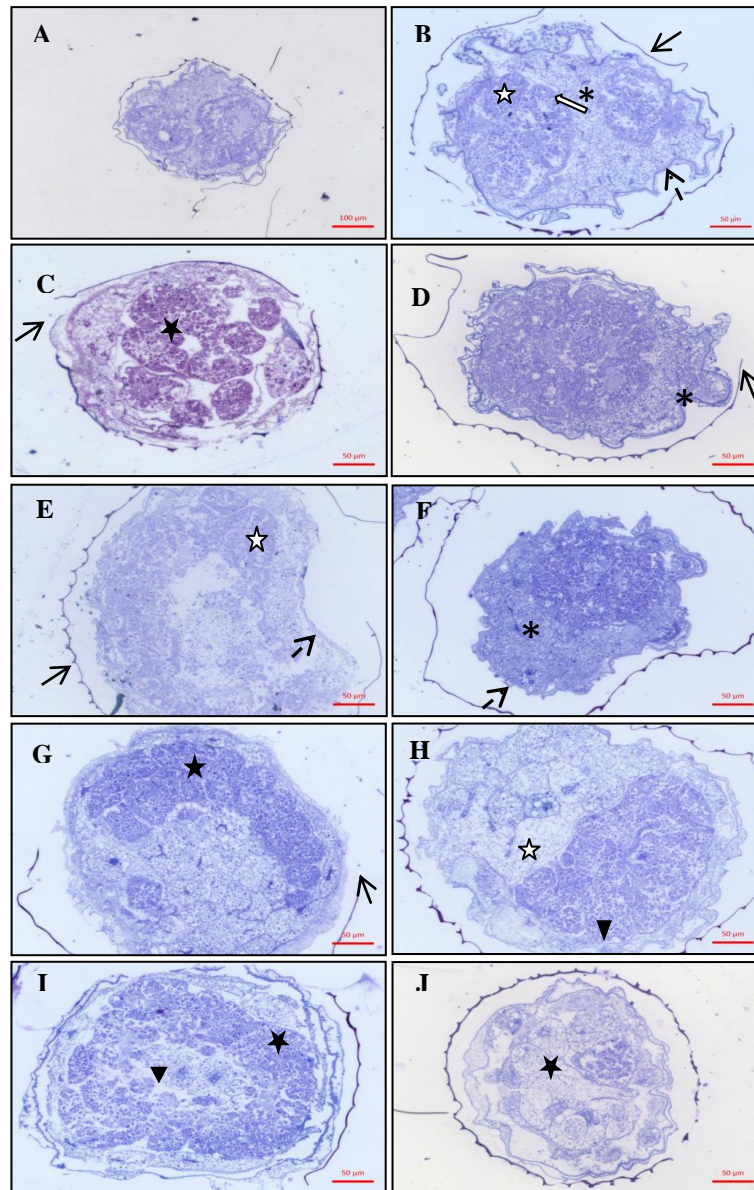


Figura 1. Ovos de *Spodoptera frugiperda* no intervalo de tempo de 24 h após tratamento. (A) Controle 24 h. (B) Controle 24 h (detalhe). Observar córion (seta), vitelófagos distribuídos (asterisco), cápsula cefálica (estrela aberta), intestino médio (seta aberta) e membrana vitelínica (seta traçada). (C) Tratamento com *Piper marginatum* CL₃₀. Observar embrião mal formado (estrela fechada) e córion rompido (seta) (D) Tratamento com *Piper marginatum* CL₅₀. Observar córion rompido (seta) e grânulos de vitelo dispersos com células amorfas (asterisco). (E) Tratamento com geraniol CL₃₀. Observar cápsula cefálica (estrela), córion (seta), membrana vitelínica (seta traçada) e lipídios (cabeça de seta). (F) Tratamento com geraniol CL₅₀. Observar membrana vitelínica definida (seta traçada) e vitelo com células amorfas (asterisco). (G) Tratamento com azadiractina (AzaMax[®] 0,06 mg/L). Observar embrião mal formado (estrela fechada) e córion rompido (seta) (H) Tratamento com azadiractina (AzaMax[®] 0,6 mg/L). Observar grânulos de vitelo (asterisco) e lipídios (cabeça de seta). (I) Tratamento com deltametrina (Decis[®] 1,25 mg/L). Observar embrião mal formado (estrela fechada) e lipídios (cabeça de seta). (J) Tratamento com deltametrina (Decis[®] 12,5 mg/L). Observar embrião mal formado (estrela fechada). Corante: Azul de Toluidina.

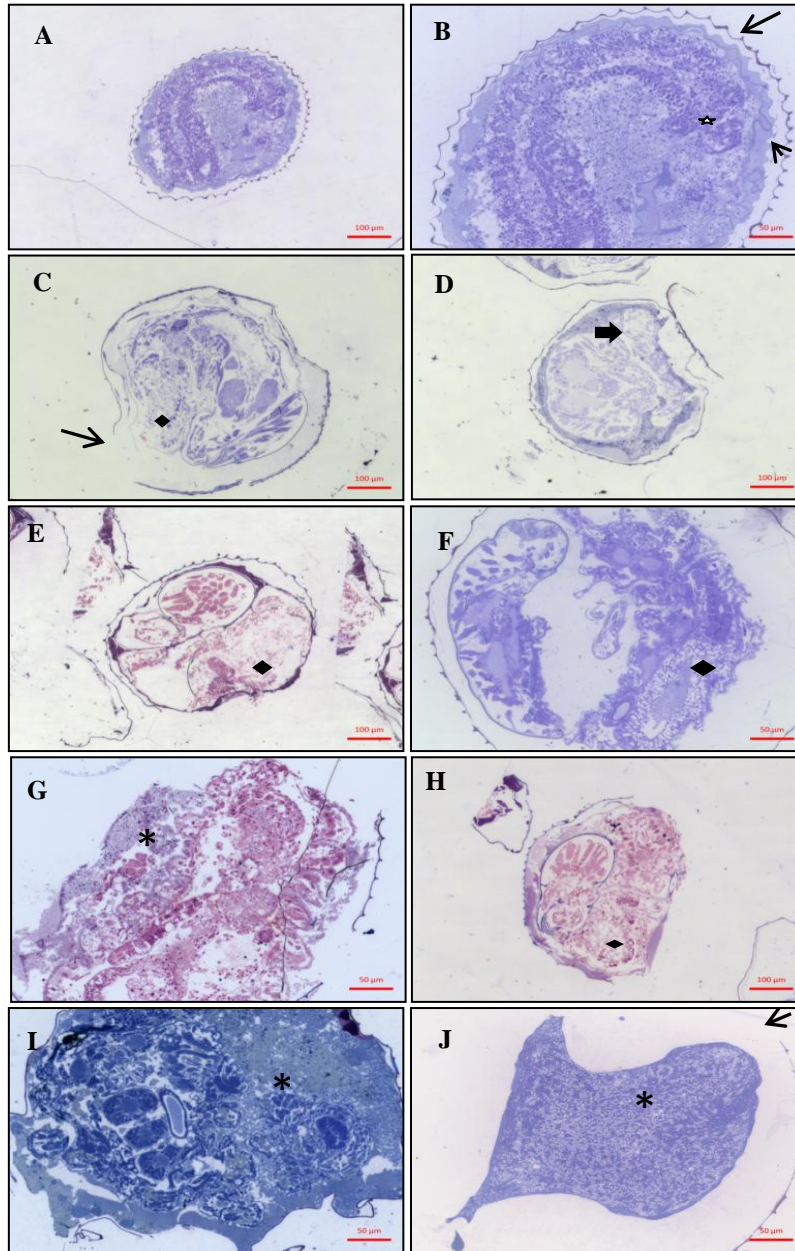


Figura 2. Ovos de *Spodoptera frugiperda* no intervalo de tempo de 72 h após tratamento. (A) Tratamento controle 72 h. (B) Tratamento controle 72 h (detalhe). Observar córion (seta), cápsula cefálica (estrela) e membrana vitelínica (seta traçada) (C) Tratamento com *Piper marginatum* CL₃₀. Observar vacúolos (losango) e córion desintegrado (seta). (D) Tratamento com *Piper marginatum* CL₅₀. Observar presença de células deformadas (seta fechada). (E) Tratamento com geraniol CL₃₀. Observar vacúolos (losango) (F) Tratamento com geraniol CL₅₀. Observar vacúolos (losango). (G) Tratamento com azadiractina (AzaMax[®] 0,06 mg/L). Observar grânulos de vitelo com células amorfas (asterisco). (H) Tratamento com azadiractina (AzaMax[®] 0,6 mg/L). Observar vacúolos (losango). (I) Tratamento com deltametrina (Decis[®] 1,25 mg/L). Observar grânulos de vitelo com células deformadas (asterisco). (J) Tratamento com deltametrina (Decis[®] 12,5 mg/L). Observar córion desintegrado (seta) e grânulos de vitelo com células amorfas (asterisco). Corante: Azul de Toluidina.

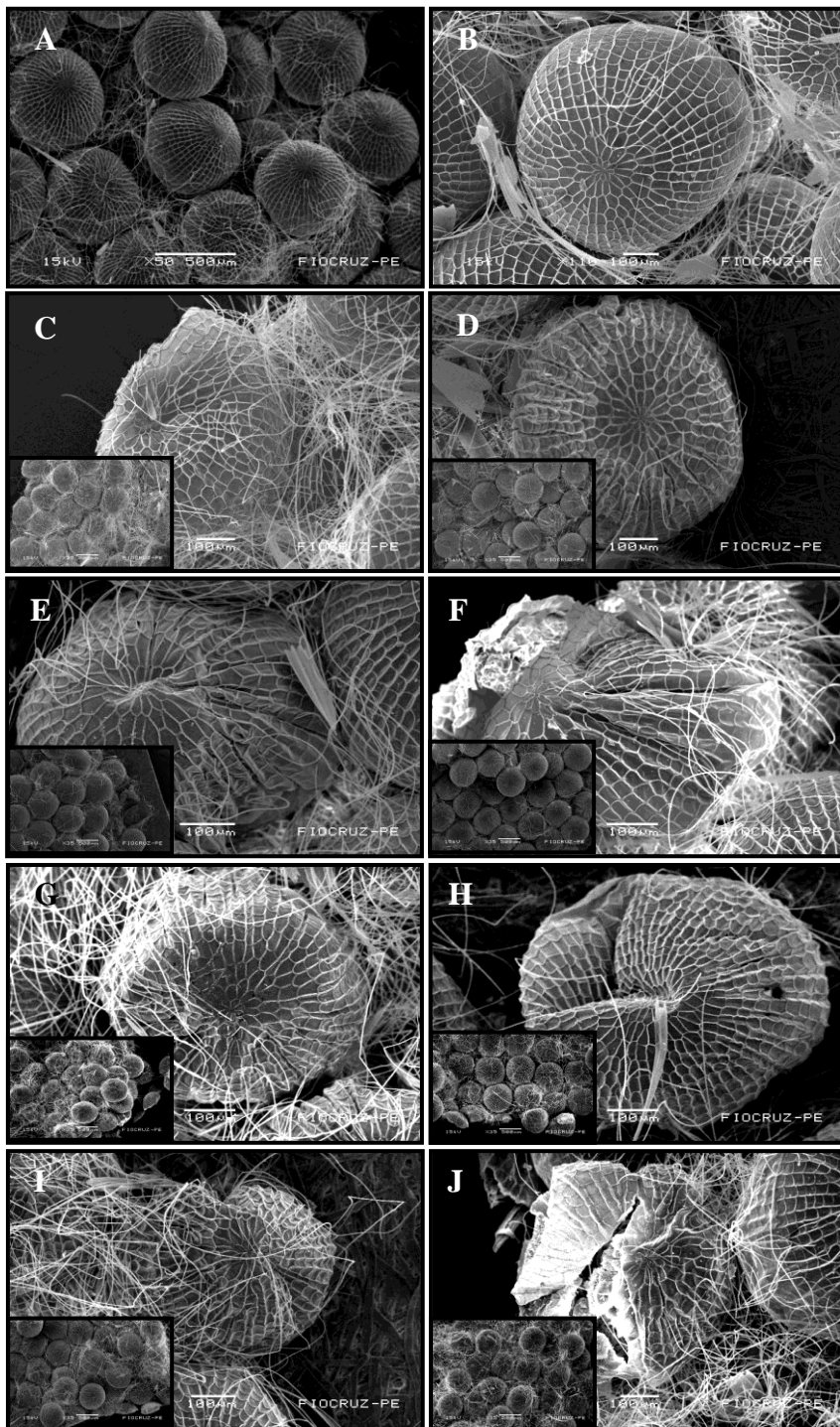


Figura 3. Imagens de MEV das posturas e ovos de *Spodoptera frugiperda* no intervalo de tempo de 72 h após oviposição e tratamento. (A) Controle. (B) Ovo isolado Controle. (C) Tratamento com *Piper marginatum* CL₃₀. (D) Tratamento com *Piper marginatum* CL₅₀. (E) Tratamento com geraniol CL₃₀. (F) Tratamento com geraniol CL₅₀. (G) Tratamento com azadiractina (AzaMax[®] 0,06 mg/L). (H) Tratamento com azadiractina (AzaMax[®] 0,6 mg/L). (I) Tratamento com deltametrina (Decis[®] 1,25 mg/L). (J) Tratamento com deltametrina (Decis[®] 12,5 mg/L).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos com a crescente preocupação ambiental, os estudos tem se concentrado na descoberta de métodos que não agridam ao meio ambiente. Por conseguinte, há uma vasta literatura com a utilização de óleos essenciais e os seus constituintes, devido à sua alta volatilidade e o seu baixo risco para o ambiente, quando comparados aos inseticidas sintéticos, com o propósito de obter novos produtos para o controle de pragas. Populações de insetos benéficos podem ser menos afetadas devido à sua atividade residual mínima, bem como a resistência pode ser retardada devido à complexas misturas de constituintes que muitos óleos apresentam.

As discussões apresentadas durante o presente estudo sobre a utilização de produtos à base de óleos essenciais de plantas ou seus constituintes demonstraram que o óleo de *P. marginatum* e os compostos limoneno, trans-anethole, geraniol e citronelal são eficazes no controle de *S. frugiperda*. Esses produtos podem ser utilizados em uma variedade de maneiras, seja através de doses / concentrações subletais, via tópica, ingestão, além de imersão. A eficácia desses produtos pode ser equivalente ou até superior aos produtos convencionais.