

AVALIAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIPERACEAE SOBRE A TOXICIDADE E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS EM *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E EFEITO SINERGISTA DOS SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS

por

KAMILLA DE ANDRADE DUTRA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE)

RESUMO

A pesquisa objetivou: (i) obtenção e identificação dos óleos essenciais das espécies de *Piper corcovadensis*, *Piper marginatum* e *Piper arboreum*, avaliação da toxicidade por contato tópico em lagartas de *Spodoptera frugiperda*, além da influência das doses letais e subletais (DL₃₀₋₅₀₋₇₀) sobre parâmetros nutricionais; (ii) investigar o efeito da DL₅₀, após o tempo de exposição de 48h sobre a histologia, morfometria, histoquímica e imunohistoquímica do intestino médio e corpo gorduroso e (iii) verificar a toxicidade dos compostos α -pineno, β -pineno, α -felandreno, terpinoleno e E-cariofileno suas misturas binárias e efeito sinérgico. Nos óleos das folhas frescas obtidos por hidrodestilação foram identificados 85 compostos por CG-EM, o E-cariofileno foi o componente majoritário em comum às três espécies. *P. corcovadensis* apresentou melhor rendimento (0,232±0,01%), menores DL₅₀(3,58 mg/g) e DL₉₀(6,34mg/g), maiores razões de toxicidade DL₅₀(3,04) e DL₉₀(8,64), além de alterar as quantidades de proteína, glicogênio e açúcar total nas doses subletal (DL₃₀) e letais (DL₅₀₋₇₀). Os óleos essenciais promoveram alterações deletérias no intestino médio das lagartas de *S. frugiperda*, sendo o óleo de *P. corcovadensis* o que proporcionou maior toxicidade, promovendo alterações histopatológicas, redução na quantidade de carboidratos no intestino médio, aumento do índice apoptótico (25%) e

menor proliferação celular, diferente do *P. arborerum*, que apesar de ocasionar alterações histopatológicas semelhantes a *P. corcovadensis*, apresentou maior índice de proliferação celular e aumento das células regenerativas, indicando regeneração acelerada do epitélio. As misturas binárias assumiram o modelo de Probit com valores de DL₅₀ e DL₉₀ variando de 1,66 a 7,75mg/g e 12,78 a 62,98mg/g, respectivamente. Misturas binárias com o terpinoleno apresentaram sinergismo, destacando-se o terpinoleno+ β -pineno que além do efeito sinérgico, apresentou alta toxicidade. A combinação do α -felandreno+E-cariofileno apresentou efeito antagonista e o β -pineno+E-cariofileno apresentou efeito aditivo. Essas observações oportunam a investigação dos efeitos potenciais que os óleos essenciais podem ocasionar em insetos-praga.

PALAVRAS-CHAVE: *Piper*, monoterpenos, sesquiterpenos, imunohistoquímica, bioquímica, fator de co-toxicidade, lagarta-do-cartucho, sistema digestivo.

EVALUATION OF PIPERACEAE ESSENTIAL OILS ON TOXICITY AND
PHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) AND THE SYNERGISTIC EFFECT OF ITS MAJORITY COMPONENTS

by

KAMILLA DE ANDRADE DUTRA

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

ABSTRACT

The objective of this research was: (i) to obtain and identify the essential oils of *Piper corcovadensis*, *Piper marginatum* and *Piper arboreum*, and evaluation of topical contact toxicity in *Spodoptera frugiperda*, in addition to the influence of lethal and sublethal doses ($LD_{30-50-70}$) on nutritional parameters; (ii) to investigate effect of LD_{50} after exposure time of 48h on histology, morphometry, histochemistry and immunohistochemistry of the midgut and fat body and (iii) to verify toxicity of α -pinene, β -pinene, α - phellandrene, terpinolene and E-caryophyllene their binary mixtures and synergistic effect. In fresh leaf oils were obtained by hydrodistillation. 85 compounds were identified by GC-ME, and E-caryophyllene the major component common to all three species. *P. corcovadensis* presented a better yield ($0.232\pm 0.01\%$), lower LD_{50} (3.58 mg/g) and DL_{90} (6.34 mg/g), higher toxicity ratios for LD_{50} (3.04) and LD_{90} (8.64), besides altering the amounts of protein, glycogen and total sugar in sublethal (LD_{30}) and lethal (LD_{50-70}) doses. The essential oils promoted deleterious alterations in the midgut of *S. frugiperda*, being *P. corcovadensis* provided the increased toxicity, promoting histopathological changes, a reduction in the number of carbohydrates in the midgut, an increase in the apoptotic index (25%) and lower cellular proliferation, different from *P. arborerum*, which, despite causing similar

histopathological alterations to *P. corcovadensis*, presented a higher rate of cell proliferation and increase of regenerative cells, indicating a more rapid regeneration of the epithelium. The binary mixtures would assume Probit model with values of LD₅₀ and LD₉₀ ranging from 1.66 to 7.75mg/g of insect and 12.78 to 62.98mg/g of insect, respectively. Binary mixtures with terpinolene showed synergism, especially terpinolene+ β -pinene which, in addition to the synergic effect, showed a higher toxicity. The combination of α -phellandrene+E-caryophyllene had an antagonistic effect and β -pinene+E-caryophyllene had an additive effect. These observations warrant investigation of the potential effects that essential oils may have on pest insects.

KEY WORDS: *Piper*, monoterpenes, sesquiterpenes, immunohistochemistry, biochemistry, co-toxicity factor, fall armyworm, digestive system.

AVALIAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIPERACEAE SOBRE A TOXICIDADE E
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS EM *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) E EFEITO SINERGISTA DOS SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS

por

KAMILLA DE ANDRADE DUTRA

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 – 2018

AVALIAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIPERACEAE SOBRE A TOXICIDADE E
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS EM *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) E EFEITO SINERGISTA DOS SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS

por

KAMILLA DE ANDRADE DUTRA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro – UFPE

AVALIAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIPERACEAE SOBRE A TOXICIDADE E
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS EM *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) E EFEITO SINERGISTA DOS SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS

por

KAMILLA DE ANDRADE DUTRA

Orientador: _____
Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Examinadores: _____
Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro – UFPE

Emmanuel Viana Pontual – UFRPE

Glaucilane dos Santos Cruz – PNPd/CAPES

Aos meus pais,
Risaldo Guerra Dutra e Mauricéa de Andrade Dutra,
A minha irmã,
Priscila Amanda de Andrade Dutra
Ao meu sobrinho,
João Pedro de Andrade Dutra da Silva,
Com muito amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque tudo posso naquele que me fortalece.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola pela minha formação acadêmica.

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 paciência, dedicação e confiança, por ter aberto as portas do Laboratório de Fisiologia de Insetos e hoje fazer parte da minha formação acadêmica.

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

A minha Co-orientadora, Prof^a Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro pela inestimável confiança desde a minha iniciação científica, pelo entusiasmo no laboratório e por mostrar sempre o lado positivo nos trabalhos e por me tornar a profissional que sou hoje, e quanto a isso não tenho palavras para descrever minha gratidão.

Ao Prof. José Vargas de Oliveira, e o eterno Laboratório de Entomologia Agrícola, Alberto Belo, Alice Maria, Alicely Araújo, Cynara Moura, Douglas Barbosa, Fabiana Cariri, Kelly, Mariana Breda, Mauricéa Fidelis, Nívea Maria, Sérgio Monteze e Solange França por compartilharem momentos inesquecíveis da minha formação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA) por todos os ensinamentos entomológicos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de insetos, Aline Cristina, Jefferson Souza, Maria Clara, Matheus Rocha e Victor Moura.

A todos do Laboratório de Histologia em especial Carolline Guimarães e Cíntia Giselle por me guiarem sempre com muita paciência nas realizações das imunohistoquímicas, muitíssimo obrigada.

Aos meus amigos Andrezo Adenilton e Hilton Nobre por todo conhecimento científico discutidos em um momento e outro no laboratório e por compartilharem momentos inesquecíveis de alegria, tornando o dia-a-dia no laboratório mais leve. As minhas amigas, Carolina Guedes, Cristiane Thalita e Glaucilane Cruz não só pela ajuda no desenvolvimento da minha pesquisa, mas também por toda convivência e vínculo de amizade construída. Sou só grato por vocês estarem comigo.

Ao Laboratório de Ecologia Química por fazer parte da minha formação acadêmica, e a todos os seus integrantes em especial Marcelo Silva pela ajuda nos isolamentos dos compostos.

Ao Jardim Botânico do Recife em nome de Amanda Lins Bispo Monteiro e Afonso Cordeiro Agra pelas coletas e concessão das espécies de *Piper* usados no trabalho.

As minhas amigas Aline Nascimento, Camila Soledade, Paloma Barreto e Patrícia Bezerra pelo carinho e compreensão nos momentos de estresse, por saber sorrir e mostrar o lado positivo. E ao amigo Lucas Arruda pelas vibrações positivas. As amigas Bheatriz Nunes, Fernanda Freitas, Geanne Novais, Rayane dos Santos e Suyana Karoline, com vocês tenho as melhores lembranças do Laboratório de Ecologia Química.

A minha amiga Vaneska Barbosa por compartilhar não só todos os momentos da nossa formação acadêmica, mas também pelo apoio emocional e espiritual, por sempre sorrir e enxugar as lágrimas juntas.

Aos amigos de turma, em especial Elaine Cristna e Franciele Santos pelo companheirismo e momentos alegres na pós-graduação.

Aos funcionários da Universidade Federal Rural de Pernambuco Marcello Medeiros, Darci Martins Correia da Silva e José Romildo Nunes pela competência e eficiência na prestação de serviços. Em especial Rejane Quirino por sempre ter um sorriso pra gente e ser tão receptiva.

Aos meus pais Risaldo G. Dutra e Mauricéa de A. Dutra por todo amor do mundo, carinho e compreensão. Por apoiarem sempre a minha formação.

A minha irmã Priscila A. de A. Dutra com amor, pelo companheirismo e me apoiar nos estudos e ao meu sobrinho João P. de A. D. da Silva com muito amor, carinho e alegria.

A José Milton Torres Neto, pelo companheirismo e por ser importante no meu crescimento pessoal e acreditando nas minhas decisões de estudo.

Enfim, a todos que de qualquer forma contribuíram para a realização deste trabalho e a confiança da sua conclusão, bem como parte de um ciclo, deixo aqui o meu muitíssimo obrigada!

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	11
2 TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO GÊNERO <i>Piper</i> COM INFLUÊNCIA NOS PARÂMETROS NUTRICIONAIS DE <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	22
RESUMO	23
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	34
CONCLUSÃO	40
AGRADECIMENTOS.....	40
LITERATURA CITADA.....	41
3 ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DO INTESTINO MÉDIO E CORPO GORDUROSO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FRENTE A ÓLEOS ESSENCIAS DO GÊNERO DE <i>Piper</i>	57

RESUMO	58
ABSTRACT	59
INTRODUÇÃO	60
MATERIAL E MÉTODOS	62
RESULTADOS	68
DISCUSSÃO.....	72
CONCLUSÃO	76
AGRADECIMENTOS.....	77
LITERATURA CITADA.....	77
4 TOXICIDADE E EFEITO SINÉRGICO DE TERPENOS EM <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	96
RESUMO	97
ABSTRACT	98
INTRODUÇÃO	99
MATERIAL E MÉTODOS	100
RESULTADOS	103
DISCUSSÃO.....	104
CONCLUSÃO	107
AGRADECIMENTOS.....	107
LITERATURA CITADA.....	107
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	113

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

É evidente o destaque que os óleos essenciais têm ganhado em pesquisas na área de controle de pragas frente a artrópodes de importância agrícola como ácaros e insetos devido a sua propriedade toxicológica, sendo classificados como inseticidas botânicos desde a década de 1980 (Regnault-Roger 1997, Madbouly *et al.* 2015, Preedy 2015).

O sucesso das pesquisas com os óleos essenciais e seus componentes não está necessariamente ligada à mortalidade apenas, também estão inseridos os efeitos subletais na biologia e comportamento com redução e inibição do desenvolvimento, alimentação e reprodução; além de promoverem repelência e deterrência (Cruz *et al.* 2014, Haddi *et al.* 2015, Ribeiro *et al.* 2015, Cruz *et al.* 2016). Não esquecendo as alterações fisiológicas que estão envolvidas para alcançar a toxicidade, com ação deletéria na morfologia de células e tecidos, interferências no sistema imunológico, além da desregulação de parâmetros bioquímicos nutricionais essenciais aos insetos (Zamari *et al.* 2011, Alves *et al.* 2013, Cruz *et al.* 2015, Silva *et al.* 2016, Cruz *et al.* 2017) que podem desfavorece a sua permanência no ambiente. Outro ponto relevante é a administração desses óleos essenciais que pode ser, por fumigação, ingestão e absorção pelo tegumento (Regnault-Roger 1997, Corrêa & Salgado 2011, Colpo *et al.* 2014, Dutra *et al.* 2016).

Uma das características mais atraentes dos óleos essenciais é que eles são, em geral, produtos de baixo risco a contaminação ambiental. A utilização desses derivados de plantas como alternativa para o controle de insetos tem sido impulsionada também pela baixa toxicidade aos mamíferos sendo relativamente bem estudados experimental e clinicamente devido à sua

utilização como medicamentos, além do fato de serem biodegradáveis, evitando a contaminação do meio ambiente, em contraste aos inseticidas sintéticos (Regnault-Roger *et al.* 2012, Madbouly *et al.* 2015, Preedy 2015).

A mistura complexa de componentes nos óleos essenciais permite que estes apresentem baixa especificidade com relação às atividades metabólicas nos insetos, uma vez que a grande variedade dos grupos químicos orgânicos presentes permite que haja vários alvos na célula, os óleos essenciais são bons penetrantes que aumentam sua própria biodisponibilidade e a de produtos co-administrados, estas propriedades estão relacionadas com a ruptura da bicamada lipídica das células e apresentam modos específicos de ação que os tornam bons sinergistas (Isman 2000, Copping & Menn 2000, Adorjan & Buchbauer 2010, Regnault-Roger *et al.* 2012). Alguns monoterpenos são neurotóxicos para os insetos e atuam sobre a acetilcolinesterase é o exemplo do terpinen-4-ol e 1,8-cineol (eugenol), encontrados em óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* Labill., *Laurus nobilis* L. e *Origanum majorana* L. O eugenol atua também através do sistema octopaminérgico ativando receptores para octopamina, que é um neuromodulador. Sendo possível também confirmar a ação na motilidade e modos de ação que envolve o efeito sobre os ciclos bioquímicos dos artrópodes (Regnault-Roger *et al.* 1993, Mills *et al.* 2004, Menezes 2005, Enan 2005, Bakkali *et al.* 2008, Lima *et al.* 2009).

Estima-se que 17.500 espécies de plantas aromáticas superiores produzam óleos essenciais, pertencendo as mais diversas famílias botânicas incluindo Myrtaceae, Lauraceae, Piperaceae, Rutaceae e Lamiaceae (Rodriguez *et al.* 1984, Jacobson 1989, Castro *et al.* 2004, Rajendran & Sriranjini 2008). Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas, sua síntese e acumulação estão associadas à presença de estruturas secretoras complexas como tricomas glandulares (Lamiaceae), cavidades secretoras (Myrtaceae, Rutaceae) e células

parenquimáticas diferenciadas (Piperaceae) (Rodriguez *et al.* 1984, Khan *et al.* 2013, Santos *et al.* 2015).

Os constituintes dos óleos essenciais pertencem a dois grupos fitoquímicos, terpenos e fenilpropanoides. Os terpenos representam a segunda maior classe de constituintes de plantas ficando atrás apenas dos alcaloides. São biossintetizados a partir de duas rotas metabólicas diferentes, a rota do metileritritol fosfato (MEP) e a rota do ácido mevalônico (MVA), sendo os precursores das unidades isoprênicas constituídas de cinco carbonos. Essas unidades se combinam em ligações formando monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Sendo a composição básica da maioria dos óleos essenciais os monoterpenos em hidrocarbonetos como, por exemplo, α , β -pineno e mirceno; álcoois como o geraniol, linalool e terpine-4-ol; éteres como 1,8-cineol (eucaliptol) entre outras funções orgânicas, bem como os sesquiterpenos com exemplo o cariofileno, humuleno e germacreno (Croteau *et al.* 2000, Larcher 2000, Dewick 2009, Bernards 2010).

Enquanto que os fenilpropanoides são biossintetizados pela rota do ácido chiquímico, caracterizados por apresentarem um grupo fenol com hidroxila funcional e um anel aromático em junção a uma cadeia lateral de três carbonos. Alguns óleos essenciais apresentam em sua composição essa classe de compostos, como os das espécies de *Piper* spp. (Piperaceae), representados pelo safrol e o dilapiol (Simões & Spitz 2004, Taiz & Zeiger 2004, Bernards 2010).

A obtenção do óleo essencial é atribuída a algumas técnicas, porém a hidrodestilação e o arraste a vapor são os métodos clássicos de produção, que se baseiam na utilização do aparelho Clevenger, desenvolvido em 1928 e que atualmente é adaptado e ampliado para produção industrial (Datta 1968, Semen & Hiziroglu 2005, Regnault-Roger *et al.* 2012). A análise dos constituintes dos óleos essenciais é bem estabelecida a partir das técnicas de cromatografia gasosa

(CG) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) que propõe quantificar e identificar a mistura dos componentes. Esta identificação de compostos individuais é realizada através da comparação dos valores de índice de retenção de Kratz e/ou Kovats calculados a partir dos tempos de retenção dos compostos e os tempos de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos, aliado ao índice são comparados também os espectros de massas dos constituintes voláteis conhecidos na literatura (Brochini & Lago 2007, Adams 2009, Rubiolo *et al.* 2010).

Estima-se que 3.000 óleos essenciais já são descritos na literatura e destes cerca de 300 estão disponíveis comercialmente para as indústrias farmacêutica, alimentícia e de perfumaria, afirmando o potencial que as plantas detêm para o alcance de novos produtos naturais a partir de recursos vegetais renováveis (Burt 2004, Preedy 2015).

Na busca por novas moléculas químicas presentes nas plantas pode-se confirmar que a família Piperaceae tem relevante participação. Compostos biossintetizados pelo metabolismo secundário dessas plantas, já são descritos, os quais fazem parte alcaloides, flavanoides, fenilpropanoides, terpenos, entre outros (Parmar *et al.* 1997, Chaves & Santos 2002, Lago *et al.* 2007, Baldoqui *et al.* 2009, Alves & Chaves 2010).

As espécies de Piperaceae são indiscutivelmente conhecidas na medicina popular, principalmente as do gênero *Piper* L. fazendo parte do material de estudo que tem revelado metabólitos secundários de grande interesse científico medicinal (Parmar *et al.* 1997, Stasi & Hiruma-Lima 2002, Lago *et al.* 2007, Xuan *et al.* 2008, Péres *et al.* 2009). Pesquisas demonstram que algumas espécies de *Piper* podem trazer benefícios atribuídos as propriedades analgésica, vasodilatadora, ação oxidante, anticâncer e anti-inflamatória (Yamaguchi *et al.* 2006, Brait *et al.* 2015, Iwamoto *et al.* 2015, Branquinho *et al.* 2017), bem como apresentarem potencial atividade antimicrobiana e inseticida (Lima *et al.* 2009, Nordin *et al.* 2014).

A família Piperaceae é pantropical apresentando cerca de 3.700 espécies distribuídas pelas Américas desde o México até o sudoeste da Argentina (Figueiredo & Sazima 2000). No Brasil são encontrados cinco gêneros, no nordeste conta com *Ottonia* Spreng, *Peperomia* Ruiz & Pav., *Piper* L. e *Pothomorphe* Miq., não tendo sido verificado o gênero *Sarchorhachis* Trel., exclusivo das regiões sudeste e sul, para o gênero *Piper* são mencionados aproximadamente 266 espécies distribuídas nas áreas remanescentes de Mata Atlântica (Di Stasi *et al.* 2002, Guimarães & Giordano 2004, Guimarães & Carvalho-Silva 2012).

As espécies de *Piper* spp. são importantes também devido à produção de óleos essenciais que apresentam na sua composição o safrol, um fenilpropanoide bastante utilizado para síntese do piperonilbutoxido (PBO) ingrediente essencial para inseticidas piretróides (Maia *et al.* 1987, Maia *et al.* 1993, Bernard *et al.* 1995, Walia *et al.* 2004, Andrade *et al.* 2008).

Óleos essenciais de *Piper* spp. têm sido utilizados em ensaios contra diversos insetos, *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC. é descrita na literatura com potencial larvicida contra *Aedes aegypti* L., além de ser deterrente a oviposição (Silva *et al.* 2016). *Piper marginatum* Jacq. é amplamente conhecida na literatura com atividade para diversos insetos-pragas, podendo citar *A. aegypti*, *Solenopsis saevissima* (Smith), *Tribolium castaneum* (H.), *Sitophilus zeamais* Motsch., *Spodoptera littoralis* (Boisduval) e *Tibraca limbativentris* Stål (Autran *et al.* 2009, Coitinho *et al.* 2011, Souto *et al.* 2012, Jaramillo-Colorado *et al.* 2015, Krinski & Foerster 2016). *Piper hispidinervum* C.DC. apresenta atividade inseticida para *S. zeamais*, *Tenebrio molitor* L., *T. castaneum*, *A. aegypti*, *Thyrinteina arnobia* (Stoll), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Estrela *et al.* 2006, Fazolin *et al.* 2007, Lima *et al.* 2009, Soares *et al.* 2011, Soares *et al.* 2012, Santana *et al.* 2015). *Piper aduncum* L. é descrita com atividade para *S. saevissima*, *S. zeamais*, *T. limbativentris* e *S. frugiperda* (Estrela *et al.* 2006, Souto *et al.* 2012, Fazolin *et al.* 2016, Krinski & Foerster 2016). *Piper tuberculatum* Jacq.

apresenta ação contra *T limbativentris* e *Crinocerus sanctus* (Fabr.) (Krinski & Foerster 2016) e *Piper betle* L. com ação frente a *S. litura* (Vasantha-Srinivasan *et al.* 2016).

Dentre os insetos de importância econômica agrícola, a lagarta do cartucho *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é de grande destaque nas lavouras por ser uma praga polífaga, podendo infestar culturas como milho (*Zea mays* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merrill), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), além de mais de 80 variedades de plantas cultivadas distribuídas em mais de 20 famílias botânicas (Pogue 2002, Prowell *et al.* 2004, Clark *et al.* 2007, Barros *et al.* 2010).

Spodoptera frugiperda tem a cultura do milho como principal hospedeira alimentando-se das folhas do cartucho no estágio vegetativo e em virtude da sua alimentação pode ocasionar uma redução na produção sendo o período crítico da sua infestação a época próxima ao florescimento, uma vez que a permanência e a alimentação nesse estágio fenológico pode levar a uma redução que varia de 17,7 a 55,6% no rendimento dos grãos (Cruz 2008a, Barros *et al.* 2010). Enquanto que na soja e no algodão alimentam-se das folhas e vagens na fase inicial, botões florais e maçãs em formação, respectivamente, causam perdas econômicas desde a emergência até a maturação das plantas, confirmando perdas consideráveis as culturas infestadas (Barros *et al.* 2010).

Os adultos de *S. frugiperda* são mariposas e as fêmeas depositam seus ovos agrupados nas folhas do milho, as lagartas recém-eclodidas iniciam sua alimentação pelas partes mais tenras das folhas, sem ocasionar furos, deixando apenas pontuações transparentes. À medida que a lagarta se desenvolve começa a furar as folhas, indo em direção ao cartucho da planta, além de penetrarem no colmo, através do cartucho, fazendo galerias descendentes até danificar o ponto de crescimento da planta ocasionando o sintoma denominado coração morto. A lagarta do cartucho pode promover a morte da planta através do seccionamento da base do colmo. Pode ocasionar perda total da produção quando infestar o ponto de inserção da espiga, devido a não formação de grãos

ou pela queda da espiga com grãos ainda em formação (Zucchi & Silveira 1993, Cruz 2008a, Cruz 2008b, Moreira & Aragão 2009).

Essa praga apresenta desenvolvimento holometábolo, o dimorfismo sexual deste inseto é verificado na fase adulta, em que as fêmeas possuem o primeiro par de asas acinzentadas e nos machos essas asas são manchadas. Os ovos são depositados, preferencialmente, nas folhas do milho durante o período noturno. São depositados em camadas e cobertos por escamas, com período de incubação de três dias. Em uma única postura cada fêmea pode depositar entre 100 a 200 ovos e esta pode ovipositar de 1.500 a 2.000 ovos durante toda sua vida reprodutiva, que dura em média sete dias. Após a eclosão as lagartas neonatas iniciam sua alimentação, nesta fase possuem cinco instares com duração de aproximadamente 15 a 20 dias. Ao fim do período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas e permanecem nesta fase de 7 a 10 dias em média, começando um novo ciclo. Esta praga alcança um ciclo biológico completo em aproximadamente 30 dias em condições favoráveis ao desenvolvimento (Cruz 1995, Sarmiento *et al.* 2002, Moreira & Aragão 2009).

Pesquisas demonstram a atividade inseticida de efeito imediato como toxicidade aguda, além de interferência em parâmetros biológicos e comportamentais dos óleos essenciais em *S. frugiperda*. Labinas & Crocomo (2002) ao estudar o óleo essencial de citronela *Cymbopogon winterianus* J., verificaram o efeito inseticida e repelente para a lagartas de *S. frugiperda*. Lima *et al.* (2009 e 2010) utilizando óleos essenciais de *P. hispidinervum* e *Ageratum conyzoides* L., verificaram a mortalidade e redução alimentar, sendo também observados sintomas de neurotoxicidade, com agitação e hiperatividade. Óleos essenciais de *Corymbia citriodora* (Hook.) Hill & Johnson, *Eucalyptus urograndis* (S. T. Blake) e *Eucalyptus urophylla* (S. T. Blake) apresentaram ação tóxica e fago-inibidora (Souza *et al.* 2010). Os óleos de *Foeniculum vulgare* Mill., *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex Bailey e *Ocimum gratissimum* L., foram tóxicos além

de promoverem a redução da oviposição e da sobrevivência dos adultos (Cruz *et al.* 2016). Niculau *et al.* (2013) observaram toxicidade dos óleos de *Pelargonium graveolens* l'Herit e *Lippia alba* (Mill) Brown para lagartas de *S. frugiperda*, e potencial tóxico dos principais compostos majoritários desses óleos essenciais constatando que o geraniol, linalol, carvona e citral ocasionam mortalidades às lagartas de terceiro instar.

Atrelada à propriedade toxicológica, os óleos essenciais revelam modos de ação em aspectos fisiológicos nos insetos, atuando na morfologia de células e tecidos, na imunologia celular e nos seus parâmetros bioquímicos nutricionais. Produtos derivados de plantas já são descritos na literatura capazes de promoverem citotoxicidade modificando a histologia do intestino médio dos insetos (Barbehen 2001, Senthil-Nathan 2008), a exemplo do óleo essencial de *C. winterianus* sobre o canal alimentar de *S. frugiperda*, o qual apresentou alterações no epitélio, com presença de protusões e extrusões citoplasmáticas, núcleos picnóticos e marcação mais expressiva de grânulos de glicogênio (Silva *et al.* 2017), bem como o óleo de *P. betle* que promove alterações morfológicas nas células do intestino médio de *S. litoralis* (Vasanthasrinivasan 2016), podendo esses efeitos contribuir para não eficiência da digestão e absorção de nutrientes essenciais ao desenvolvimento e reprodução dos insetos, referenciando proteínas, lipídios, carboidratos e açúcares.

De acordo com Senthilkumar *et al.* (2009) e Sharma *et al.* (2011), inseticidas botânicos promovem interferências nos constituintes nutricionais dos insetos, e podem influenciar no seu quantitativo, promovendo consequências que variam desde redução no peso, alterações nos tempos dos instares, até um decréscimo da capacidade reprodutiva (Jervis & Ferns 2004, Milano *et al.* 2010, Cruz *et al.* 2016), como foi observado por Alves *et al.* (2013) trabalhando com óleo essencial de *P. hispidinervum* em lagartas de *S. frugiperda*, que ocasionou uma redução no quantitativo de lipídios, proteínas e carboidratos neutros nas gônadas dos insetos afetando

negativamente a espermatogênese e ovários e por consequência, a reprodução. Resultados semelhantes foram observados por Silva *et al.* (2016) ao submeterem esta mesma praga ao óleo de citronela, *C. winterianus* e verificarem que ocorreu um decréscimo no quantitativo de nutrientes diretamente proporcional a uma redução no potencial reprodutivo. Esses resultados evidenciam que o sucesso reprodutivo desses insetos está diretamente relacionado à aquisição dos nutrientes na fase imatura, principalmente em lepidópteros (Milano *et al.* 2010). Com relação aos constituintes de óleos essenciais, Cruz *et al.* (2017) relataram uma diminuição no quantitativo de proteínas, lipídios, glicogênio e açúcar total em lagartas tratadas com limoneno e trans-anethole, sendo esses resultados mais expressivos quando os compostos foram utilizados em associação.

Os constituintes nutricionais são imprescindíveis ao desenvolvimento do inseto, as proteínas participam da estrutura do tegumento, e da síntese de hormônio e enzimas, os lipídios também realizam papéis essenciais como servir de reserva energética, atuar como hormônio e evitar perda de água pela cutícula, os carboidratos são importantes fontes energéticas, podendo ser convertidos em lipídios e participar da síntese de aminoácidos. O glicogênio é outro carboidrato armazenado no corpo gorduroso, podendo também ser encontrado nos músculos, intestino e outros tecidos (Oliveira & Cruz-Ladim 2003, Gillott 2005, Klowden 2007, Chapman 2013).

Um organismo exposto a um procedimento estressor como inseticidas, pode resultar em situações de complicações na sua homeostase funcional promovendo estresse oxidativo, alterações na proliferação celular, apoptose e necrose celular (Karthi & Shivakumar 2015, Kodrík *et al.* 2015). Respostas celulares podem ser observadas tanto no intestino médio quanto nas gônadas, entende-se por estresse oxidativo a elevada produção de espécies reativas de oxigênio simultâneo ao comprometimento de seus sistemas de eliminação, essas altas concentrações podem ocasionar efeitos adversos sobre os componentes celulares bem como modificações de lipídios, proteínas e DNA (Halliwell & Gutteridge 1999, Kodrík *et al.* 2015). A proliferação celular é o

potencial regenerador das células que é avaliado pelo crescimento celular e medido por meio de ensaios que avaliem sua atividade metabólica, viabilidade e tamanho celular (Freshney 2010). O processo de apoptose é definido como morte celular programada e ocorre naturalmente na fisiologia dos organismos, é desencadeada no interior das células pelas vias: intrínseca (mitocondrial) ou extrínseca (citoplasmática) e são mediados por proteínas pro-apoptóticas, antiapoptóticas, e pelas caspases (Lockshin & Zakeri 2001), e quando ocorre no intestino médio ou gônadas ocasiona complicações nutricionais como também reprodutivas, sendo a nutrição embrionária fundamental para o desenvolvimento de seus descendentes (Levy *et al.* 2004, Klowden 2007, Huang *et al.* 2013). Cruz *et al.* (2017) utilizando lagartas de *S. frugiperda* tratadas com trans-anethole e limoneno associados e limoneno isolado verificaram apoptose testicular desses insetos e consequente redução populacional. A necrose é caracterizada como morte celular passiva e acidental resultante de perturbações ambientais com liberação descontrolada de conteúdos celulares inflamatórios, não ocorre somente em situações patológicas, mas é também um componente de alguns processos fisiológicos, como renovação de tecidos, embriogênese e resposta imune (Proskuryakov *et al.* 2003). No processo de necrose as células incham, a membrana plasmática é rompida e ocorre extravasamento do conteúdo citoplasmático (Brown 1982).

Para identificar a apoptose celular a técnica de TUNEL é aplicada, sendo desvendada através da identificação microscópica de núcleos celulares individuais que foram positivos para necrose ou apoptose. A degradação do DNA é um dos passos mais importantes no processo apoptótico, a quebra da cadeia de DNA pode dar origem a fragmentos de cadeia dupla ou simples. Ambos podem ser detectados pela marcação das zonas hidroxilo-terminais 3' recorrendo a nucleotídeos modificados numa reação enzimática através da deoxynucleotidyl transferase (TdT). O nome TUNEL vem do termo TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling. As células são

fixadas e incubadas em enzimas TdT ou TMR-dUTP (Higuchi 2003, Fink & Cookson 2005, Mizuta *et al.* 2013).

É importante ressaltar que o sistema imunológico dos insetos só é desafiado quando esses agentes estressores (inseticidas) ultrapassam as suas barreiras estruturais, representadas pela parede externa do corpo, a cutícula e o epitélio do tubo digestivo, que por sua própria organização são consideradas fortes barreiras mecânicas de defesa (Schmid-Hempel & Ebert 2003). Contudo estudos com óleos essenciais e seus constituintes quanto a mecanismos de defesa a nível celular tornam-se indispensáveis para a elucidação do modo de ação desses.

Assim, a presente pesquisa teve os seguintes objetivos: (i) a obtenção e identificação dos óleos essenciais das espécies de *Piper corcovadensis*, *Piper marginatum* e *Piper arboreum*, bem como a avaliação da toxicidade destes óleos por contato tópico em lagartas de *Spodoptera frugiperda*, além da influencia das doses letais e subletais (DL₃₀₋₅₀₋₇₀) sobre parâmetros nutricionais da praga; (ii) investigar o efeito da DL₅₀, após o tempo de exposição de 48 h por contato tópico sobre a histologia, morfometria, histoquímica e imunohistoquímica do intestino médio e corpo gorduroso e (iii) verificar a toxicidade por contato tópico dos compostos α -pineno, β -pineno, α -felandreno, terpinoleno e E-cariofileno, e suas misturas binárias para avaliação do efeito sinérgico.

Literatura Citada

Adams, R.P. 2009. Identification of essential oil components by gas chromatography quadupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 804p.

Adorjan, B. & G. Buchbauer. 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. Flavour Fragr. J. 25: 407-26.

Alves, H.S. & M.C.O. Chaves. 2010. Caldensinic acid, a benzoic acid derivative and others compounds from *Piper carniconnectivum*. Quím. Nova 33:1-4.

- 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.* 88: 1-11.
- Andrade, E.H.A., L.M.M. Carreira, M.H.L. Silva, J.D. Silva, C.N. Bastos, P.J.C. Sousa, E.F. Guimarães & J.G.S. Maia. 2008.** Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chem. Biodivers.* 5: 197-208.
- Autran, E.S., I.A. Neves, C.S.B. Silva, G.K.N. Santos, C.A.G. Câmara & D.M.A.F. Navarro. 2009.** Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresour. Technol.* 100: 2284-2288.
- Bakkali, F., S. Averbeck., D. Averbeck. & M. Idaomar. 2008.** Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Tox.* 46: 446-475.
- Baldoqui, D.C., V.S. Bolzani, M. Furlan, M.J. Kato & M.O.M. Marques, 2009.** Flavonas lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). *Quím. Nova* 32: 1107-1109.
- Barbehenn, R.V. 2001.** Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 86-99.
- Barros, E.M., J.B. Torres, J.R. Ruberson & M.D. Oliveira. 2010.** Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. *Entomol. Exp. Appl.* 137: 237-245.
- Brait, D.R.H., M.S.M. Vaz, J. S. Arrigo, L.N.B. de Carvalho, F.H.S. de Araújo, J.M. Vani, J.S. Mota, C.A.L. Cardoso, R.J. Oliveira, F.J. Negrão, C.A.L. Kassuya & A.C. Arena. 2015.** Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73: 699-705.
- Branquinho, L.S., J.A. Santos, C.A.L. Cardoso, J.S. Mota, U. Lanza Junior, C.A.L. Kassuya & A.C. Arena. 2017.** Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 198: 372-378.
- Bernard, C.B., H.G. Krishnamurty, D. Chauret, T. Durst, B.J.R. Philogene, P. Sanches-Vindas, C. Hasbaun, L. Poveda, L.S. Roman & J.T. Arnason. 1995.** Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *J. Chem. Ecol.* 21: 801-814.
- Bernards, M.A. 2010.** Plant natural products: a primer. *Can. J. Zool.* 88: 601-14.
- Brochini, C.B. & J.H.G. Lago. 2007.** Aplicação de técnicas cromatográficas e espectrométricas como ferramentas de auxílio na identificação de componentes de óleos voláteis. *Rev. Bras. Farmacog.* 17: 266-270.

- Brown, B.E., 1982.** The form and function of metal-containing 'granules' in invertebrate tissues. *Biol. Rev.* 57: 621-667.
- Burt, S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
- Castro, H.G., F.A. Ferreira, D.J.H. Silva & P.R. Mosquim. 2004.** Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. Viçosa, UFV, 113p.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structures and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Chaves, M.C.O. & B.V.O. Santos. 2002.** Constituents from *Piper marginatum* fruits. *Fitoterapia* 73:547-549.
- Clark, P.L. J. Molina-Ochoa, S. Martinelli, S.R. Skoda, D.J. Isenhour, D.J. Lee, J.T. Krumm & J.E. Foster. 2007.** Population variation of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in the Western Hemisphere. *Int. J. Insect Sci.* 7: 1-10.
- Coitinho, R.L.B.C., J.V. Oliveira, M.G.C. Gondim & C.A.G. Câmara. 2011.** Toxicity by fumigation, contact and ingestion of essential oils in *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). *Ciênc. Agrotec.* 35: 172-178.
- Colpo, J.F., S. M. Jahnke & T. Füller. 2014.** Potencial inseticida de óleos de origem vegetal sobre *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 16: 182-188.
- Copping, L.G. & J.J. Menn. 2000.** Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag. Sci.* 56: 651-676.
- Corrêa, J.C.R. & H.R.N. Salgado. 2011.** Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Rev. Bras. Pl. Med.* 13: 500-506.
- Croteau, R., T.M. Kutchan & N.G. Lewis. 2000.** Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., W. Gruissem & R. Jones (eds.), *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville, American Society of Plant Physiologists, 1367p.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, A.A.C. Teixeira, A.C. Araújo, T.J.S. Alves, F.M. Cunha & M.O. Breda. 2015.** Histological and histochemical changes by clove essential oil upon the gonads of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Morphol.* 33: 1393-1400.
- 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.** 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, 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.
- 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, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa/CNPMS, 45p. (Circular Técnica 21).
- Cruz, I. 2008a.** Manejo de pragas de milho. In: Cruz, J.C., D. Karam, M.A.R. Monteiro & P.C. Magalhães (eds.), A cultura de milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 303-362p.
- Cruz, I. 2008b.** Manual de identificação de pragas do milho e de seus principais agentes de controle biológico. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 192p.
- Datta, P.R. 1968.** Official analytical methods of the American Spice Trade Association. American Spice Trade Association – ASTA. Englewood Cliffs, N.J, p.8-11.
- Dewick, P.M. 2009.** Medicinal natural products: A biosynthetic approach. John Wiley & Sons, Chichester, 550p.
- Di Stasi, L.C., C.A. Hiruma-Lima, F.G. Gonzalez & W.G. Portilho. 2002.** Violaes medicinais. In Di Stasi, L.C. & C.A. Hiruma-Lima (eds.), Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Fundação Editora Unesp, São Paulo, 592p.
- Dutra, K.A., J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, D.R.S. Barbosa & J.P. Oliveira. 2016.** Control of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in *Vigna unguiculata* (L.) WALP. with essential oils from four *Citrus* spp. plants. *J. Stored Prod. Res.* 68: 25-32.
- Enan, E.E. 2005.** Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to essential oils. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 59: 161-71.
- Estrela, J.L.V., M. Fazolin, V. Catani, M.R. Alécio & M.S. Lima. 2006.** Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. *PAB.* 41: 217-222.

- Fazolin, M., J.L.V. Estrela, A.F.M. Monteiro, I.M. da Silva, L.P. Gomes & M.S.F. Silva. 2016.** Combining the essential oil of *Piper aduncum* L. with commercial insecticides. *Semina: Ciênc. Agrár.* 37: 3903-3914.
- Fazolin, M., J.L.V. Estrela, V. Catani, M.R. Alécio, M.S. de Lima, 2007.** Insecticidal properties of essential oils of *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. and *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum against *Tenebrio molitor* L.,1758. *Ciênc. Agrotec.* 31: 113-120.
- Figueiredo, R.A. & M. Sazima. 2000.** Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Ann. Bot.* 85: 455-460.
- Fink, S.L. & B.T. Cookson. 2005.** Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73: 1907-1916.
- Freshney, R.I. 2010.** Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. Hoboken, Wiley Blackwell, 732p.
- Gillott, C. 2005.** Entomology. Dordrecht, Springer, 834p.
- Guimarães, E.F. & L.C.S. Giordano. 2004.** Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. *Rodriguésia* 55: 21-46.
- Guimarães, E.F. & M. Carvalho-Silva. 2012.** Piperaceae. In: Wanderley, M.G.L., S.E. Martins, R.P. Romanini, T.S. Melhem, G.J. Shepherd, A.M. Giulietti, J.R. Pirani, M. Kirizawa, M.M.R.F. Melo, I. Cordeiro & L.S. Kinoshita (eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo, 320p.
- Haddi, K., E.E. Oliveira, L.R.A. Faroni, D.C. Guedes & N.N.S. Miranda. 2015.** Sublethal exposure to clove and cinnamon essential oils induces hormetic-like responses and disturbs behavioral and respiratory responses in *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 108: 2815-2822.
- Halliwell, B. & J.M.C. Gutteridge. 1999.** Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, New York, 980p.
- Higuchi, Y. 2003.** Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1527-1535.
- Huang, N., S. Covicristov, C.J. Hawkins & R.J. Clem. 2013.** SfDronc, an initiator caspase involved in apoptosis in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 43: 444-454.
- Isman, M.B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603-608.
- Iwamoto, L.H., D.B. Vendramini-Costa, P.A. Monteiro, A.L.T.G. Ruiz, I.M.D.O. Sousa, M.A. Foglio, J.E. de Carvalho & R.A.F. Rodrigues. 2015.** Anticancer and anti-

inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. Evid. Based Complement. Alternat. Med. <https://doi:10.1155/2015/948737>

Jacobson, M. 1989. Botanical pesticides: past, present and future, p. 69-77. In: Arnason, J.T., B.J.R. Philogène & P. Morand (eds.), Insecticide of plant origin. Washington, American Chemical Society, 213p.

Jaramillo-Colorado, B., J. Julio-Torres, E. Duarte-Restrepo, A. Gonzalez-Coloma & L.F. Julio-Torres. 2015. Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. Colombiano. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas 14: 343-354.

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: 499-460.

Karthi, S. & M.S. Shivakumar. 2015. The protective effect of melatonina against cypermethrin-induced oxidative stress damage in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Biol. Rhythm Res. 46: 1-12.

Khan, A.A., S.P. Bhatnagar, B.N. Sinha & U.R. Lal. 2013. Pharmacognostic specifications of eight cultivars of *Piper betle* from eastern region of India. Pharmacogn. J. 5: 176-183.

Klowden, M.J. 2007. Physiological Systems in Insects. New York, Academic Press, 668p.

Kodrik, D., A. Bednarova, M. Zemanova & N. Krishnan. 2015. Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—A update. Int. J. Mol. Sci. 16: 25788-25816.

Krinski, D. & L.A. Foerster. 2016. Toxicity of essential oils from leaves of Piperaceae species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). Ciên. Agrotec. 40: 676-687.

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.

Lago, J.H.G., M.C.M. Young, J.B. Reigada, M.G. Soares, B.P. Roesler & M.J. Kato. 2007. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (Piperaceae). Quím. Nova 30: 1222-1224.

Larcher, W. 2000. Ecofisiologia vegetal. São Carlos, Rima, 531p.

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, 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.

Lima, R.K., M.G. Cardoso, J.C. Moraes, M.A. Andrade, B.A. Melo & V.G. Rodrigues. 2010. Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (lepidoptera: noctuidae). Biosci. J. 26:1-5.

Lockshin R.A. & Z. Zakeri. 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2: 545-550.

Madbouly, S.A., C. Zhang & M.R. Kessler. 2015. Bio-based plant oil polymers and composites. Elsevier Inc., Oxford, UK, 213p.

Maia, J.G.S., C.L. Green & M.J. Milchard. 1993. New source of natural safrole. Flavour Fragr. J. 18: 20-22.

Maia, J.G.S., M.H.L. Silva, A.I.R. Luz, M.G.B. Zoghbi & L.S. Ramos. 1987. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. Quím Nova 10: 200-204.

Menezes, E.L.A. 2005. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro, Embrapa Agrobiologia. 58p.

Milano, P., E.B. Filho, J.R.P. Parra, M.L. Oda & F.L. Cônsoli. 2010. Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade nas espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae. Neotrop. Entomol. 39: 172-180.

Mills, C., B.J. Cleary, J.F. Gilmer & J.J. Walsh. 2004. Inhibition of acetylcholinesterase by tea tree oil. J. Pharm. Pharmacol. 56: 375-79.

Mizuta, R., S. Araki, M. Furukawa, Y. Furukawa, S. Ebara, D. Shiokawa, S. Hayashi & D. Kitamura. 2013. DNase is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. PLoS One. 8: e80223.

Moreira, H.J.C. & F.D. Aragão. 2009. Manual de pragas do milho. Campinas, 132p.

Niculau, E.S., P.B. Alves, P.C.L. Nogueira, V.R.S. Moraes, A.P. Matos, A.R. Bernardo, A.C. Volante, J.B. Fernandes, M.F.G.F. Silva, A.G. Corrêa & L.P. Ribeiro. 2013. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* l'Herit e *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Quím. Nova 36: 1391-1394.

Nordin, M.A.F., W.H.A.W. Harun, F.A. Razak & M.Y. Musa 2014. Growth inhibitory response and ultrastructural modification of oral-associated candidal reference strains (ATCC) by *Piper betle* L. extract. Int. J. Oral Sci. 6: 15-21.

Oliveira, V.T.P. & C. Cruz-Landim. 2003. Morphology and function of insect fat body cells: a review. Biociência 11: 195-205.

- Parmar, V.S., S.C. Jain, K.S. Bisht, R. Jain, P. Taneja, A. Jha, O.D. Tyagi, A.K. Prasad, J. Wengel, C.E. Olsen & P.M. Boll. 1997.** Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46: 597-673.
- Péres, V.F., D.J. Moura, A.R.M. Sperotto, F.C. Damasceno, E.B. Caramão, C.A. Zini & J. Saffi. 2009.** Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food Chem. Tox.* 47: 2389-2395.
- Pogue, G.M. 2002.** A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 43: 1-202.
- Preedy, V.R. 2015.** Essential oil in food preservation, flavour and safety. London, Academic Press, 862p.
- Proskuryakov, S.Y., A.G. Konoplyannikov & V.L. Gabai. 2003.** Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 283: 1-16.
- Prowell, D.P., M. McMichael & J.F. Silvain. 2004.** Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 1034-1044.
- Rajendran, S. & V. Sriranjini. 2008.** Plant products as fumigants for stored-product insect control. *J. Stored Prod. Res.* 44: 126-135.
- Regnault-Roger, C., A. Hamraoui, M. Holeman, E. Théron & R. Pinel. 1993.** Insecticidal effect of essential oils from Mediterranean plants upon *Acanthocelides obtectus* Say (Coleoptera, Bruchidae), a pest of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Chem. Ecol.* 19: 1231-42.
- Regnault-Roger, C. 1997.** The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Manag. Rev.* 2: 25-34.
- Regnault-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.
- Ribeiro, C.R., T.V. Zanuncio, F.S. Ramalho, C.A.D. Silva, J.E. Serrão & J.C. Zanuncio. 2015.** Feeding and oviposition of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) with sublethal concentrations of ten condiments essential oils. *Ind. Crops Prod.* 74: 139-143.
- Rodriguez, E., P.L. Healey & I. Mehta. 1984.** Biology and chemistry of plant trichomes. New York, Plenum Press, 255p.
- Rubiolo, P., B. Sgorbini, E. Liberto, C. Cordero & C. Bicchi. 2010.** Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour Fragr. J.* 25: 282-90.

- Santana, H.T., F.T.T. Trindade, R.G. Stabeli, A.A.E. Silva, J.S.T.L. Militão & V.A. Facundo. 2015.** Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev. Bras. Plantas Med. 17: 105-111.
- Santos, V.L.P., C.R.C. Franco, E. Amano, I.J. Messias-Reasond & J.M. Budel. 2015.** Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. Rev. Bras. Farmacogn. 25: 85-89.
- Sarmaneto, R.A., R.W.S. Aguiar, R.A.S.S. Aguiar, S.M.J. Viera, H.G. Oliveira & A.M. Holtz. 2002.** Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), em milho no Brasil. Biosci. J. 18: 41-48.
- Schmid-Hempel, P. & D. Ebert. 2003.** On the evolutionary ecology of specific immune defence. Trends Ecol. Evol. 18: 27-32.
- Semen, E. & S. Hiziroglu. 2005.** Production, yield and derivatives of volatile oils from Eastern Redcedar (*Juniperus Virginiana* L.). Am. J. Environ. Sci. 1: 133-138.
- 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.
- Senthil-Nathan, S., M.Y. Choi, H.Y. Seo, C.H. Paik, K. Kalaivani & J.D. Kim. 2008.** Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown plant hopper *Nilaparvata lugens* (Stal). Ecotoxicol. Environ. Saf. 70: 244-250.
- Sharma, P., L. Mohan, K.K. Dua & C.N. srivastava. 2011.** Status os carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. Asina. 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) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. Acta Histochem. 118: 347-352.
- 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. 2017.** Effects of citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) midgut and fat body. Biotech. Histochem. 5 :1-13.
- Silva, M.F.R., P.C. Bezerra-Silva, C.S. Lira, B.N.L. Albuquerque, A.C. Agra Neto, E.V. Pontual, J.R. Maciel, P.M.G. Paiva & D.M.A.F. Navarro. 2016.** Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). Exp. Parasitol. 165: 64-70.

- Simões, C.M.O. & V. Spitz.** 2004. Óleos voláteis, p. 467-495. In: Simões, C.M.O., E.P., Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick (eds.), Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre, Editora da universidade/UFSC, 1104p.
- Soares, C.S.A., M. Silva, M.B. Costa & E.S. Bezerra.** 2011. Inseticida de óleos essenciais sobre a lagarta desfolhadora *Thyrintea arnobia* (stoll) (Lepidoptera: Geometridae). Rev. Verde 6: 154-157.
- Soares, C.S.A., M. Silva, M.B. Costa, C.E.S. Bezerra, L.M. Carvalho & A.H.V. Soares.** 2012. Atividade inseticida de óleos essenciais sobre *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) em roseira. Rev. Bras. Agroecol. 7: 169-175.
- Souto, R., A. Harada, E. Andrade & J. 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.
- Souza, T.F., S. Favero & C.O. Conte.** 2010. Bioatividade de óleos essenciais de espécies de eucalipto para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). RBA. 5: 157-164.
- Stasi, L.C.D. & C.A. Hiruma-Lima.** 2002. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, São Paulo, UNESP, 604p.
- Taiz, L. & E. Zeiger.** 2004. Fisiologia Vegetal. Porto Alegre, Artmed, 719p.
- Vasanth-Srinivasan, P., S. Senthil-Nathan, A. Thanigaivel, E.S. Edwin, A. Ponsankar, S. Selin-Rani, V. Pradeepa, M. Sakthi-Bhagavathy, K. Kalaivani, W.B. Hunter, V. Duraipandiyam & N.A. Al-Dhabi.** 2016. Developmental response of *Spodoptera litura* Fab. to treatments of crude volatile oil from *Piper betle* L. and evaluation of toxicity to earthworm, *Eudrilus eugeniae* Kinb. Chemosphere 155: 336-247.
- Walia, S., S. Saha, & B.S. Parmar.** 2004. Liquid chromatographic method for the analysis of two plant based insecticide synergists dillapiole and dihydrodillapiole. J. Chromatogr. A 1047: 229-233.
- Xuan, T.D., M. Fukuta, A.C. Wie, A.A. Elzaawely, T.D. Khanh & S. Tawata.** 2008. Efficacy of extracting solvents to chemical compounds of kava (*Piper methysticum*) roots. J. Nat. Med. 62: 188-94.
- Yamaguchi, L.F., J.H.G. Lago, T.M. Tanizaki, P. Di Mascio & M.J. Kato.** 2006. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. Phytochemistry 67: 1838-1843.
- Zamari, S., J.J. Sendi & M. Ghadamyari.** 2011. Effect of *Artemisia annua* L. (Asterales: Asteraceae) essential oil on mortality, development, reproduction and energy reserves of *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae). J. Biofertil. Biopestici. 2: 1-6.

Zucchi, R.A., S. Silveira Neto & O. Nakano. 1993. Guia de Identificação de pragas agrícolas.
Piracicaba, FEALQ, 139p.

CAPÍTULO 2

TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO GÊNERO *Piper* COM INFLUÊNCIA NOS PARÂMETROS NUTRICIONAIS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

KAMILLA A. DUTRA¹

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

¹Dutra, K.A. Toxicidade de óleos essenciais de plantas do gênero *Piper* com influência nos parâmetros nutricionais de *Spodoptera frugiperda* (J.E. smith) (Lepidoptera: Noctuidae). A ser submetido.

RESUMO – *Spodoptera frugiperda* é uma praga de grande importância econômica para o milho (*Zea mays*) encontrada em países com maiores produções e exportações desta cultura. É controlada principalmente por inseticidas sintéticos que nem sempre são eficientes e ainda promovem a contaminação do agroecossistema. Assim, o presente estudo examinou a toxicidade dos óleos essenciais de *Piper corcovadensis*, *Piper marginatum* e *Piper arboreum* com influência por contato tópico em lagartas de *S. frugiperda* e sua resposta nos parâmetros nutricionais. Os óleos essenciais foram obtidos de folhas frescas das espécies de *Piper* por hidrodestilação. E a curva dose-resposta através da análise de Probit, após 48 h de instalação do experimento. Foi quantificado proteína total, lipídio, açúcar total e glicogênio. Após análise cromatográfica por GC-EM, 85 componentes foram identificados, onde 16 foram em comum para as três espécies, e dentro destes, o E-cariofileno foi o componente majoritário. Das três espécies de *Piper* testadas, o óleo de *P. corcovadensis* foi o que mais se destacou, por apresentar um melhor rendimento ($0,232 \pm 0,01$ %), menores DL_{50} (3,58 mg/g) e DL_{90} (6,34 mg/g), maiores razões de toxicidade nas DL_{50} (3,04) e DL_{90} (8,64), além de alterar as quantidades de proteína, glicogênio e açúcar total nas doses subletais (DL_{30}) e letais (DL_{50-70}). Essas observações auxiliam na elucidação dos efeitos tóxicos que os óleos essenciais podem ocasionar em doses subletais e letais. Confirmando a importância do estudo de cada espécie de planta individualmente, abrindo margem para investigação dos efeitos potenciais de óleos essenciais e seus modos de ação nos insetos.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta do cartucho, produtos naturais, dose letal, dose subletal, bioquímica

TOXICITY OF ESSENTIAL OILS OF THE GENUS PLANT *Piper* AND INFLUENCE IN
NUTRITIONAL PARAMETERS OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)

ABSTRACT - *Spodoptera frugiperda* is a pest of great economic importance for corn (*Zea mays*) found in countries with higher yields and exports of this crop. It is mainly controlled by synthetic insecticides that are not always efficient and still promote the contamination of the agroecosystem. Thus, the present study examined the toxicity of the essential oils of *Piper corcovadensis*, *Piper marginatum* and *Piper arboreum* with influence on topical contact toxicity in *S. frugiperda* and their response on nutritional parameters. Essential oils were obtained from fresh leaves of the *Piper* species by hydrodistillation. The dose-response curve through the analysis of Probit, after 48 h installation of the experiment. Total protein, lipid, total sugar and glycogen were quantified. After chromatographic analysis by GC-MS, 85 components were identified, where 16 were in common for the three species, and within these, E-caryophyllene was the major component. Of the three *Piper* species tested, *P. corcovadensis* oil showed the highest performance ($0.232\pm 0.01\%$), lower LD₅₀ (3.58 mg/g) and LD₉₀ (6.34 mg/g), higher toxicity ratios in LD₅₀ (3.04) and LD₉₀ (8.64), in addition to altering the amounts of protein, glycogen and total sugar in sublethal (LD₃₀) and lethal (LD₅₀₋₇₀) doses. These observations assist in elucidating the toxic effects that essential oils can cause in sublethal and lethal doses. Confirming the importance of the study of each species of plant individually, opening space for investigation of the potential effects of essential oils and their modes of action on insects.

KEY WORDS: Fall armyworm, natural products, lethal dose, sublethal dose, biochemistry

Introdução

Em busca de produtos menos tóxicos, biodegradáveis e seguros ao meio ambiente, os óleos essenciais alcançam cada vez mais espaço nas pesquisas que visam o controle de insetos-pragas. (Madbouly *et al.* 2015, Preedy 2015, Bezerra-Silva *et al.* 2016, Cruz *et al.* 2016).

O gênero *Piper* é o mais abundante da família Piperaceae com aproximadamente 700 espécies distribuídas pelas Américas, indo desde o México até o sudoeste da Argentina (Figueiredo & Sazima 2000). No Brasil são encontradas aproximadamente 266 espécies nas áreas remanescentes de Mata Atlântica (Di Stasi *et al.* 2002, Guimarães & Carvalho-Silva 2012). As espécies de *Piper* spp. são amplamente conhecidas devido as suas propriedades medicinais (Pereira *et al.* 2011, Yukes & Balick 2011, Sequeda-Castañeda *et al.* 2015), podemos citar trabalhos sobre a atividade antimicrobiana para bactérias de importância médica e fitopatogênicas com *Escherichia coli* (T. Escherich) e *Xanthomonas albilineans* (Ashby), respectivamente e fungos com *Alternaria solani* Sorauer e *Fusarium oxysporum* Schlecht (Duarte *et al.* 2007, Santos *et al.* 2011, Sánchez *et al.* 2012, Duarte *et al.* 2013).

Os principais metabólitos secundários encontrados no gênero *Piper* são fenilalcaloides, terpenoides e fenilpropanoides, como o safrol (matéria-prima para síntese de piperonilbutoxido, importante sinergista de inseticidas) (Maia *et al.* 1987, Maia *et al.* 1993, Andrade *et al.* 2008).

A Organização Mundial para Alimentação e Agricultura (FAO) estima que insetos-pragas são capazes de promover, em média, cerca de 15,6 % das perdas de produção agrícola no mundo (FAO 2013). Dentre os insetos de importância econômica agrícola, a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é de grande destaque nas lavouras por ser uma praga polífaga, podendo infestar culturas como milho (*Zea mays* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merrill), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Esta praga pode ser encontrada no Brasil, Argentina e EUA, países que estão no ranking da produção e

exportação mundial de milho (Pogue 2002, Prowell *et al.* 2004, Clark *et al.* 2007, Nagoshi 2009, Bueno *et al.* 2011).

Pesquisas envolvendo óleos essenciais concentram-se principalmente na avaliação da mortalidade dos insetos, mas interferências fisiológicas também são importantes como propriedade desses óleos, uma vez que podem promover alterações morfológicas em seus órgãos internos, assim como uma baixa assimilação de nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento (Sharma *et al.* 2011, Yazdani *et al.* 2013, Vasantha-Srinivasan *et al.* 2016). Alves *et al.* (2013) verificaram que o óleo essencial de *Piper hispidinervum* C. DC. causa alterações morfológicas dos órgãos reprodutivos de *S. frugiperda*, além da redução no quantitativo de lipídio, proteína e carboidratos neutros nas gônadas destes insetos.

Óleos essenciais de *Piper marginatum* Jacq. e *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC. são descritos na literatura com potencial larvicida contra *Aedes aegypti* L., além de ser repelente e deterrente a oviposição respectivamente (Autran *et al.* 2009, Silva *et al.* 2016). *P. marginatum* é amplamente conhecida na literatura com atividade para diversos insetos-pragas, podendo citar *Solenopsis saevissima* (Smith), *Tribolium castaneum* (H.) e *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Souto *et al.* 2012, Jaramillo-Colorado *et al.* 2015). Entretanto, esta é a primeira descrição dos óleos essenciais das espécies de *P. marginatum*, *P. corcovadensis* e *Piper arboreum* Aubl. para atividade toxicológica e sua influência nos parâmetros nutricionais de *S. frugiperda*, como uso alternativo para o controle deste inseto-praga.

Material e Métodos

As pesquisas foram conduzidas no Laboratório de Fisiologia de Insetos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/DMFA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com temperatura, umidade relativa e fotofase monitoradas. As extrações dos óleos essenciais e as

análises cromatográficas foram conduzidas, respectivamente, no Laboratório de Ecologia Química e Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Obtenção e Criação de *Spodoptera frugiperda*. Os insetos foram obtidos da criação estoque do Laboratório de Entomologia Agrícola da UFRPE e mantidas no Laboratório de Fisiologia de insetos à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h. Os adultos foram criados em gaiolas de oviposição, confeccionadas em tubo PVC de 20 cm de altura e 15 cm de diâmetro e suportadas por uma bandeja plástica de dois cm de altura por 17 cm de diâmetro, ambos forrados internamente com papel contínuo branco. As gaiolas foram fechadas na parte superior com filme plástico. Os adultos foram alimentados com solução aquosa de mel a 10 % e as posturas coletadas periodicamente. Os ovos foram mantidos em gaiolas plásticas de 15 cm de diâmetro por nove cm de altura, onde as lagartas foram alimentadas com dieta artificial de Greene modificada, recomendada para a espécie (Busato *et al.* 2006).

Material Vegetal. As folhas de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* foram coletadas no Jardim Botânico do Recife, localizado no bairro do Curado, Km 7 da BR232, na Cidade do Recife. As plantas foram autenticadas por Jefferson Rodrigues Maciel e uma exsicata de cada espécime foi depositado no Herbário do Jardim Botânico do Recife (*P. corcovadensis* exsicata: UFP-15987, *P. marginatum* exsicata: UFP-10826 e *P. arboreum* exsicata: UFP7-78113).

Extração dos Óleos Essenciais de *Piper* spp. Folhas frescas de cada espécie de *Piper* foram previamente trituradas e em seguida hidrodestiladas separadamente em aparelho tipo Clevenger modificado, por três horas. Os óleos essenciais foram coletados e tratados com sulfato de sódio anidro P.A. Os óleos foram conservados sob refrigeração a -24°C até a realização dos bioensaios e/ou análises cromatográficas. O procedimento de extração foi realizado em triplicada e o rendimento de cada óleo essencial foi calculado pelo quociente das massas das folhas frescas, em

relação às massas dos respectivos óleos essenciais, obtendo assim as respectivas médias para cada espécie de *Piper*.

Análises Cromatográficas em Fase Gasosa. Os óleos essenciais de *Piper* spp. foram analisados qualitativamente por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series CG/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). 1 µL da solução (2000 µg/mL) de cada óleo essencial preparada em hexano foi injetada em split 1:50, assim como uma solução hexânica da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C8-C30 (Sigma-Aldrich®). A temperatura do CG foi ajustada em 60 °C por 3 min, sendo então elevada 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 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5 scan-s de m/z 20-350 (Santos *et al.* 2014). Os constituintes do óleo essencial foram quantificados através da Cromatografia Gasosa (CG) em um sistema Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Trace CG Ultra gás equipado com um detector de ionização por chama (DIC), 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, 1 µL da solução (2000 µg/mL) de cada óleo essencial preparada em hexano foi injetada em splitless. Esse procedimento foi realizado em triplicada para obtenção da média aritmética das porcentagens de cada composto e seu desvio padrão (Silva *et al.* 2016). A composição de cada componente foi expressa na forma de porcentagens da área total do pico conforme registrado por GC-FID.

Identificação Química dos Óleos Essenciais de *Piper* spp. Os Índices de Retenção (IR) de cada componente dos óleos essenciais foram calculados segundo a equação de Van den Dool & Kratz

(1963), de acordo com os tempos de retenção dos componentes da amostra de cada óleo essencial, do padrão de hidrocarboneto (C8-C30) e da combinação de cada óleo essencial com a mistura deste padrão. Os componentes de cada óleo essencial foram previamente identificados por similaridade dos valores dos índices de retenção (IR) 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).

Bioensaio de Toxicidade por Contato Tópico. Testes preliminares foram realizados visando definir as faixas de concentração dos óleos essenciais de *Piper* spp., capazes de promover mortalidades em torno de 5 e 95%, utilizando lagartas de terceiro instar com peso médio de 0,078 g. Para cada teste foram individualizadas 10 lagartas por repetição em tubos de vidro e aplicados 1,0 µL da solução da dose do óleo essencial mais acetona (solvente), na região protorácica da lagarta, utilizando uma seringa Hamilton™ (50 µL). O grupo controle foi tratado apenas com acetona. As lagartas foram alimentadas individualmente com dieta artificial e submetidas ao bioensaio por 48 h até a avaliação da toxicidade aguda de cada óleo essencial, contando-se as lagartas mortas após esse tempo. De acordo com o resultado obtido nos testes preliminares foram estabelecidos os tratamentos com as doses para os óleos essenciais de *P. corcovadensis* (2; 4; 6; 8; 10 mg/g de inseto), *P. marginatum* (1; 3; 6; 10; 12 ;14 mg/g de inseto) e *P. arboreum* (2; 6; 10; 15; 20; 25 mg/g de inseto). As Doses Letais (DL₃₀, DL₅₀, DL₇₀ e DL₉₀) foram determinadas, através da análise de probit pelo programa SAS Proc Probit (SAS 2001). As Razões de Toxicidade (RT) foram obtidas, através do quociente entre a dose letal do óleo de maior toxicidade e dose letal dos demais óleos, individualmente.

Ensaio Bioquímicos. Para extração e quantificação das Proteínas Solúveis Totais, Lipídios, Açúcar Total e Glicogênio, foram montados previamente os bioensaios de toxicidade por contato

tópico utilizando as doses letais (DL₃₀, DL₅₀ e DL₇₀) para cada óleo essencial de acordo com o bioensaio descrito anteriormente. Para a *P. corcovadensis* utilizou-se a DL₃₀ de 2,84 mg/g, DL₅₀ de 3,58 mg/g e DL₇₀ de 4,53 mg/g, enquanto que para *P. marginatum* utilizou-se a DL₃₀ de 2,29 mg/g, DL₅₀ de 4,18 mg/g e DL₇₀ de 7,62 mg/g e para *P. arboreum* a DL₃₀ de 5,64 mg/g, DL₅₀ de 10,91 mg/g e DL₇₀ de 21,13 mg/g. O bioensaio controle foi realizado com acetona. A extração ocorreu após 48 h da instalação dos bioensios de toxicidade e cada amostra constou de quatro lagartas, para cada tratamento foram obtidas 10 amostras, totalizando 40 lagartas/tratamento. O preparo das amostras (controle e tratamento) se deu com as lagartas imobilizadas a uma temperatura de 4 °C e maceradas em tampão fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,1 M), na proporção de quatro lagartas/5 mL de tampão. Para cada grupo de macerado retirou-se com um pipetador automático 1,0 mL da mistura (lagartas + tampão) e manteve armazenado em um microtúbulo devidamente etiquetado. Todo procedimento foi efetuado em baixa temperatura para evitar a oxidação das amostras, obtendo-se assim as amostras de cada tratamento. Após esta etapa ocorreu o preparo das amostras, para isso cada grupo de amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação foram separados 100 µL de cada amostra para análise das proteínas solúveis totais e 200 µL para as análises de lipídeos, açúcar total e glicogênio.

Extração e Quantificação das Proteínas Solúveis Totais. As proteínas solúveis totais foram determinadas a partir do método de Bradford (1976). Os 100 µL de cada amostra de macerado foram transferidos para tubos de vidro de centrifugação, adicionando o corante Bradford (0,01% de Comissie Blue G-250; 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol) até alcançar o volume de 5 mL. As misturas foram então homogeneizadas em agitador tipo vórtex e em seguida permaneceram em repouso por 2 minutos. Posteriormente, verificou-se a absorvância em espectrofotômetro UV visível/190-1000 nm Biospectro SP-220 em comprimento de onda de 595

nm. A unidade de leitura utilizada foi $\mu\text{g/mL}$. 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 2001).

Extração e Quantificação de Lipídio, Açúcar Total e Glicogênio. O conteúdo de lipídeo, açúcar total e glicogênio foram avaliados utilizando o método de Van Handel (1985a, b), onde 200 μL do macerado homogeneizado foram acrescidos de 200 μL de sulfato de sódio e 800 μL de clorofórmio e metanol (1:1), e centrifugado a 3000 rpm durante 3 min. O precipitado foi utilizado para a análise de glicogênio, e o sobrenadante foi transferido para um microtúbulo onde foi acrescentado 600 μL de água destilada e centrifugado a 3000 rpm durante 3 min. O precipitado foi utilizado para a análise de lipídios e o sobrenadante para análise de açúcar total. O lipídio foi tratado com reagente ácido fosfórico/vanilina enquanto que o açúcar total e o glicogênio, tratados com reagente ácido sulfúrico/antrona. Posteriormente, verificou-se a absorvância em espectrofotômetro UV visível/190-1000 nm Biospectro SP-220 em comprimento de onda de 625 nm. A unidade de leitura utilizada foi $\mu\text{g/mL}$. 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 2001).

Resultados

Extração dos Óleos Essenciais de *Piper* spp. As médias (\pm erro padrão) dos rendimentos dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de folhas frescas de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* foram $0,232\pm 0,01$; $0,114\pm 0,02$ e $0,095\pm 0,008$ %, respectivamente (Tabela 1).

Análises por CG e CG-EM dos Óleos Essenciais de *Piper* spp. Os componentes dos óleos essenciais das três espécies de *Piper* foram identificados por análise CG-EM e quantificado em GC-DIC (Tabela 1). No óleo essencial de *P. corcovadensis* foi possível verificar monoterpenos

(29,21%), sesquiterpenos (21,42%), sesquiterpenos oxigenados (12,77%) e fenilpropanoides (35,1%), no entanto esta última classe é representada por um único componente do óleo, o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (35,1±0,14%), sendo seu componente majoritário seguido pelo terpinoleno (13,7±0,14%), E-cariofileno (6,02±0,02%), α -pineno (5,78±0,06%), δ -cadineno (5,19±0,02%) e germacreno D-4-ol (4,52±0,05%). O óleo de *P. marginatum* mostrou seus componentes majoritários distribuídos nos monoterpenos (36,25%), sesquiterpenos (14,49%), sesquiterpenos oxigenados (6,29%) e fenilpropanoides (41,66%), apresentando 2-metoxi-4,5-(metilenodioxo)-propiofenona (22,19±2,14%), exalatacina (9,12±0,90%), α -pineno (8,45±1,05%), α -felandreno (6,97±0,82%), β -pineno (6,51±0,69%), E-cariofileno (5,71±0,16%), metoxi-4,5-(metilenodioxo)-propiofenona (5,50±0,17%) e limoneno (4,98±0,59%), enquanto que o óleo de *P. arboreum* apresentou seus componentes majoritários entre os sesquiterpenos (72,91%) e sesquiterpenos oxigenados (19,8%), são eles o zingibereno (14,9±0,21%), E-cariofileno (8,26±0,1%), δ -cadineno (7,57±0,08%), germacreno D (6,53±0,08%), E-nerolidol (5,60±0,08%), α -humuleno (4,63±0,05%) e δ -elemeno (4,01±0,03%).

Bioensaio de Toxicidade por Contato Tópico. Os óleos essenciais de *Piper* apresentaram ação tóxica contra *S. frugiperda*. Os resultados de dose-mortalidade obtidos assumiriam o modelo de Probit com valores de DL₅₀ e DL₉₀ variando de 3,58 a 10,91 mg/g de inseto e 6,34 a 54,83 mg/g de inseto, respectivamente, entretanto os óleos essenciais de *P. corcovadensis* e *P. marginatum* possuem as menores DL₅₀ e as maiores razões de toxicidade para esta dose letal em relação a *P. arboreum* (Tabela 2). O óleo essencial de *P. corcovadensis* mostrou ainda menor DL₉₀ e maior razão de toxicidade para esta dose.

Ensaio Bioquímicos. A quantificação de proteínas totais mostrou que a *P. corcovadensis* em todas as doses testadas (DL₃₀= 81,28 ± 2,63 µg/mL, DL₅₀= 95,57 ± 2,64 µg/mL e DL₇₀= 69,12 ± 0,97) promoveram a redução na quantidade de proteína, porém a dose letal DL₇₀ foi à dose que

ocasionou maior redução. *P. arboreum* nas doses $DL_{30} = 63,92 \pm 5,37 \mu\text{g/mL}$ e $DL_{50} = 63,75 \pm 4,65 \mu\text{g/mL}$ promoveram redução na quantidade de proteína, já a $DL_{70} = 104,85 \pm 5,06 \mu\text{g/mL}$ não diferiu do controle $= 108,09 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$ (Figura 1). *P. marginatum* nas doses $DL_{50} = 125,12 \pm 4,80$ e $DL_{70} = 130,36 \pm 4,22 \mu\text{g/mL}$ aumentaram a quantidade de proteína total, comparadas ao controle $= 108,09 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$ e a dose letal $DL_{30} = 107,80 \pm 4,23 \mu\text{g/mL}$ (Figura 1). Nos ensaios de extração e quantificação de lipídios para *P. corcovadensis* as doses letais $DL_{50} = 100,88 \pm 4,09 \mu\text{g/mL}$ e $DL_{70} = 97,72 \pm 3,68 \mu\text{g/mL}$ aumentaram a quantidade de lipídio quando comparadas ao controle $= 87,05 \pm 4,89 \mu\text{g/mL}$ e a dose letal $DL_{30} = 88,94 \pm 1,66 \mu\text{g/mL}$ (Figura 2). O mesmo padrão foi observado em *P. marginatum*, com $DL_{50} = 98,88 \pm 3,41 \mu\text{g/mL}$ e $DL_{70} = 108,83 \pm 5,12 \mu\text{g/mL}$ aumentando a quantidade de lipídio comparada ao controle $= 87,05 \pm 4,89 \mu\text{g/mL}$ e a dose letal $DL_{30} = 86,55 \pm 1,23$ (Figura 2). Em *P. arboreum* todas as doses $DL_{30-50-70} = 43,64 \pm 11,81 \mu\text{g/mL}$, $30,57 \pm 7,40 \mu\text{g/mL}$ e $22,28 \pm 3,83 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, reduziram a quantidade de lipídio quando comparadas com o controle $= 87,05 \pm 4,89 \mu\text{g/mL}$ (Figura 2). Os ensaios de extração e quantificação de açúcar total para *P. corcovadensis* mostraram uma redução na quantidade de açúcar nas $DL_{50} = 321,32 \pm 7,33 \mu\text{g/mL}$ e $DL_{70} = 150,55 \pm 6,77 \mu\text{g/mL}$ quando comparadas ao controle $= 277,44 \pm 4,15 \mu\text{g/mL}$ e a dose letal $DL_{30} = 321,32 \pm 4,85 \mu\text{g/mL}$ (Figura 3). Em *P. marginatum* $DL_{30-50-70} = 95,73 \pm 20,29 \mu\text{g/mL}$, $82,24 \pm 7,27 \mu\text{g/mL}$ e $170 \pm 8,84 \mu\text{g/mL}$, reduziram respectivamente, porém as doses letais DL_{30-50} promoveram as maiores reduções. Em *P. arboreum* as $DL_{30-50-70} = 61,02 \pm 5,31 \mu\text{g/mL}$, $143,42 \pm 5,69 \mu\text{g/mL}$ e $168,06 \pm 7,22 \mu\text{g/mL}$; reduziram a quantidade de açúcar total quando comparadas ao controle $= 277,44 \pm 4,15 \mu\text{g/mL}$, contudo a dose letal DL_{30} ocasionou a maior redução (Figura 3). Nos ensaios de extração e quantificação de glicogênio todas as doses letais $DL_{30} = 125,75 \pm 4,10 \mu\text{g/mL}$, $DL_{50} = 116,62 \pm 6,62 \mu\text{g/mL}$ e $DL_{70} = 86,76 \pm 5,28 \mu\text{g/mL}$ de *P. corcovadensis* e *P. arboreum* $DL_{30} = 23,88 \pm 2,78 \mu\text{g/mL}$, $DL_{50} = 21,30 \pm 0,40 \mu\text{g/mL}$, $DL_{70} = 31,12 \pm 2,19 \mu\text{g/mL}$ reduziram a quantidade de

glicogênio, quando comparadas com o controle= $168,08 \pm 11,47 \mu\text{g/mL}$, porém em *P. corcovadensis* a dose letal DL_{70} promoveu a maior redução comparada ao controle e as demais doses (Figura 4). Enquanto que na *P. marginatum* ocorreu o inverso, todas as doses letais DL_{30} = $329,19 \pm 11,37 \mu\text{g/mL}$, DL_{50} = $301,75 \pm 13,67 \mu\text{g/mL}$ e DL_{70} = $314,41 \pm 17,29 \mu\text{g/mL}$ aumentaram a quantidade de glicogênio quando comparadas com o controle= $168,08 \pm 11,47 \mu\text{g/mL}$ (Figura 4).

Discussão

O rendimento é uma característica importante dos óleos essenciais, uma vez que pode ser influenciada pela temperatura e umidade relativa da época de coleta do material vegetal e massa inicial da planta, sendo esta seca ou fresca (Wang *et al.* 2010, Borges *et al.* 2012, Moraes *et al.* 2014). Os rendimentos dos óleos essenciais utilizados nesta pesquisa variaram de 0,095-0,232 %. Resultados aproximados também foram encontrados por Cysne *et al.* (2005) para espécies de *Piper* spp (0,03-0,11 %). Do ponto de vista econômico, o rendimento (%) é um fator relevante a ser considerado em plantios destinados a produção comercial de óleos essenciais, como exemplos de produção de grande expressividade no Brasil tem-se o *Eucalyptus citriodora* Hook (1,30 %), o *Cymbopogon winterianus* Jowitt (2,00 %) e o *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (3,53 %), que além de serem óleos amplamente utilizados nas indústrias de perfumaria e fármacos, já são descritos na literatura com atividades inseticidas (Vitti & Brito 1999, Bizzo *et al.* 2009, Gusmão *et al.* 2013, Cruz *et al.* 2016, Dutra *et al.* 2016, Silva *et al.* 2016). Apesar dos rendimentos descritos para as espécies de *Piper* serem relativamente menores, em comparação aos rendimentos descritos para as produções comerciais, Mesquita *et al.* (2005) verificaram que espécies de *Piper* podem alcançar valores expressivos de rendimentos (0,2-2,3 %), sabendo que essa característica é também

dependente de fatores extrínsecos, pode-se sugerir que as espécies de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* alcancem rendimentos desejáveis para o mercado de óleos essenciais.

Monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides fazem parte da composição química dos óleos essenciais de *Piper* spp. (Santana *et al.* 2015, Brú & Guzman 2016) e o presente trabalho confirma a presença destas classes de terpenos para as espécies de *Piper* estudadas. O E-cariofileno foi o componente majoritário em comum para as espécies de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum*, este componente pode ser majoritário em outros óleos essenciais de *Piper*, assim como o β -pineno, limoneno, germacreno D e α -pineno (Mesquita *et al.* 2005). Estes compostos também foram identificados para as espécies de *Piper* estudadas no presente trabalho, exceto para o germacreno D que não fez parte da composição química do *P. marginatum*.

O componente majoritário da *P. corcovadensis* identificado neste trabalho foi o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, semelhante aos trabalhos de Silva *et al.* (2016) para esta mesma espécie e Nascimento *et al.* (2013) para *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. No óleo essencial de *P. arboreum* predominaram os sesquiterpenos e os sesquiterpenos oxigenados com ausência de fenilpropanoides, essa característica também foi verificada por Navickiene *et al.* (2006) e Potzernhein *et al.* (2006) estudando *P. arboreum* coletadas em São Paulo e Brasília, porém houve diferença na composição química do óleo essencial dessas plantas quando comparadas entre si e quando comparadas com as do presente trabalho, as diferenças na composição química dos óleos essenciais de *P. arboreum* podem ser atribuídas à influência das condições edafo-climáticas no metabolismo secundário assim como a localização das plantas em diferentes regiões (Taveira *et al.* 2003, Lima *et al.* 2004, Bakkali *et al.* 2008). A composição do óleo essencial da *P. marginatum* estudado neste trabalho foi bastante semelhante para o óleo desta mesma espécie em plantas coletadas na Amazônia examinadas por Andrade *et al.* (2008). No entanto os componentes majoritários do óleo essencial de *P. marginatum* foram diferentes daqueles

verificado por Autran *et al.* (2009), também estudando *P. marginatum* coletadas em Recife, a diferença dessa composição química pode ser atribuída à influência no espaço de tempo, em decorrência de fenômenos cronobiológicos (variação mensal, semanal e diária/fenologia da planta) (Rohloff *et al.* 2005, Deschamps *et al.* 2008, Moraes *et al.* 2014). A composição química do óleo de *P. marginatum* do Brasil também difere com aqueles de outros países como Costa Rica, Cuba e Colômbia (Vogler *et al.* 2006, Sánchez *et al.* 2011, Jaramillo-Colorado *et al.* 2015), a esse fato, trabalhos sugerem a existência de quimiotipos diferentes de *P. marginatum* podendo ser significativos em uma descrição taxonômica para espécie (Andrade *et al.* 2008, Brú & Guzman 2016).

Os ensaios de contato tópico revelaram que a DL₅₀ dos óleos de *P. corcovadensis* e *P. marginatum* foram 3,58 e 4,18 mg/g de inseto respectivamente, apresentando as melhores atividades quando comparadas ao óleo de *P. arboreum* com 10,91 mg/g de inseto. Esses resultados assemelham-se com os descritos na literatura para outros óleos essenciais de diferentes espécies de plantas também com ação por teste de contato frente a *S. frugiperda*, apresentando valores de DL₅₀ de 1,52; 3,20 e 5,04 mg/g de inseto para os óleos de *Foeniculum vulgare* Mill., *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex Bailey e *Ocimum gratissimum* L., respectivamente (Cruz *et al.* 2016). Os óleos essenciais de *P. corcovadensis* e *P. marginatum* em sua composição química são abundantes em monoterpenos e fenilpropanoides, diferente do óleo de *P. arboreum* rico em sesquiterpenos, essa diferença na composição pode explicar a melhor atividade dessas duas espécies para *S. frugiperda*, uma vez que monoterpenos e fenilpropanoides já são descritos na literatura com atividade para *S. frugiperda*, *S. litura* e *Chilo partellus* (Swinhoe) (Hummelbrunner & Isman 2001, Singh *et al.* 2009, Lima *et al.* 2009, Cruz *et al.* 2014).

Monoterpenos apresentam propriedades lipofílicas e fenilpropanoides, com grupos substituintes não polares, caracterizam uma propriedade hidrofóbica para essa classe. A

hidrofobicidade parece desempenhar um papel fundamental na toxicidade dessas classes de compostos, promovendo uma melhor penetração no tegumento do inseto, causando deterrência alimentar. Dessa forma terpenos e fenilpropanoides alcançam uma íntima relação entre estrutura química e atividade biológica (Dell & McComb 1981, Rice & Coats 1994, Harmatha & Nawrot 2002, Kim *et al.* 2003), podendo ser capazes de promover alterações no metabolismo e na fisiologia de insetos. Essa propriedade química pode explicar a eficiência dos óleos de *P. corcovadensis* e *P. marginatum*.

Óleo essencial de *P. corcovadensis* tem sua atividade confirmada para *Aedes aegypti* L., enquanto que a atividade de *P. marginatum* já é descrita na literatura para *A. aegypti*, *Sitophilus zeamais* Motsch., *Solenopsis saevissima*, *T. castaneum*, *Myzus persicae* (Sulzer), *Rhopalosiphum padi* (L.) e *S. littoralis* (Autran *et al.* 2009, Souto *et al.* 2012, Jaramillo-Colorado *et al.* 2015, Silva *et al.* 2016), porém a presente pesquisa elucidou a ação desses óleos na toxicidade e nos parâmetros nutricionais: proteína, lipídio, açúcar total e glicogênio, não descritos anteriormente para *S. frugiperda*.

Além dos óleos essenciais das espécies de *Piper*, é possível verificar na literatura as atividades dos compostos que se mostraram majoritários para as três espécies de *Piper* estudadas neste trabalho, sendo confirmadas a ação do 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno para *A. aegypti*; terpinoleno para *S. littoralis*, *A. aegypti* e *Aedes albopictus* (Skuse); α -felandreno para *A. aegypti* e *A. albopictus*; E-cariofileno para *Aphis gossypii* Glover e *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank); β -pineno para *S. littoralis* e *A. aegypti*; α -pineno para *S. zeamais*, *T. castaneum*, *S. littoralis* e *A. aegypti*; α -humuleno para *S. zeamais* e *T. castaneum* e limoneno para *S. frugiperda*, *Callosobruchus maculatus* (Fabr.), *S. zeamais* e *T. castaneum* (Don-Pedro 1996, Cheng *et al.* 2009, Liu *et al.* 2010, Santos *et al.* 2012, Kim & Lee 2014, Pavela *et al.* 2014, Silva *et al.* 2016 Cruz *et al.* 2017), essas informações só confirmam o potencial inseticida das espécies de *P.*

corcovadensis, *P. marginatum* e *P. arboreum* podendo assumir a atividade frente a *S. frugiperda* decorrente da presença desses compostos majoritários e abrindo margem para novos estudos envolvendo esses óleos e seus respectivos constituintes.

A natureza lipofílica de muitos terpenos sugere que os principais alvos dessa classe de compostos sejam as membranas celulares e sua toxicidade promovida pela perda do controle quimiosmótico (Cox *et al.* 2000, Inoue *et al.* 2004) a este fato compreende-se que uma vez alcançado esse alvo pode ocorrer uma disfunção celular diretamente relacionada ao insucesso das atividades bioquímicas.

A fisiologia é intimamente dependente de processos bioquímicos que convertem moléculas complexas como proteínas, lipídios, glicogênio e carboidratos em componentes simples necessários para o crescimento e metabolismo dos insetos, no que se refere a óleo essencial, Silva *et al.* (2016) verificaram que *C. winterianus* promoveu um aumento da quantidade de glicogênio e diminuição de proteínas, lipídios e açúcar totais em lagartas de *S. frugiperda*. Com relação a constituintes de óleos essenciais, Cruz *et al.* (2017) relataram uma diminuição em todos os parâmetros supracitados em lagartas tratadas com limoneno e E-anetol, sendo esses resultados mais expressivos quando os compostos foram utilizados em associação.

Os óleos essenciais de *Piper* estudados no presente trabalho alcançaram respostas significativas aos parâmetros nutricionais: proteína, lipídio, açúcar total e glicogênio. As três espécies de *Piper* reduziram a quantidade de açúcar total e os óleos das espécies de *P. corcovadensis* e *P. arboreum* promoveram a redução da quantidade de glicogênio, este fato pode ser elucidado pela presença dos sesquiterpenos na composição desses óleos essenciais uma vez que em lagartas de Lepidoptera esses terpenos bloqueiam os estimuladores de glicose e sacarose (Gershenson & Dudareva 2007). *P. corcovadensis* em todas as doses testadas reduziu a quantidade de proteína nas lagartas de *S. frugiperda*, enquanto que nas maiores doses de *P.*

marginatum, ocorreu o aumento da quantidade de proteína total, fenilpropanoide é uma classe de compostos com característica de promover a deterrência alimentar em insetos (Harmatha & Nawrot 2002), que conseqüentemente podem reduzir a eficiência do alimento ingerido, a esse fato as lagartas tratadas com o óleo essencial da *P. corcovadensis* podem ter sofrido uma disfunção na assimilação de proteína ocasionando assim a sua redução, enquanto que o estresse ocasionado pelo óleo da *P. marginatum* nas maiores doses (DL₅₀ e DL₇₀) desencadeou um acúmulo dessa substância.

Bharani & Namasivayan (2017) perceberam alterações nas enzimas intestinais lipase de *S. littoralis* após tratamento com extratos vegetais de *Punica granatum* L., essa situação pode ter ocorrido também na *P. arboreum* visto que esta promoveu uma redução de lipídio em todas as doses do óleo essencial testadas.

Alterações nesses padrões bioquímicos ocasionam efeitos adversos na fisiologia dos insetos, sendo mais acentuada em holometábolos, pois seu sucesso reprodutivo, quando adulto, depende diretamente da aquisição nutricional no período larval (Milano *et al.* 2010, Cruz *et al.* 2016). Essa relação entre o déficit nutricional e a redução da capacidade reprodutiva deve-se ao fato que proteínas como vitelogenina, catepsina B, entre outras, são importantes no processo de vitelogenese. Já os lipídios são importantes fontes de reserva e se associam a proteínas, a exemplo da lipoforina que atuam no transporte do hormônio juvenil e produção de ovos. Além dos carboidratos e açúcares que atuam no processo previtelogênico e na reserva energética, respectivamente (Arrese *et al.* 2010, Lima-Mendonça *et al.* 2014, Rosas-Mejía *et al.* 2015).

Outro ponto a ser considerado é a capacidade que alguns produtos derivados de plantas têm de modificar a histologia do intestino médio dos insetos (Barbehen 2001, Senthil-Nathan *et al.* 2008), promovendo alterações morfológicas nas células deste órgão (Vasanth-Srinivasan *et al.*

2016), podendo contribuir para não eficiência da digestão e absorção de proteínas, lipídios, glicogênio e açúcar totais, fato este que pode ter ocorrido na presente pesquisa.

Conclusões

Após análise cromatográfica por GC-EM, 85 componentes foram identificados, onde 16 foram em comum para as três espécies, e dentro destes, o E-cariofileno foi o componente majoritário. Das três espécies de *Piper* testadas, o óleo de *P. corcovadensis* foi o que mais se destacou, por apresentar um melhor rendimento, menores DL₅₀ e DL₉₀, maiores razões de toxicidade nessas mesmas doses, além de alterar as quantidades de proteína, glicogênio e açúcar total nas doses subletais (DL₃₀) e letais (DL_{50,70}). Essas observações auxiliam na elucidação dos efeitos tóxicos que os óleos essenciais podem ocasionar em doses subletais e letais, confirmando a importância do estudo de cada espécie de planta individualmente, abrindo margem para investigação dos efeitos potenciais de óleos essenciais e seus modos de ação nos insetos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida ao primeiro autor. Ao Jardim Botânico do Recife pela concessão das folhas de *Piper* spp. utilizadas no trabalho.

Literatura Citada

- Adams, R.P. 2009.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, Allured Publishing, Carol Stream, IL, 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. 88: 1-11.

- Andrade, E.H.A., L.M.M. Carreira, M.H.L. Silva, J.D. Silva, C.N. Bastos, P.J.C. Sousa, E.F. Guimarães & J.G.S. Maia. 2008.** Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chem. Biodivers.* 5: 197-208.
- 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.
- Autran, E.S., I.A. Neves, C.S.B. Silva, G.K.N. Santos, C.A.G. Câmara & D.M.A.F. Navarro. 2009.** Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresour. Technol.* 100: 2284-2288.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck & M. Idaomar. 2008.** Biological effects of essential oi – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446-475.
- Barbehenn, R.V. 2001.** Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 86-99.
- Bezerra-Silva, P.C., K.A. Dutra, G.K.N. Santos, R.C.S. Silva, J. Iulek, P.Milet-Pinheiro & D.M.A.F. Navarro. 2016.** Evaluation of the activity of the essential oil from an ornamental flower against *Aedes aegypti*: electrophysiology, molecular dynamics and behavioral assays. *PLoS One.* 11: 1-15.
- Bharani, R.S.A. & S.K.R. Namasivayam. 2017.** Biogenic silver nanoparticles mediated stress on developmental period and gut physiology of major lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) - An eco-friendly approach of insect pest control. *J. Environ. Chem. Eng.* 5: 453-467.
- Bizzo, H.R., A.M.C. Hovell & C.M. Rezende. 2009.** Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quím. Nova* 32: 588-594.
- Borges, A.M., J. Pereira, M.G. Cardoso, J.A. Alves & E.M.P. Lucena. 2012.** Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). *Rev. Bras. Pl. Med.* 14: 656-665.
- 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.
- Brú, J. & J.D. Guzman. 2016.** Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. *Braz. J. Pharmacog.* 26:767-779.
- Bueno, R.C.O.F., A.F. Bueno, F. Moscardi, J.R. Parra & C.B. Hoffmann-Campo. 2011.** Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. *Pest Manag. Sci.* 67: 170-174.

- 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.
- Cheng, S.S., H.T. Chang, C.Y. Lin, P.S. Chen, C.G. Huang, W.J. Chen & S.T. Chang. 2009.** Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavata* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Pest Manag. Sci.* 65, 339-343.
- Clark, P.L. J. Molina-Ochoa, S. Martinelli, S.R. Skoda, D.J. Isenhour, D.J. Lee, J.T. Krumm & J.E. Foster. 2007.** Population variation of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in the Western Hemisphere. *Int. J. Insect Sci.* 7: 1-10.
- Cox, S.D., C.M. Mann, J.L. Markham, H.C. Bell, J.E. Gustafson, J.R. Warmington & S.G. Wyllie. 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88: 170-175.
- 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.** 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, 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.
- 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.
- Cysne, J.B., K.M. Canuto, O.D.L. Pessoa, E.P. Nunes & E.R. Silveira. 2005.** Leaf Essential Oils of Four *Piper* Species from the State of Ceará - Northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 16: 1378-1381.
- Dell, B. & A.J. McComb. 1981.** Plant resins – Their formation, secretion and possible functions. *Adv. Bot. Res.* 6: 278-316.
- Deschamps, C., J.L. Zanatta, H.R. Bizzo, M.C. Oliveira & L.C. Roswalka. 2008.** Avaliação sazonal do rendimento de óleo essencial em espécies de *Menta*. *Ciênc. agrotec.* 32: 725-730.
- Di Stasi, L.C., C.A. Hiruma-Lima, F.G. Gonzalez & W.G. Portilho. 2002.** Violaes medicinais, p. 147-173. In Di L.C. Stasi, & C.A. Hiruma-Lima (eds.), *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. Fundação Editora Unesp, São Paulo, 592p.

- Don-Pedro, K.N. 1996.** Fumigant toxicity is the major route of insecticidal activity of citruspeel essential oils. *Pestic. Sci.* 46: 71-78.
- Duarte, M.C.T., E.E. Leme, C. Delarmelina, A.A. Soares, G.M. Figueira & A. Sartoratto. 2007.** Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J. Ethnopharmacol.* 111: 197-201.
- Duarte, Y., O. Pino, D. Infante, Y. Sánchez, M.d.C. Travieso & B. Martínez. 2013.** Efecto in vitro de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *Rev. Prot. Veg.* 28: 54-59.
- Dutra, K.A., J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, D.R.S. Barbosa & J.P. Oliveira. 2016.** Control of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in *Vigna unguiculata* (L.) WALP. with essential oils from four *Citrus* spp. plants. *J. Stored Prod. Res.* 68: 25-32.
- FAO 2013.** Food and Agriculture Organization. World Production. Disponível em: <www.faostat.org.br>. Access in: 15 mar. 2017.
- Figueiredo, R.A. & M. Sazima. 2000.** Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Ann. Bot.* 85: 455-460.
- Gershenson, J. & N. Dudareva. 2007.** The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3: 408-414.
- Guimarães, E.F. & M. Carvalho-Silva. 2012.** Piperaceae. p. 263-320. In: M.G.L. Wanderley, S.E. Martins, R.P. Romanini, T.S. Melhem, G.J. Shepherd, A.M. Giulietti, J.R. Pirani, M. Kirizawa, M.M.R.F. Melo, I. Cordeiro & L.S. Kinoshita (eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo. 320p.
- 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.
- Harmatha, J. & J. Nawrot. 2002.** Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. *Entomol. Exp. Appl.* 104: 51-60.
- 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. Agric. Food Chem.* 49: 715-720.
- Inoue, Y., A. Shiraishi, T. Hada, K. Hirose, H. Hamashima & J. Shimada. 2004.** The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* 237: 325-331.

- Jaramillo-Colorado, B., J. Julio-Torres, E. Duarte-Restrepo, A. Gonzalez-Coloma & L.F. Julio-Torres. 2015.** Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. Colombiano. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas 14: 343-354.
- Kim, E.H, H.K. Kim, D.H. Choi, & Y.J. Ahn. 2003.** Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). Appl. Entomol. Zool. 38: 261-266.
- Kim, S.I. & D.W. Lee. 2014.** Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. J. Asia Pac. Entomol. 17: 13-17.
- Lima, M.P., T.M.D. Silva, J.D. Silva, M.G.B. Zoghbi & E.H.A. Andrade. 2004.** Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba canelilla* (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. Acta Amaz. 34: 2-4.
- 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.
- Lima-Mendonça, A., A.L. Mendonça, A.E.G. Sant'Ana & R.R. Nascimento. 2014.** Semioquímicos de moscas das frutas do gênero *Anastrepha*. Quím. Nova 37: 293-301.
- Liu, Y.Q., M. Xue, Q.C. Zhang, F.Y. Zhou & J.Q. Wei. 2010.** Toxicity of β -caryophyllene from *Vitex negundo* (Lamiales: Verbenaceae) to *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) and its action mechanism. Acta Entomol. Sin. 53: 396-404.
- Madbouly, S.A., C. Zhang & M.R. Kessler. 2015.** Bio-based plant oil polymers and composites. Elsevier Inc., Oxford, UK, 213p.
- Maia, J.G.S., C.L. Green & M.J. Milchard. 1993.** New source of natural safrole. Flavour Fragr. J. 18: 20-22.
- Maia, J.G.S., M.H.L. Silva, A.I.R. Luz, M.G.B. Zoghbi & L.S. Ramos. 1987.** Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. Quím. Nova 10: 200-204.
- Mesquita, J.M.O., C. Cavaleiro, A.P. Cunha, J. Lombardi & A.B. Oliveira. 2005.** Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. Braz. J. Pharmacog. 15: 6-12.
- Milano, P., E. Berti-Filho, J.R.P. Parra, M.L. Oda & F.L. Cònsoli. 2010.** Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade de espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elasmobranchidae. Neotrop. Entomol. 39: 172-180.

- Moraes, M.M., T.M. Silva, R.R. Silva, C.S. Ramos & C.A. Câmara. 2014.** Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas 13: 270-277.
- Nagoshi, R.N. 2009.** Can the amount of corn acreage predict fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation levels in nearby cotton? J. Econ. Entomol. 102: 210-218.
- Nascimento, J.C., J.M. David, L.C. Barbosa, V.F. Paula, A.J. Demuner, J.P. David, L.M. Conserva, J.C. Ferreira & E.F. Guimarães. 2013.** Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae). Pest Manag. Sci. 69: 1267-1271.
- Navickiene, H.M.D., A.A. Morandim, A.C. Alécio, L.O. Regasini, D.C. Bergamo, M. Telascra, A.J. Cavalheiro, M.N. Lopes, VS. Bolzani, M.O. Marques, M.C.M. Young & M.J. Kato 2006.** Composition and antifungal activity of essential oil from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Quím Nova 29: 467-470.
- Pavela R. 2014.** Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. Ind. Crops Prod. 60: 247-258.
- Pereira, L.A., G.E. Barboza, M.G. Bovini, M.Z. De Almeida & E.F. Guimarães. 2011.** Caracterización y uso de pimientas en una comunidad Quilombola de la Amazonía Oriental (Brasil). J Bot Res Inst. Tex. 5: 255-272.
- Pogue, G.M. 2002.** A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). Mem. Am. Entomol. Inst. 43: 1-202.
- Potzernheim, M.C.L., H.R. Bizzo & R.F. Vieira 2006.** Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). Rev. Bras. Farmacogn. 16: 246-251.
- Preedy, V.R. 2015.** Essential oil in food preservation, flavour and safety. London, Academic Press, 862p.
- Prowell, D.P., M. McMichael & J.F. Silvain. 2004.** Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 97: 1034-1044.
- Rice, P.J. & J.R. Coats. 1994.** Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and the southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 87: 1172-1179.
- Rohloff, J., S. Dragland, R. Mordal & T.H. Iversen. 2005.** Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield and quality of peppermint (*Mentha x piperita* L.). J. Agric. Food Chem. 53: 4143-4148.

- Rosas-Mejía, M., A. Correa-Sandoval, C.S. Venegas-Barrera & J.V. Horta-Veja. 2015.** Preferencias entre cinco carbohidratos en *Pheidole bilimeki* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool. Mex.* 31: 291-297.
- Sánchez, Y., T.M. Correa, Y. Abreu & O. Pino. 2012.** Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson. *Rev. Protec. Veg.* 27: 39-44.
- Sánchez, Y., T.M. Correa, Y. Abreu, B. Martínez, Y. Duarte & O. Pino. 2011.** Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. *Rev. Protec. Veg.* 26: 170-176.
- Santana, H.T., F. Trindade, R.G. Stabeli, A.A.E. Silva, J.S.L.T. Militão & V.A. Facundo. 2015.** Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 17: 105-111.
- Santos, G.K.N., K.A. Dutra, R.S. 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.
- Santos, G.K.N., K.A. Dutra, C.S. Lira, B.N. Lima, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, C.A. Maranhão, S.S.F. Brandão & D.M.A.F. Navarro. 2014.** Effects of *Croton rhamnifolioides* essential oil on *Aedes aegypti* oviposition, larval toxicity and trypsin activity. *Molecules* 19: 16573-87.
- Santos, M.R.A., R.A. Lima, C.F. Fernandes, A.G. Silva & V.A. Facundo. 2011.** Atividade fungicida do óleo essencial de *Piper marginatum* L. (Piperaceae) sobre *Fusarium oxysporum* (Schlecht) in vitro. *Rev. Saúde Pesq.* 4: 09-14.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Senthil-Nathan, S. 2013.** Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Front. Physiol.* 359: 1-17.
- Sequeda-Castañeda, L., C. Celis, S. Gutiérrez & F. Gamboa. 2015.** *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae): phytochemical: therapeutic, botanical insecticidal and phy-tosanitary uses. *Pharmacologyonline* 3: 136-145.
- Sharma, P., L. Mohan, K.K. Dua & C.N. srivastava. 2011.** Status os carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. *Asina. 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) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. *Acta Histochem.* 118: 347-352.

Silva, M.F.R., P.C. Bezerra-Silva, C.S. Lira, B.N.L. Albuquerque, A.C. Agra Neto, E.V. Pontual, J.R. Maciel, P.M.G. Paiva & D.M.A.F. Navarro. 2016. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). *Exp. Parasitol.* 165: 64-70.

Singh, R., O. Koul, P.J. Rup & J. Jindal. 2009. Toxicity of some essential oil constituents and their binary mixtures against *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Int. J. Trop. Insect Sci.* 29: 93-101.

Souto, R., A. Harada, E. Andrade & J. 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.

Taveira, F.S.N., E.H.A. Andrade, W.N. Lima & J.G.S. Maia. 2003. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 75: 27-31.

Van Den Dool, H. & P.D.J.A. Kratz. 1963. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11: 463-471.

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.

Vasanth-Srinivasan, P., S. Senthil-Nathan, A. Thanigaivel, E.S. Edwin, A. Ponsankar, S. Selin-Rani, V. Pradeepa, M. Sakthi-Bhagavathy, K. Kalaivani, W.B. Hunter, V. Duraipandiyam & N.A. Al-Dhabi. 2016. Developmental response of *Spodoptera litura* Fab. to treatments of crude volatile oil from *Piper betle* L. and evaluation of toxicity to earthworm, *Eudrilus eugeniae* Kinb. *Chemosphere* 155: 336-247.

Vitti, A.M.S. & J.O. Brito. 1999. Avaliação do rendimento e do teor de citronelal do óleo essencial de procedências e raças de *Eucalyptus citriodora*. *Sci. Forest.* 56: 145-154.

Vogler, B., J.A. Noletto, W.A. Haber & W.N. Setzer. 2006. Chemical constituents of the essential oils of three *Piper* species from Monteverde, Costa Rica. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 9: 230-238.

Wang, H.W., Y.Q. Liu, S.L. Wei, Z.J. Yan & K. Lu. 2010. Comparison of microwave-assisted and conventional hydrodistillation in the extraction of essential oils from mango (*Mangifera indica* L.) flowers. *Molecules* 15: 7715-7723.

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.

Yukes, J.E. & M.J. Balick. 2011. Dominican medicinal plants: A guide for health care providers. The New York Botanical Garden, New York. 25p.

Tabela 1. Identificação e proporções dos constituintes dos óleos essenciais de folhas de *Piper* spp.

Nº	Composto ¹	<i>Piper corcovadensis</i>			<i>Piper marginatum</i>		<i>Piper arboreum</i>	
		IR ²	IR ⁵	Área (% do total± σ)	IR ⁵	Área (% do total± σ)	IR ⁵	Área (% do total± σ)
1	α -tujeno	924	-	-	924	0,12±0,01	-	-
2	α -pineno	932	929	5,78± 0,06	930	8,45±1,05	930	0,69±0,04
3	canfeno	946	943	0,07± 0,01	944	0,13±0,02	-	-
4	sabineno	969	970	0,05± 0,01	970	0,09±0,06	-	-
5	β -pineno	974	972	2,25± 0,2	973	6,51±0,69	973	0,54±0,05
6	mirceno	988	990	1,71± 0,02	990	1,36±0,16	990	0,13±0,01
7	α -felandreno	1002	1001	0,79±0,01	1002	6,97±0,82	-	-
8	δ -3-careno	1008	1007	1,15±0,01	1008	0,57±0,07	1008	0,13±0,02
9	α -terpineno	1014	1014	1,09±0,01	1014	2,33±0,27	1015	0,52±0,05
10	o-cimeno	1022	1022	0,59±0,01	1023	0,95±0,11	1023	0,19±0,02
11	limoneno	1024	1026	1,87±0,02	1026	4,98±0,59	1027	0,24±0,03
12	β -(Z)- ocimeno	1032	-	-	1038	0,69± 0,06	1038	0,57±0,03
13	β -(E)- ocimeno	1044	1048	0,16±0	1048	2,69±0,30	1048	0,53±0,04
14	γ -terpineno	1054	-	-	1057	0,09±0,02	-	-
15	terpinoleno	1086	1087	13,7±0,14	1087	0,32±0,04	1087	0,19±0,01
16	perileno	1102	-	-	-	-	1117	0,26±0,01
17	δ -elemeno	1335	-	-	1338	2,57±0,06	1338	4,01±0,03
18	α -cubebeno	1348	1350	0,14±0	-	-	1350	0,28±0
19	ciclosativeno	1369	1365	0,04±0	-	-	1366	0,24±0
20	α -copaeno	1374	1376	0,75±0,01	1376	1,00±0,04	1376	3,55±0,04
21	β -bourboneno	1387	1385	0,09±0	1385	0,14±0,01	1385	0,20±0,01
22	β -elemeno	1389	1392	0,36±0,02	1392	1,21±0,03	1392	3,47±0,03
23	cipereno	1398	-	-	-	-	1400	0,93±0,01
24	1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno	1408 ³	1402	35,1±0,14	-	-	-	-
25	α -gurjuneno	1409	1410	0,56±0,01	-	-	1410	0,56±0,01
26	β -funebreno	1413	-	-	-	-	1416	0,18±0,01
27	E-cariofileno	1417	1420	6,02±0,02	1420	5,71±0,16	1420	8,26±0,1
28	miltail-4(12)-ene	1445	-	-	1444	0,25±0,01	-	-
29	β -copaeno	1430	1430	0,5±0,02	-	-	1430	0,88±0,03

Continuação da Tabela 1.

30	β -gurjuneno	1431	1433	0,25 \pm 0	-	-	-	-
31	γ -elemeno	1434	-	-	-	-	1434	0,1 \pm 0,03
32	α -guaiano	1437	-	-	-	-	1439	1,97 \pm 0,02
33	aromadendreno	1439	-	-	-	-	1444	0,39 \pm 0,01
34	Z-Muuroala-3,5-dieno	1448	1447	0,22 \pm 0,02	-	-	-	-
35	E-Muuroala-3,5-dieno	1451	1451	0,09 \pm 0,01	-	-	-	-
36	α -humuleno	1452	1454	0,71 \pm 0,02	1455	0,26 \pm 0,01	1455	4,63 \pm 0,05
37	croweacin	1457	-	-	1461	0,94 \pm 0,11	-	-
38	allo-aromadendreno	1458	1462	0,41 \pm 0,02	-	-	1461	2,66 \pm 0,03
39	Ishwarane	1465	-	-	1464	1,93 \pm 0,07	-	-
40	α -macrocarpeno	1470	-	-	1474	0,13 \pm 0,03	-	-
41	E-Cadina-1 (6),4-dieno	1475	1473	0,03 \pm 0	-	-	1475	0,08 \pm 0,01
42	γ -muuroleno	1478	1476	0,35 \pm 0,18	1482	0,09 \pm 0,03	1478	2,31 \pm 0,01
43	germacreno D	1480	1481	2,21 \pm 0,03	-	-	1482	6,53 \pm 0,08
44	β -selineno	1489	-	-	1487	0,31 \pm 0,07	1490	0,84 \pm 0,01
45	β -(Z)-guaiano	1492	-	-	1494	0,38 \pm 0,06	-	-
46	epi-cubebol	1493	1495	0,27 \pm 0,05	-	-	-	-
47	zingibereno	1493	-	-	-	-	1496	14,9 \pm 0,21
48	biciclogermacreno	1500	1497	0,49 \pm 0,02	1498	0,26 \pm 0,05	-	-
49	α -muuroleno	1500	1501	0,04 \pm 0	-	-	1501	3,57 \pm 0,08
50	α -bulneseno	1509	-	-	-	-	1507	3,61 \pm 0,04
51	γ -cadineno	1513	1515	2,26 \pm 0,02	-	-	1515	0,82 \pm 0,01
52	δ -cadineno	1522	1525	5,19 \pm 0,02	1525	0,25 \pm 0,06	1525	7,57 \pm 0,08
53	E-cadina-1,4-dieno	1533	1534	0,34 \pm 0,01	-	-	1533	0,14 \pm 0,16
54	α -cadineno	1537	1539	0,37 \pm 0	-	-	1539	0,19 \pm 0,01
55	elemol	1548	-	-	1550	1,34 \pm 0,12	1550	0,11 \pm 0,01
56	Z-muurool-5-em-4- β -ol	1550	1549	0,08 \pm 0	-	-	-	-
57	germacreno B	1559	-	-	-	-	1558	0,04 \pm 0,01
58	E-nerolidol	1561	-	-	1564	1,53 \pm 0,12	1564	5,60 \pm 0,08
59	palustrol	1567	1569	0,14 \pm 0,01	-	-	1569	0,28 \pm 0,01
60	γ -asarone	1572	-	-	1576	0,38 \pm 0,03	-	-
61	germacreno D-4-ol	1574	1577	4,52 \pm 0,05	-	-	-	-
62	spatuleno	1577	-	-	1579	0,11 \pm 0,01	1579	0,84 \pm 0,02

Continuação da Tabela 1.

63	óxido cariofileno	1582	1585	0,55±0,01	1585	0,14±0,02	-	-
64	cubebol	1582	1590	0,03±0	-	-	-	-
65	globulol	1590	-	-	-	-	1585	1,27±0,02
66	viridiflorol	1592	1605	0,18±0,01	-	-	1593	0,60±0,01
67	guaiol	1600	-	-	1599	0,49±0,04	-	-
68	ledol	1602	-	-	-	-	1605	1,21±0,01
69	Z-asarone	1616	-	-	1623	2,55±1,02	-	-
70	1,10-di-epi-cubenol	1618	1617	0,21±0	-	-	-	-
71	isolongifolan-7- α -ol	1618	-	-	-	-	1614	0,41±0,03
72	junenol	1618	-	-	-	-	1620	0,15±0,01
73	1-epi-cubenol	1627	1630	0,25±0,01	-	-	-	-
74	metoxi-4,5-(metilenodioxo)-propiofenona	1627 ⁴	-	-	1628	5,50±0,17	-	-
75	γ -eudesmol	1630	-	-	-	-	1627	0,23±0,01
76	epi- α -cadinol	1638	1643	2,63±0,11	-	-	1630	1,59±0,02
77	epi- α -muurulol	1640	-	-	-	-	1644	2,31±0,06
78	α -muurulol	1644	1648	0,05±0,04	-	-	1648	1,53±0,03
79	β -eudesmol	1649	-	-	1652	0,05±0,03	-	-
80	α -cadinol	1652	1656	3,86±0,1	-	-	1656	3,46±0,06
81	exalatacina	1655	-	-	1659	9,12±0,90	-	-
82	selin-11-en-4- α -ol	1658	-	-	-	-	1661	0,21±0,01
83	bulnesol	1670	-	-	1670	0,08±0,01	-	-
84	E-asarone	1675	-	-	1682	3,53±0,34	-	-
85	2-metoxi-4,5-(metilenodioxo)-propiofenona	1713	-	-	1718	22,19±2,14	-	-
Monoterpeno				29,21%		36,25%		3,73%
Monoterpeno Oxigenado				-		0,07%		0,26%
Sesquiterpeno				21,42%		14,49%		72,91%
Sesquiterpeno oxigenado				12,77%		6,29%		19,8%
Fenilpropanoide				35,1%		41,66%		-
Total identificado				98,51%		71,07%		96,71%
Rendimento do óleo essencial				0,232±0,01 %		0,114±0,02%		0,095±0,008 %

¹Constituintes listados em ordem de eluição na coluna apolar DB-5, detector GC-FID; ²Índices de retenção de Kratz da literatura (Adams 2009); ³Índices de retenção de Kratz da literatura (Nascimento *et al.* 2013); ⁴Índices de retenção de Kratz da literatura (Andrade *et al.* 2008); ⁵Índices de retenção de Kratz calculados através dos tempos de retenção em relação aos da série de n-alcenos (C₈-C₂₅); Rendimento calculado a partir da razão m/m (massa de óleo obtido/massa de material fresco).

Tabela 2. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper* spp. em lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamentos	N ¹	GL ²	Inclinação ³ (±EP)	DL ₅₀ ⁴ (IC95%) mg/g	RT ₅₀ ⁵	DL ₉₀ ⁴ (IC95%) mg/g	RT ₉₀ ⁵	χ ²
<i>P. corcovadensis</i>	150	3	5,17 ±0,74	3,58 (3,10-4,02)	3,04	6,34 (5,56-7,72)	8,64	0,28
<i>P. marginatum</i>	180	4	2,00±0,27	4,18 (3,18-5,30)	2,61	18,16 (12,88-31,24)	3,01	4,67
<i>P. arboreum</i>	180	4	1,82±0,31	10,91 (8,37-14,20)	-	54,83 (34,63-131,04)		3,97

¹Número de insetos usados no teste,

²Grau de liberdade,

³Erro padrão da média,

⁴Dose Letal e intervalo de confiança,

⁵Razão de toxicidade,

χ²= Qui-quadrado.

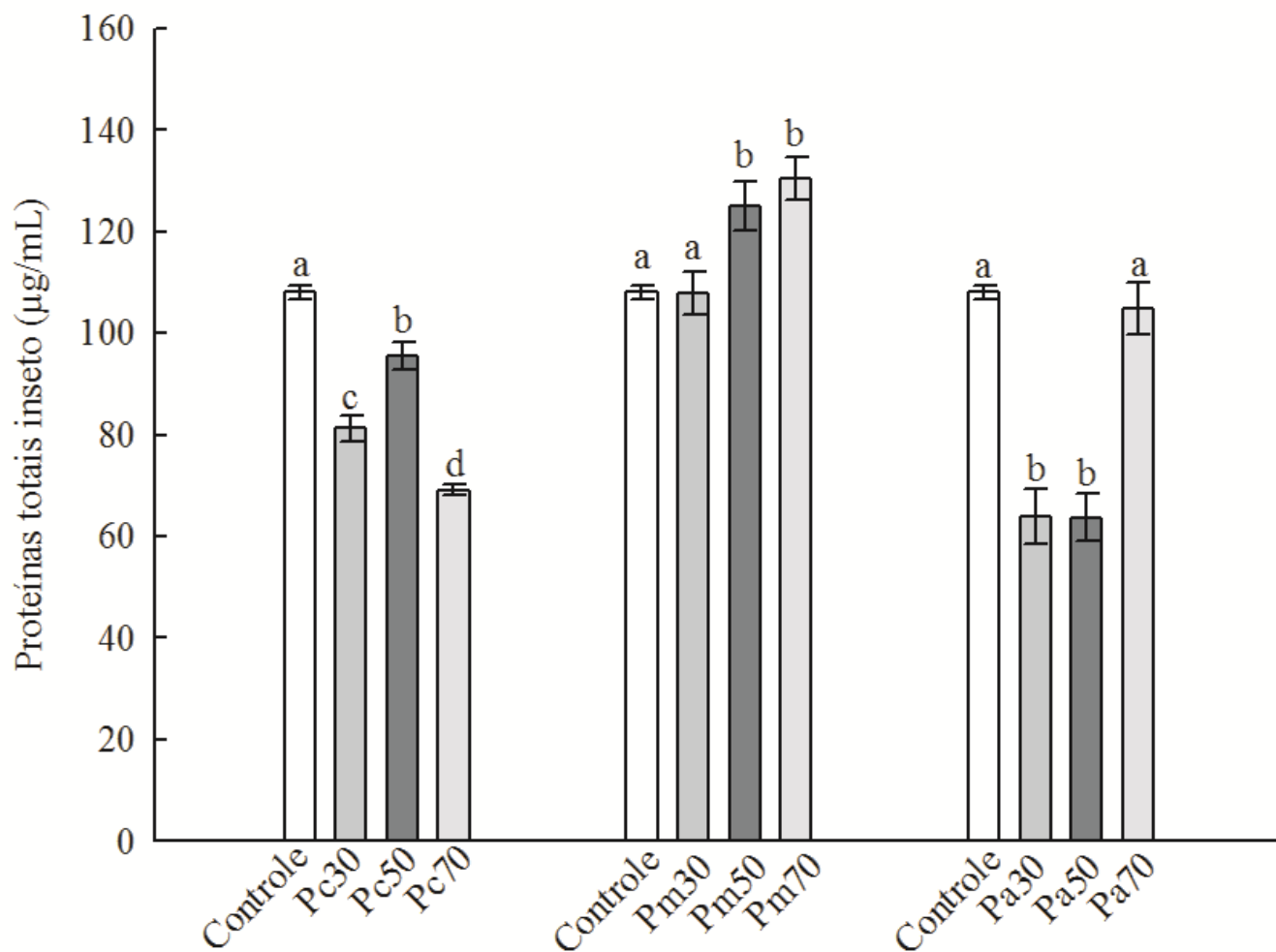


Figura 1. Quantidade de proteínas totais (médias \pm erro padrão) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* submetidas ao ensaio de toxicidade por contato tópico nas Doses Letais (30-50-70), dos óleos essenciais de *Piper corcovadensis* (Pc), *Piper marginatum* (Pm) e *Piper arboreum* (Pa). Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

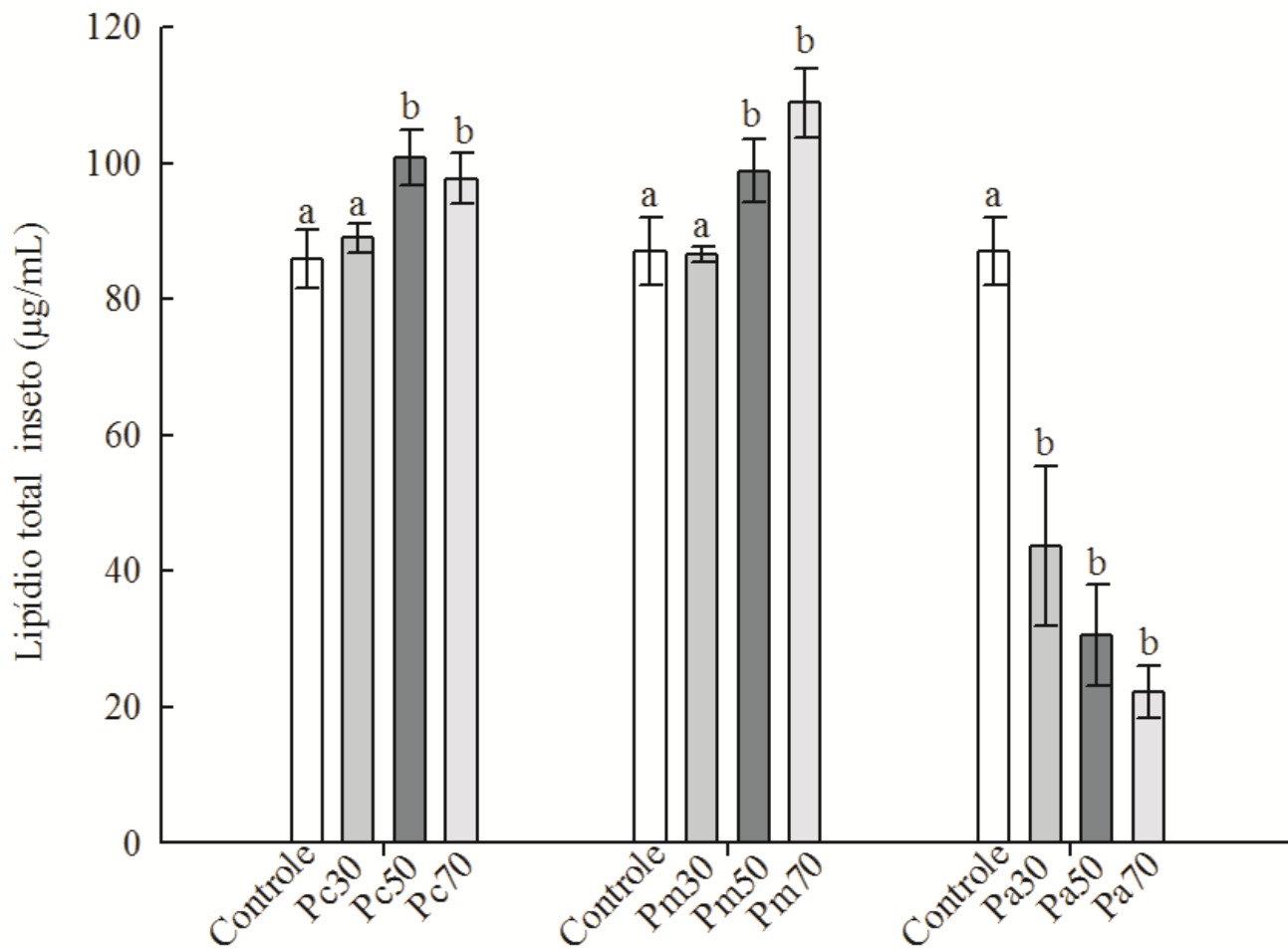


Figura 2. Quantidade de lipídios totais (médias \pm erro padrão) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* submetidas ao ensaio de toxicidade por contato tópico nas Doses Letais (30-50-70), dos óleos essenciais de *Piper corcovadensis* (Pc), *Piper marginatum* (Pm) e *Piper arboreum* (Pa). Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

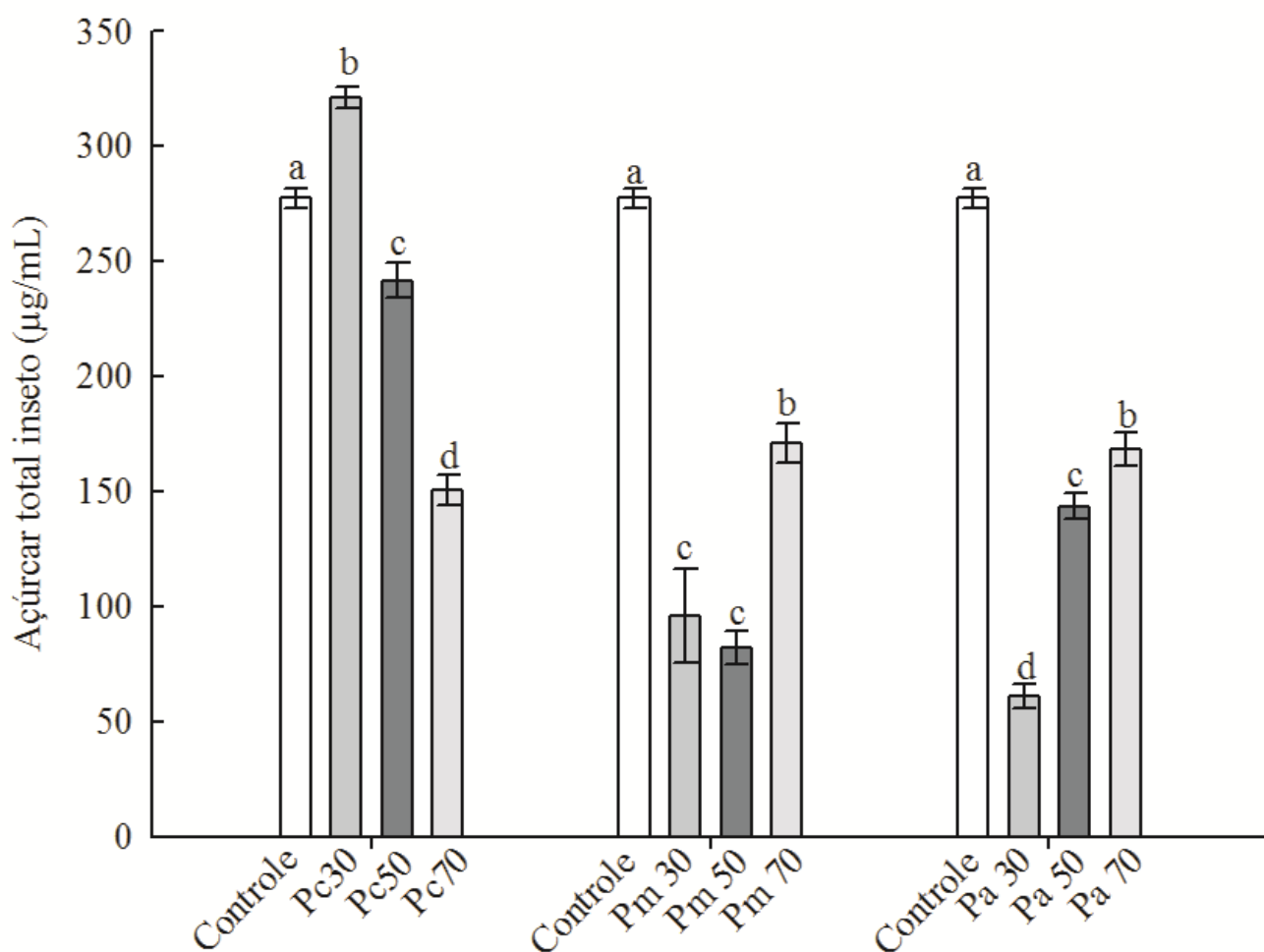


Figura 3. Quantidade de açúcar total (médias \pm erro padrão) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* submetidas ao ensaio de toxicidade por contato tóxico nas Doses Letais (30-50-70), dos óleos essenciais de *Piper corcovadensis* (Pc), *Piper marginatum* (Pm) e *Piper arboreum* (Pa). Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

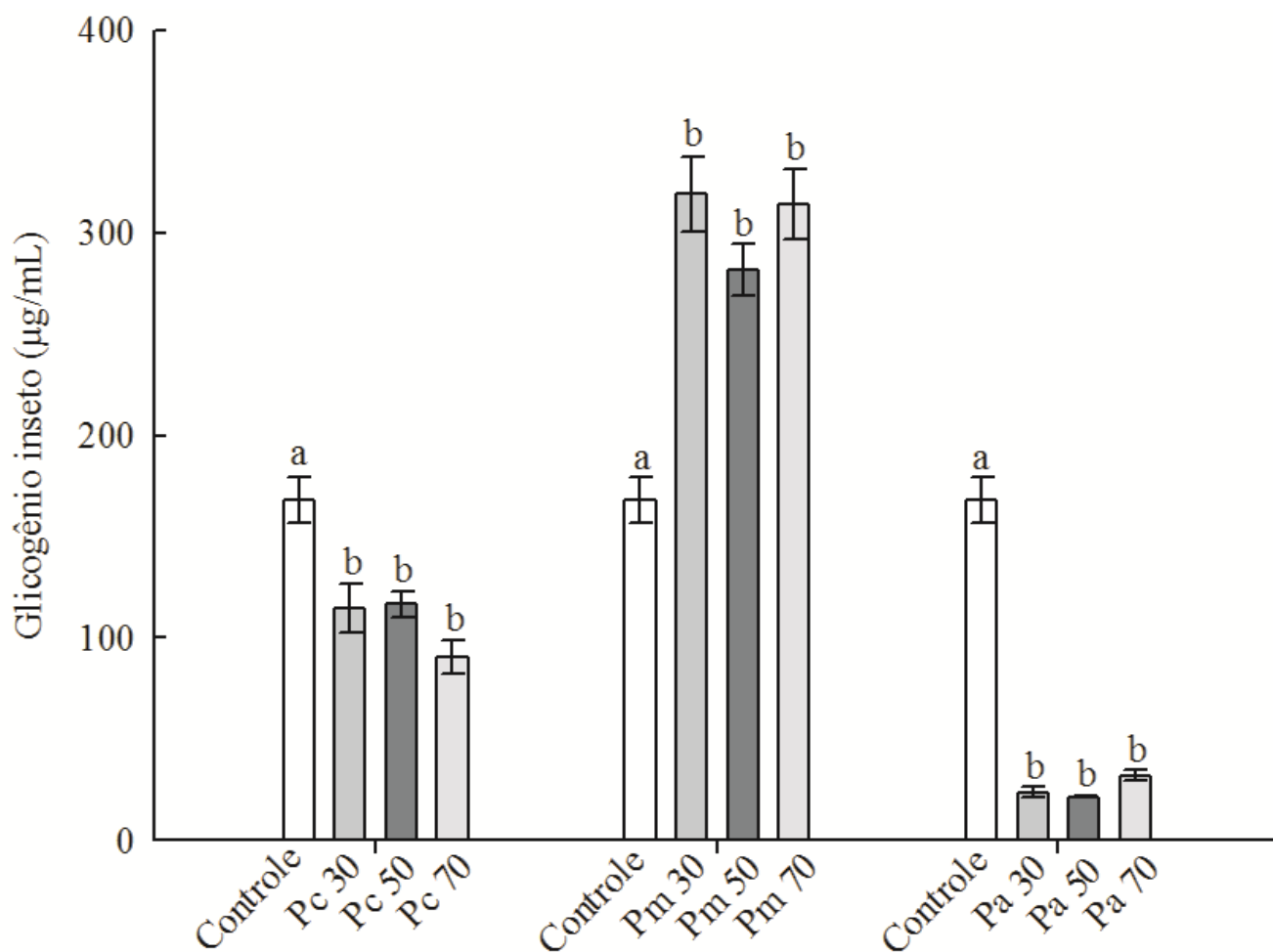


Figura 4. Quantidade de glicogênio (médias \pm erro padrão) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* submetidas ao ensaio de toxicidade por contato tópico nas Doses Letais (30-50-70), dos óleos essenciais de *Piper corcovadensis* (Pc), *Piper marginatum* (Pm) e *Piper arboreum* (Pa). Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

CAPÍTULO 3

ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DO INTESTINO MÉDIO E CORPO
GORDUROSO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)
FRENTE A ÓLEOS ESSENCIAS DO GÊNERO DE *Piper*

KAMILA A. DUTRA¹

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

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

¹Dutra, K.A. Estudo morfológico e imunohistoquímico do intestino médio e corpo gorduroso de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) frente a óleos essenciais do gênero de *Piper*. A ser submetido.

RESUMO - Óleos essenciais podem ser uma alternativa promissora ao uso de inseticidas, este fato é comprovado pelo aumento das pesquisas nesta área visando estudar possíveis efeitos deletérios em insetos praga. Assim, objetivou-se avaliar os óleos *Piper corcovadensis*, *Piper marginatum* e *Piper arboreum* nas DL₅₀, após 48 h por contato tópico, em lagartas de *S. frugiperda*, sobre a histologia, morfometria, histoquímica e imunohistoquímica no intestino médio e corpo gorduroso. A cromatografia dos óleos revelou que o E-cariofileno foi o composto majoritário comum para as espécies de *Piper*. A utilização dos óleos essenciais de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arborerum*, promoveram alterações deletérias no intestino médio das lagartas de *S. frugiperda*. Porém *P. corcovadensis* foi o óleo que proporcionou melhores resultados, por apresentar a menor DL₅₀, ocasionar alterações histopatológicas, tais como, alongamento das células colunares com formação de protusões e extrusões citoplasmáticas, redução na quantidade de carboidratos, um aumento do índice apoptótico em 25% e menor proliferação celular, diferente de *P. arborerum*, que apesar de ocasionar alterações histopatológicas semelhantes ao *P. corcovadensis*, apresentou o maior índice de proliferação celular (15,75 %), bem como um aumento das células regenerativas (15,70 %), indicando uma regeneração mais rápida do epitélio. Esses resultados demonstram o potencial inseticida mais evidente de *P. corcovadensis* no controle desta praga, por ocasionar danos permanentes no intestino médio.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta-do-cartucho, produtos naturais, histofisiologia, apoptose, proliferação celular, morfometria.

MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY STUDY OF THE MIDGUT AND
FATY BODY OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)
AGAINST ESSENCIAL OILS GENUS OF *Piper*

ABSTRACT - Essential oils can be a promising alternative to the use of insecticides, this fact is proven by the increase of the research in this area aiming to study possible deleterious effects on pest insects. The objective of this study was to evaluate the *Piper corcovadensis*, *Piper marginatum* and *Piper arboreum* oils in the LD₅₀ after 48 h by topical contact in *S. frugiperda* on histology, morphometry, histochemistry and immunohistochemistry in the midgut and faty body. Chromatography of the oils revealed that E-caryophyllene was the major compound common to *Piper* species. The use of the essential oils of *P. corcovadensis*, *P. marginatum* and *P. arborerum*, promoted deleterious changes in the midgut of *S. frugiperda*. However, *P. corcovadensis* was the oil that provided the best results because it presented the lowest LD₅₀, causing histopathological alterations, such as columnar cell elongation with formation of protrusions and extrusions cytoplasmic, reduction in the amount of carbohydrates in the intestine medium, an apoptotic index increase of 25% and a lower cell proliferation, different from *P. arborerum*, which, despite causing histopathological changes similar to *P. corcovadensis*, had the highest rate of cell proliferation (15,75 %), as well as an increase in regenerative cells (15,70 %), indicating a faster regeneration of the epithelium. These results demonstrate the most evident insecticidal potential of *P. corcovadensis* in the control of this pest, as it causes permanent damage to the midgut.

KEY WORDS: Fall armyworm, natural products, histophysiology, apoptosis, cell proliferation, morphometry

Introdução

Pesquisas indicam que a composição química e o amplo espectro de atividade biológica dos óleos essenciais são a combinação para um modo de ação com alvos múltiplos em insetos, relatos para interferência neurotóxica com ação na octopamina neuromoduladora e em canais de cloreto GABA já são descritos na literatura (Sikkemma *et al.* 1995, Kostyukovsky *et al.* 2002, Choi *et al.* 2003, Sedy & Koschier 2003, Priestley *et al.* 2003, Enan 2005, Rattan 2010). A propriedade lipofílica dos óleos essenciais pode elucidar a penetração destes através da cutícula dos insetos alcançando sistemas fisiológicos e conseqüentemente diferentes órgãos podem ser afetados como, por exemplo, o intestino médio e o corpo gorduroso (Rice & Coats 1994, López *et al.* 2011).

O sistema digestivo dos insetos é dividido em três regiões distintas, a saber, estomodeu (ou intestino anterior), mesêntero (ou intestino médio) e proctodeu (ou intestino posterior). Dentre essas regiões o intestino médio ganha destaque, pois é o principal local de digestão e absorção dos nutrientes e nele ocorre a síntese e secreção de enzimas e hormônios, além de apresentar uma matriz peritrófica como mecanismo de defesa, no entanto constitui-se um órgão vulnerável à ação de elementos não desejáveis uma vez que o trato digestivo possibilita o contato entre o meio interno e o ambiente, tornando-se um órgão importante para estudos ecotoxicológicos (Levy *et al.* 2004, Martins *et al.* 2006, Chapman 2013, Catae *et al.*, 2014). O intestino médio é um alvo interessante, pois qualquer efeito prejudicial pode acarretar na deterrência alimentar, afetando o crescimento e o desenvolvimento do inseto, bem como a morte por intoxicação (Hakim *et al.* 2010).

O corpo gorduroso associado ao intestino médio é um importante local de armazenamento para polissacarídeos e compostos protéicos, além de ser um dos tecidos mais importantes nos processos de manutenção e de reprodução dos insetos, possibilitando a biossíntese e a atividade metabólica (Fantazzini *et al.*, 2002, Arrese & Soulages 2010, Roma *et al.* 2010).

Dentre as pragas de milho mais significativas a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) sob condições de desenvolvimento favoráveis, tem um alto potencial para elevar sua população, conseqüentemente ocasionando prejuízos econômicos as lavouras. É controlada principalmente por inseticidas sintéticos e por cultivares de milhos resistentes que expressam toxinas Bt e nem sempre são eficientes (Waquil *et al.* 2002, Pogue 2002, Prowell *et al.* 2004).

Estudos revelam que a toxicidade tem sido evidenciada em sistemas fisiológicos envolvendo, alterações histofisiológicas e imunohistoquímicas (apoptose) em resposta aos inseticidas sintéticos (Yoon *et al.* 2001, Nandi *et al.* 2006, Huang *et al.* 2011). No entanto, já é discutido que produtos naturatis, a exemplo do óleo de Nim (Natuneem[®]) e componentes ativos de óleos essenciais promovem a morte celular por necrose e apoptose, respectivamente afetando a substituição do epitélio do intestino médio e causando efeitos citotóxicos em insetos comparados aqueles causados por inseticidas sintéticos (Scudeler *et al.* 2014, Cruz *et al.* 2017) além de ser responsável pela redução da quantidade de lipídios e proteínas no corpo gorduroso de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Almeida *et al.* 2014). Com relação as alterações histofisiológicas de óleos essenciais, Silva *et al.* (2017) constatou o efeito de *Cymbopogon winterianus* Jowitt. no intestino médio de *S. frugiperda*, o qual apresentou alterações no epitélio, com presença de protusões citoplasmáticas e extrusões de células colunares, e aumento de grânulos PAS positivos.

No entanto, ainda são poucos os trabalhos que descrevem essa relação apartir da utilização dos óleos essenciais. Com isso o objetivo do presente trabalho foi investigar alterações histomorfológica, histoquímica e imunohistoquímica dos óleos essenciais de *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC., *Piper marginatum* Jacq. e *Piper arboreum* Aubl. no intestino médio e no corpo gorduroso de lagartas de *S. frugiperda* uma vez que não há dados na literatura com essa combinação.

Material e Métodos

As pesquisas foram conduzidas nos Laboratórios de Histologia e Fisiologia de Insetos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/DMFA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As extrações dos óleos essenciais e as análises cromatográficas foram conduzidas, respectivamente, no Laboratório de Ecologia Química e Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Obtenção e Criação de *Spodoptera frugiperda*. Os insetos foram obtidos da criação estoque do Laboratório de Fisiologia de insetos, mantidos à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h. Os adultos foram criados em gaiolas de oviposição, confeccionadas em tubo PVC de 20 cm de altura e 15 cm de diâmetro e suportadas por uma bandeja plástica de dois cm de altura por 17 cm de diâmetro, ambos forrados internamente com papel contínuo branco. As gaiolas foram fechadas na parte superior com filme plástico. Os adultos foram alimentados com solução aquosa de mel a 10 % e as posturas coletadas periodicamente. Os ovos foram mantidos em gaiolas plásticas de 15 cm de diâmetro por nove cm de altura, onde as lagartas foram alimentadas com dieta artificial de Greene modificada, recomendada para a espécie (Busato *et.al.* 2006).

Material Vegetal. As folhas de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* foram coletadas no Jardim Botânico do Recife, localizado no bairro do Curado, Km 7 da BR232, na Cidade do Recife. As plantas foram autenticadas por Jefferson Rodrigues Maciel e uma exsicata de cada espécime foi depositado no Herbário do Jardim Botânico do Recife (*P. corcovadensis* exsicata: UFP-15987, *P. marginatum* exsicata: UFP-10826 e *P. arboreum* exsicata: UFP7 78113).

Extração dos Óleos Essenciais de *Piper* spp. Folhas frescas de cada espécie de *Piper* foram previamente trituradas e em seguida hidrodestiladas separadamente em aparelho tipo Clevenger

modificado, por três horas. Os óleos essenciais foram coletados e tratados com sulfato de sódio anidro P.A. Os óleos foram conservados sob refrigeração a -24 °C até a realização dos bioensaios e/ou análises cromatográficas. O procedimento de extração foi realizado em triplicada e o rendimento de cada óleo essencial foi calculado pelo quociente das massas das folhas frescas, em relação às massas dos respectivos óleos essenciais, obtendo assim as respectivas médias para cada espécie de *Piper*.

Análises Cromatográficas em Fase Gasosa. Os óleos essenciais de *Piper* spp. foram analisados qualitativamente por cromatografia a gás acoplada à espectrometria CG/EM de massas em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series CG/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). 1 µL da solução (2000 µg/mL) de cada óleo essencial preparada em hexano foi injetada em split 1:50, assim como uma solução hexânica da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C8-C30 (Sigma-Aldrich®). A temperatura do cromatógrafo gasoso foi ajustada em 60 °C por 3 min, sendo então elevada 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 da espectrometria de massas foi definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5 scan-s de m/z 20-350 (Santos *et al.* 2014). Os constituintes do óleo essencial foram quantificados através da Cromatografia Gasosa (CG) em um sistema Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Trace CG Ultra gás equipado com um detector de ionização por chama (DIC), 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, 1 µL da solução (2000 µg/mL) de cada óleo essencial preparada em hexano foi injetada em splitless. Esse procedimento foi realizado em triplicada para obtenção da

média aritmética das porcentagens de cada composto e seu desvio padrão (Silva *et al.* 2016). A composição de cada componente foi expressa na forma de porcentagens da área total do pico conforme registrado por GC-FID.

Identificação Química dos Óleos Essenciais de *Piper* spp. Os Índices de Retenção (IR) de cada componente dos óleos essenciais foram calculados segundo a equação de Van den Dool & Kratz (1963), de acordo com os tempos de retenção dos componentes da amostra de cada óleo essencial, do padrão de hidrocarboneto (C8-C30) e da combinação de cada óleo essencial com a mistura deste padrão. Os componentes de cada óleo essencial foram previamente identificados por similaridade dos valores dos índices de retenção (IR) 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).

Bioensaio por Contato Tópico. Lagartas de terceiro ínstar, com peso médio de 0,078 g, foram submetidas ao bioensaio de toxicidade por contato tópico. Os tratamentos consistiram na diluição dos óleos essenciais de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* em acetona nas Doses letais 50 (DL₅₀), de 3,58 mg/g, 4,18 mg/g e 10,91 mg/g respectivamente. Utilizando uma seringa Hamilton™ (50 µL), aplicou-se 1,0 µL da solução da dose respectiva do óleo essencial, na região protorácica da lagarta. Cada tratamento consistiu de 100 lagartas individualizadas em tubos de vidro. O bioensaio controle foi tratado apenas com acetona. As lagartas foram alimentadas individualmente com dieta artificial e submetidas ao bioensaio por 48 h, após esse período realizou-se a extração do canal alimentar e corpo gorduroso das lagartas sobreviventes.

Análise Histológica e Morfométrica do Intestino Médio. As lagartas sobreviventes ao bioensaio de toxicidade por contato tópico foram imobilizadas e dissecadas em tampão fosfato-salino – PBS (pH 7,4 e 0,2 M) sob estereomicroscópio para retirada do canal alimentar. Estes

foram fixados em formol tamponado a 10% por 24h e conservados em álcool 70%. Cada canal alimentar foi clivado para a seleção apenas dos intestinos médios, que foram 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 finalmente incluído em historesina Leica©. Secções de cortes de 3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo Leica© RM 2035. Para os estudos histológicos e morfométricos os cortes foram submetidos à técnica de coloração pelo Azul de Toluidina. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz OLYMPUS BX-49 e fotografadas em fotomicroscópio Leica© DM 500 e OLYMPUS BX-51. As imagens da análise histológica foram digitalizadas pelo software LAS Leica Image. A análise morfométrica foi verificada pelo software de processamento de imagem ImageJ, a unidade de medida de comprimento foi calibrada de acordo com a escala da imagem captada no fotomicroscópio. Utilizando-se da ferramenta *Measure* foi possível mensurar a espessura do tecido epitelial a partir de três lâminas de indivíduos diferentes, sendo analisados quatro campos de cada lâmina, totalizando 12 campos por grupo (Abramoff *et al.* 2004, Scudeler *et al.* 2016). As médias foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis através do programa SAS (SAS Institute 2001).

Quantificação das Células Regenerativas do Intestino Médio. Foram quantificadas as células regenerativas baseando-se no método de Pinheiro *et al.* (2003), na qual as lâminas coradas com azul de toluidina foram submetidas a verificação de 10 secções aleatórias de três cortes para cada três blocos, sendo as médias submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis através do programa SAS (SAS Institute 2001).

Histoquímica do Intestino Médio e Corpo Gorduroso. As lagartas sobreviventes ao bioensaio de toxicidade por contato tópico foram imobilizadas e dissecadas em tampão fosfato-salino – PBS (pH 7,4 e 0,2 M) sob estereomicroscópio para retirada do canal alimentar e corpo gorduroso, e

submetidos ao mesmo procedimento de inclusão e obtenção de cortes para a análise histológica e morfométrica do intestino médio. Para as 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 lâminas foram examinadas em microscópio de luz OLYMPUS BX-49 e fotografadas em fotomicroscópio Leica© DM 500 e OLYMPUS BX-51. As imagens foram digitalizadas pelo software LAS Leica Image.

Quantificação Média de Polissacarídeos Neutros e Proteínas Totais. Com o auxílio do programa de editor de imagens GIMP 2.8 (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms) foram convertidas as imagens digitais de histoquímica para uma escala de cinza, permitindo assim a mensuração dos valores de pixels referentes à marcação selecionada no tecido (Solomon 2009). Para cada análise histoquímica utilizou-se três lâminas de indivíduos diferentes, sendo mensurados quatro campos de cada lâmina, totalizando 12 campos por grupo. Os resultados dos teores de glicogênio e proteína foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de tukey ao nível de 5% de significância. As médias que não apresentavam distribuição normal foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis através do programa SAS (SAS Institute 2001).

Preparação para Análise Imunohistoquímica. As lagartas sobreviventes ao bioensaio de toxicidade por contato tópico foram imobilizadas e dissecadas em tampão fosfato-salino – PBS (pH 7,4 e 0,2 M) sob estereomicroscópio para retirada do canal alimentar. Estes foram fixados em formol tamponado a 10% por 24h e conservados em álcool 70%. Os intestinos médios foram clivados e desidratados em banhos crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%), por 30 minutos cada, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Secções de cortes de 4 µm de espessura foram obtidos em micrótomo Leica© RM 2035. Posteriormente os cortes foram

desparafinados e hidratados e submetidos às análises imunohistoquímicas pelo ensaio TUNEL e proliferação celular.

Índice apoptótico do Intestino Médio. Para isso foi utilizado o método TUNEL como indicador de apoptose. Após a hidratação as lâminas foram incubadas 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). As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de hidrogênio a 3% à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados em Equilibration Buffer por 1 hora a 4 °C. Depois, os cortes foram incubados com a enzima TdT a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. Após esse período foi aplicada a solução stop em temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-digoxigenina. As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™), sendo contracolorados com hematoxilina. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz OLYMPUS BX-49 e fotografadas em fotomicroscópio Leica© DM 500 e OLYMPUS BX-51. As imagens foram digitalizadas pelo software LAS Leica Image. O índice apoptótico foi determinado pela contagem dos núcleos positivos, calculado a partir do quociente do número de núcleos positivos pelo número de núcleos totais (positivo e negativo) e o valor final multiplicado por 100 (Scudeler *et al.* 2016). As médias foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis através do programa SAS (SAS Institute 2001).

Proliferação Celular. Para isso foi utilizado o método PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular). Após a hidratação as lâminas passaram pela recuperação antigênica com Tampão Citrato (pH 6,0) em forno micro-ondas por cinco minutos. Depois desse passo, quando alcançada a temperatura ambiente as lâminas foram lavadas em Tris base. Para inibição da Peroxidase endógena as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos, em seguida lavadas em Tris base e mantidas por 30 minutos em Tris BSA a 5%. A incubação em

anticorpo específico primário (PCNA) foi realizada em câmara úmida por 18 horas. Em seguida foram mantidos em anticorpo secundário, Histofine® por 30 minutos. As lâminas foram enxaguadas em Tris base e os cortes revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™), sendo contracolorados com hematoxilina. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz OLYMPUS BX-49 e fotografadas em fotomicroscópio Leica© DM 500 e OLYMPUS BX-51. As imagens foram digitalizadas pelo software LAS Leica Image. O índice de proliferação foi determinado o resultado foi submetido à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de tukey ao nível de 5% de significância.

Resultados

Extração dos Óleos Essenciais de *Piper* spp. A hidrodestilação das folhas frescas das espécies de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* resultou em rendimentos dos óleos essenciais de (médias \pm erro padrão) 0,232 \pm 0,01; 0,114 \pm 0,02 e 0,095 \pm 0,008 %, respectivamente (Tabela 1).

Análises por CG e CG-EM dos Óleos Essenciais de *Piper* spp. Um total de 85 componentes, distribuídos nas classes de terpenos e fenilpropanoides foram identificados nos óleos essenciais das três espécies de *Piper* por análise CG-EM e quantificados em GC-DIC (Tabela 1). O óleo essencial de *P. corcovadensis* tem o fenilpropanoide 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (35,1 \pm 0,14%) como componente majoritário, seguido pelo monoterpeno terpinoleno (13,7 \pm 0,14%), sesquiterpeno E-cariofileno (6,02 \pm 0,02%), monoterpeno α -pineno (5,78 \pm 0,06%), sesquiterpeno δ -cadineno (5,19 \pm 0,02%) e sesquiterpeno oxigenado germacreno D-4-ol (4,52 \pm 0,05%), em ordem decrescente. O óleo de *P. marginatum* em sua composição apresenta os fenilpropanoides 2-metoxi-4,5-(metilenodioxi)-propiofenona (22,19 \pm 2,14%), exalatacina (9,12 \pm 0,90%) e metoxi-4,5-(metilenodioxi)-propiofenona (5,50 \pm 0,17%), os monoterpenos α -pineno (8,45 \pm 1,05%), α -felandreno (6,97 \pm 0,82%), β -pineno (6,51 \pm 0,69%) e limoneno

(4,92±0,59%), e o sesquiterpeno E-cariofileno (5,71±0,16%) como componentes principais, enquanto que o óleo de *P. arboreum* apresentou seus componentes majoritários entre os sesquiterpenos zingibereno (14,9±0,21%), E-cariofileno (8,26±0,1%), δ-cadineno (7,57±0,08%), germacreno D (6,53±0,08%), α-humuleno (4,63±0,05%) e δ-elemeno (4,01±0,03%), e o sesquiterpeno oxigenado E-nerolidol (5,60±0,08%).

Análise Histológica e Morfométrica do Intestino Médio. As observações em microscopia de luz demonstraram que o intestino médio das lagartas do controle de *S. frugiperda* exibiu histologia característica, composto por um tecido epitelial simples envolto por duas camadas de tecido muscular, uma mais interna com músculo disposto circularmente e outra mais externa apresentando feixes de fibras musculares dispostos longitudinalmente. O tecido epitelial simples é constituído por células colunares com núcleos esféricos centralmente localizados e microvilosidades na região apical; células caliciformes caracterizadas por apresentarem invaginação da membrana plasmática formando uma câmara globosa, com núcleo basal e achatado; e células regenerativas encontradas isoladamente ou em grupos, na região basal do epitélio. Separando o tecido epitelial do lúmen intestinal encontra-se a matriz peritrófica, limitando a região do lúmen, espaço endoperitrófico (Fig. 1. A-B). O intestino médio das lagartas submetidas ao contato tóxico com os óleos essenciais de *P. corcovadensis* e de *P. arboreum* mostrou desorganização do epitélio com alongamento das células colunares dando a impressão de estratificação epitelial; dilatação da região apical das células colunares com formação de protusões e emissão das extrusões em direção ao lúmen, promovendo perda na integridade da membrana apical juntamente com a lise celular, e degeneração da matriz peritrófica (Fig.1. C-D e G-H). As lagartas tratadas com óleo de *P. arboreum* quando comparadas ao controle, demonstraram um intenso alongamento das células colunares confirmando por análise de morfometria a alteração na espessura do epitélio desse intestino médio de 86,07±1,76 µm no

epitélio do controle para a $127,02 \pm 12,34 \mu\text{m}$ no epitélio das lagartas tratadas com o óleo (Fig.1. I). As lagartas tratadas com o óleo essencial de *P. marginatum* também apresentaram desorganização do intestino médio com estratificação epitelial (Fig.1. E-F). Os intestinos médios das lagartas tratadas com esse óleo quando comparados ao controle, exibiram células caliciformes bem desenvolvidas. A análise morfométrica confirmou a alteração na espessura do epitélio desse intestino médio de, $86,07 \pm 1,76 \mu\text{m}$ no epitélio do controle para $116,50 \pm 11,25 \mu\text{m}$ no epitélio das lagartas tratadas com o óleo de *P. marginatum* (Fig.1. I). Com relação ao número de células regenerativas do intestino médio das lagartas submetidas aos tratamentos com os óleos essenciais, apenas as lagartas tratadas com o óleo de *P. arboreum* apresentaram maior quantidade de células regenerativas $15,70 \pm 1,66$, em relação ao controle $10,12 \pm 0,92$ (Fig. 2).

Histoquímica do Intestino Médio e Corpo Gorduroso. A análise histoquímica detectou reação positiva para o Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) no epitélio do intestino médio das lagartas do controle e das lagartas submetidas ao contato tópico com os óleos essenciais. No epitélio do controle, assim como no tratado com o óleo de *P. marginatum* nota-se uma distribuição uniforme de grânulos de glicogênio em todo citoplasma das células epiteliais, enquanto que as tratadas com o óleo de *P. arboreum* apresentaram distribuição de grânulos de glicogênio na região basal das células epiteliais (Fig. 3. A, C e D). As células epiteliais do intestino médio das lagartas tratadas com o óleo de *P. corcovadensis* exibiram uma reação de menor intensidade de grânulos de glicogênio (Fig. 3. B), e conseqüentemente o único tratamento que evidenciou a diferença significativa na redução da quantidade de carboidratos neutros quando comparado ao controle e aos outros óleos (Fig. 3. E). Na detecção de proteínas totais por Xylidine Ponceau, tanto o controle quanto as lagartas submetidas ao contato tópico com os óleos essenciais, mostraram uma coloração positiva do epitélio (Fig. 4. A-D). Na quantificação em pixels de proteínas totais apenas as lagartas tratadas com o óleo de *P. arboreum* apresentaram redução significativa na quantidade

de proteínas quando comparadas ao controle (Fig. 4. E). A análise histoquímica detectou reação positiva para o Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) no corpo gorduroso, observando um aumento na quantidade de carboidratos neutros em todos os tratamentos quando comparados ao controle, porém houve um aumento considerável da quantidade de carboidratos neutros no tratamento com o óleo de *P. marginatum* quando comparado ao controle e aos demais tratamentos (Fig. 5). Na detecção de proteínas totais por Xylidine Ponceau, tanto o controle quanto as lagartas submetidas ao contato tópico com os óleos essenciais, mostraram uma coloração positiva, não sendo observada diferença significativa entre as lagartas tratadas quando comparadas com as do controle, evidenciando que a quantidade de proteínas totais não foi alterada pelos óleos essenciais (Fig. 6).

Índice apoptótico do Intestino Médio. Foram detectados sinais positivos nas células colunares do epitélio nas lagartas do controle e das lagartas submetidas aos tratamentos com os óleos essenciais, indicando que foi induzida a morte celular por apoptose no epitélio do intestino médio (Fig. 7). A análise quantitativa do índice apoptótico revelou que apenas o número de núcleos positivos no tratamento com o óleo essencial de *P. corcovadensis* foi maior quando comparado com o controle, apresentando aproximadamente 25% de núcleos positivos no tratamento e 10% para o controle, os demais tratamentos não diferiram do controle.

Proliferação Celular. Em resposta ao ensaio PCNA os núcleos positivos para esse marcador apresentam típica coloração marrom. Esse tipo de coloração indicativa de proliferação celular foi mais intenso no intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* tratadas com o óleo de *P. arboreum* ($15,75 \pm 0,47$), em contrapartida as tratadas com *P. corcovadensis* ($6,25 \pm 0,85$) foram as que apresentaram menor proliferação. *P. marginatum* ($10,0 \pm 0,407$) não diferiu do controle ($10,50 \pm 0,64$). (Fig. 8).

Discussão

Os rendimentos dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de folhas frescas das espécies de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* variaram entre 0,09-0,23% (m/m), valores comparáveis aos relatados anteriormente para outras espécies de *Piper* spp. encontrados por Cysne *et al.* (2005) e Mesquita *et al.* (2005). As classes dos terpenos e fenilpropanoides são comumente observadas fazendo parte da composição química dos óleos essenciais das plantas do gênero *Piper* spp. (Santana *et al.* 2015, Brú & Guzman 2016), assemelhando-se aos resultados obtidos no presente trabalho para as espécies de *Piper* estudadas. Os óleos essenciais de *P. corcovadensis* e *P. marginatum* apresentaram na sua composição compostos pertencentes a classes dos monoterpenos e sesquiterpenos, além dos fenilpropanoides, o componente majoritário da *P. corcovadensis* identificado neste trabalho foi 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, também encontrado nas pesquisas de Silva *et al.* (2016) para esta mesma espécie. Os componentes majoritários do óleo essencial de *P. marginatum* foram diferentes daqueles verificados por Autran *et al.* (2009), também estudando *P. marginatum* coletadas em Recife, porém semelhantes aquelas estudadas por Andrade *et al.* (2008) para espécie de *P. marginatum* coletadas na Amazônia.. No óleo essencial de *P. arboreum* predominaram os sesquiterpenos e os sesquiterpenos oxigenados, essa característica também foi constatada por Navickiene *et al.* (2006) e Potzernhein *et al.* (2006) estudando *P. arboreum* coletadas em São Paulo e Brasília.

O rendimento e a composição química dos óleos essenciais são intimamente influenciados sob as condições edafo-climáticas no metabolismo das plantas, sua localização em diferentes regiões geográficas, assim como fatores genéticos de melhoramento e variações derivadas a partir de distorções espaciais e temporais e/ou parte da planta utilizada no processo de extração (Galambosi & Peura 1996, Blair *et al.* 2001, Duarte *et al.* 2010, Moraes *et al.* 2014, Al-Qudah *et al.* 2017).

As observações em microscopia de luz demonstraram que o intestino médio das lagartas do controle de *S. frugiperda* exibiu histologia característica, assim como aquelas descritas por Correia *et al.* (2009), no qual o tecido epitelial simples é composto predominantemente por células colunares e caliciformes, além das células regenerativas, com características apropriadas para funções de absorção de nutrientes; crescimento e regeneração tecidual; e controle de processos metabólicos, proliferação e diferenciação celular; e ainda, limitando a região do lúmen encontra-se a matriz peritrófica, que exerce função de proteção do epitélio contra danos mecânicos e químicos (Harper & Granados 1999, Martins *et al.* 2006, Teixeira *et al.* 2013).

Todos os óleos essenciais de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum*, atuando por contato tópico nas doses letais 50 (DL₅₀), promoveram alterações histológicas no intestino médio das lagartas de *S. frugiperda*. Esse conjunto de alterações histológicas promovidas pelos óleos de *P. corcovadensis* e *P. arboreum* foram caracterizadas pelo alongamento das células colunares com formação de protusões e emissão das extrusões em direção ao lúmen, promovendo perda na integridade da membrana apical juntamente com a lise celular. Este fato pode estar relacionado à perda do controle do equilíbrio iônico e influxo de água nas células causando hipertrofia celular sugerindo ser um indicativo de efeito tóxico nas células colunares (Cheville 1994, Reed & Majumdar 1998, Rey *et al.* 1999, Cheville, 2009, Scudeler & Santos 2013, Rossi *et al.* 2013). Essas dilatações observadas nas células colunares, podem servir para aumentar a área de superfície das células a fim de promover intercâmbios com o meio e pode ser indicativo da tentativa de aumentar o transporte do excesso de fluido das células para o hemocele (De Lello *et al.* 1984, Bauer & Pankratz 1992, Scudeler & Santos 2013, Cruz-Landim *et al.* 2013). Já as lagartas tratadas com *P. marginatum* apresentaram células caliciformes bem desenvolvidas. Essas células são responsáveis pela homeostase iônica do tecido, o que pode ter influenciado na integridade desse epitélio (Chiang *et al.* 1986). Outra alteração que pode ser caracterizada após o

tratamento com os óleos de *P. corcovadensis* e *P. arboreum*, é a ausência da membrana peritrófica, o que pode ter ocorrido pela disfunção de atividades das células epiteliais, responsáveis por secretar essa estrutura (Harper & Hopkins 1997, Harper & Granados 1999). Esses efeitos são semelhantes aos descritos por Knaak *et al.* (2010) avaliando a toxicidade de extratos de *Petiveria alliacea* L., *Zingiber officinale* Roscoe, *Ruta graveolens* L., *Malva sylvestris* L., *Baccharis genistelloides* (Lam.) e *Cymbopogon citratus* (D.C.) no intestino médio de lagartas de *S. frugiperda*.

Usando análises histológicas e morfométricas, foi possível observar mudanças na morfologia do intestino médio, como o aumento da espessura epitelial das lagartas tratadas com *P. marginatum* e *P. arboreum*. Dados semelhantes também foram observados por Scudeler *et al.* 2016, verificando a influencia do óleo de Nim (Natuneem[®]) no intestino médio de *Ceraeochrysa claveri* Navás. Essas mudanças podem ser indícios de reorganização epitelial devido à aceleração do processo de renovação celular (Nogarol & Fontanetti 2010). Foi constatado um aumento na quantidade de células regenerativas do intestino médio das lagartas de *S. frugiperda* tratadas com *P. arboreum*, esse mesmo resultado foi verificado por Silva *et al.* (2017), após tratamento com o óleo essencial de Citrolena (*C. winterianus*). Sendo confirmada em nosos estudos pelo aumento significativo da proliferação celular no intestino médio das lagartas tratadas com *P. arboreum* como renovação celular objetivando a substituição das células danificadas, bem como um mecanismo de defesa que ajuda a combater os agentes patogênicos que infectam essas células (Chiang *et al.* 1986).

A análise histoquímica detectou reação positiva para o Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) tanto no epitélio do intestino médio quanto no corpo gorduroso das lagartas do controle e das lagartas submetidas ao contato tópico com os óleos essenciais. Essa reação é observada pelos grânulos PAS-positivos que são representados pelas reservas de glicogênio e/ou grânulos

contendo polissacarídeos neutros (Mc Manus 1946, Kilby 1965). Os grânulos de glicogênio nas células do intestino médio e do corpo gorduroso podem indicar o armazenando de carboidratos intracelulares a fim de fornecer energia para realizar diferentes atividades metabólicas (Fialho *et al.* 2009, Souza & Fontanetti 2011, Scudeler *et al.* 2014). Os efeitos histopatológicos promovidos por *P. corcovadensis* no epitélio do intestino médio das lagartas de *S. frugiperda* podem ter sido os responsáveis pela redução da quantidade de carboidratos neutros, o que pode estar relacionado ao realocamento desses para as reservas do corpo gorduroso.

Lagartas submetidas ao tratamento com *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* demonstraram um aumento da quantidade de carboidratos neutros no corpo gorduroso, resultados semelhantes aos observados por Scudeler *et al.* (2014) após utilização do óleo de Nim (Natuneem[®]) em *C. claveri*. Ainda de acordo com Dixit *et al.* (1986) óleos e extratos vegetais promoverem efeito direto sobre o metabolismo da glicose. Na detecção de proteínas totais por Xylidine Ponceau, foi observado tanto no epitélio do intestino médio quanto no corpo gorduroso das lagartas, coloração fortemente positiva, porém a quantificação de pixels demonstrou haver diferença apenas no intestino médio das lagartas tratadas com *P. arboreum*, promovendo uma redução. Já no corpo gorduroso não houve diferença nessa quantificação. Este resultado comprova que o corpo gorduroso associado ao intestino médio é um importante local de armazenamento de polissacarídeos neutros e compostos protéicos (Fantazzini *et al.* 2002). Um dos mecanismos de desintoxicação descritos para invertebrados é a precipitação de toxinas na forma de grânulos intracelulares de diferentes tipos, a exemplo dos grânulos de glicogênio, que após o armazenamento em vacúolos digestivos, podem ser liberados através de vesículas secretoras no lúmen intestinal ou por substituição do epitélio intestinal (Hopkin 1989, Hubert 1979). O que pode ter ocorrido no intestino médio e no corpo gorduroso dos insetos tratados.

Através da imunohistoquímica pode-se observar apoptose no intestino médio em todos os tratamentos, no entanto, as lagartas tratadas com *P. corcovadensis* apresentaram um aumento significativo do índice apoptótico e menor percentual de proliferação celular, indicando dano permante no epitélio do intestino médio. Apesar da apoptose ocorrer por um processo de morte celular natural programada, objetivando a remoção de células danificadas e a manutenção da homeostase, lesões graves no tecido também podem desencadear este processo (Uwo *et al.* 2002, Eisenberg-Lerner *et al.* 2009, Malagoli *et al.* 2010, Franzetti *et al.* 2012, Khoa *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2012). David *et al.* (2008) afirmaram que a apoptose é um mecanismo de defesa do corpo que pode atuar na remoção de toxinas e também pode estar relacionado a processos de renovação do tecido através da reabsorção do epitélio danificado.

Sendo assim os achados dessa pesquisa confirmam relatos anteriores de que o modo de ação dos óleos essenciais está vinculado a eventos fisiológicos indicando que os produtos naturais das plantas podem produzir alterações histológicas no canal alimentar dos insetos bem como no corpo gorduroso (Scudeler & Santos 2013, Scudeler *et al.* 2014, Scudeler *et al.* 2016, Guedes *et al.* 2017, Silva *et al.* 2017).

Conclusões

A utilização dos óleos essenciais de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arborerum*, promoveram alterações deletérias no intestino médio das lagartas de *S. Frugiperda*. Porém *P. corcovadensis* foi o óleo que proporcionou melhores resultados, por apresentar a menor DL₅₀, ocasionar alterações histopatológicas, redução na quantidade de carboidratos no intestino médio, um aumento do índice apoptótico em 25% e uma menor proliferação celular, diferente do *P. arborerum*, que apesar de ocasionar alterações histopatológicas semelhantes ao *P. corcovadensis*, apresentou o maior índice de proliferação celular, bem como um aumento das células

regenerativas, indicando uma regeneração mais rápida do epitélio. Esses resultados demonstram o potencial inseticida mais evidente de *P. corcovadensis* no controle desta praga, por ocasionar danos permanentes.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida ao primeiro autor. Ao Jardim Botânico do Recife pela concessão das folhas de *Piper* spp. usadas no trabalho.

Literatura citada

- Abramoff, M.D., P.J. Magalhaes & S.J. Ram. 2004.** "Image Processing with ImageJ". J. Biophotonics. 11: 36-42.
- Adams, R.P. 2009.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed. Allured Publishing Co., Carol Stream, IL, 469p.
- Almeida, G.D., J.C. Zanuncio, S. Senthil-Nathan, D. Pratissoli, R.A. Polanczyk, D.O. Azevedo & J.E. Serrão. 2014.** Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. Invertebr. Surv. J. 11: 79-86.
- Al-Qudah, M.A., A.M. Saleh, N.L. Alhawsawi, H.I. Al-Jaber, S.A. & F.U. Afifi . 2017.** Composition, antioxidant and anticancer activities of the essential oil from fresh and air-dried aerial parts of *Pallenis spinosa*. Chem. Biodivers. 14: doi: 10.1002/cbdv.201700146.
- Andrade, E.H.A., L.M.M. Carreira, M.H.L. Silva, J.D. Silva, C.N. Bastos, P.J.C. Sousa, E.F. Guimarães & J.G.S. Maia. 2008.** Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. Chem. Biodivers. 5: 197-208.
- Arrese, E.L. & J.L. Soulages. 2010.** Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. Annu. Rev. Entomol. 55: 207-225
- Autran, E.S., I.A. Neves, C.S.B. Silva, G.K.N. Santos, C.A.G. Câmara & D.M.A.F. Navarro. 2009.** Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Bioresour. Technol. 100: 2284-2288.

- Bauer, L.S. & H.S. Pankratz. 1992.** Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. san diego on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 15-25.
- Blair, J., T. Aichinger, G. Hackal, K. Hueber & M. Dachler. 2001.** Essential oil content and composition in commercially available dill cultivars in comparison to caraway. *Ind. Crops Prod.* 14: 229-239.
- Brú, J. & J.D. Guzman. 2016.** Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. *Braz. J. Pharmacog.* 26: 767-779.
- 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.
- Catae, A.F., T.C. Roat, R.A. Oliveira, R.C.F. Nocelli & O. Malaspina. 2014.** Cytotoxic effects of thiamethoxan in the midgut and malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.* 77: 274-281.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Cheville, N.F. 1994.** Ultrastructural Pathology: An Introduction to Interpretation. Iowa State University. Press. Ames, 946p.
- Cheville, N.F. 2009.** Ultrastructural pathology: the comparative cellular basis of disease, Wiley-Blackwell, Ames, 973p.
- Chiang, A.S., D.F. Yen & W.K. Peng. 1986.** Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 333-339.
- Choi, W.I., E.H. Lee, B.R. Choi, H.M. Park & Y.J. Ahn. 2003.** Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 1479-1484.
- 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, 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.

- Cruz-Landim, C., T.C. Roat & B. Berger. 2013.** Fat body, hemolymph and ovary routes for delivery of substances to ovary in *Melipona quadrifasciata* anthidioides: differences among castes through the use of electron-opaque tracers. *Microscopy* 62: 457-466.
- Cysne, J.B., K.M. Canuto, O.D.L. Pessoa, E.P. Nunes & E.R. Silveira. 2005.** Leaf Essential Oils of Four *Piper* Species from the State of Ceará - Northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 16: 1378-1381.
- David, J.A.O., R.B. Salaroli & C.S. Fontanetti. 2008.** The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. *Micron* 39: 1293-1299.
- De Lello, E., W.K. Hanton, S.T. Bishoff & D.W. Misch. 1984.** Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the midgut of tobacco hornworm larvae (*Manduca sexta*): low doses compared with fasting. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 169-181.
- Dixit, V.P., R. Sinha & R. Tank. 1986.** Effect of neem seed oil on the blood glucose concentration of normal and alloxan diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 17: 95-8.
- Duarte, A.R., R.R. Naves, S.C. Santos, J.C. Seraphin & P.H. Ferri. 2010.** Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*. *J. Braz. Chem. Soc.* 21: 1459-1467.
- Eisenberg-Lerner, A., S. Bialik, H-U Simon & A. Kimchi. 2009.** Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell. Death Differ.* 6: 966-75.
- Enan E. 2005.** Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 59: 161-171.
- Fantazzini, E.R., C.S. Fontanetti & M.I. Camargo-Mathias. 2002.** Midgut of the millipede, *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida): Histology and histochemistry. *Arthropoda Sel.* 11: 135-142.
- Fialho, M.C.Q., J.C. Zanuncio, C.A. Neves, F.S. Ramalho & J.E. Serrão. 2009.** Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102: 119-27.
- Franzetti, E., Z.J. Huan, Y.X. Shi, K. Xie, X.J. Deng & J.P. Li. 2012.** Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis* 17: 305-24.
- Galambosi, B. & P. Peura. 1996.** Agrobotanical features and oil content of wild and cultivated forms of caraway (*Carum carvi* L). *J. Essent. Oil Res.* 8: 389-397.
- Guedes, C.A. 2017.** Efeitos de óleo essencial e compostos isolados sobre parâmetros histofisiológicos, histoquímicos, imunohistoquímico, nutricionais e embriológicos de

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Tese de Doutorado, UFRPE, Recife, 104p.

Hakim, R.S., K. Baldwin & G. Smaghe. 2010. Regulation of midgut growth, development and metamorphosis. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 593-608.

Harper, M.S. & R.R. Granados. 1999. Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia ni* with an investigation on the secretion patterns of a PM mucin. *Tissue Cell.* 31: 202-211.

Harper, M.S. & T.L. Hopkins. 1997. Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue Cell.* 29: 463-475.

Hopkin, S.P. 1989. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier Applied Science, Barking, UK.

Huang, J.F., M. Tian, C.J. LV, H.Y. Li, R. Muhammad & G.H. Zhong. 2011. Preliminary studies on induction of apoptosis by abamectin in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100: 256-263.

Hubert, W., 1979. The midgut of *Tomocerus minor* Lubbock (Insecta: Collembola): Ultrastructure, cytochemistry, ageing and renewal during a moulting cycle. *Cell Tissue Res.* 196: 39-57.

Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira, 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Guanabara Koogan, 123p.

Khoa, D.B., L.T.D. Trang & M. Takeda. 2012. Expression analyses of caspase-1 and related activities in the midgut of *Galleria mellonella* during metamorphosis. *Insect Mol. Biol.* 21: 247-56.

Kilby, B.A. 1965. Intermediary Metabolism and the insect fat body. In: Goodwin, T.W. Aspects of insect biochemistry. New York, Academic Press, p39-48.

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.

Kostyukovsky, M., A. Rafaeli, C. Gileadi, N. Demchenko & E. Haaya. 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag. Sci.* 58: 1101-1106.

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.

- López, M.F., C. Cano-Ramírez, M. Shibayma & G. Zúñiga. 2011.** α -Pinene and myrcene induce ultrastructural changes in the midgut of *Dendroctonus valens* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 104: 553-561.
- Malagoli, D., F.C. Abdalla, Y. Cao, Q. Feng, K. Fujisaki & Gregorc A. 2010.** Autophagy and its physiological relevance in arthropods. Current know ledge and perspectives. *Autophagy* 6: 575-88.
- Martins, G.F., L.A.O. Neves & J.E. Serrão. 2006.** The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 37: 161-168.
- McManus, J.F.A. 1946.** Demonstration of certain fatty substances in paraffin sections. *J. Pathol.* 58: 93-95.
- Mesquita, J.M.O., C. Cavaleiro, A.P. Cunha, J. Lombardi & A.B. Oliveira. 2005.** Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Braz. J. Pharmacog.* 15: 6-12.
- Moraes, M.M., T.M. Silva, R.R. Silva, C.S. Ramos & C.A. Câmara. 2014.** Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas* 13: 270-277.
- Nandi, A, D. Chandi, R. Lechesa, S.C. Pryor, A. Mclaughlin, J.A. Bonventre, K. Flynn & B.S. Weeks. 2006.** Bifenthrin causes neurite retraction in the absence of cell death: a model for pesticide associated neuro degeneration. *Med. Sci. Monit.* 12: 169-17.
- Navickiene H.M.D., A.A. Morandim, A.C. Alécio, L.O. Regasini, D.C. Bergamo, M. Telascra, A.J. Cavalheiro, M.N. Lopes, VS. Bolzani, M.O. Marques, M.C.M. Young & M.J. Kato 2006.** Composition and antifungal activity of essential oil from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Quím. Nova* 29: 467-470.
- Nogarol, L.R. & C.S. Fontanetti. 2010.** Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: tissular responses of the midgut. *Micron* 41: 239-246.
- Pearse, A.G.E. 1960.** Histochemistry: theoretical and applied. London, Churchill, 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.
- Pogue, G.M. 2002.** A world revision of the genus *Spodoptera Guenée* (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 43: 1-202.
- Potzernheim M.C.L., H.R. Bizzo & R.F. Vieira 2006.** Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). *Rev. Bras. Farmacogn.* 16: 246-251.

- Priestley, C.M., E.M. Williamson, K.A. Wafford & D.B. Sattelle. 2003.** Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA receptors and a homoligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br. J. Pharmacol.* 140: 1363-1372.
- Prowell, D.P., M. McMichael & J.F. Silvain. 2004.** Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 1034-1044.
- Rattan, R.S. 2010.** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.* 29: 913-920.
- Reed, E. & S.K. Majumdar. 1998.** Differential cytotoxic effects of azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* and mouse cultured cells. *Ent. Exp. Appl.* 89: 215-221.
- Rey, D., M.P. Pautou & J.C. Meyran. 1999.** Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic dipteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 173-181.
- Rice, P.J. & J.R. Coats. 1994.** Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and the southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 1172-1179.
- Roma, G.C., O.C. Bueno & M.I. Camargo-Mathias. 2010.** Morphophysiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron* 41: 395-401.
- Rossi, C.A., T.C. Roat, D.A. Tavares, P. Cintra-Socolowski & O. Malaspina. 2013.** Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Microsc. Res. Tech.* 76: 552-8.
- Santana, H. T., F. Trindade, R.G. Stabeli, A.A.E. Silva, J.S.L.T. Militão & V.A. Facundo. 2015.** Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 17: 105-111.
- Santos, G.K.N., K.A. Dutra, C.S. Lira, B.N. Lima, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, C.A. Maranhão, S.S.F. Brandão & D.M.A.F. Navarro. 2014.** Effects of *Croton rhamnifolioides* essential oil on *Aedes aegypti* oviposition, larval toxicity and trypsin activity. *Molecules* 19: 16573-87.
- 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. 2013.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navas, 1911)(Neuroptera: Chrysopidae). *Micron* 44: 125-132.

- Scudeler, E.L., A.S.G. Garcia, C.R. Padovani, P.F.F. Pinheiro & D.C. Santos. 2016.** Cytotoxic effects of neem oil in the midgut of the predator *Ceraeochrysa claveri*. *Micron* 80: 96-111.
- Scudeler, E.L., C.R. Padovani & D.C. Santos. 2014.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on the replacement of the midgut epithelium in the lacewing *Ceraeochrysa claveri* during larval-pupal metamorphosis. *Acta Histochem.* 116: 771-780.
- Sedy, K.A. & E.H. Koschier. 2003.** Bioactivity of carvacrol and thymol, against *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci*. *J. Appl. Entomol.* 127: 313-316.
- Sikkemma, J., J.A.M. Bont & B. Poolman. 1995.** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59: 201-222.
- 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, 2017.** Effects of citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) midgut and fat body. *Biotech. Histochem.* Early Online: 1-13.
- Silva, M.F.R., P.C. Bezerra-Silva, C.S. Lira, B.N.L. Albuquerque, A.C. Agra Neto, E.V. Pontual, J.R. Maciel, P.M.G. Paiva & D.M.A.F. Navarro. 2016.** Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). *Exp. Parasitol.* 165: 64-70.
- Solomon, R.W. 2009.** Free and open source software for manipulation of digital images. *Am. J. Roentgenol.* 192: 330-334.
- Souza, T.S. & C.S Fontanetti. 2011.** Morphological biomarkers in the *Rhinocriscus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 10-18.
- Teixeira, A.D., M.C.Q. Fialho, J.C. Zanuncio, F.S. Ramalho & J.E. Serrão. 2013.** Degeneration and cell regeneration in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) during post-embryonic development. *Arthropod. Struct. Dev.* 42: 237-246.
- Uwo, M.F., K. Ui-Tei, P. Park & M. Takeda. 2002.** Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal mouth. *Cell. Tissue Res.* 308: 319-31.
- Van Den Doll, H. & P.D.J.A. Kratz. 1963.** Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11: 463-471.
- Waquil, J.M., F.M.F. Villela & J.E. Foster. 2002.** Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt) à Lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Bras. Milho e Sorgo* 1: 1-11.

Yoon, J.Y., S.H. Oh, S.M. Yoo, S.J. Lee, H.S. Lee, S.J. Choi, C.K. Moon & B.H. Lee. 2001.
N-Nitrosocarbofuran, but carbofuran, induces apoptosis and cell cycle arrest in CHL cells.
Toxicology 169: 153-161.

Zhang, M., M. Jiang, Y. Bi, H. Zhu, Z. Zhou & J. Sha. 2012. Autophagy and apoptosis act as partners to induce germ cell death after heat stress in mice. *PLoS One* 7: e41412.

Tabela 1. Identificação e proporções dos constituintes dos óleos essenciais de folhas de *Piper* spp.

Nº	Composto ¹	<i>Piper corcovadensis</i>			<i>Piper marginatum</i>		<i>Piper arboreum</i>	
		IR ²	IR ⁵	Área (% do total± σ)	IR ⁵	Área (% do total± σ)	IR ⁵	Área (% do total± σ)
1	α -tujeno	924	-	-	924	0,12±0,01	-	-
2	α -pineno	932	929	5,78±0,06	930	8,45±1,05	930	0,69±0,04
3	canfeno	946	943	0,07±0,01	944	0,13±0,02	-	-
4	sabineno	969	970	0,05±0,01	970	0,09±0,06	-	-
5	β -pineno	974	972	2,25±0,2	973	6,51±0,69	973	0,54±0,05
6	mirreno	988	990	1,71±0,02	990	1,36±0,16	990	0,13±0,01
7	α -felandreno	1002	1001	0,79±0,01	1002	6,97±0,82	-	-
8	δ -3-careno	1008	1007	1,15±0,01	1008	0,57±0,07	1008	0,13±0,02
9	α -terpineno	1014	1014	1,09±0,01	1014	2,33±0,27	1015	0,52±0,05
10	o-cimeno	1022	1022	0,59±0,01	1023	0,95±0,11	1023	0,19±0,02
11	limoneno	1024	1026	1,87±0,02	1026	4,98±0,59	1027	0,24±0,03
12	β -(Z)- ocimeno	1032	-	-	1038	0,69±0,06	1038	0,57±0,03
13	β -(E)- ocimeno	1044	1048	0,16±0	1048	2,69±0,30	1048	0,53±0,04
14	γ -terpineno	1054	-	-	1057	0,09±0,02	-	-
15	terpinoleno	1086	1087	13,7±0,14	1087	0,32±0,04	1087	0,19±0,01
16	perileno	1102	-	-	-	-	1117	0,26±0,01
17	δ -elemeno	1335	-	-	1338	2,57±0,06	1338	4,01±0,03
18	α -cubebeno	1348	1350	0,14±0	-	-	1350	0,28±0
19	ciclosativeno	1369	1365	0,04±0	-	-	1366	0,24±0
20	α -copaeno	1374	1376	0,75±0,01	1376	1,00±0,04	1376	3,55±0,04
21	β -bourboneno	1387	1385	0,09±0	1385	0,14±0,01	1385	0,20±0,01
22	β -elemeno	1389	1392	0,36±0,02	1392	1,21±0,03	1392	3,47±0,03
23	cipereno	1398	-	-	-	-	1400	0,93±0,01
24	1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno	1408 ³	1402	35,1±0,14	-	-	-	-
25	α -gurjuneno	1409	1410	0,56±0,01	-	-	1410	0,56±0,01
26	β -funebreno	1413	-	-	-	-	1416	0,18±0,01
27	E-cariofileno	1417	1420	6,02±0,02	1420	5,71±0,16	1420	8,26±0,1
28	miltail-4(12)-ene	1445	-	-	1444	0,25±0,01	-	-
29	β -copaeno	1430	1430	0,5±0,02	-	-	1430	0,88±0,03
30	β -gurjuneno	1431	1433	0,25±0	-	-	-	-
31	γ -elemeno	1434	-	-	-	-	1434	0,1±0,03
32	α -guaiano	1437	-	-	-	-	1439	1,97±0,02

Continuação da Tabela 1.

33	aromadendreno	1439	-	-	-	-	1444	0,39±0,01
34	Z-Muurolo-3,5-dieno	1448	1447	0,22±0,02	-	-	-	-
35	E-Muurolo-3,5-dieno	1451	1451	0,09±0,01	-	-	-	-
36	α-humuleno	1452	1454	0,71±0,02	1455	0,26±0,01	1455	4,63±0,05
37	croweacin	1457	-	-	1461	0,94±0,11	-	-
38	allo-aromadendreno	1458	1462	0,41±0,02	-	-	1461	2,66±0,03
39	Ishwarane	1465	-	-	1464	1,93±0,07	-	-
40	α-macrocarpeno	1470	-	-	1474	0,13±0,03	-	-
41	E-Cadina-1 (6),4-dieno	1475	1473	0,03±0	-	-	1475	0,08±0,01
42	γ-muurolo	1478	1476	0,35±0,18	1482	0,09±0,03	1478	2,31±0,01
43	germacreno D	1480	1481	2,21±0,03	-	-	1482	6,53±0,08
44	β-selineno	1489	-	-	1487	0,31±0,07	1490	0,84±0,01
45	β-(Z)-guaiano	1492	-	-	1494	0,38±0,06	-	-
46	epi-cubebol	1493	1495	0,27±0,05	-	-	-	-
47	zingibereno	1493	-	-	-	-	1496	14,9±0,21
48	biciclogermacreno	1500	1497	0,49±0,02	1498	0,26±0,05	-	-
49	α-muurolo	1500	1501	0,04±0	-	-	1501	3,57±0,08
50	α-bulneseno	1509	-	-	-	-	1507	3,61±0,04
51	γ-cadineno	1513	1515	2,26±0,02	-	-	1515	0,82±0,01
52	δ-cadineno	1522	1525	5,19±0,02	1525	0,25±0,06	1525	7,57±0,08
53	E-cadina-1,4-dieno	1533	1534	0,34±0,01	-	-	1533	0,14±0,16
54	α-cadineno	1537	1539	0,37±0	-	-	1539	0,19±0,01
55	elemol	1548	-	-	1550	1,34±0,12	1550	0,11±0,01
56	Z-muurolo-5-em-4-β-ol	1550	1549	0,08±0	-	-	-	-
57	germacreno B	1559	-	-	-	-	1558	0,04±0,01
58	E-nerolidol	1561	-	-	1564	1,53±0,12	1564	5,60±0,08
59	palustrol	1567	1569	0,14±0,01	-	-	1569	0,28±0,01
60	γ-asarone	1572	-	-	1576	0,38±0,03	-	-
61	germacreno D-4-ol	1574	1577	4,52±0,05	-	-	-	-
62	spatuleno	1577	-	-	1579	0,11±0,01	1579	0,84±0,02
63	óxido cariofileno	1582	1585	0,55±0,01	1585	0,14±0,02	-	-
64	cubebol	1582	1590	0,03±0	-	-	-	-
65	globulol	1590	-	-	-	-	1585	1,27±0,02
66	viridiflorol	1592	1605	0,18±0,01	-	-	1593	0,60±0,01
67	guaiol	1600	-	-	1599	0,49±0,04	-	-
68	ledol	1602	-	-	-	-	1605	1,21±0,01

Continuação da Tabela 1.

69	Z-asarone	1616	-	-	1623	2,55±1,02	-	-
70	1,10-di-epi-cubenol	1618	1617	0,21±0	-	-	-	-
71	isolongifolan-7- α -ol	1618	-	-	-	-	1614	0,41±0,03
72	junenol	1618	-	-	-	-	1620	0,15±0,01
73	1-epi-cubenol	1627	1630	0,25±0,01	-	-	-	-
74	metoxi-4,5-(metilenodioxi)-propiofenona	1627 ⁴	-	-	1628	5,50±0,17	-	-
75	y-eudesmol	1630	-	-	-	-	1627	0,23±0,01
76	epi- α -cadinol	1638	1643	2,63±0,11	-	-	1630	1,59±0,02
77	epi- α -muurulol	1640	-	-	-	-	1644	2,31±0,06
78	α -muurulol	1644	1648	0,05±0,04	-	-	1648	1,53±0,03
79	β -eudesmol	1649	-	-	1652	0,05±0,03	-	-
80	α -cadinol	1652	1656	3,86±0,1	-	-	1656	3,46±0,06
81	exalatacina	1655	-	-	1659	9,12±0,90	-	-
82	selin-11-en-4- α -ol	1658	-	-	-	-	1661	0,21±0,01
83	bulnesol	1670	-	-	1670	0,08±0,01	-	-
84	E-asarone	1675	-	-	1682	3,53±0,34	-	-
85	2-metoxi-4,5-(metilenodioxi)-propiofenona	1713	-	-	1718	22,19±2,14	-	-
Monoterpeno				29,21%	36,25%		3,73%	
Monoterpeno Oxigenado				-	0,07%		0,26%	
Sesquiterpeno				21,42%	14,49%		72,91%	
Sesquiterpeno oxigenado				12,77%	6,29%		19,8%	
Fenilpropanoide				35,1%	41,66%		-	
Total identificado				98,51%	71,07%		96,71%	
Rendimento do óleo essencial				0,232±0,01 %	0,114±0,02%		0,095±0,008 %	

¹Constituintes listados em ordem de eluição na coluna apolar DB-5, detector GC-FID; ²Índices de retenção de Kratz da literatura (Adams 2009); ³Índices de retenção de Kratz da literatura (Nascimento *et al.* 2013); ⁴Índices de retenção de Kratz da literatura (Andrade *et al.* 2008); ⁵Índices de retenção de Kratz calculados através dos tempos de retenção em relação aos da série de n-alcanos (C₈-C₂₅); Rendimento calculado a partir da razão m/m (massa de óleo obtido/massa de material fresco).

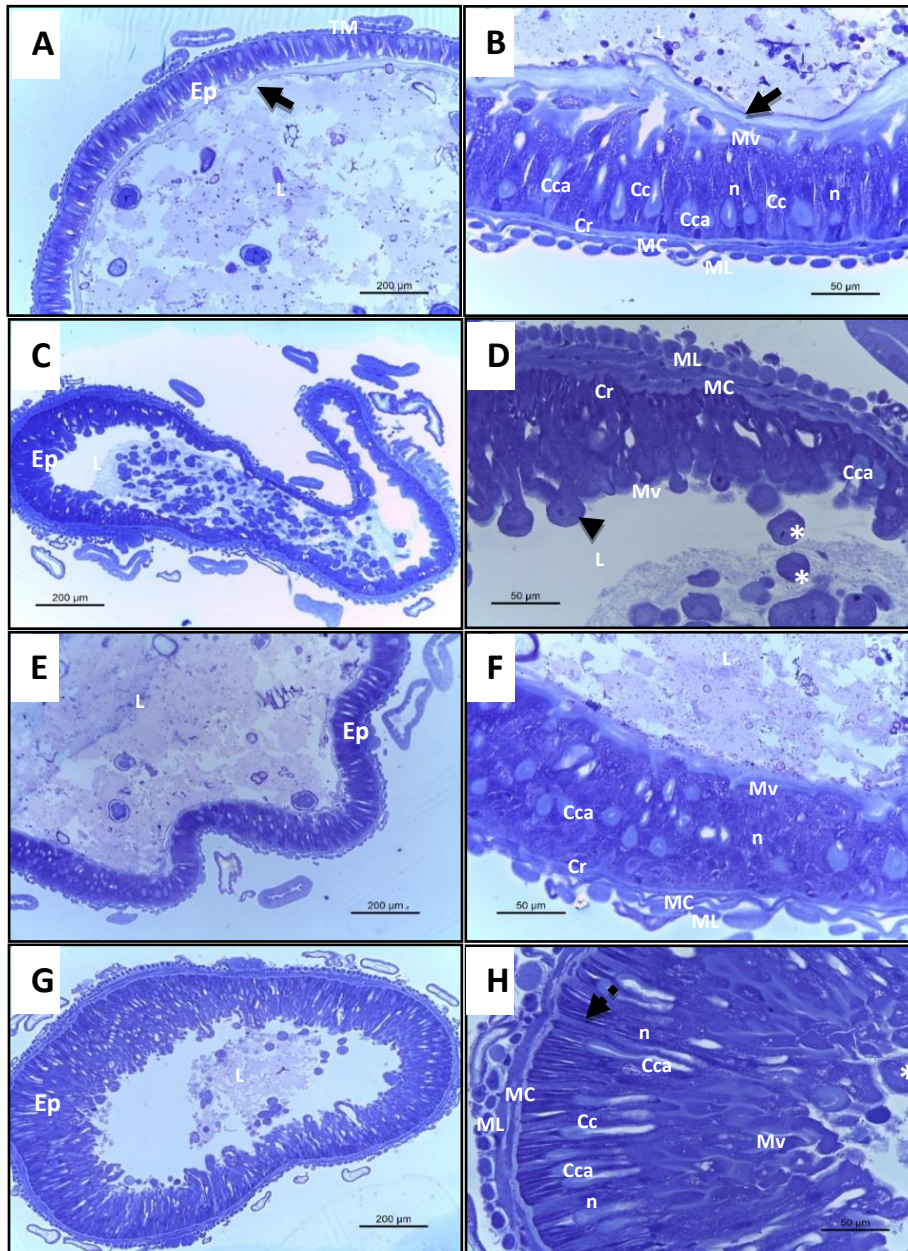
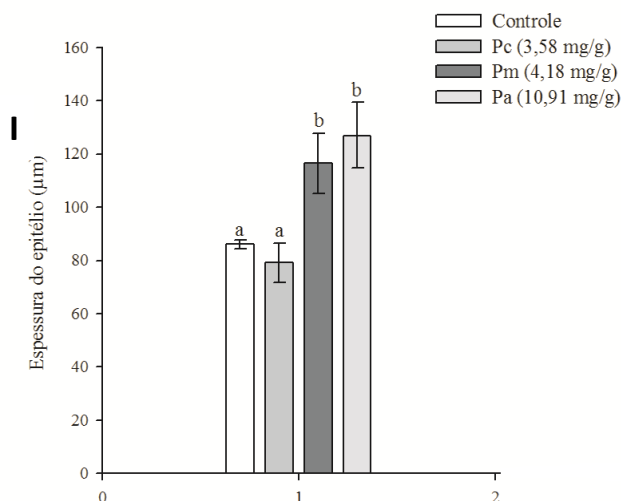


Figura 1. Corte transversal do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (terceiro instar) submetidas ao tratamento com contato tópico com óleos essenciais de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* nas Doses Letais 50 (DL₅₀). A e B, controle. C e D, tratadas com *P. corcovadensis*. E e F, tratadas com *P. marginatum*. G e H, tratadas com *P. arboreum*. Coloração Azul de Toluidina. A– vista geral do intestino médio. B– detalhe do intestino médio com presença da matriz peritrófica (seta curta). C– desorganização do intestino médio. D– estratificação epitelial, com presença de protusões (ponta de seta) e extrusão celular (asterisco). E– desorganização do intestino médio. F– estratificação epitelial com células caliciformes globosas. G– desorganização do intestino médio. H– estratificação epitelial, com células colunares alongadas (seta pontilhada) e extrusão celular (asterisco). Músculo longitudinal (ML), músculo circular (MC), células regenerativas (Cr), células caliciformes (Cca), células colunares (Cc) com núcleos (n), presença de microvilos (Mv) e lúmen (L). I– Espessura do epitélio em μm (média \pm EP). *Piper corcovadensis* (Pc), *Piper marginatum* (Pm) e *Piper arboreum* (Pa). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).



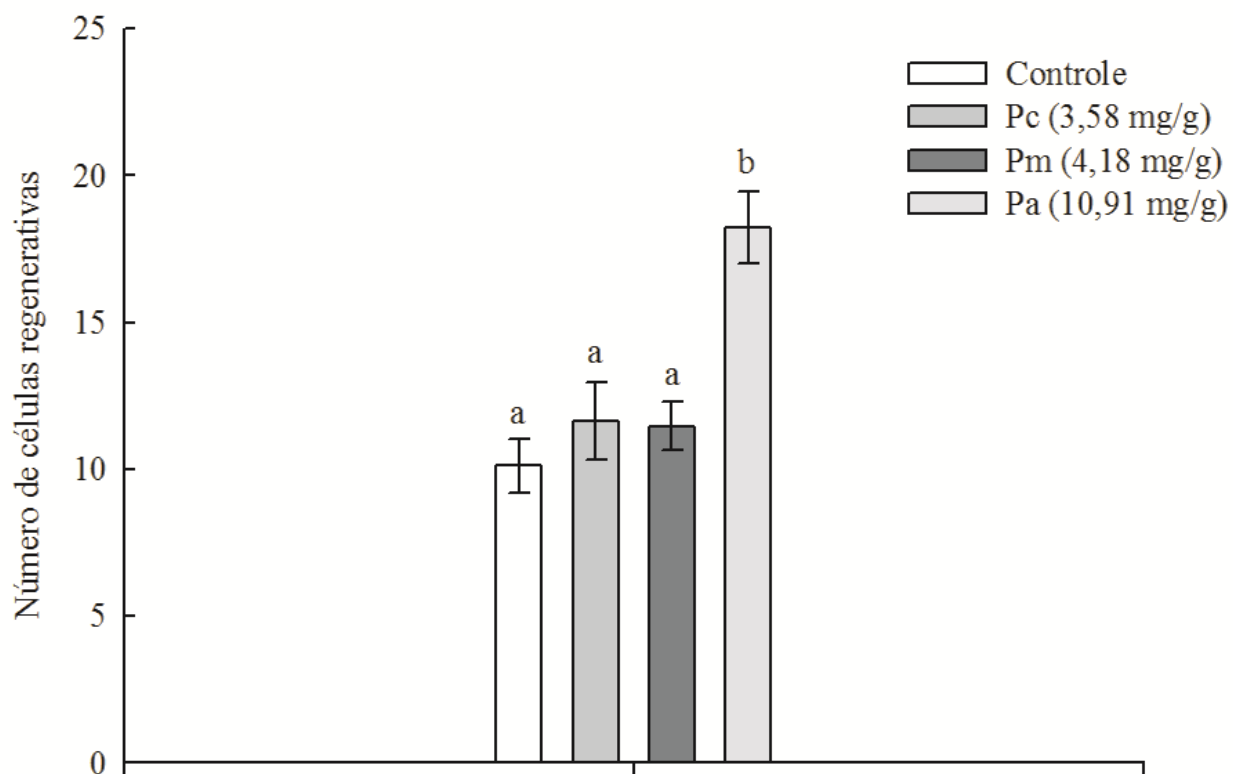


Figura. 2. Número médio (\pm EP) de células regenerativas do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* submetidas ao ensaio de toxicidade por contato tópico na Dose Letal 50 (DL_{50}), dos óleos essenciais de *Piper corcovadensis* (Pc), *Piper marginatum* (Pm) e *Piper arboreum* (Pa). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$).

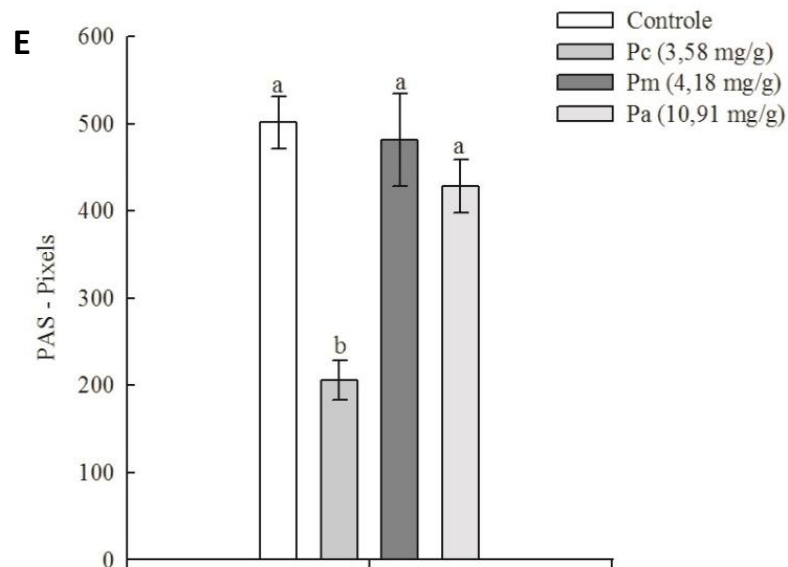
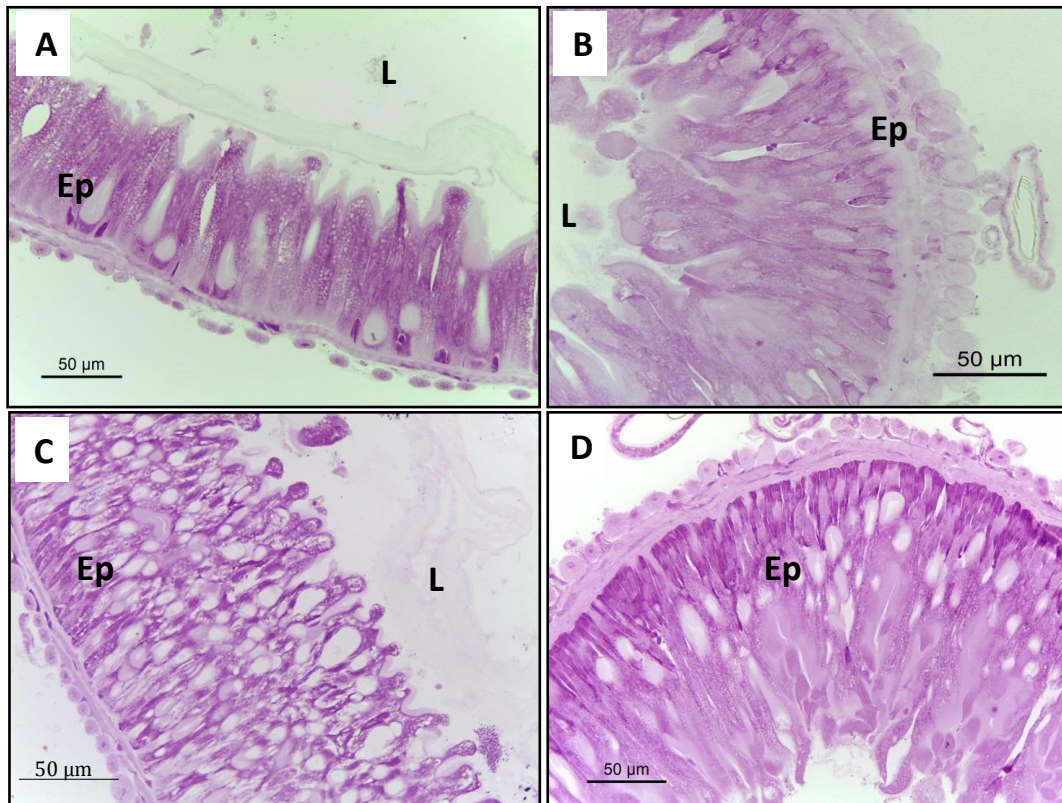


Figura 3. Histoquímica do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (terceiro instar) em contato tóxico com óleos essenciais de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* nas Doses Letais 50 (DL₅₀). A, controle. B, tratadas com *P. corcovadensis*. C, tratadas com *P. marginatum*. D, tratadas com *P. arboreum*. Coloração com ácido periódico de Schiff (P.A.S.). A e C– notar distribuição uniforme de grânulos de glicogênio no citoplasma das células. B– menor intensidade de grânulos de glicogênio no citoplasma das células. D– notar distribuição de grânulos de glicogênio na região basal das células epiteliais. E– quantidade de pixels (média ± EP) para polissacarídeos neutros. *P. corcovadensis* (Pc), *P. marginatum* (Pm) e *P. arboreum* (Pa). Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

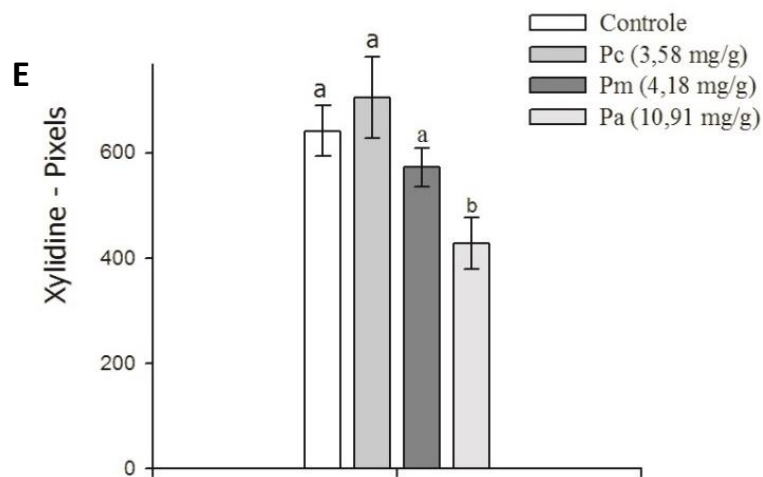
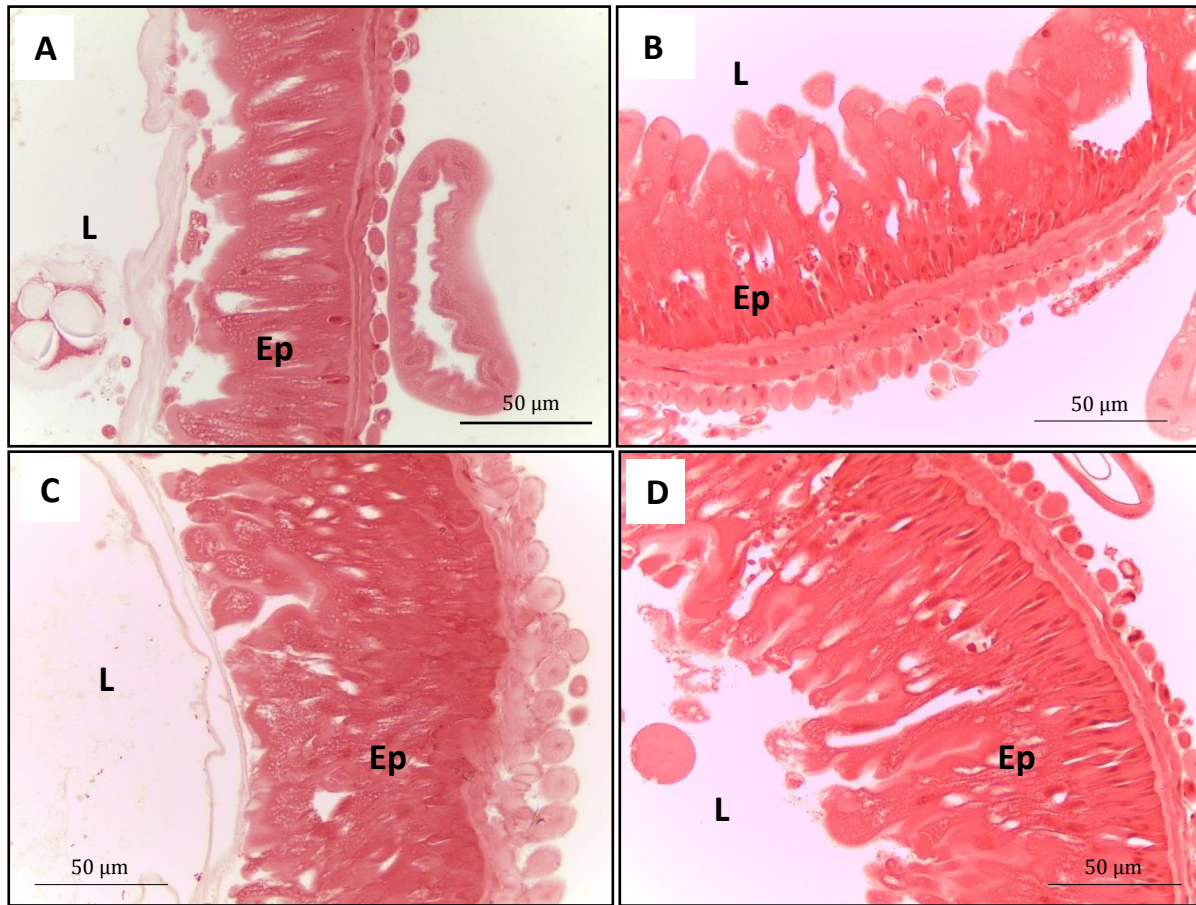


Figura 4. Histoquímica do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (terceiro instar) em contato tópico com óleos essenciais de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* nas Doses Letais 50 (DL₅₀). A, controle. B, tratadas com *P. corcovadensis*. C, tratadas com *P. marginatum*. D, tratadas com *P. arboreum*. Coloração com Xylidine Ponceau. E, quantidade de pixels para proteínas totais (média ± EP). *P. corcovadensis* (Pc), *P. marginatum* (Pm) e *P. arboreum* (Pa). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P>0,05).

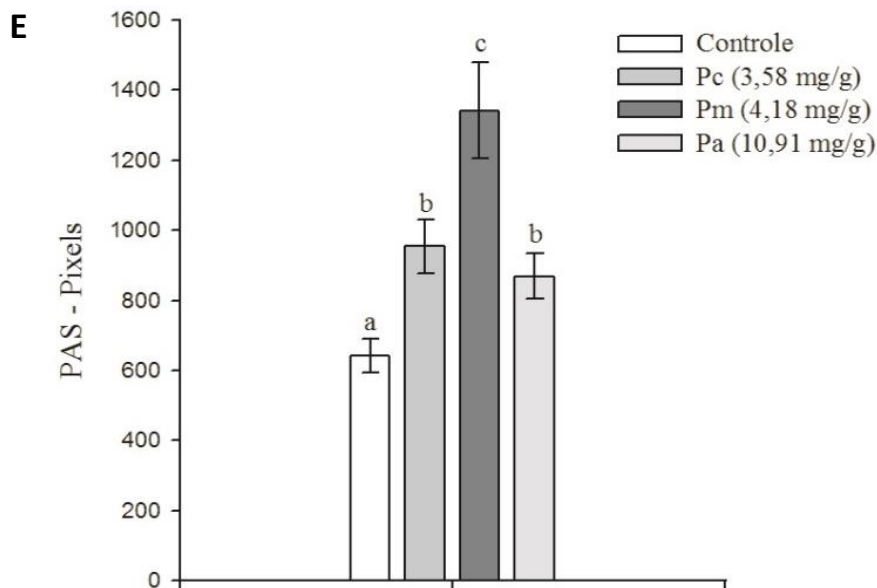
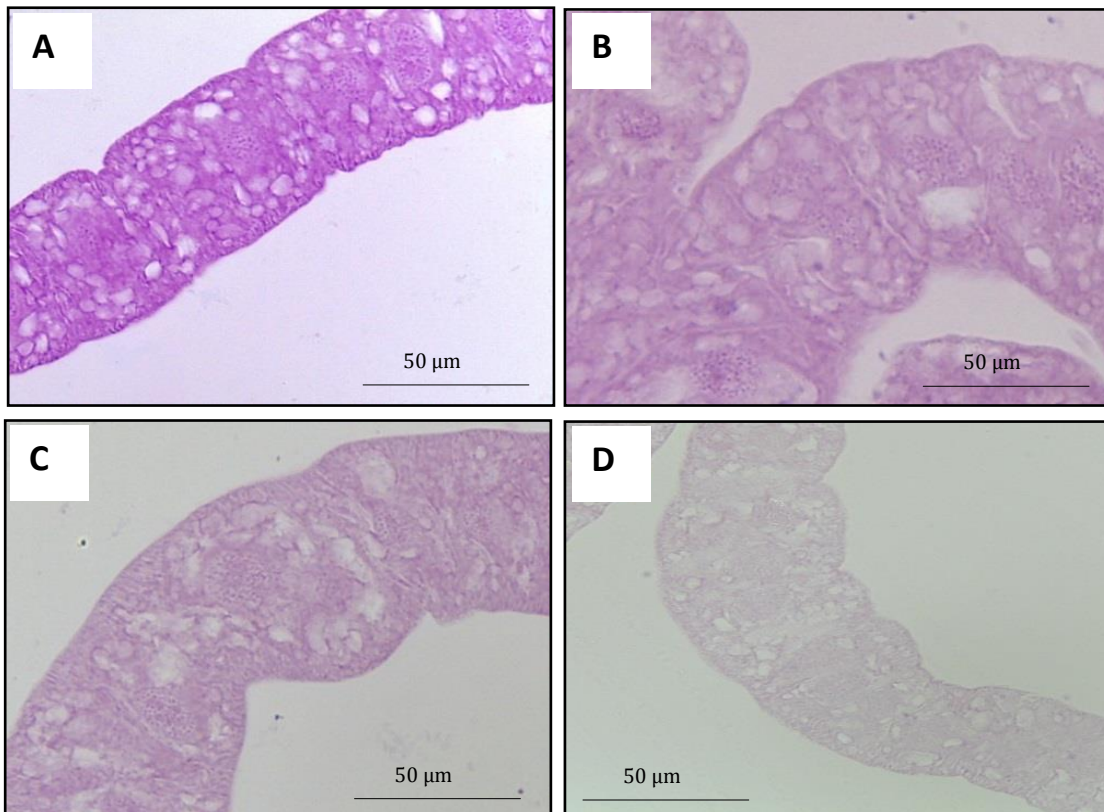


Figura 5. Histoquímica do corpo gorduroso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (terceiro instar) em contato tópico com óleos essenciais de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* nas Doses Letais 50 (DL₅₀). A, controle. B, tratadas com *P. corcovadensis*. C, tratadas com *P. marginatum*. D, tratadas com *P. arboreum*. Coloração com ácido periódico de Schiff (P.A.S.). E, quantidade de pixels (média ± EP) para polissacarídeos neutros. *P. corcovadensis* (Pc), *P. marginatum* (Pm) e *P. arboreum* (Pa). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$).

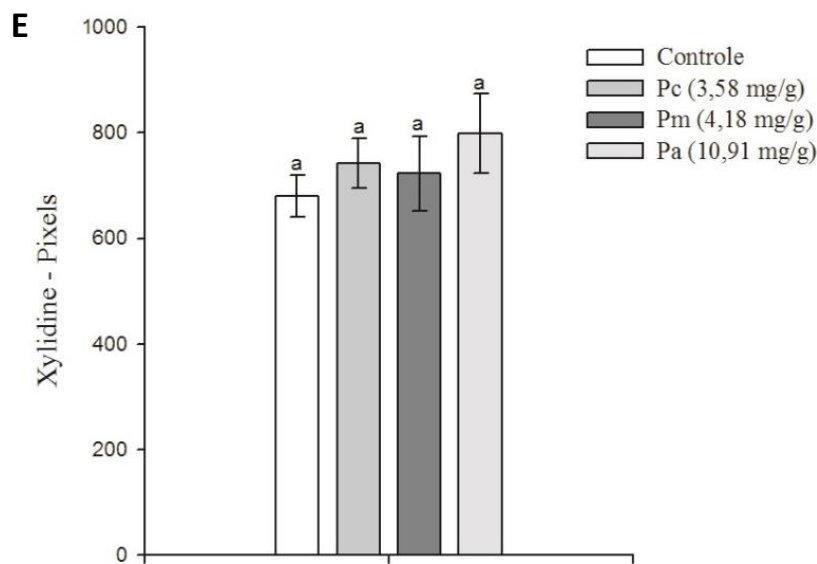
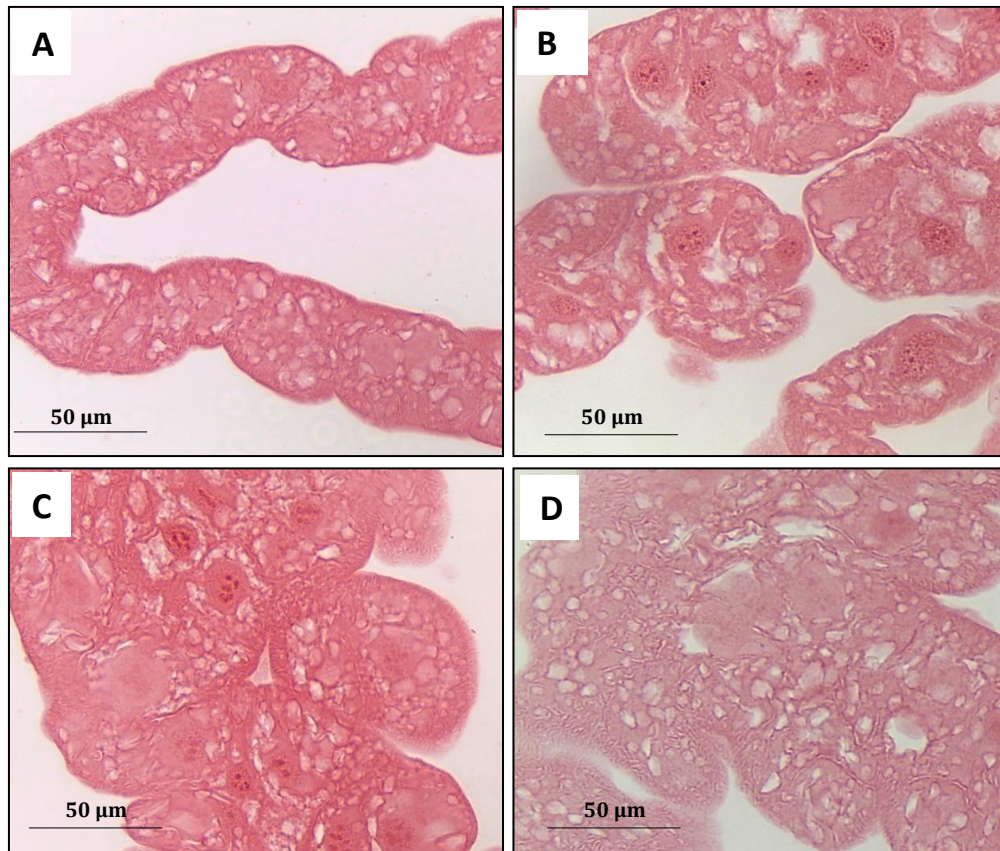


Figura 6. Histoquímica do corpo gorduroso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* submetidas ao ensaio de toxicidade por contato tóxico na Dose Letal 50 (DL₅₀), dos óleos essenciais de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum*. A, controle. B, tratadas com *P. corcovadensis*. C, tratadas com *P. marginatum*. D, tratadas com *P. arboreum*. Coloração com Xylidine Ponceau. E, quantidade de pixels para proteínas totais (média ± EP). *P. corcovadensis* (Pc), *P. marginatum* (Pm) e *P. arboreum* (Pa). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

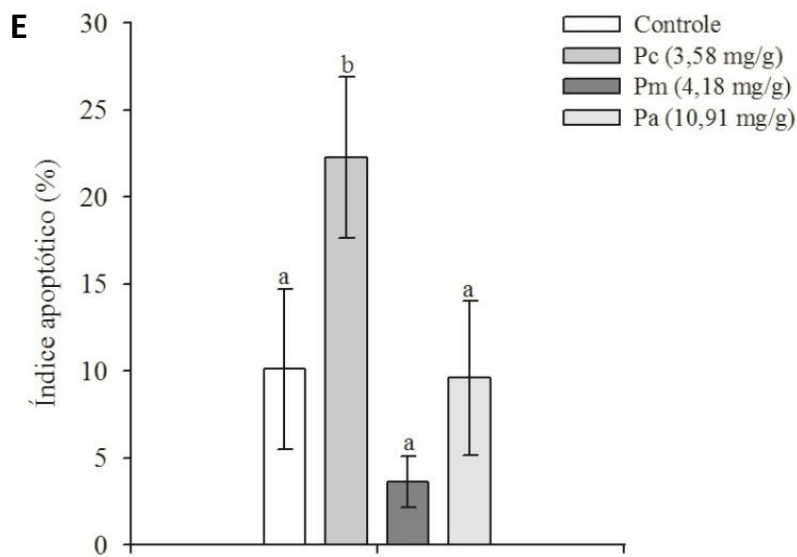
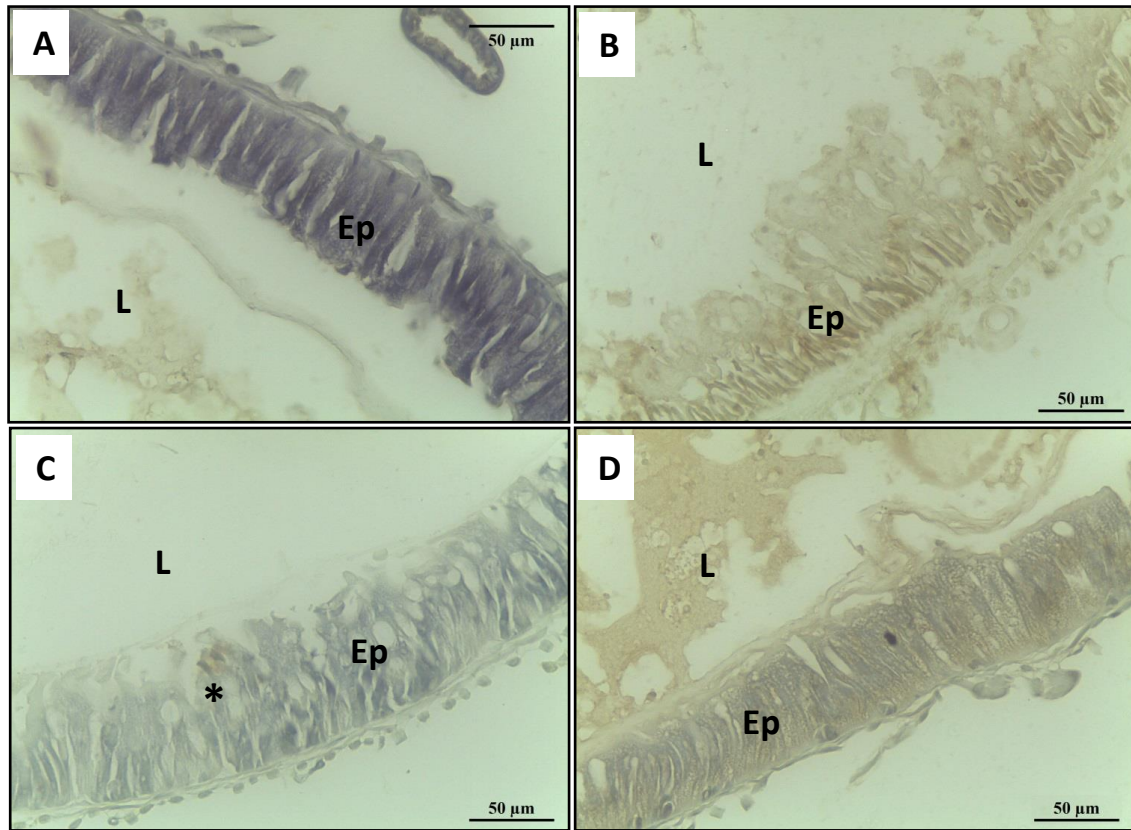


Figura 7. Ensaio TUNEL do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* submetidas ao ensaio de toxicidade por contato tóxico na Dose Letal 50 (DL_{50}), dos óleos essenciais de *P. corcovadensis* (Pc), *P. marginatum* (Pm) e *P. arboreum* (Pa). A, controle. B, tratadas com *P. corcovadensis*. C, tratadas com *P. marginatum*. D, tratadas com *P. arboreum*. (*) Núcleo apoptótico. E, Índice apoptótico (média \pm EP). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$).

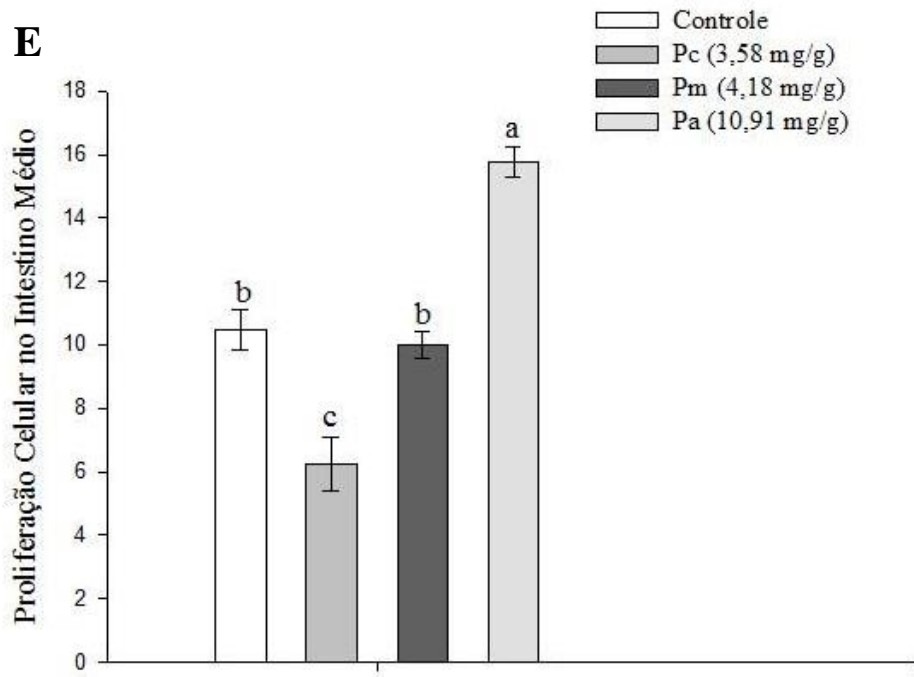
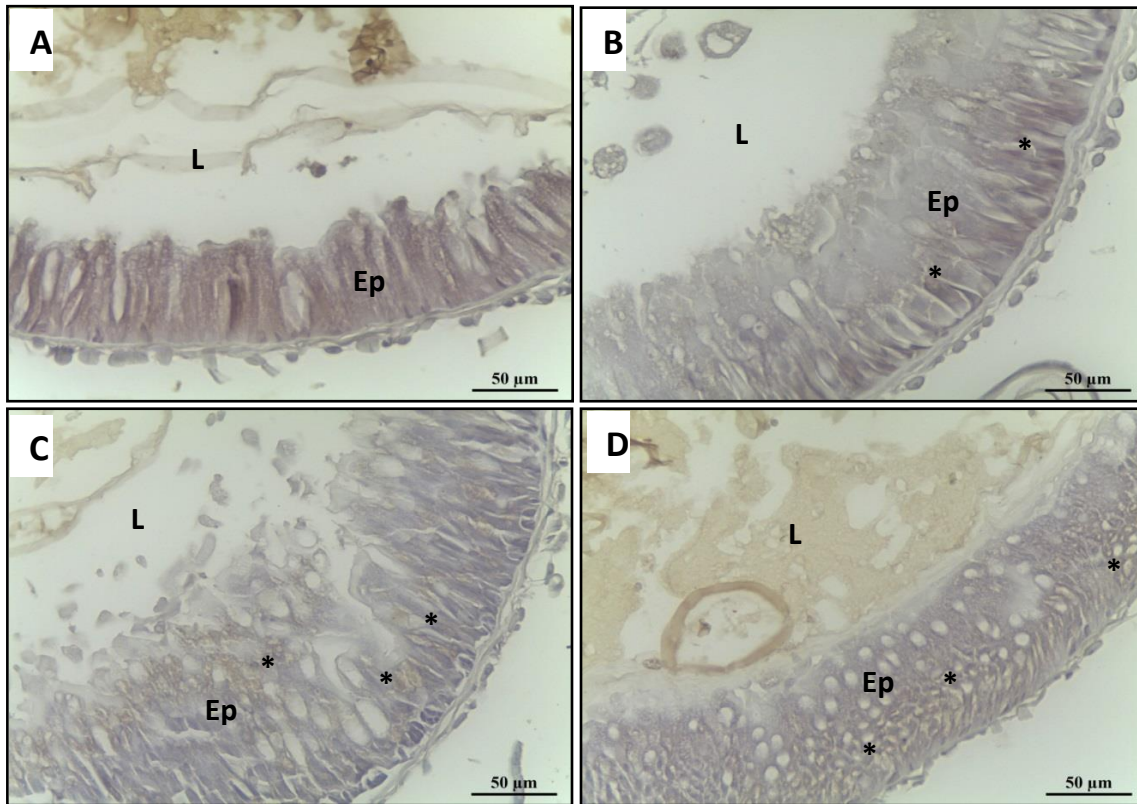


Figura 8. Ensaio de Proliferação celular do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* submetidas ao ensaio de toxicidade por contato tópico na Dose Letal 50 (DL₅₀), dos óleos essenciais de *P. corcovadensis*, *P. marginatum* e *P. arboreum* após 48 h. A, controle 48 h. B, tratadas com *P. corcovadensis* 48 h C, tratadas com *P. marginatum* 48 h. D, tratadas com *P. arboreum* 48 h. (*) Marcação Proliferação. E, proliferação (média ± EP). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

CAPÍTULO 4

TOXICIDADE E EFEITO SINÉRGICO DE TERPENOS EM *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

KAMILLA A. DUTRA¹

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

¹Dutra, K.A. Toxicidade e efeito sinérgico de terpenos em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). A ser submetido.

RESUMO - Compreender a contribuição dos compostos individualmente e suas interações em misturas binárias para a toxicidade em insetos-praga é um importante requisito nos estudos com óleos essenciais como alternativa ao uso de inseticidas sintéticos. A toxicidade dos compostos α -pineno, β -pineno, α -felandreno, terpinoleno e E-cariofileno e suas combinações binárias foram testada frente à lagarta *Spodoptera frugiperda*. Os monoterpenos α -felandreno, β -pineno e α -pineno exibiram os menores valores de Dose Letal₅₀ (3,96; 7,29 e 8,56 mg/g de inseto) respectivamente. A mistura binária dos cinco compostos ativos resultou em 10 combinações: terpinoleno+E-carifileno, terpinoleno+ α -pineno, terpinoleno+ β -pineno, terpinoleno+ α -felandreno, α -pineno+E-carifileno, α -pineno+ β -pineno, α -pineno+ α -felandreno, β -pineno+E-carifileno, β -pineno+ α -felandreno e α -felandreno+E-carifileno. Os resultados do teste de toxicidade dessas misturas binárias assumiriam o modelo de Probit com valores de DL₅₀ e DL₉₀ variando de 1,66 a 6,88 mg/g de inseto e 12,78 a 62,98 mg/g de inseto, respectivamente. Misturas binárias com o terpinoleno apresentaram sinergismo, com destaque para o terpinoleno+ β -pineno que além do efeito sinérgico, apresentou uma toxicidade mais elevada. O efeito antagonista foi encontrado na combinação do α -felandreno+E-cariofileno, do mesmo modo que o aditivo foi encontrado apenas na combinação β -pineno+E-cariofileno. Estudos envolvendo resultados de toxicidade de composto ativos e suas misturas binárias podem ajudar na obtenção de novas formulações de inseticidas.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta-do-cartucho, monoterpeno, sesquiterpeno, fator de co-toxicidade, *Piper*

TOXICITY AND SYNERGISTIC EFFECT OF TERPENES IN *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT - Understanding the contribution of individual compounds and their interactions in binary mixtures for pest insect toxicity is an important requirement in studies with essential oils as an alternative to the use of synthetic insecticides. The toxicity of the α -pinene, β -pinene, α -phellandrene, terpinolene and E-caryophyllene compounds and their binary combinations were tested against the *Spodoptera frugiperda*. The monoterpenes α -phellandrene, β -pinene and α -pinene exhibited the lowest values of Dose Letal₅₀ (3.96, 7.29 and 8.56 mg/g insect), respectively. The binary mixture of the five active compounds resulted in 10 combinations: terpinolene + E-caryophyllene, terpinolene + α -pinene, terpinolene + β -pinene, terpinolene + α -phellandrene, α -pinene + E-caryophyllene, α -pinene + β -pinene, α -pinene + α -phellandrene, β -pinene + E-caryophyllene, β -pinene + α -phellandrene and α -phellandrene + E-caryophyllene. The toxicity test results from these binary mixtures would assume the Probit model with LD₅₀ and LD₉₀ values ranging from 1.66 to 6.88 mg/g insect and 12.78 to 62.98 mg/g insect, respectively. Binary mixtures with terpinolene showed synergism, especially terpinolene + β -pinene which, in addition to the synergic effect, showed a higher toxicity. The antagonist effect was found in the combination of α -phellandrene + E-caryophyllene, in the same way that the additive was found only in the β -pinene + E-caryophyllene combination. Studies involving active compound toxicity results and their binary mixtures may help in the development of new formulations of insecticidal.

KEYWORDS: Fall armyworm, monoterpene, sesquiterpene, co-toxicity factor, *Piper*

Introdução

Quimicamente os óleos essenciais são ricos em substâncias pertencentes as classes dos terpenos e fenilpropanoides, sendo os terpenos a segunda maior classe de constituintes de plantas ficando atrás apenas dos alcaloides. São formados por unidade isoprênicas constituídas de cinco carbonos e podem ser classificados de acordo com suas características estruturais em monoterpenos, sesquiterpenos entre outros, exibindo grupos funcionais como exemplo dos álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos (Tsao & Coats 1995, Simões & Spitzza 2004). Esses constituintes dos óleos essenciais são comumente usados na composição de fragrâncias e aditivos alimentares como agentes aromatizantes. Mas recentemente ganharam atenção crescente na agricultura, tornando-se o foco de interesse na busca do desenvolvimento de novos inseticidas (Isman 2000, Zwenger & Basu 2008, Bergamaschi 2011).

A toxicidade de terpenoides e óleos essenciais é relatada para muitos insetos nas diferentes ordens de importância econômica, por exemplo, Lepidoptera com *Spodoptera litura* (Fab.), *Spodoptera littoralis* Boisd., *Helicoverpa armigera* Hübner, e *Chilo partellus* (Swinhoe); Coleoptera com *Rhyzopertha dominica* (Fab.), *Tribolium castaneum* (H.) e *Sitophilus oryzae* (L.); Diptera como *Ceratitis capitata* (Wiedemann), *Musca domestica* L., *Culex quinquefasciatus* Say e *Aedes aegypti* (L.); Hemiptera como *Aphis gossypii* Glover e Neuroptera com *Chrysoperla externa* Hagen (Hummelbrunner & Isman 2001, Rozman *et al.* 2006, Papachristos *et al.* 2009, Liu *et al.* 2010, Pavela 2014, Silva *et al.* 2016).

Entre os insetos de importância econômica agrícola, a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é de grande destaque nas lavouras por ser uma praga polífaga, podendo infestar grandes culturas de exportação como milho (*Zea mays* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.), além de mais de 80 variedades de

plantas cultivadas distribuídas em mais de 20 famílias botânicas (Pogue 2002, Prowell *et al.* 2004, Clark *et al.* 2007, Barros *et al.* 2010).

Embora pesquisas tenham sido publicadas sobre óleos essenciais e seus compostos ativos, confirmando a excelência das suas atividades, poucos estudos são focados nas interações entre os terpenos contidos nesses óleos quanto aos efeitos positivos ou negativos das suas combinações, esse fenômeno, muitas vezes discutido em vários trabalhos é importante para elucidação do potencial sinérgico de misturas binárias (Hummelbrunner & Isman 2001, Pavela 2008, Koul *et al.* 2013).

No presente trabalho cinco substâncias pertencentes à classe dos terpenos, foram escolhidas a partir da identificação química dos óleos essenciais de plantas do gênero *Piper*, a saber, *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC., *Piper marginatum* Jacq. e *Piper arboreum* Aubl. como alguns dos compostos que alcançaram as maiores concentrações na sua composição, e estão também presentes em outras composições de óleos essenciais, tem-se os monoterpenos α -pineno, β -pineno, α -felandreno, terpinoleno e um sesquiterpeno o E-cariofileno, para avaliação individual e possíveis efeitos sinérgicos quando aplicados em misturas binárias para toxicidade em lagartas de *S. frugiperda*.

Material e Métodos

As pesquisas foram conduzidas no Laboratório de Fisiologia de Insetos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/DMFA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção e Criação de *Spodoptera frugiperda*. Os insetos foram obtidos da criação estoque do Laboratório de Fisiologia de insetos, mantidos à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h. Os adultos foram criados em gaiolas de oviposição, confeccionadas em tubo PVC de 20 cm de altura e 15 cm de diâmetro e suportadas por uma bandeja plástica de

dois cm de altura por 17 cm de diâmetro, ambos forrados internamente com papel contínuo branco. As gaiolas foram fechadas na parte superior com filme plástico. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10 % e as posturas coletadas periodicamente. Os ovos foram mantidos em gaiolas plásticas de 15 cm de diâmetro por nove cm de altura, onde as lagartas foram alimentadas com dieta artificial de Greene modificada, recomendada para a espécie (Busato *et al.* 2006).

Produtos Químicos. Os terpenos testados foram os monoterpenos α -pineno, β -pineno, α -felandreno e terpinoleno e o sesquiterpeno E-cariofileno, obtidos da Sigma Aldrich® Brasil, com pureza acima de 99%.

Bioensaio de Toxicidade por Contato Tópico dos Compostos Individuais. Testes preliminares visando definir as faixas de concentração capazes de promover mortalidades em torno de 5 e 95% (Finney, 1971) dos terpenos, foram realizados utilizando lagartas de *S. frugiperda* de terceiro instar com peso médio de 0,078 g. Para cada teste foram individualizadas 10 lagartas por repetição, sendo 3 repetições por dose, totalizando 30 indivíduos. Foi então aplicado 1,0 μ L da solução (composto + acetona), na região protorácica da lagarta, utilizando uma seringa Hamilton™ (50 μ L). O controle foi tratado apenas com acetona. As lagartas foram alimentadas individualmente com dieta artificial, e a avaliação da toxicidade aguda foi feita 48 h após a instalação do bioensaio, pela contagem das lagartas mortas. De acordo com o resultado obtido nos testes preliminares foram estabelecidos os tratamentos. As Doses Letais (DL₅₀₋₉₀) foram determinadas, através da análise de probit pelo programa SAS PROC Probit (SAS 2001). As Razões de Toxicidade (RT) foram obtidas, através do quociente entre a dose letal do composto de maior toxicidade e dose letal dos demais compostos, individualmente.

Bioensaio de Toxicidade por Contato Tópico das Misturas Binárias. Inicialmente bioensaios de toxicidade por contato tópico foram realizados com as misturas binárias dos compostos ativos

de acordo com o método de aplicação e as condições experimentais descritos acima. Essas misturas foram preparadas na proporção 1:1. Sendo as seguintes combinações: terpinoleno+E-carifileno, terpinoleno+ α -pineno, terpinoleno+ β -pineno, terpinoleno+ α -felandreno, α -pineno+E-carifileno, α -pineno+ β -pineno, α -pineno+ α -felandreno, β -pineno+E-carifileno, β -pineno+ α -felandreno e α -felandreno+E-carifileno. De acordo com os resultados obtidos nos testes preliminares foram estabelecidos às doses intermediárias utilizadas nas curvas. As Doses Letais (DL₅₀₋₉₀) foram então determinadas, através da análise de probit pelo programa SAS PROC Probit (SAS 2001). As Razões de Toxicidade (RT) foram obtidas, através do quociente entre a dose letal da mistura binária de maior toxicidade e dose letal das demais misturas binárias, individualmente.

Efeito Sinérgico das Misturas Binárias por Contato Tópico. Para avaliar o efeito sinérgico das misturas binárias dos compostos, foram preparadas as combinações na proporção 1:1, na concentração de 2,0 mg/g em que o composto individual causou uma mortalidade de até 30%, conforme a metodologia utilizada por Wu *et al.* (2017). Foi executado então o ensaio para cada mistura binária e para cada composto individual. As porcentagens de mortalidade determinadas para cada composto individual foram consideradas como mortalidade esperada, enquanto que as porcentagens de mortalidade causadas pelas misturas binárias foram consideradas como mortalidade observada. O fator de co-toxicidade (CTF) tomado como critério para avaliação do efeito tóxico combinado foi calculado da seguinte forma: Fator de co-toxicidade = $[(MO - ME)/ME] \times 100$, onde MO é a mortalidade observada (%) da mistura binária, e ME é a mortalidade esperada, ou seja, a soma da mortalidade (%) causada por cada composto testado individualmente. Um fator positivo de +20 ou superior indica sinergismo, um fator negativo de -20 ou inferior significa um efeito de antagonismo, e valores entre -20 e + 20 implicam um efeito apenas aditivo (Abbassy *et al.* 2009, Pavela 2014, Wu *et al.* 2017).

Resultados

Bioensaio de Toxicidade por Contato Tópico dos Compostos Individuais. Os compostos apresentaram ação tóxica contra *S. frugiperda*. Os resultados de dose-mortalidade obtidos assumiram o modelo de Probit com os seguintes valores de DL₅₀: α -felandreno 3,96 (2,95-5,18) mg/g; β -pineno 7,29 (4,23-19,80) mg/g; α -pineno 8,56 (7,00-10,69) mg/g; terpinoleno 13,14 (10,95-15,84) mg/g e E-cariofileno 18,62 (15,96-22,47) mg/g. Os monoterpenos α -felandreno, β -pineno e α -pineno possuem os menores valores de DL₅₀ e as maiores razões de toxicidade para esta dose letal em relação ao E-cariofileno e terpinoleno (Tabela 1).

Bioensaio de toxicidade por Contato Tópico das Misturas Binárias. A mistura binária dos cinco compostos ativos resultou em 10 combinações. Essas combinações mostraram ação tóxica contra *S. frugiperda*. Os resultados de dose-mortalidade obtidos assumiram o modelo de Probit com os seguintes valores de DL₅₀ : terpinoleno+ β -pineno 1,66 (1,17-2,36) mg/g; terpinoleno+ α -pineno 1,76 (1,21-2,61) mg/g; β -pineno+ α -felandreno 1,79 (1,21-2,70) mg/g; terpinoleno+ α -felandreno 1,93 (1,38-2,67) mg/g; α -pineno+ α -felandreno 2,98 (1,92-4,57) mg/g; α -pineno+ β -pineno 3,05 (1,93-4,86) mg/g; α -pineno+E-carifileno 5,83 (4,28-7,78) mg/g; terpinoleno+E-carifileno 6,21 (4,80-7,94) mg/g; β -pineno+E-carifileno 7,75 (5,69-10,75) mg/g; e α -felandreno+E-carifileno 6,88 (5,06-9,31) mg/g. As misturas binárias que apresentaram o E-cariofileno possuem os maiores valores de DL₅₀ em relação às misturas sem esse composto, demonstrando uma menor toxicidade (Tabela 1).

Efeito Sinérgico das Misturas Binárias por Contato Tópico. O efeito dos compostos combinados foram investigados para as interações sinérgicas, utilizando o fator de co-toxicidade (CTF) como critério. Apenas a mistura binária de α -felandreno+E-carofileno exibiu efeito antagonista (-37,5) e a combinação de β -pineno+E-carifileno apresentou efeito aditivo, exibindo valor de CTF entre -20 e +20, enquanto que todas as demais combinações tiveram efeitos

sinérgicos exibindo valores superiores de +20, principalmente as combinações que apresentaram o monoterpeno terpinoleno, terpinoleno+E-carifileno (50,0); terpinoleno+ α -pineno (220,0); terpinoleno+ β -pineno (157,14); terpinoleno+ α -felandreno (80,0) e a combinação α -pineno+E-carifileno (100) (Tabela 2).

Discussão

Na avaliação das substâncias isoladas referentes à toxicidade por contato tópico para lagartas de *S. frugiperda*, os compostos α -felandreno, β -pineno e α -pineno exibiram as menores DL₅₀: 3,96 (2,95-5,18); 7,29 (4,23-19,80) e 8,56 (7,00-10,69) mg/g, respectivamente, quando comparadas ao terpinoleno (13,14 mg/g) e E-cariofileno (18,62 mg/g). No entanto o terpinoleno e o E-cariofileno alcançaram DL₅₀ semelhante ao geraniol (13,65 mg/g) e relativamente menores quando comparados ao limoneno (32,24 mg/g) atuando também por contato tópico em lagartas de *S. frugiperda* (Cruz *et al.* 2017, Guedes *et al.* 2017). Outros terpenos já são descritos na literatura com ação tópica para esta praga agrícola, a exemplo do E-anetol (0,027 mg/g), citronelal (0,07 mg/g) e linalol (5,20 mg/g) (Cruz *et al.* 2017).

Além da *S. frugiperda*, outros insetos de importância econômica também são alvos de pesquisas que envolvem a toxicidade de compostos ativos de óleos essenciais, a saber, monoterpenos para *S. litura*, compostos fenólicos para *M. domestica* e *C. quinquefasciatus*, fenilpropanoides para *Cryptolestes pusillus* (Schoenherr), *S. oryzae*, *A. aegypti* e sesquiterpeno para *A. gossypii* além de ácaros de importância econômica como *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) e *Tetranychus urticae* Koch (Hummelbrunner & Isman, 2001, Kim *et al.* 2003, Liu *et al.* 2010, Pavela 2011, López & Villa Lobos 2014, Silva *et al.* 2016, Moraes *et al.* 2017). Essas pesquisas demonstram o reflexo da importância dos estudos não só com os óleos essenciais, mas também de seus compostos ativos, uma vez que, a eficácia da atividade desses óleos é devida não

apenas aos constituintes presentes, mais principalmente nas várias combinações e proporções (Dias & Moraes 2014, Wu *et al.* 2017).

A classe dos terpenos é amplamente conhecida por exibirem propriedade lipofílica, porém características estruturais como o tamanho, forma da molécula e o grupo funcional presente também contribuem para propriedade inseticida dos terpenóides, assim como na capacidade de penetração da cutícula, movimentação e interação em sítios ativos no inseto (Rice & Coats 1994, Pavela 2011, Castilhos *et al.* 2017). Os terpenos estudados no presente trabalho apresentam em comum um grupo funcional metil (-CH₃), essa característica é descrita na literatura em substâncias capazes de aumentar o efeito da ação sinérgica de misturas binárias de compostos ativos (Pavela 2011, Pavela 2014).

Foram testadas para efeito de toxicidade cinco substâncias que combinaram um total de 10 misturas binárias, na qual α -felandreno+E-carifileno exibiu efeito antagonista, β -pineno+E-carifileno apresentaram efeito aditivo e as oito combinações restantes, tiveram efeitos sinérgicos para mortalidade das lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*. Outras pesquisas com misturas binárias confirmam a eficácia desta propriedade sinérgica para compostos ativos, por exemplo, Koul *et al.* (2013) observaram um efeito sinérgico em timol+linalol, timol+E-anetol e linalol+1,8-cineol sobre a mortalidade de *H. armigera*, *S. litura* e *C. partellus*. O contrário também pode ser encontrado, a exemplo do composto L-carvona que promove efeito antagonista com maior frequência nas misturas binárias as quais envolve essa substância (Ntalli *et al.* 2011, Pavela 2014).

Pode-se observar especificamente que o terpinoleno e o E-carifileno foram às substâncias que demonstraram os maiores valores de DL₅₀ (menor toxicidade) quando testadas isoladamente, no entanto ambas proporcionaram um alto potencial sinérgico quando combinadas entre si e nas demais misturas binárias, exceto para a mistura de α -felandreno+E-carifileno. Resultados semelhantes foram relatados por Pavela (2014) a partir da atividade dos compostos borneol e

cânfora para toxicidade de *S. littoralis*, ambos causaram baixa mortalidade quando testados isoladamente, porém proporcionaram um alto potencial sinérgico quando misturadas (na concentração de 50 µg/lagarta e na dose equivalente a DL₂₅, respectivamente). Nesta combinação de cânfora+borneol também foi verificado que a mistura binária alcançou um maior efeito sinérgico na proporção de 2:1 respectivamente, quando comparadas as proporções de 1:2 e 1:1, de posse dessas observações é importante considerar que o efeito sinérgico depende não somente de uma combinação adequada de duas substâncias, mas também da proporção dos seus conteúdos na mistura (Pavela 2014, Wu *et al.* 2017).

Esses achados podem elucidar o fato de que a atividade inseticida de um óleo essencial nem sempre é determinada apenas pelas substâncias mais ativas, mas também pelas interações entre os compostos presentes no óleo (Wu *et al.* 2017). Pesquisadores sugerem ainda que compostos ativos testados individualmente podem em suas combinações não só proporcionarem aumento significativo de atividade, como também evitar o desenvolvimento da resistência de insetos-praga (Dayan *et al.* 2009, Rattan 2010).

Com isso é válido lembrar que, pesquisas precedentes envolvendo metabólitos de plantas deram origem a importantes insecticidas sintéticos de diferentes grupos químicos utilizados na agricultura. Os exemplos de destaque são os piretróides sintéticos, desenvolvidos com base nas piretrinas naturais de *Chrysanthemum cinerariaefolium* L., os alcalóides encontrados na espécie de *Nicotiana tabacum* L. e a rianodina obtidos da espécie *Ryania speciosa* Vahl (Elliott 1989, Jeschke & Nauen 2008, Lahm *et al.* 2009), que reafirmam o potencial dos compostos presentes nas plantas como fontes de estudos para descobertas de novas moléculas com atividade inseticida.

Assim qualquer efeito sinérgico ou antagonista pode ser investigado com base em misturas binárias, não esquecendo a importância dos estudos prévios dos óleos essenciais para compreensão da contribuição de cada composto ativo na toxicidade do óleo e na sinergia entre

eles a fim de promover o desenvolvimento de inseticidas eficazes com base em misturas de terpenos que já existam ou não na natureza (Pavela 2014, Wu *et al.* 2017).

Conclusões

Todos os compostos e suas misturas binárias exibiram toxicidade sendo os terpenos α -felandreno, β -pineno e α -pineno os monoterpenos testados isoladamente mais tóxicos. Todas as misturas binárias que contiam o terpinoleno apresentaram sinergismo, com destaque para o terpinoleno+ β -pineno que apresentou além do efeito sinérgico, uma toxicidade mais elevada quando comparado às demais misturas binárias. Esses resultados confirmam o potencial dos compostos ativos dos óleos essenciais bem como o efeito sinérgico das misturas binárias abrindo margem para pesquisas mais complexas que envolvam particularmente a descoberta de formulações eficazes para utilização no controle de pragas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida ao primeiro autor.

Literatura Citada

- Abbassay, M.A., S.A.M. Abdelgaleil & R.Y.A. Rabie. 2009.** Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents. Entomol. Exp. Appl. 131: 225-232.
- Barros, E.M., J.B. Torres, J.R. Ruberson & M.D. Oliveira. 2010.** Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. Entomol. Exp. Appl. 137: 237-245.
- Bergamaschi, J.M. 2011.** Desengraxante verde, uma realidade. Rev. Trat. Superficie 168: 64-66.

- 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.
- Castilhos, R.V., A.D. Grützmacher & J.R. Coats. 2017.** Acute toxicity and sublethal effects of terpenoids and essential oils on the predator *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotrop Entomol.* <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0547-6>.
- Clark, P.L. J. Molina-Ochoa, S. Martinelli, S.R. Skoda, D.J. Isenhour, D.J. Lee, J.T. Krumm & J.E. Foster. 2007.** Population variation of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in the Western Hemisphere. *Int. J. Insect Sci.* 7: 1-10.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, L.M. Silva, K.A. Dutra, C.A. Guedes, J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, B.C. Araújo & Á.A.C. Teixeira. 2017.** Chemical composition and insecticidal activity of the essential oils of *Foeniculum vulgare* Mill., *Ocimum basilicum* L., *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex Bailey, *Eucalyptus citriodora* Hook and *Ocimum gratissimum* L. and their major components on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 20: 1360-1369.
- Dayan, F.E., C.L. Cantrell & S.O. Duke. 2009.** Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4022-4034.
- Dias, C.N. & D.F.C. Moraes. 2014.** Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: a review. *Parasitol. Res.* 113: 565-592.
- Elliot, M. 1989.** The pyrethroids: early discovery, recent advances and the future. *Pestic. Sci.* 27: 337-351.
- Finney, D.J.** Probit analysis. 3. ed. London: Crambridge Press, 1971. 338 p.
- Guedes, C.A. 2017.** Efeitos de óleo essencial e compostos isolados sobre parâmetros histofisiológicos, histoquímicos, imunohistoquímico, nutricionais e embriológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Tese de Doutorado, UFRPE, Recife, 104p.
- 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. Agric. Food Chem.* 49: 715-720.
- Isman, M.B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603-608.
- Jeschke, P. & R. Nauen. 2008.** Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag. Sci.* 64: 1084-1098.

- Kim, E.H., H.K. Kim, D.H. Choi & Y.J. Ahn. 2003.** Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *Appl. Entomol. Zool.* 38: 261-266.
- Koul, O., R. Singh, B. Kaur & D. Kanda. 2013.** Comparative study on the behavioural response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. *Ind. Crops Prod.* 49: 428-436.
- Lahm, G.P., D. Cordova & J.D. Barry. 2009.** New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4127-4133.
- Liu, Y.Q, M. Xue, Q.C. Zhang, F.Y. Zhou & J.Q. Wei. 2010.** Toxicity of β -caryophyllene from *Vitex negundo* (Lamiales: Verbenaceae) to *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) and its action mechanism. *Acta Entomol. Sin.* 53: 396-404.
- López, M.D. & M.J. Pascual-Villalobos. 2014.** Are monoterpenoids and phenylpropanoids efficient inhibitors of acetylcholinesterase from stored product insect strains? *Flavour Fragr. J.* 1: 1-5.
- Moraes, M.M., C.A.G. Câmara & M.M.C. Silva. 2017.** Comparative toxicity of essential oil and blends of selected terpenes of *Ocotea species* from Pernambuco, Brazil, against *Tetranychus urticae* Koch. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 89: 1417-1429.
- Ntalli, G.N., F. Ferrari, I. Giannakou & U. Menkissoglu-Spiroudi. 2011.** Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. *Pest Manag. Sci.* 67: 341-351.
- Papachristos, D.P., A.C. Kimbaris, N.T. Papadopoulos & M.G. Polissiou. 2009.** Toxicity of citrus essential oils against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) larvae. *Ann. Appl. Biol.* 155: 381-389.
- Pavela, R. 2008.** Acute and synergistic effects of some monoterpenoid essential oil compounds on the house fly (*Musca domestica* L.). *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 11: 451-459.
- Pavela, R. 2011.** Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L. *Parasit. Res.* 190: 1547-1553.
- Pavela, R. 2014.** Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Bois. (Lep., Noctuidae) larvae. *Ind. Crops Prod.* 60: 247-258.
- Pogue, G.M. 2002.** A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem. Am. Entomol. Soc.* 43: 1-202.

- Prowell, D.P., M. McMichael & J.F. Silvain. 2004.** Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 1034-1044.
- Rattan, R.S. 2010.** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.* 29: 913-920.
- Rice, P. & J. Coats. 1994.** Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 1172-1179.
- Rozman, V., I. Kalinovic & Z. Korunic. 2006.** Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 43: 349-355.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Silva, M.F.R., P.C. Bezerra-Silva, C.S. Lira, B.N.L. Albuquerque, A.C. Agra Neto, E.V. Pontual, J.R. Maciel, P.M.G. Paiva, D.M.A.F. Navarro. 2016.** Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). *Exp. Parasitol.* 165: 64-70.
- Simões, C.M.O. & V. Spitz. 2004.** Óleos Voláteis, p. 467-495. In Simões, C.M.O., E.P., Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick (eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Editora da UFSC, 1104p.
- Tsao, R. & J.R. Coats. 1995.** Starting from nature to make better insecticides. *ChemTech.* 25: 23-28.
- Wu, L., X. Huo, X. Zhou, D. Zhao, W. He, S. Liu, H. Liu, T. Feng & C. Wang. 2017.** Acaricidal activity and synergistic effect of thyme oil constituents against carmine spider mite (*Tetranychus Cinnabarinus* (Boisduval)). *Molecules* 22: E1873.
- Zwenger, S. & C. Basu. 2008.** Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 3: 1-7.

Tabela 1. Toxicidade dos componentes ativos e das misturas binárias por contato tópico em *Spodoptera frugiperda*.

Compostos	n ¹	GL ²	Inclinação (\pm EP) ³	DL ₅₀ (IC95%) ⁴	RT ₅₀ ⁵	DL ₉₀ (IC95%) ⁴	RT ₉₀ ⁵	χ^2
				mg/g		mg/g		
α -pineno	180	4	2,32 \pm 0,36	8,56 (7,00-10,69)	2,17	30,40 (21,10-58,15)	1,55	1,99
β -pineno	210	5	1,58 \pm 0,39	7,29 (4,23-19,80)	2,55	47,16 (18,19-77,98)	-	10,87
α -felandreno	180	4	1,79 \pm 0,26	3,96 (2,95-5,18)	4,70	20,60 (13,66-40,61)	2,28	0,25
E-cariofileno	150	4	3,42 \pm 0,56	18,62 (15,96-22,47)	-	44,10 (33,31-73,61)	1,06	2,02
terpinoleno	210	5	2,47 \pm 0,37	13,14 (10,95-15,84)	1,41	43,38 (31,53-75,30)	1,08	8,05
Misturas binárias								
terpinoleno+E-cariofileno	150	4	2,12 \pm 0,35	6,21 (4,80-7,94)	1,25	24,84 (16,82-50,45)	2,53	3,84
terpinoleno+ α -pineno	180	4	1,28 \pm 0,18	1,76 (1,21-2,61)	4,40	17,40 (9,41-47,86)	3,61	2,49
terpinoleno+ β -pineno	180	4	1,44-0,19	1,66 (1,17- 2,36)	4,67	12,78 (7,54-29,54)	4,92	2,13
terpinoleno+ α -felandreno	210	5	1,42-0,17	1,93 (1,38-2,67)	4,02	15,28 (9,48-31,46)	4,12	8,63
α -pineno+E-cariofileno	180	4	1,69-0,24	5,83 (4,28-7,78)	1,33	33,33 (21,55-67,67)	1,88	3,34
α -pineno+ β -pineno	180	4	1,07-0,15	3,05 (1,93-4,86)	2,54	48,03 (23,04-163,77)	1,31	6,16
α -pineno+ α -felandreno	240	6	0,96-0,12	2,98 (1,92-4,57)	2,60	62,98 (30,84-194,72)	-	3,58
β -pineno+E-cariofileno	180	4	1,57-0,24	7,75 (5,69-10,75)	-	50,68 (29,90-127,05)	1,24	5,54
β -pineno+ α -felandreno	180	4	1,22-0,18	1,79 (1,21-2,70)	4,33	19,86 (10,31-60,23)	3,18	0,37
α -felandreno+E-cariofileno	180	4	1,64-0,24	6,88 (5,06-9,31)	1,13	41,44 (25,79-91,64)	1,51	4,88

¹Número de insetos usados no teste,

²Grau de liberdade,

³Erro padrão da média,

⁴Dose Letal e intervalo de confiança,

⁵Razão de toxicidade,

χ^2 Qui-quadrado.

Tabela 2. Efeito sinérgico de misturas binárias de cinco compostos ativos por contato tópico em *Spodoptera frugiperda*.

Mistura Binária	Mortalidade Observada (%)	Mortalidade Esperada (%)	Fator de co-toxicidade	Efeito
terpinoleno+E-cariofileno	10	6,67	50,0	Sinergista
terpinoleno+ α -pineno	53,33	16,67	220,0	Sinergista
terpinoleno+ β -pineno	60	23,33	157,14	Sinergista
terpinoleno+ α -felandreno	60	33,33	80	Sinergista
α -pineno+E-cariofileno	20	10	100	Sinergista
α -pineno+ β -pineno	33,33	26,67	25	Sinergista
α -pineno+ α -felandreno	46,67	36,67	27,27	Sinergista
β -pineno+E-cariofileno	16,67	16,67	0	Aditivo
β -pineno+ α -felandreno	53,33	43,33	23,08	Sinergista
α -felandreno+E-cariofileno	16,67	26,67	-37,5	Antagonista

CAPITULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Obtenção dos óleos das folhas frescas se deu por hidrodestilação, e sua análise cromatografica por CG-EM resultou na identificação de 85 compostos, entre esses, 16 foram comuns às três espécies de *Piper* utilizadas, a saber: *P. corcovadensis*, *P. arborerum* e *P. marginatum*. O componente majoritário em comum aos três óleos foi o E-cariofileno. Dentro das espécies testadas o óleo de *P. corcovadensis* apresentou melhor rendimento ($0,232\pm 0,01\%$), menores DL_{50} (3,58 mg/g) e DL_{90} (6,34 mg/g), maiores razões de toxicidade nas DL_{50} (3,04) e DL_{90} (8,64), além de alterar as quantidades de proteína, glicogênio e açúcar total nas doses subletais (DL_{30}) e letais ($DL_{50,70}$). No que se refere a histologia todos os óleos essenciais promoveram alterações deletérias no intestino médio das lagartas de *S. frugiperda*. Porém *P. corcovadensis* foi o que proporcionou melhores resultados, promovendo alterações histopatológicas como: desorganização do epitélio com alongamento das células colunares dando a impressão de estratificação epitelial; dilatação da região apical das células colunares com formação de protusões e emissão das extrusões em direção ao lúmen, redução na quantidade de carboidratos no intestino médio, aumento do índice apoptótico (25%) e menor proliferação celular, diferente do *P. arboreum*, que apesar de ocasionar alterações histopatológicas semelhantes ao *P. corcovadensis*, apresentou menor toxicidade, maior índice de proliferação celular ($15,75\pm 0,47$) e aumento das células regenerativas ($15,70\pm 1,66$), indicando regeneração mais rápida do epitélio. As misturas binárias assumiram o modelo de Probit com valores de DL_{50} e DL_{90} variando de 1,66 a 6,88 mg/g de inseto e 12,78 a 62,98 mg/g de inseto, respectivamente. Misturas binárias com o terpinoleno apresentaram sinergismo, com destaque para o

terpinoleno+ β -pineno que além do efeito sinérgico, apresentou uma toxicidade mais elevada. O efeito antagonista foi encontrado na combinação do α -felandreno+E-cariofileno, do mesmo modo que o aditivo foi encontrado apenas na combinação β -pineno+ E-cariofileno. Essas informações confirmam a importância do estudo de cada espécie de planta individualmente, abrindo margem para investigação dos efeitos potenciais de óleos essenciais e seus modos de ação nos insetos, além da verificação dos efeitos sinérgicos que podem causar a associação dos compostos ativos, a fim da descoberta de formulações eficazes para utilização no controle de pragas.