

EFEITO DO ÓLEO DE CITRONELA (*Cymbopogon winterianus* JOWITT) SOBRE A
HISTOFISIOLOGIA DIGESTIVA E REPRODUTIVA DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

CRISTIANE THALITA DOS SANTOS SILVA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE)

RESUMO

Como alternativa aos inseticidas sintéticos, os óleos essenciais mostram-se promissores no controle de pragas. Assim, avaliou-se a hipótese de que dose subletal do óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus*) pode interferir na histofisiologia do intestino médio e corpo gorduroso, nos parâmetros bioquímicos e refletir na reprodução de *Spodoptera frugiperda*. O óleo foi submetido à análise CG-MS. Folhas de milho imersas em concentração de 50mg/mL (não fitotóxica) foram oferecidas às lagartas de terceiro instar. O intestino médio foi coletado após 24h de tratamento (histologia e histoquímica), e no sexto instar, o intestino médio e corpo gorduroso para histologia e histoquímica, e perfil bioquímico; e na fase adulta, histologia e histoquímica das gônadas, número de ovos e taxa de eclosão. Após 24h de tratamento com o óleo de citronela o intestino médio das lagartas mostrou alterações como: protusões citoplasmáticas, extrusões de células colunares, núcleos picnóticos e aumento de grânulos PAS positivos. O aumento de células regenerativas possibilitou a regeneração deste epitélio no sexto instar. O corpo gorduroso apresentou apenas trofócitos em sua estrutura. Os trofócitos do grupo tratado apresentaram vacúolos maiores, presença de corpos mitóticos e redução de glicogênio, proteína e lipídio. Testículo dos insetos de ambos os tratamentos apresentou revestimento de tecido conjuntivo e

abundantes espermatozoides. Porém, no tratado verificou-se intensa vacuolização periférica e redução de carboidratos neutros. Os ovários dos insetos tratados apresentaram estratificação e afastamento das células foliculares, menor desenvolvimento das células nutrízes, menor quantidade de vitelo, bainha conjuntiva mais delgada e redução de proteínas e carboidratos neutros. Os ovos oriundos dos casais tratados com o óleo foram inviáveis. Portanto, o óleo de citronela (50mg/mL) provoca alterações reparáveis no intestino médio, reduz as reservas do corpo gorduroso, além de diminuir os níveis de proteína, lipídeos e açúcares totais, e aumentar os níveis de glicogênio, causando danos a sua histofisiologia reprodutiva.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta-do-cartucho, citronela, histologia, fisiologia, intestino, corpo gorduroso, reprodução

EFFECT OF CITRONELLA OIL (*Cymbopogon winterianus* JOWITT) ON THE DIGESTIVE
AND REPRODUCTIVE HISTOPHYSIOLOGY OF *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

by

CRISTIANE THALITA DOS SANTOS SILVA

(Under the direction of Valéria Wanderley Teixeira)

ABSTRACT

As alternative to synthetic insecticides, essential oils show promise in control of pests. Thus, was evaluated hypothesis that sublethal dose of citronella oil (*Cymbopogon winterianus*) can interfere with midgut and fat body's histophysiology, biochemistry parameters and reflects on reproduction of *Spodoptera frugiperda*. The oil was subjected to GC-MS analysis. Corn leaves dipped in concentration of 50mg/mL (nonphytotoxic) were offered to third instar larvae. The midgut was collected after 24h of treatment (histology and histochemistry), and the sixth instar, the midgut and fat body for histology and histochemistry and biochemistry profile; and in adulthood, histology and histochemistry of gonads, number of eggs and hatching rate. After 24h of treatment with citronella oil the larvae's midguts showed changes such as: cytoplasmic protrusions, extrusions columnar cells, pyknotic nuclei and increased PAS positive granules. The increase of regenerative cells enabled the regeneration of this epithelium in the sixth instar. The fat body showed only trophocytes in its structure. The trophocytes treated group showed larger vacuoles, presence of mitotic bodies and reduction of glycogen, protein and lipid. The testis of insects of both treatments showed connective tissue coating and abundant sperm. However, the treaty there was intense peripheral vacuolization and reduction of neutral carbohydrates. The

ovarioles of treated insects showed stratification and removal of follicular cells, cells nurse less developed, lower amount of yolk, thinner conjunctiva sheath and reduction of protein and neutral carbohydrates. The eggs came of couples treated with oil were unviable. Therefore, citronella oil (50mg/mL) causes repairable changes in the midgut, reduces the reserves of the fat body, and reduce the levels of protein, lipids and total sugars, and increases glycogen levels, causing damage to its histophysiology.

KEY WORDS: Armyworm, citronela, hytology, physiology, midgut, fat body, reproduction

EFEITO DO ÓLEO DE CITRONELA (*Cymbopogon winterianus* JOWITT) SOBRE A
HISTOFISIOLOGIA DIGESTIVA E REPRODUTIVA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

CRISTIANE THALITA DOS SANTOS SILVA

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

RECIFE - PE

Julho-2014

EFEITO DO ÓLEO DE CITRONELA (*Cymbopogon winterianus* JOWITT) SOBRE A
HISTOFISIOLOGIA DIGESTIVA E REPRODUTIVA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

CRISTIANE THALITA DOS SANTOS SILVA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

Franklin Magliano da Cunha – PNPd/UFRPE

EFEITO DO ÓLEO DE CITRONELA (*Cymbopogon winterianus* JOWITT) SOBRE A
HISTOFISIOLOGIA DIGESTIVA E REPRODUTIVA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

CRISTIANE THALITA DOS SANTOS SILVA

Orientador:

Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Examinadores:

José Vargas de Oliveira – UFRPE

Franklin Magliano da Cunha - PNPd/UFRPE

À minha mãe, Izabel Cristina,

Ao meu esposo, Alex Luciano,

Ao meu primo, Paulo Ricardo,

À minha afilhada, Sofia Maria,

Aos meus amigos, Felipe, Franklin, Mariana,

Ronald, Thiago e Widma.

OFEREÇO

À minha mãe e ao meu esposo,

Por todo carinho, amor e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola

Agradeço à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao Centro de Apoio à Pesquisa (Cenapesq), por permitir o uso dos equipamentos utilizados nesta pesquisa.

À minha orientadora, Professora Valéria Wanderley Teixeira, pela oportunidade e confiança. Por todo o apoio e colaboração, paciência e dedicação no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, por toda colaboração, dedicação, assistência e paciência.

Ao meu co-orientador, Dr. Franklin Magliano da Cunha, pelos ensinamentos e amparo, bem como pela amizade e encorajamento nesses anos.

Ao professor José Vargas de Oliveira, pelo apoio para que esta pesquisa pudesse ser feita.

Aos professores do programa de

Ao Doutorando, Thiago José Alves de Souza, pela amizade e assistência sempre que eu necessitei.

Aos meus companheiros de disciplina, Cristina, Elaine, Guilherme, Sibelle, Zuim, entre outros, que tornaram esta jornada ser menos árdua.

Aos amigos e companheiros de laboratório, pelos momentos de descontração e auxílio nas atividades. Em especial, à Andresa, Carolline, Cíntia, Clovis, Gyl, Hilda, Ismaela, Lécio, Lílian, Mariana, Solange e Yuri.

Aos estagiários de Iniciação Científica, Marta e Raionir, pelo auxílio com a manutenção da criação, os quais me ajudaram muito.

À Kamila Dutra e à professora Daniela do Amaral Ferraz Navarro do Laboratório de Ecologia Química, do Departamento de Química Fundamental, UFPE, pela doação dos dados cromatográficos do óleo, bem como à Glaucilane Cruz pela toda a ajuda concedida.

Aos meus amigos, pela compreensão nos momentos que não pude estar presente, por me aturarem quando eu estava estressada e pelos momentos de descontração. Arthur Lira, Felipe Wagner, Geraldo José, Ronald Moura e Widma Sandrelly, obrigada pelo apoio.

Ao meu marido, Alex Luciano, pela compreensão e companheirismo, por se preocupar comigo e sempre me impulsionar em ir adiante.

À minha mãe, Izabel Cristina, por ser meu alicerce e me apoiar incondicionalmente.

A Deus, por me conceder pessoas maravilhosas para estarem me apoiando e por todo alento me dado.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
LITERATURA CITADA	08
2 EFEITO DE DOSE SUBLETAL DO ÓLEO DE CITRONELA (<i>Cymbopogon winterianus</i> JOWITT) SOBRE A HISTOFISIOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO E CORPO GORDUROSO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH).....	17
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	28
LITERATURA CITADA	33
3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH) TRATADAS COM DOSE SUBLETAL DO ÓLEO DE CITRONELA <i>Cymbopogon winterianus</i> JOWITT E SEU REFLEXO NA REPRODUÇÃO	49
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	51
INTRODUÇÃO	52

MATERIAL E MÉTODOS	53
RESULTADOS.....	56
DISCUSSÃO	58
LITERATURA CITADA	62

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cultura do milho, *Zea mays* L., ocupa posição de destaque entre as atividades agropecuárias do Brasil, graças ao seu cultivo na maioria das propriedades rurais e seu valor de produção. A produção de grãos de milho total para a safra 2013/14 foi estimada em 75.191.100t, havendo um decréscimo de 7,7% em relação à safra de 2012/13 devido à redução de 3,2% (508.100ha) na área cultivada. Tendo o Nordeste produzido 7.356.000t, com 72.200t em Pernambuco (Conab 2014). É considerada a segunda maior entre as culturas anuais, superada apenas pela soja, que juntas chegam a produzir 83% de toda a safra de grãos (EMBRAPA 2006).

No Brasil, a produção do milho tem sido feita em duas épocas de plantio, safra e safrinha (Embrapa 2006). Além disso, há práticas da sucessão de culturas, como soja e milho “safrinha”, e a realização do plantio escalonado em áreas próximas, o que tem contribuído para o aumento da infestação da principal praga do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), devido à grande oferta de hospedeiros que o inseto encontra ao longo do ano (Cruz 1995, Barros & Torres 2009, Barros *et al.* 2010).

O gênero *Spodoptera* possui 30 espécies descritas, sendo metade consideradas pragas de várias culturas de importância econômica (Pogue 2002). A espécie *S. frugiperda* foi identificada nos EUA em 1797, é polífaga e possui mais de 80 espécies de plantas hospedeiras, tais como o milho, algodão, arroz, soja, trigo, entre outras, em diversos países (Latorre 1990, Cruz 1995, Busato *et al.* 2002, Capinera 2001, Pogue 2002, Bastos & Torres 2004). Conhecida como a principal praga da cultura do milho, é responsável, no Brasil, por prejuízos econômicos de até 60% em períodos de seca, podendo assim impedir a produção econômica (Cruz 1995, Lourenção

et al. 2009). O ataque na planta ocorre desde a emergência até o pendoamento. Muitas vezes a falta de controle ou o controle inadequado do inseto na fase vegetativa (fase de cartucho), proporciona a presença de lagartas bem desenvolvidas com grande capacidade de destruição na espiga (Cruz *et al.* 2000).

Os aspectos biológicos de *S. frugiperda* já foram descritos e revisados por Cruz (1995). Os ovos são depositados em massa, não havendo substrato preferencial. O número de posturas por fêmea pode variar, chegando ao máximo de 13. O número de ovos por postura varia de nove a 593 com um período de incubação dependente, principalmente, da temperatura, com dois dias para a eclosão, em temperatura média de 26,7°C (Cruz 1995). Os ovos possuem diâmetro de 0,2 mm, com coloração rósea-clara e estriados radialmente, antes da eclosão assumem coloração cinza (Silvie *et al.* 2001), devido à cápsula cefálica da lagarta.

As lagartas recém-eclodidas são brancas, com cabeças pretas e espinhos pretos pelo corpo, de 1 a 1,5 mm. Já nesta fase iniciam a alimentação nas folhas novas do milho, ocasionando uma injúria característica denominada de “folhas raspadas”, possuem hábito canibal e migram até atingir a nova planta hospedeira, instalando-se no cartucho. Devido a este hábito é comum encontrar apenas uma larva por planta. A larva possui seis ínstaes, e quando maiores apresentam coloração marrom a esverdeada, chegando a 50mm de comprimento. Logo após ocorre o último estágio denominado pré-pupa, onde se direciona para o solo e não se alimenta até empupar (Cruz 1995, Silvie *et al.* 2001).

A pupa possui coloração avermelhada, com aproximadamente 15mm de comprimento, com dois pequenos espinhos em forma de “V” no extremo do abdome e com duração em torno de 10 a 12 dias. O inseto adulto possui hábito noturno, de coloração cinza, apresentando 25mm de comprimento e 35mm de envergadura. Os machos podem ser diferenciados por apresentarem manchas brancas nas asas anteriores. O ciclo de vida de *S. frugiperda* é bastante dependente da

temperatura, sendo que no verão é de 30 dias e no inverno pode chegar a 50 dias (Cruz 1995, Silvie *et al.* 2001, Paula *et al.* 2009).

O controle de *S. frugiperda*, ainda, é realizado em grande maioria com a utilização de inseticidas sintéticos (Cruz 2002), como os das classes dos organofosforados, carbamatos e piretróides. E, apesar de serem eficientes, podem acarretar diversos problemas, como a presença de resíduos nos alimentos acima dos limites permitidos por lei, ressurgência de pragas, surtos de pragas secundárias, intoxicações aos aplicadores e seleção de populações de pragas resistentes, entre outros efeitos adversos diretos e indiretos (Roel *et al.* 2000).

Devido à necessidade da disposição de novos compostos para uso no controle de pragas que tornem ínfimos os problemas de contaminação e efeito prejudicial sobre organismos benéficos, e o tempo de comercialização de um novo produto comercial ser de difícil cálculo e limitado graças à adquirente rápida resistência, o que acarretou na busca de métodos alternativos de controle, nos quais se incluem a utilização de produtos naturais, destacando-se aqueles de origem vegetal (Vendramim & Castiglioni 2000, Roel 2001, Chagas *et al.* 2002).

Dentre as espécies vegetais existentes, muitas produzem através do metabolismo secundário substâncias que atuam como atraentes ou repelentes de outros organismos (Saito 2004). O estudo das plantas repelentes e com efeito inseticida para o controle de insetos-pragas tem ressurgido e inúmeras são as vantagens no emprego de suas substâncias extraídas, na qualidade de inseticidas quando comparado ao uso de sintéticos por serem: obtidas de recursos renováveis, rapidamente degradáveis, com lento desenvolvimento de resistência (em decorrência de serem compostos da associação de vários princípios ativos), de fácil acesso e obtenção por agricultores e não deixam resíduos em alimentos, além de serem de menor custo (Vendramim & Castiglioni 2000, Roel 2001, Maia & Parente-Júnior 2008). Além disso, os produtos naturais obtidos de matéria-prima vegetal oferecem vasta gama de moléculas com grande diversidade nas suas estruturas e atividade

biológica (Reigosa & Pedrol 2002), são capazes de interagir com novos sítios de ação nos organismos-alvos, indicando alternativas para a síntese de novos produtos (Duke *et al.* 2000).

Vários são os relatos sobre a atividade biológica de produtos de origem vegetal citados na literatura, como, ação antifúngica (Nakahara *et al.* 2003, Medice *et al.* 2007), ação antibacteriana (Nogueira *et al.* 2007), ação antiinflamatória e analgésica (Bose *et al.* 2007, Dlíaz-Viciedo *et al.* 2008), atividade antioxidante (Scherer *et al.* 2009), alelopática (Ootani *et al.* 2011), carrapaticida (Martin 2006, Vendrame *et al.* 2007, Olivo *et al.* 2008), inseticida (Lima *et al.* 2010), repelente (Raja *et al.* 2001), dentre outras.

Muitas espécies de plantas exercem efeitos biológicos diversos sobre pragas agrícolas por possuírem propriedades deterrentes, repelentes, inibidores do crescimento dos insetos e fatores que retardam a resistência desses invertebrados ao vegetal (Roel 2001, Gallo *et al.* 2002, Saito *et al.* 2004, Oliveira *et al.* 2007).

Uma classe de substâncias que tem merecido muita atenção são os óleos essenciais de plantas aromáticas (Saito 2004). São compostos voláteis e aromáticos derivados do metabolismo secundário das plantas, podendo ser encontrados em vários órgãos do vegetal, como folhas e talo, em geral. São assim denominados devido à composição lipofílica que apresentam, mas quimicamente diferentes da composição glicerídica dos verdadeiros óleos e gorduras. São produzidos por células secretoras (Conner 1993). Segundo Borges *et al.* (2002), o óleo de interesse comercial é encontrado em células oleíferas presentes nas folhas.

Por serem insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos, são extraídos por técnicas como, destilação por arraste de vapor de água e prensagem (Maia & Parente-Junior 2008). Em sua maioria, são constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta (Siani *et al.* 2000).

De uso medicinal e aromático, a importância da citronela no Brasil tem crescido devido à grande procura pelo seu óleo essencial, tanto no mercado interno, quanto para exportação (Rocha *et al.* 2000, Shasany *et al.* 2000). É cultivada em áreas tropical e subtropical da África, Ásia e América, e tem sido utilizada na indústria farmacêutica, perfumaria e cosmética, além da composição de produtos repelentes e sanitários (Shasany *et al.* 2000). O óleo extraído de suas folhas é rico em aldeído citronelal (aproximadamente 40%) e tem pequenas quantidades de geraniol, citronelol e ésteres (Marco *et al.* 2007). Contudo, os óleos essenciais são suscetíveis a grandes variações em suas composições, devido à origem da planta, ao estágio de seu desenvolvimento e à parte usada para a destilação do óleo (Simões *et al.* 2002).

O citronelal é utilizado como material básico para a síntese de importantes compostos químicos, como as iononas e na síntese da vitamina A. Além disso, apresenta atividade repelente e aromatizante de ambientes (Rocha *et al.* 2000, Tronglokit *et al.* 2005, Wong *et al.* 2005, Isman 2006).

Chen & Viljoen (2010) apontam diversas propriedades biológicas do geraniol, destacando as atividades anti-helmíntica, anti-inflamatória, anticâncer e efeitos antimicrobiano, antioxidante, ainda possuindo efeito repelente e inseticida, entre outros.

O capim de citronela pertence ao gênero *Cymbopogon* (Poaceae), no qual há aproximadamente 140 espécies descritas (Shasany *et al.* 2000), das quais muitas têm sido descritas na literatura com atividade inseticida e repelente.

No Brasil, o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt, conhecida como citronela de Java, tem grande importância na produção de óleo essencial (Martins, 2006), tendo despertado interesse agrícola devido a referências sobre suas ações fungicida, carrapaticida, repelente e inseticida. É comprovada sua ação repelente sobre os mosquitos vetores, *Aedes aegypti* (L.), *Anopheles dirus* Peyton & Harisson e *Culex quinquefasciatus* Say (Tawatsin *et al.* 2001).

Verificou-se seu efeito larvicida sobre o mosquito transmissor da dengue, *A. aegypti* (Furtado *et al.* 2005). Causou mortalidade 34,3% e 96,9% em *Frankliniella schultzei* (Trybom) e *Myzus persicae* (Sulzer), respectivamente, a 1% (V/V) (Pinheiro *et al.* 2013), e apresentou repelência em adultos de *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Gusmão *et al.* 2013).

Sobre *S. frugiperda*, Labinas & Crocomo (2002) mostraram através de testes de ingestão e/ou contato tópico com o óleo de citronela (*C. winterianus*), que houve deterrência alimentar e mortalidade, bem como sintomas de neurotoxicidade, como agitação e hiperatividade.

A fim de investigar a ação dos inseticidas na fisiologia dos insetos, o sistema digestório se tornou alvo de grande parte das pesquisas para se controlar o ataque de pragas, por ser nele que ocorre boa parte do contato entre os insetos e o meio ambiente (Levy *et al.* 2004, Chapman 2013). Alguns produtos de origem vegetal e componentes derivados destes mostraram alterações no sistema digestório de alguns insetos. Correia *et al.* (2009), relataram o efeito da alimentação com folhas de milho tratadas com nim provocando alterações morfológicas evidenciadas no intestino médio de *S. frugiperda*, caracterizadas pela degeneração do epitélio e redução de células regenerativas desta região. Nos tratamentos à base de extratos de *Petiveria alliacea* L., *Zingiber officinale* Roscoe, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Malva sylvestris* L., *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. e *Ruta graveolens* L. interagindo com *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae) são visíveis as mudanças na histologia do intestino médio das lagartas desta mesma espécie, com alterações nas microvilosidades, desorganização do intestino médio e a hipertrofia das células epiteliais que se projetaram para o lúmen (Knaak *et al.* 2010). Resultados semelhantes foram encontrados nas células do intestino médio das larvas do predador *Ceraeochrysa claveri* (Navás) alimentadas com ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) tratados com óleo de nim, observando-se danos nas células colunares, com protusões citoplasmáticas, agrupamento e rompimento dos microvilos, dilatação e ruptura de células, dilatação e vesiculação do retículo

endoplasmático rugoso, aumento do espaço extracelular basal e intracelular e necrose (Scudeler & Santos 2013).

Alterações ocorridas na região do intestino médio são capazes de afetar o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, bem como de todos seus eventos fisiológicos, os quais dependem da alimentação adequada, de sua absorção e transformação, prejudicando a aquisição dos nutrientes destinados na sustentação do crescimento e reprodução do inseto [Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Mordue (Luntz) & Nisbet 2000].

O corpo gorduroso, além de participar do armazenamento e utilização de energia, é um dos tecidos mais importantes nos processos de manutenção e de reprodução do inseto, com grande biossíntese e a atividade metabólica (Arrese & Soulages 2010, Roma *et al.* 2010). Suas células respondem às alterações nutricionais e hormonais, provendo as necessidades de crescimento, metamorfose e reprodução dos mesmos (Gullan & Cranston 2008).

Alguns trabalhos tem mostrado que inseticidas botânicos exercem alterações no sistema reprodutivo de insetos. Alves *et al.* (2014) verificaram que lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com *Piper hispidinervum* C. DC. apresentaram um adensamento do tecido conjuntivo que faz parte do revestimento e septos do testículo de lagartas, com redução de cistos na zona de crescimento, vacuolizações, ausência de espermátides e espermatozoides, e redução de espermatozoides nos testículos de adultos. Medina *et al.* (2004) verificaram a inibição da oogênese em *Chrysoperla carnea* (Stephens) quando tratada com Azadirachtin.

Assim, investigações sobre as mudanças nos parâmetros fisiológicos tornam-se essenciais para avaliar e prever o efeito tóxico de fitoquímicos sobre a fisiologia dos insetos (Sharma *et al.* 2011). Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar as alterações provocadas por dose subletal do óleo de citronela, *C. winterianus*, sobre a histofisiologia do intestino médio e corpo gorduroso da

lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, bem como parâmetros bioquímicos e seu reflexo na sua reprodução.

Literatura citada

- 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. 2014.** Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. *Biotech. Histochem* 89: 245-255.
- Arrese, E.L. & J.L. Soulages. 2010.** Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 207–225.
- Barros, E. M. & J.B. Torres. 2009.** História de vida de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro, milho e soja. *Anais do Congresso Brasileiro do Algodão* 7: 433-440.
- 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.
- Bastos, C.S. & J.B. Torres. 2004.** Os perigos às escondidas. *Rev. Cult.* 60: 10-13.
- Borges, N.S.S., R. Inecco, S.H. Matos & E.O. Nagão. 2002.** Horário de corte no redimento de óleo essencial de capim citronela (*Cymbopogon winterianus*). 42 Congresso Brasileiro de Olericultura e 11 Congresso Latino Americano de Horticultura 20: 356-356.
- Bose, A., S. Mondal, J.K. Gupta, T. Gosh, G.K. Dash & S. Si. 2007.** Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. *Fitoterapia*, 78:515-520.

- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia, F.P. Giolo & F.A. Martins. 2002.** Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. Neotrop. Entomol 31: 525-529.
- Capinera, J. L. 2001.** Handbook of vegetable pests. San Diego: Academic Press. p.2700.
- Chagas, A.C.S., W.M.Passos, H.T.Prates, R.C.Leite, J. Furlong, & I.C.P.Fortes. 2002.** Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 39:247-253.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Chen, W. & A. M. Viljoen. 2010.** Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. South Afr. J. Bot. 76: 643–651.
- Conab (Companhia Nacional de Abastecimento). 2014.** Acompanhamento da safra brasileira: grãos. 93p.
- Conner, D.E. 1993.** Naturally occurring compounds. In: Davidson P., & A.L. Branen. Antimicrobials in foods. New York, Marcel Dekker, 441-468p.
- 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, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45 p. (Circular Técnica, n. 21).
- Cruz, I. 2002.** Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 32p. (Documentos, 21).

- Cruz, I., P.A. Viana & J.M. Waquil. 2000.** Pragas da fase vegetativa e reprodutiva. Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/prvegetativa.htm>> Acesso: 13/07/2013.
- Díaz-Viciedo, R., S. Hortelano, N. Girón, J.M. Massón, B. Rodriguez, A. Villar & B. de Las Heras. 2008.** Modulation of anti-inflammatory responses by diterpene acids from *Helianthus annuus* L. Bioch. Bioph. Re. Co. 56: 761-766.
- Duke, S.O., F.E. Dayan, & A.M. Rimando. 2000.** Natural products and herbicide discovery. p.105-133. In: A.H. Cobb & R.C. Kirkwood (ed.). Herbicides and their mechanisms of action. Sheffield: Academic Press, 320p.
- Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2006.** Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2ed/index.htm> Acesso: 25/02/2013.
- Furtado, R.F., M.G.A. Lima, M. Andrade-Neto, J.N.S. Bezerra & M.G.V. Silva. 2005.** Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Neotrop. Entomol. 34:843-847.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, S., R.P.L. Carvalho, G.C. Batista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ/USP, 920p.
- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2008.** Os insetos: um resumo de Entomologia. São Paulo, Roca, 440p.
- Gusmão, N.M.S., J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, K.A. Dutra, W.A. Silva & M.J.A. Wanderley. 2013.** Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus staigeriana* F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare*

- Mill. essential oils in the management of *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). J. Stored Prod. Res. 54: 41-47.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51: 45-66.
- 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.
- 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.
- Latorre, B.A. 1990.** Plagas de las hortalizas – Manual de Manejo Integrado. Santiago, FAO, 520p.
- Levy, S.M., A.M.F. Falleiros, E.A. Gregório, N.R. Arrebola & L.A. Toledo. 2004.** The larval midgut of *Anticarsia gemmatilis* (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, 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.
- Lourenção, A.L.F, R. Barros & E.P. Melo. 2009.** Milho Bt: Uso correto da tecnologia. Tecnologia e Produção: Milho safrinha e culturas de inverno. 79-89.
- Maia, C.S. & W.C. Parente-Júnior. 2008.** Citronela, aliada natural para repelir pernilongos. Norte Científico 3: 1-7.

- Marco, C.A., R. Innecco, S.H. Mattos, N.S.S. Borges & E.O. Nagao. 2007.** Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. *Hortic. Bras.* 25:429-432.
- Martins, R.M. 2006.** Estudio in vitro de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8:71-78.
- Medice, R., E. Alves, R.T. Assis, R.G. Magno Júnior & E.A.G.L. Lopes. 2007.** Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciênc. Agrotec.* 31: 83-90.
- Medina P., F. Budia, P. del Estal & E. Vinuela. 2004.** Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *J. Econ. Entomol.* 97: 43-50.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39: 903-924.
- Mordue (Luntz), A.J. & A.J. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 29: 615-632.
- Nakahara, K., N.S. Alzoreky, T. Yoshihashi, H.T.T. Nguyen & G. Trakoontivakorn. 2003.** Chemical Composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella grass). *Jpn. Agri. Res. Q.* 37:249-252.
- Nogueira, M.A., M.G. Diaz, P.M. Tagami & J. Lorscheide. 2007.** Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 28: 93-97.

- Oliveira, M.S.S., A.R. Roel, E.J. Arruda & A.S. Marques. 2007.** Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Ciênc. Agrotec 31: 326-331.
- Olivo, C.J., N.M. Carvalho, J.H.S. Silva, F.F. Vogel, P. Massariol, G. Meinerz, C. Agnolin, A.F. Morel & L.V. Viau. 2008.** Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. Cienc. Rural 38: 406-410
- Ootani, M.A., R.W.S. Aguiar, A.V. Mello, J. Didonet, A.C.F. Portella & I.R. Nascimento. 2011.** Toxicidade de óleos essenciais de eucalipto e citronela sobre *Sithophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Biosci. J. 27: 609-618.
- Paula, C.S., I. Cruz, M.L.C. Figueiredo, A.M. Penteado-Dias, R.B. Silva, I.F. Silva, T.E. Ferreira, A.L.G. Castro & M. Leão. 2009.** Dinâmica de parasitóides de *Spodoptera frugiperda* em milho convencional e em milho geneticamente modificado. São Lourenço. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, p.1-4.
- Pinheiro, P.F., V.T. Queiroz, V.M. Rondelli, A.V. Costa, T.P. Marcelino & D. Pratisoli. 2013.** Insecticidal activity of citronella grass essential oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*. Ciênc. Agrotec. 37: 138-144.
- Pogue, M.G. 2002.** A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée: (Lepidoptera: Noctuidae). Philadelphia, American Entomological Society, 202p.
- Raja, N., S. Albert & S. Ignacimuthu. 2001.** Effect of volatile oil in protecting stored *Vigna unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation. J. Stored Prod. Res. 37: 127-132.
- Reigosa, M.J. & N. Pedrol. 2002.** Allelopathy: from molecules to ecosystems. Plymouth, Science Publishers, 316p.

- Rocha, S.F.R, L.C. Ming & M.O.M. Marques, 2000.** Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composição do óleo essencial de citronela *Cymbopogon winterianus* Jowitt. Rev. Bras. Pl. Med. 3:73-78.
- Roel, A.R. 2001.** Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. Rev. Int. Desenv. Local 1:43-50.
- Roel, A.R., J.D. Vendramim, R.T.S. Frighetto & N. Frighetto. 2000.** Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). An. Soc. Entomol. Brasil 29: 799-808.
- Roma, G.C., O.C. Bueno & M.I. Camargo-Mathias. 2010.** Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. Micron 41:395-401.
- Saito, M. L. 2004.** As plantas praguicidas: Alternativa para o controle de pragas na agricultura. Matéria do informativo: Embrapa - Meio Ambiente. Jaguariúna. 4p. Disponível: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Saito_plantasID-xWZZuffPN5.pdf> Acesso: 15/03/2014.
- Saito, M.L., A. Pott, J.M.G. Ferraz & R.S. Nascimento. 2004.** Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e *Anticarsia gemmatilis* Hubner. Pesticidas: R. Ecotoxicol. Meio Ambiente 14: 1-10.
- Scherer, R., R. Wagner, M.C.T. Duarte, H.T. Godoy. 2009.** Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. Rev. Bras. Pl. Med. 11:442-449.
- 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.

- Sharma, P., L. Mohan, K.K. Dua & C.N. Srivastava. 2011.** Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. Asian Pac. J. Trop. Med. 4:301-304.
- Shasany, A.K., R.K. Lal, N.K. Patra, M.P. Darokar, A. Garg, S. Kumar & S.P.S. Khanuj. 2000.** Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. Genet. Resour. Crop. Evol. 47: 553-559.
- Siani, A.C., A.L.F. Sampaio, M.C. Sousa, M.G.M.O. Henriques & M.F.S. Ramos. 2000.** Óleos essenciais – Potencial Anti-inflamatório. Biotecnologia – ciência e desenvolvimento. Disponível: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio16/16_oleos.pdf> Acesso: 25/02/2013.
- Silvie P., T. Lerot, J.L. Belót & B. Michel. 2001.** Manual de identificação das pragas e seus danos no algodoeiro. Cascável: Coodotec, 100p. (Boletim Técnico, n 34).
- Simões, C.M.O. E.P. Schenkel, G. Gosman, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, & P.R. Petrovick. 2002.** Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianópolis, UFSC, 821p.
- Tawatsin, A., S.T. Wratten, R.R.Scott, U.Thavara & Y. Techadamrongsin. 2001.** Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. J. Vector Ecol. 26:76-82.
- Tronglokit, Y., Y. Rongsriyam, N. Komalamisra & C. Apiwathnasorn. 2005.** Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytot. Res. 19: 303-309.
- Vendrame, T., C.J. Olivo, G.R. Meinerz, C.A. Agnolin, M.F. Ziech, F. Hohenreuther, M. Diehl & E. Steinwandter. 2007.** Extrato aquoso de citronela no controle do carrapato de bovinos. Rev. Bras. Agroecol. 2: 1544-1547.
- Vendramim, J.D. & E. Castiglioni. 2000.** Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas. 113-128 In: J. C. Guedes & I. Drester Da Costa & E. Castiglioni. 2000. Bases e Técnicas do Manejo de insetos. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS. 248p.

Wong, K.K.Y., F.A. Signal, S.H. Campion & R.L. Montion. 2005. Citronella as an insect repellent in food packaging. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4633-4636.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE DOSE SUBLETAL DO ÓLEO DE CITRONELA (*Cymbopogon winterianus* JOWITT) SOBRE A HISTOFISIOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO E CORPO GORDUROSO DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)

Cristiane T. S. Silva¹, Valéria Wanderley-Teixeira², Franklin M. Cunha¹, José V. Oliveira¹,
Kamilla A. Dutra¹, Daniela Maria A.F. Navarro³ E Álvaro A.C. Teixeira²

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

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

³Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Química Fundamental, Universidade
Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-
PE, Brazil.

Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. da Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. Efeito de dose subletal do óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) sobre a histofisiologia do intestino médio e corpo gorduroso de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). A ser submetido a Journal Agricultural and Food Chemistry.

RESUMO – *Spodoptera frugiperda* é conhecida no Brasil como a principal praga da cultura do milho. Seu controle é feito principalmente por inseticidas sintéticos, o que tem provocado diversos problemas ao agroecossistema, estimulando pesquisas por produtos alternativos, como os inseticidas botânicos. O óleo essencial de citronela (*Cymbopogon. winterianus*) tem se mostrado promissor. Assim, avaliou-se os efeitos de dose subletal (que não ocasionaram fitotoxicidade) deste óleo sobre a morfometria das células regenerativas e histologia e histoquímica do intestino médio e corpo gorduroso de *S. frugiperda*. O óleo foi submetido à análise CG-MS. Folhas de milho imersas em concentração de 50mg/mL foram oferecidas às lagartas de terceiro instar. O intestino médio foi coletado após 24h de tratamento e no sexto instar, além do intestino médio, foi coletado o corpo gorduroso para análise histológica e histoquímica. O intestino médio das lagartas do controle apresentou morfologia típica, contudo o tratado com citronela após 24h mostrou alterações no epitélio, com presença de protusões citoplasmáticas, extrusões de células colunares, núcleos picnóticos e aumento de grânulos PAS positivos. O aumento de células regenerativas nesta fase possibilitou a regeneração deste epitélio, visível em lagartas de sexto instar. O corpo gorduroso apresentou apenas trofócitos em sua estrutura. Os trofócitos do grupo tratado apresentaram vacúolos maiores, presença de corpos mitóticos e redução de glicogênio, proteína e lipídio. Assim, o óleo de citronela em dose subletal pode provocar alterações reparáveis no intestino médio, e ocasionou a redução dos recursos armazenados pelo corpo gorduroso o que poderá refletir na reprodução e sobrevivência do inseto.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta-do-cartucho, óleo essencial, fisiologia, histoquímica, intestino médio, trofócitos

EFFECT OF SUBLETHAL DOSE OF CITRONELLA OIL (*Cymbopogon winterianus* JOWITT)
ON THE MIDGUT AND FAT BODY HISTOPHYSIOLOGY OF *Spodoptera frugiperda* (J.E.
SMITH)

ABSTRACT – *Spodoptera frugiperda* is well known in Brazil as the main pest of corn crops. Its control is made by synthetic insecticides, which has caused many problems to the agroecosystem, stimulating researches for alternative products such as botanical insecticides. The essential oil of citronella (*Cymbopogon. winterianus*) has shown promise. Thus, was evaluated the effects of sublethal dose (which did not cause phytotoxicity) of this oil on the regenerative cells' morphometry and midgut and fat body's histology and histochemical of *S. frugiperda*. The oil was subjected to GC-MS analysis. Corn leaves dipped in concentration of 50mg/mL were offered to third instar larvae. Midgut was collected after 24 h of treatment and on sixth instar, beyond of the midgut, was collected the fat body for histological and histochemical analysis. The midgut of control larvae showed typical morphology, yet treated with citronella after 24h showed epithelial changes with the presence of cytoplasmic protrusions, extrusions columnar cells, pyknotic nuclei and increased PAS positive granules. The increase of regenerative cells at this stage enabled the regeneration of this epithelium, visible in sixth instar larvae. The fat body showed only trophocytes in its structure. Trophocytes of treated group showed larger vacuoles, presence of mitotic bodies and reduction of glycogen, protein and lipid. Thus, citronella oil in sublethal dose can cause repairable changes in the midgut, but results in the reduction of resources stored by the fat body which may reflect on reproduction and survival of the insect.

KEY WORDS: Armyworm, essential oil, physiology, histochemistry, midgut, trophocyte

Introdução

Diversas plantas produzem, através de seu metabolismo secundário, substâncias que exercem efeitos biológicos diversos sobre pragas agrícolas por possuírem propriedades deterrentes, repelentes, inibidoras do crescimento dos insetos e fatores que retardam a resistência desses invertebrados ao vegetal (Roel 2001, Gallo *et al.* 2002, Saito *et al.* 2004, Oliveira *et al.* 2007). Entre essas classes de substâncias, destacam-se os óleos essenciais de plantas aromáticas, que tem recebido grande atenção devido à presença de compostos como monoterpenos, fenóis e sesquiterpenos, os quais possuem atividades insetistáticas (Saito 2004, Isman 2006).

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), no Brasil, é conhecida como a principal praga da cultura do milho, capaz de provocar prejuízos econômicos de até 60% em períodos de seca, limitando assim sua produção (Cruz 1995, Lourenção *et al.* 2009). Seu controle é realizado frequentemente com a utilização de inseticidas sintéticos (Cruz 2002). E apesar de sua eficiência, o seu inadequado pode selecionar populações de insetos resistentes, além de provocar a intoxicação de aplicadores e consumidores (Roel *et al.* 2000).

O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt, conhecida como citronela de Java, é reconhecido por suas propriedades medicinais e aromáticas, havendo aumento de interesse no uso agrícola devido aos seus efeitos fungicida, carrapaticida, repelente e inseticida (Martins, 2006), já sendo utilizado em algumas formulações comerciais como repelente de culicídeos. Sua ação repelente foi comprovada sobre alguns mosquitos vetores de doenças, como *Aedes aegypti* L., *Anopheles dirus* Peyton & Harrison e *Culex quinquefasciatus* Say (Tawatsin *et al.* 2001). Seu efeito larvicida foi evidenciado sobre o mosquito transmissor da dengue, *A. aegypti* (Furtado *et al.* 2005). Causou mortalidade em *Frankliniella schultzei* (Trybom) e *Myzus persicae* (Sulzer), de 34,3% e 96,9%, respectivamente, a 1% (V/V) (Pinheiro *et al.* 2013). Provocou a repelência em

adultos de *Callosobruchus maculatus* (Fabr) (Gusmão *et al.* 2013). E por fim, proporcionou a deterrência alimentar e mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* (Labinas & Crocomo 2002).

A fim de avaliar a ação de inseticidas na fisiologia dos insetos, o sistema digestório se tornou alvo de grande parte das pesquisas no controle de pragas, pois é nele que ocorre boa parte do contato entre os insetos e o meio ambiente (Levy *et al.* 2004, Chapman 2013). Sendo o intestino médio o principal objeto destas pesquisas, devido às alterações ocorridas nesta região serem capazes de afetar o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, bem como todos seus eventos fisiológicos, os quais dependem da alimentação adequada, de sua absorção e transformação [Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Mordue (Luntz) & Nisbet 2000].

O corpo gorduroso é o principal órgão do metabolismo intermediário dos insetos (Roma *et al.* 2010). É nele que ocorre o armazenamento de proteínas, lipídios e carboidratos que servirão como precursores para o metabolismo de diversas substâncias (Keeley 1985, Arrese & Soulages 2010, Roma *et al.* 2010). Além disso, tem como função o armazenamento e neutralização de substâncias não utilizáveis pelo inseto, sendo comparado ao fígado de vertebrados, ao armazenar nutrientes em excesso da hemolinfa, desintoxicando-a e servindo como fonte biossintética para metabólitos que seriam liberados na circulação (Kilby 1963, Price 1973, Gullan & Cranston 2008).

Distribuído por todo corpo do inseto, podem ser classificados em dois tipos de acordo com sua localização: parietal e perivisceral. Os trofócitos são as células dominantes do corpo gorduroso, caracterizadas pelo seu desenvolvido sistema vacuolar (Locke 1984, Gullan & Cranston 2008, Chapman 2013). Mudanças na sua histofisiologia podem ser influenciadas por diversos fatores, como ciclo de muda, estado nutricional e de desenvolvimento do inseto (Cotton & Anstee 1991). Assim, a presente pesquisa avaliou o efeito de dose subletal (que não ocasionaram fitotoxicidade) do óleo essencial de *C. winterianus* sobre a morfometria das células

regenerativas, histologia e histoquímica do intestino médio, e corpo gorduroso de lagartas de *S. frugiperda*.

Material e Métodos

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e no Centro de Apoio à Pesquisa (Cenapesq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Obtenção dos Insetos. Os insetos foram obtidos da criação estoque do Laboratório de Histologia, mantidos em câmaras climatizadas do tipo B.O.D. a $25^{\circ}\text{C}\pm 0,2$, 70% de UR e fotofase de 12h. As lagartas foram alimentadas com dieta artificial modificada para *Spodoptera*, segundo a metodologia de Busato *et al.* (2006) e os adultos com solução de mel a 10%. No entanto, as lagartas destinadas à parte experimental foram alimentadas com folha de milho híbrido duplo AG105, cultivados em casa de vegetação com duas plantas por vasos de 5L com solo misturado com húmus (2:1), acrescentando 12,1g N, P, K (formulação de 4:14:8).

Obtenção e Análise Cromatográfica do Óleo. O óleo essencial de citronela (*C. winterianus*) foi oriundo da Universidade Federal da Paraíba – Campus Bananeiras. A cromatografia foi realizada no Laboratório de Ecologia Química, do Departamento de Química Fundamental, UFPE.

O óleo essencial foi diluído em hexano e analisado por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series GC/EM (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0.25 mm d.i., 0,25 μm espessura da película), na qual a alíquota de 1 μL foi injetada em split 1:20, assim como a solução da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C9-C34, sendo esta solução hexânica composta por padrões comerciais da Sigma-Aldrich®. As condições CG foram: hélio como gás carreador, pressão constante de 100kPa; temperatura inicial de 60°C por 3min,

aumentando 2,5°C/min até 240°C e mantida nesta temperatura por 10 min. Espectrometria de massa: a 200°C e os espectros de massa registrados em 70eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5scan^{-s} de m/z 20-350.

A partir da obtenção dos tempos de retenção dos compostos na amostra do óleo essencial, nos padrões de hidrocarboneto e na combinação do óleo essencial com a mistura de padrões de hidrocarboneto foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Van den Dool e Kratz (1963). Os componentes dos óleos essenciais foram previamente identificados por similaridade dos valores dos índices de retenção e posteriormente confirmados por comparação dos respectivos espectros de massa com aqueles disponíveis na biblioteca do GC/EM: MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition e com os descritos por Adams (2009) e por fim, as áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para a obtenção do sinal iônico total e seus valores utilizados para determinar as proporções relativas respectivas a cada composto.

Teste de Fitotoxicidade. Realizado a fim de determinar qual dose subletal ao inseto que não causasse dano à planta. Foram selecionadas as concentrações de 1500, 1000, 500, 100 e 50 mg em 98 mL de água destilada + 2mL de DMSO. Três pedaços de folha de milho, aproximadamente 4,0cm de comprimento, foram usadas para cada concentração, em três repetições. As folhas foram imersas por 10 segundos em cada concentração e deixadas secar a temperatura ambiente sobre papel toalha. O nível de fitotoxicidade foi avaliado de acordo com o tamanho de áreas queimadas, e classificados como leve, moderada, ou grave usando uma escala percentual de fitotoxicidade, adaptado de Frans *et al.* (1986) (Fig. 1). A concentração em que não promoveu fitotoxicidade foi utilizada para testar a bioatividade sobre lagartas de *S. frugiperda*.

Bioensaios. Para a realização dos bioensaios, pedaços de folhas de milho de 20 a 40 dias de idade foram imersas na solução contendo o óleo essencial de citronela (50mg óleo essencial + 98mL

água destilada + 2mL de DMSO) e para o grupo controle foram imersas apenas em solução de 98mL água destilada e 2mL de DMSO, e colocadas para secar em temperatura ambiente e posteriormente oferecidas às lagartas de *S. frugiperda* com 10 dias de idade (3º instar), durante 24 horas, após esse intervalo de tempo as lagartas passaram a ser alimentadas com folhas de milho não tratadas até o 6º instar. Cada tratamento constou de 50 lagartas individualizadas em potes plásticos de 80mL com tampa.

Análise Histológica e Histoquímica do Intestino Médio. Foram coletados dez intestinos médios de lagartas após 24h do tratamento e dez de sexto instar. Para a coleta do material, os insetos foram imobilizados a baixa temperatura (4°C) e dissecados com o auxílio de um estereomicroscópio. Fixados em formol 10% por 24h e conservados em álcool 70%. O intestino médio foi seccionado, desidratado em banhos crescentes de álcool etílico (70 - 100%) por 10 min cada, embebido em álcool+historesina (1:1) por 24h e finalmente incluído em historesina Leica®. Cortes com 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo Leica® RM 2035. Os cortes foram submetidos às técnicas de coloração pelo Azul de Toluidina para análise morfológica do tecido; Para análises histoquímicas, técnica de Feulgen para detecção de núcleos, Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) para detecção de polissacarídeos neutros, e Xylidine Ponceau para proteínas totais. A análise histológica e histoquímica foram realizadas utilizando-se um microscópio de luz da marca OLYMPUS BX-49, e fotografado em fotomicroscópio Leica® DM500 e OLYMPUS BX-51.

Foram quantificadas as células regenerativas baseando-se no método de Pinheiro *et al.* (2003), na qual foram usadas 10 secções aleatórias de três cortes para cada três blocos por tratamento, obtida a média e submetida ao teste T usando o programa SAS (SAS Institute, 2001).

Análise Histológica e Histoquímica do Corpo Gorduroso. Foram coletados de lagartas de sexto instar e submetidos ao mesmo procedimento de inclusão e obtenção de cortes para o intestino

médio. Submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (H-E), para análise morfológica e para histoquímica utilizou-se Feulgen para núcleo, Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) na detecção de glicogênio, Xylidine Ponceau, para proteínas, e Sudan Black, para lipídios. Os cortes foram examinados e fotografados em fotomicroscópio de luz Leica[®] DM500.

Resultados

Composição Química do Óleo Essencial. A análise do óleo essencial de citronela, *C. winterianus*, detectou a presença de 62 compostos, dos quais, o citronelal, geraniol e citronelol apresentaram-se como compostos majoritários com 35,47%, 21,83% e 10,94%, respectivamente (Tabela 1).

Morfologia e Histoquímica do Intestino Médio de Lagarta de *S. frugiperda*. As lagartas do controle após 24h apresentaram o intestino médio constituído por duas camadas de tecido muscular, a mais externa com músculo disposto longitudinalmente, com feixes espaçados entre si, e a interna com músculo disposto circularmente. Internamente encontra-se a camada de tecido epitelial simples colunar, composta por três tipos celulares: células colunares, caracterizadas pela presença de microvilosidades em seu ápice e núcleos esféricos centrais; células caliciformes, as quais possuem uma invaginação de sua membrana formando a câmara globosa, com núcleo basal e achatado; e células regenerativas, com citoplasma bastante basófilo e núcleo esférico, podem ser encontradas solitárias ou em grupo, formando ninhos. Recobrimo o epitélio há a matriz peritrófica (Figs. 2A e 2B).

O intestino médio das lagartas tratadas com o óleo de citronela apresentou após 24h o tecido muscular aparentemente bem preservado. No entanto, houve uma desorganização estrutural no epitélio, com alongamento e aparente aumento de células caliciformes, presença de protusões

citoplasmáticas nas células colunares e extrusões destas e de seus fragmentos lançados em direção ao lúmen, além disso essas células mostraram-se alongadas (Figs. 2C e 2D).

Através da técnica de Feulgen, é possível observar que as células colunares do controle possuem núcleos esféricos e volumosos, porém no tratamento ocorreu a presença de núcleos que se apresentaram mais condensados e com tamanho reduzido, distinguindo-os como picnóticos. Também foi visualizado o afastamento destas células da lâmina basal e extrusão celular para o lúmen (Figs. 2E e 2F). Verificou-se ainda aumento significativo na quantidade de células regenerativas no intestino médio das lagartas tratamento com citronela após 24h em relação ao controle (Tabela 2).

As células epiteliais do intestino médio das lagartas do controle após 24h demonstraram positividade ao ácido periódico de Schiff (P.A.S.), detectando a presença de carboidratos neutros caracterizada pela presença de grânulos no citoplasma, dispostos aleatoriamente nas células (Fig. 3A). Verificou-se que o teor de glicogênio nas células epiteliais do intestino médio das lagartas tratadas com óleo de citronela exibiu uma reação muito mais intensa, chegando a ocupar quase todo o epitélio, inclusive nos fragmentos lançados no lúmen (Fig. 3B).

Quanto à detecção de proteína o controle de 24h exibiu uma coloração positiva e uniforme por todo o epitélio, com destaque para as células regenerativas que reagiram de forma mais intensa (Fig. 3C). No tratamento também foi obtida coloração positiva, contudo na área em que ocorre a estratificação do epitélio, é possível observar núcleos intensamente corados. Além disso, no interior da câmara globosa das células caliciformes evidenciou-se uma reação mais fraca, sugerindo a presença de secreção de natureza não proteica produzida por estas células (Fig. 3D).

Nas lagartas avaliadas no sexto instar, o intestino médio do controle apresentou características histológicas semelhantes às observadas para as lagartas avaliadas após 24h (Fig. 4A). Em relação às lagartas oriundas do tratamento com o óleo de citronela, foi constatada uma

recuperação da morfologia típica do epitélio, bem próxima do controle. No entanto, verificou-se um notável alongamento de suas células colunares (Fig. 4B). Não houve diferença significativa entre o número de células regenerativas no controle e no tratamento (Tabela 2).

O conteúdo de glicogênio, no intestino médio das lagartas de sexto instar do controle, demonstrou uma maior quantidade de grânulos do que aqueles do controle de 24h e uma redução significativa do tratamento com o óleo de citronela. Ainda foi possível observar grânulos PAS positivos no interior da câmara globosa das células caliciformes (Figs. 4C e 4D). Para proteína tanto o controle quanto o tratamento com óleo de citronela obtiveram reação positiva (porém com ligeira intensidade para as lagartas do grupo tratado com o óleo), e com distribuição de coloração homogênea por todo o tecido (Figs. 4E e 4F).

Morfologia e Histoquímica do Corpo Gorduroso. Foram observados apenas trofócitos compondo o corpo gorduroso, tanto no controle quanto no tratamento com o óleo de citronela. Estas células foram encontradas justapostas, em fileira, geralmente com uma ou duas camadas celulares, formando uma fita. Os trofócitos apresentaram várias vesículas e o núcleo central esférico, com presença de nucléolos (Figs. 5A). No tratamento com o óleo, as vesículas foram aparentemente bem maiores em relação ao controle e localizadas mais na periferia das células (Fig. 5B).

Através da técnica de Feulgen, ainda foi possível observar que os núcleos do controle apresentaram área eucromática (Fig. 5C), enquanto que no tratamento com o óleo de citronela os núcleos estavam aparentemente com volume maior e mais condensado, ainda foi possível verificar núcleos alongados e em que não houve completa cariocinese, possivelmente em metáfase e com cromossomos condensados, com evidente poliploidia (Fig. 5D).

Tanto no controle como nas lagartas tratadas com óleo de citronela o corpo gorduroso apresentou reação positiva ao PAS no conteúdo citoplasmático dos trofócitos, indicando a

presença de glicogênio nestas células, porém de maior intensidade no corpo gorduroso das lagartas do controle. Estes grânulos também foram observados preenchendo vesículas no grupo controle e circundando internamente as vesículas no grupo tratado com o óleo de citronela (Figs 6A e 6B).

Através da coloração com Xylidine Ponceau foi evidenciada a presença de proteínas no citoplasma entre os vacúolos dos trofócitos, tanto do controle quanto no tratado com o óleo de citronela (Figs 6C e 6D). E pelo Sudan Black, foram verificadas a presença de lipídios distribuídos pelo citoplasma do controle e tratado com o óleo de citronela, em formas de gotículas, com algumas presentes dentro dos vacúolos, entretanto a maior parte se encontra entre eles.

Discussão

Assim como em nossos resultados, o citronelal, geraniol e citrionelol foram detectados, respectivamente, como compostos majoritários do óleo essencial de *C. winterianus* por Labinas & Crocomo (2002), nas concentrações de 42,15%, 16,44% e 22,03%, por Martins (2006), 41,15%, 17,90%, 17,20%, e por Beneti *et al.* (2011), 40,23%, 17,70% e 13,39%. Alterações na concentração destes constituintes são bastante comuns, pois a produção e composição do óleo essencial podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como, variabilidade genética, localização geográfica, época da colheita, condições climáticas, parte do vegetal destilado, entre outros (Simões *et al.* 2002, Marco *et al.* 2007, Moraes 2009).

Estes compostos são classificados como monoterpenos, tendo o citronelal e o geraniol sido reportados com propriedades repelente e inseticida (Isman 2006, Chen & Viljoen 2010). Knaak *et al.* (2010) supõem que os componentes ativos tóxicos provenientes de vegetais são capazes de

atuar no intestino médio de insetos. Segundo Correia *et al.* (2009), por ser esta uma região de digestão e absorção, é portanto mais vulnerável.

O intestino médio da lagarta *S. frugiperda* do grupo controle apresentou o mesmo padrão morfológico descrito por Rost-Roszkowska *et al.* (2008) para *Spodoptera exigua* (Hübner), por Correia *et al.* (2009) e Roel *et al.* (2010), para a mesma espécie em estudo. Segundo Sousa *et al.* (2009), o epitélio do intestino médio de *Alabama argillacea* (Hübner) é composto por quatro tipos celulares: colunares, caliciformes, endócrinas e regenerativas. A não visualização das células endócrinas neste trabalho confirma ser apenas possível distingui-las das outras células do epitélio com análises ultraestruturais e imunohistoquímicas (Scudeler & Santos 2014).

A estratificação do epitélio, ocasionada pela hiperplasia das células colunares, formação e expansão dos espaços intercelulares, protusões e extrusão de fragmentos celulares para o lúmen, núcleos condensados e reduzidos (picnóticos), provocadas pelo óleo de *C. winterianus*, são alterações patológicas graves, semelhantes a sintomas necróticos acarretados pela administração de outros compostos derivados de plantas, tais como, *Azadirachta indica* A. Juss, *Cymbopogon citratus* (D.C.), *Petiveria alliacea* L. e *Zingiber officinalis* Roscoe (Nogueira *et al.* 2007, Correia *et al.* 2009, Knaak *et al.* 2010, Roel *et al.* 2010, Scudeler & Santos 2013). Estes mesmos autores ainda relataram modificações ou degradação das microvilosidades e/ou da matriz peritrófica, não observadas neste trabalho. Porém, apesar da matriz peritrófica aparentemente íntegra, não foi suficiente para impedir a ação do óleo de citronela sobre o epitélio, assim como o nim, segundo Correia *et al.* (2009).

Estes sintomas patológicos são comparáveis ainda às alterações provocadas pelo *Bacillus thuringiensis* no intestino médio das lagartas *Manduca sexta* Linnaeus e *Corcyra cephalonica* (Stainton), descritas, respectivamente, por DeLello *et al.* (1984) e Chiang *et al.* (1986) e na lagarta *A. argillacea* alimentada com algodão Bt, por Sousa *et al.* (2010).

O aumento do número de células regenerativas evidenciado nesta pesquisa difere do encontrado por Correia *et al.* (2009) em intestino médio de *S. frugiperda* submetidas a doses de nim. O que pode ter ocorrido devido a contagem ter sido feita após 24h do tratamento na presente pesquisa, enquanto que os outros autores verificaram após 48h do tratamento. A renovação epitelial pela proliferação e diferenciação das células regenerativas é estimulada pela liberação de fatores que podem estar ligados a alterações nas células colunares (Spies & Spence 1985).

Os resultados observados no intestino médio corroboram com as três respostas celulares aos patógenos na tentativa de defesa do epitélio citadas por Chiang *et al.* (1986), a descamação das células colunares, que apesar de ser considerada patológica, estimula a proliferação das células regenerativas a fim de recuperar o epitélio danificado e a secreção, talvez merócrina, pelas células caliciformes protegendo o novo epitélio formado de uma lesão contínua e evitando a mistura do fluido corporal com o conteúdo gástrico. E assim, permitiu a reestruturação deste tecido, ao se mostrar intacto nas lagartas de sexto instar.

A grande quantidade de grânulos PAS positivos, detectada após 24h de tratamento com citronela nas células colunares do intestino médio, pode indicar a perda deste material no lúmen, visto que estas células estavam sofrendo protusões e extrusões, e haver redução deste material nas células do sexto instar. Corroborando com os resultados de DeLello *et al.* (1986) e Sculeder & Santos (2013), que verificaram uma redução de glicogênio nas células colunares remanescentes após o dano no epitélio.

A fim de prover as necessidades dos insetos, as células do corpo gorduroso são capazes de mudarem suas atividades como resposta aos sinais nutricionais e hormonais, sendo um dos tecidos mais importantes para os processos de manutenção e reprodução (Gullan & Cranston 2008, Roma *et al.* 2010).

Este tecido pode ser composto por dois tipos de células, os trofócitos, mais abundantes, tem origem mesodérmica, e os enócitos, associados às anteriores, com origem ectodérmica (Oliveira & Cruz-Ladim, 2003). Estas últimas não foram visualizadas em nossos cortes histológicos. Evans (1967) e Oliveira & Cruz-Ladim (2003) relatam que os enócitos podem ser encontrados por todo o corpo do inseto, situados abaixo da epiderme ou agrupados próximos aos espiráculos e traquéias, bem como associados aos trofócitos.

Segundo Chapman (2013), as células do corpo gorduroso são geralmente fracamente aderidas uma à outra, raramente são encontrados casos em que haja junções comunicantes e adesivas entre elas, como aparentemente ocorre em lagartas-do-cartucho.

A presença de corpos mitóticos visualizados no tratamento com citronela indica que pode ter ocorrido o desenvolvimento nuclear precoce, como sugerem Cotton & Anstee (1991), ao verificarem modificações similares nos núcleos de *Locusta migratoria* L. tratadas com metopreno. Uma vez que, o corpo gorduroso tem seu crescimento na fase embrionária através do aumento do número e da diferenciação das células presentes, e na fase larval apenas deveria ocorrer o aumento de volume de suas células (Chapman 2013).

Os grandes vacúolos encontrados no corpo gorduroso de *S. frugiperda*, exposta ao tratamento com óleo de citronela, podem ser classificados como vacúolos aquosos, visto que não foi detectada a presença de proteínas nem lipídios em seu interior, apenas alguns grânulos PAS positivos em sua parede. Assim como sugere Wigglesworth (1982), ao verificar a presença de vacúolos semelhantes no corpo gorduroso de insetos adultos de *Rhodnius* (Hemiptera), quando realimentados após inanição avançada; estes vacúolos são originados de citolisossomos (vacúolos autofágicos), associados a depósitos de lipofuscina, provenientes da degeneração mitocondrial nas células do corpo gorduroso.

Muitas vezes os trofócitos são designados como adipócitos, sendo esta uma denominação errônea, visto que estas células não são apenas responsáveis pelo armazenamento de lipídios (Oliveira & Cruz-Ladim 2003, Roma *et al.* 2010). A presença de carboidratos, proteínas e lipídios no citoplasma dos trofócitos detectada pelas técnicas histoquímicas também foi verificada e descrita por Roma *et al.* (2006) em formigas da tribo Anttini. A presença destes compostos no citoplasma destas células admite sua função de armazenamento.

Segundo Oliveira & Cruz-Landim (2003), os lipídios são armazenados como gotículas que chegam a ocupar grandes extensões do citoplasma, grande parte como triglicerídeo. As proteínas são armazenadas na forma de cristais ou de grânulos eletrondensos de diferentes tamanhos (Jensen & Borgesen 2000, Rollo & Camargo-Mathias 2006, Roma *et al.* 2008). Como exemplo de síntese proteica, tem a secreção de proteínas dos oócitos, tais como vitelogeninas, como cita Keeley (1985).

Os carboidratos armazenados nos trofócitos, principalmente na forma de glicogênio, constituem uma fonte importante de energia para os insetos, que podem estar associados a lipídios e proteínas (Locke 1984, Keeley 1985, Roma *et al.* 2006). Estas células são capazes de sintetizar a partir do glicogênio a trealose, importante carboidrato circulante na hemolinfa (Röseler e Röseler, 1986).

A importância na captação de recursos nutricionais relacionados aos vários processos da fase pupal e adulta do inseto, em muitas espécies de insetos se iniciam desde a fase larval, como em *S. frugiperda* (Attardo *et al.* 2005, Milano *et al.* 2010). O desperdício desses recursos nas lagartas tratadas com óleo de citronela, devido à perda deste material nos danos provocados no intestino médio durante o terceiro instar e seu uso como fonte energética para restaurar o epitélio, podem ter provocado a diminuição do glicogênio no corpo gorduroso.

Assim, conclui-se que o óleo de citronela *C. winterianus*, na concentração de 50mg/mL, é capaz de provocar alterações patológicas na estrutura do epitélio do intestino médio de lagartas de terceiro instar, o qual através de mecanismo de defesas consegue se reintegrar. No entanto, o uso de recursos para esta restauração implica na redução do teor de glicogênio do corpo gorduroso, o qual poderá refletir no processo de reprodução e sobrevivência do inseto. Sendo portanto, necessárias novas pesquisas que investiguem estas lacunas no conhecimento.

Literatura Citada

- Adams, R.P. 2009.** Identification of essential oil components by Gas Chromatography Quadupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois, 804p.
- Arrese, E.L. & J.L. Soulages. 2010.** Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. Annu. Rev. Entomol. 55: 207–225.
- Attardo, G.M., I.A Hansen & A.S. Raikhel. 2005.** Nutricional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. Insect Biochem. Molec. 35: 661-675.
- Busato, G.R., M.S. Garcia, A.E. Loeck, M. Zart, A.M. Nunes, O. Bernardi & F.S. Andersson. 2006.** Adequação de uma dieta artificial para os biótipos "milho" e "arroz" de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Bragantia 65: 317-323.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Chen, W. & A. M. Viljoen. 2010.** Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. South Afr. J. Bot. 76: 643–651.
- 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. 4: 333–39.

- 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.
- Cotton, G. & J.H. Anstee. 1991.** A biochemical and structural study on the effects of methoprene on fat body development in *Locusta migratoria* L. J. Insect Physiol. 37: 525-539.
- Cruz, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45 p. (Circular Técnica, n. 21).
- Cruz, I. 2002.** Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 32p. (Documentos, 21).
- DeLello, 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.
- Evans, J.J.T. 1967.** Development and ultrastructure of the fat body cells and oenocytes of the Queensland fruit fly *Dacus tryoni* (Frogg). Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 81: 49-61.
- Frans, R.E., R.Talbert, D. MarX & H. Crowley. 1986.** Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: Camper, N.D. (Ed.), Research Methods in Weed Science. Champaign, IL Southern Weed Science Society, 486p.
- Furtado, R.F., M.G.A. Lima, M. Andrade-Neto, J.N.S. Bezerra & M.G.V. Silva. 2005.** Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Neotrop. Entomol. 34: 843-847.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, S., R.P.L. Carvalho, G.C. Batista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ/USP, 920p.

- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2008.** Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Roca, 440p.
- Gusmão, N.M.S., J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, K.A. Dutra, W.A. Silva & M.J.A. Wanderley. 2013.** Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus staigeriana* F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare* Mill. essential oils in the management of *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). J. Stored Prod. Res. 54: 41-47.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51: 45-66.
- Jensen, P.V. & L.W. Borgesen. 2000.** Regional and function differentiation in the fat body of pharaoh's ant queens *Monomorium pharaonis* (L.). Arthropod Struct. Dev. 29: 171-184.
- Keeley, L.L. 1985.** Physiology and biochemistry of the fat body, p. 211-248. In: G.A. Kerkut & L.I. Gilbert (eds.), Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford, Pergamon Press, 715p.
- Kilby, B.A. 1963.** The biochemistry of the insect fat body, p. 111-174 In: J.W.L. Beament, J.E. Treherne & V.B. Wigglesworth (eds.), Advances in insect physiology. New York, Academic Press, 512p.
- 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.
- 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.

- 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.
- Locke, M. 1984.** The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects, p. 151-197. In: R.C. King & H. Akai (eds.), *Insect Ultrastructure*. New York, Plenum Press, 485p.
- 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.
- Lourenção, A.L.F, R. Barros & E.P. Melo. 2009.** Milho Bt: Uso correto da tecnologia. *Tecnologia e Produção: Milho safrinha e culturas de inverno.* 79-89.
- Marco, C.A., R. Inecco, S.H. Mattos, N.S.S. Borges & E.O. Nagao. 2007.** Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. *Hortic. Bras.* 25: 429-432.
- Martins, R.M. 2006.** Estudio in vitro de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8: 71-78.
- Mcdermid, H. & M.Locke. 1983.** Tyrosine storage vacuoles in insect fat body. *Tissue Cell* 15: 137-158.
- 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 Elachistidae. *Neotrop. Entomol.* 39: 172-180.
- Morais, L.A.S. 2009.** Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira* 27: 4050-4063.

- Mordue (Luntz), A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39: 903-924.
- Mordue (Luntz), A.J. & A.J. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 29: 615-632.
- Nogueira, M.A., M.G. Diaz, P.M. Tagami & J. Lorscheide. 2007.** Atividade Microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. *Rev. Ciênc. Farmc Básica Apl.* 28: 93-97.
- Oliveira V.T.P. & C. Cruz-Landim. 2003.** Morphology and fuction of insect fat body cells: a review. *Biociências* 11: 195-205.
- Oliveira, M.S.S., A.R. Roel, E.J. Arruda & A.S. Marques. 2007.** Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec* 31: 326-331.
- Pinheiro, P.F., V.T. Queiroz, V.M. Rondelli, A.V. Costa, T.P. Marcelino & D. Pratissoli. 2013.** Insecticidal activity of citronella grass essential oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*. *Ciênc. Agrotec.* 37: 138-144.
- Price, G.M. 1973.** Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. *Biol. Rev.* 48: 333-372.
- Roel, A.R. 2001.** Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Rev. Int. Desenv. Local* 1: 43-50.
- Roel, A.R., D.M. Dourado, R. Matias, K.R.A. Porto, A.V. Bednaskil & R.B. Costa. 2010.** The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Rev. Bras. Entomol.* 54: 505-510.
- Roel, A.R., J.D. Vendramim, R.T.S. Frighetto & N. Frighetto. 2000.** Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 799-808.

- Rollo, J.P. & M.I. Camargo-Mathias. 2006.** Morphohistochemical characterization of the perivisceral fat body in royal and worker female castes in different ages of *Atta sexdens rubropilosa* ants (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology* 47: 519–530.
- Roma G.C., M.I.C. Mathias & O. C. Bueno. 2006.** Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection. *Micron* 37: 234–242
- Roma, G.C., M.I. Camargo-Mathias & O.C. Bueno. 2008.** Chemical detection of the proteins and lipids in the fat body cells from workers of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae). *Cell Biol. Int.* 32: 406-416.
- Roma, G.C., O.C. Bueno & M.I. Camargo-Mathias. 2010.** Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron* 41: 395-401.
- Röseler P. & I. Röseler. 1986.** Caste specific differences in fat body glycogen metabolism of the bumblebee, *Bombis terrestris*. *Insect Biochem.* 16: 501-508.
- Saito, M. L. 2004.** As plantas praguicidas: Alternativa para o controle de pragas na agricultura. Matéria do informativo: Embrapa - Meio Ambiente. Jaguariúna. 4p. Disponível: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Saito_plantasID-xWZZuffPN5.pdf> Acesso: 31/05/2014.
- Saito, M.L., A. Pott, J.M.G. Ferraz & R.S. Nascimento. 2004.** Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e *Anticarsia gemmatilis* Hubner. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. Meio Ambiente* 14: 1-10.
- SAS Institute. 2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.

- Scudeler E.L. & D.C. Santos. 2014.** Side effects of neem oil on the midgut endocrine cells of the green lacewing *Ceraeochrysa claveri* (Navás) (Neuroptera: Chrysopidae). Neotrop. Entomol. 43: 154-160.
- 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.
- Simões, C.M.O., E.P. Schenkel, G. Gosman, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick. 2002.** Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianópolis, Editora da UFSC, 821p.
- Sousa, M.E.C., F.A.B. Santos, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A.A. Siqueira, L.C. Alves & J.B. Torres. 2010.** Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Insect Physiol. 56: 1913-1919.
- Sousa, M.E.C., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A. De Siqueira, F.A. Santos & L.C. Alves. 2009.** Ultrastructure of the *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. Micron. 40: 743-749.
- Spies, A.G. & K.D. Spence. 1985.** Effect of a sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca sexta*: a SEM study. Tissue Cell 17: 379-394.
- Tawatsin, A., S.T. Wratten, R.R.Scott, U.Thavara & Y. Techadamrongsin. 2001.** Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. J. Vector Ecol. 26: 76-82.
- 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.
- Wigglesworth, V.B. 1982.** Fine structural changes in the fat body cells of *Rhodnius* (Hemiptera) during extreme starvation and recovery. J. Cell Sci. 53: 337- 346.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de citronela *C. winterianus* com suas respectivas porcentagens

	Compostos	I.R.¹	I.R.²	Área(%)
1	α –Pineno	932	932	0,01
2	Hepten-2-one<6-methyl-5>	989	981	0,06
3	Mirceno	991	988	0,07
4	α –Felandreno	1003	1002	0,02
5	O- Cimenol	1024	1022	0,02
6	Limoneno	1028	1024	3,90
7	(Z)- β -Ocimenol	1039	1032	0,01
8	Bergamotol	1054	1051	0,05
9	γ -Terpineno	1058	1054	0,02
10	Terpinoleno	1088	1086	0,07
11	Linalol	1100	1095	1,15
12	(Z)- Rose oxide	1111	1106	0,03
13	(E)- Rose oxide	1128	1122	0,01
14	Isopulegol	1145	1145	1,22
15	P- Menth-3-en-8-ol	1148	1145	0,06
16	Citronelol	1154	1148	35,47
17	Menthone (iso)	1165	1158	0,03
18	Isopulegol (neoiso)	1168	1167	0,08
19	Terpinen-4-ol	1177	1174	0,06
20	α –Terpineol	1190	1186	0,06
21	Metil Chavicol	1198	1195	0,04
22	<n>- Decanal	1206	1201	0,08
23	Citronelol	1229	1223	10,94
24	Neral	1242	1235	0,33
25	Geraniol	1256	1249	21,83
26	Geranial	1271	1264	0,50
27	(E)- Anethole	1286	1282	0,72
28	Thymol	1292	1289	0,03
29	Menthol <8-hydroxy-neo>	1333	1328	0,21
30	Citronelil acetate	1354	1350	2,51
31	Eugenol	1358	1356	0,82
32	Neryl acetate	1365	1359	0,03
33	α –Copaeno	1378	1374	0,02
34	Geranil acetate	1384	1379	3,15

35	β -Elemeno	1393	1389	1,67
36	(E)-Cariofileno	1422	1417	0,11
37	β -Copaeno	1432	1430	0,03
38	Muurola-3,5-diene <E>	1454	1451	0,03
39	α -Humuleno	1457	1452	0,11
40	Dauca-5,8-diene	1467	1471	0,03
41	Cadina-1(6),4-diene <E>	1478	1475	0,05
42	γ -Muurolene	1481	1478	0,14
43	Germacreno-D	1486	1484	1,93
44	β -Selineno	1491	1489	0,06
45	Muurola-4(14),5-diene <E>	1497	1493	0,05
46	Cubebol <epi>	1499	1493	0,13
47	α -Muuronelo	1505	1500	0,45
48	Germacreno – A	1510	1508	0,38
49	γ -Cadineno	1519	1513	0,36
50	δ -Cadineno	1528	1522	2,02
51	Cadina-1,4-diene <E>	1536	1533	0,05
52	α -Cadineno	1541	1537	0,08
53	Elemol	1553	1548	3,73
54	Germacreno D-4-ol	1579	1574	0,45
55	Eudesmol <5-epi-7-epi- α >	1607	1607	0,03
56	Cubenol <1-epi>	1631	1627	0,05
57	γ -Eudesmol	1634	1630	0,58
58	Muurolol <epi- α >	1644	1640	0,86
59	α -Muurolol	1649	1644	0,15
60	β -Eudesmol	1653	1649	0,33
61	α -Cadinol	1657	1652	1,61
62	Bulnesol	1671	1670	0,16
TOTAL				99,24

¹Índice de retenção.

²Constituintes listados por ordem de eluição em uma coluna nonopolar DB-5.

Tabela 2. Número de células regenerativas no intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* submetidas ao tratamento 50mg/L de óleo essencial de citronela (*C. winterianus*) (25°C, 70% de UR e fotofase de 12h).

Tratamento	N	Média ± E.P. ¹	Estatística T ^P
24h após alimentação			-4,03 ^{0,0157}
Controle	3	6,0 ± 0,47 a ²	
Citronela 50mg/L	3	8,7 ± 0,44 b	
Sexto instar			2,46 ^{0,0861}
Controle	3	6,1 ± 0,34 a	
Citronela 50mg/L	3	5,0 ± 0,33 a	

¹E.P. (Erro Padrão).

²Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente.

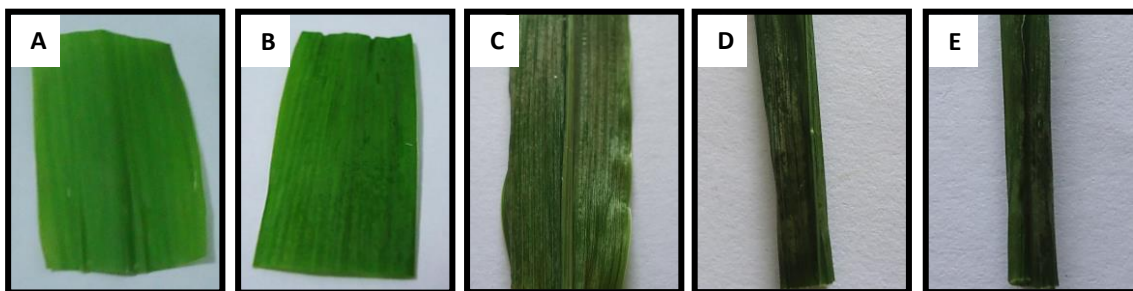


Figura 1. Fitotoxicidade de folhas de milho imersas em diferentes concentrações do óleo essencial de citronela (*C. winterianus*). (A) 50mg/mL, não houve fitotoxicidade. (B) 100mg/mL, leve a moderada. (C-D-E) 500mg/L, 1000mg/mL e 1500mg/mL, respectivamente, apresentaram fitotoxicidade grave.

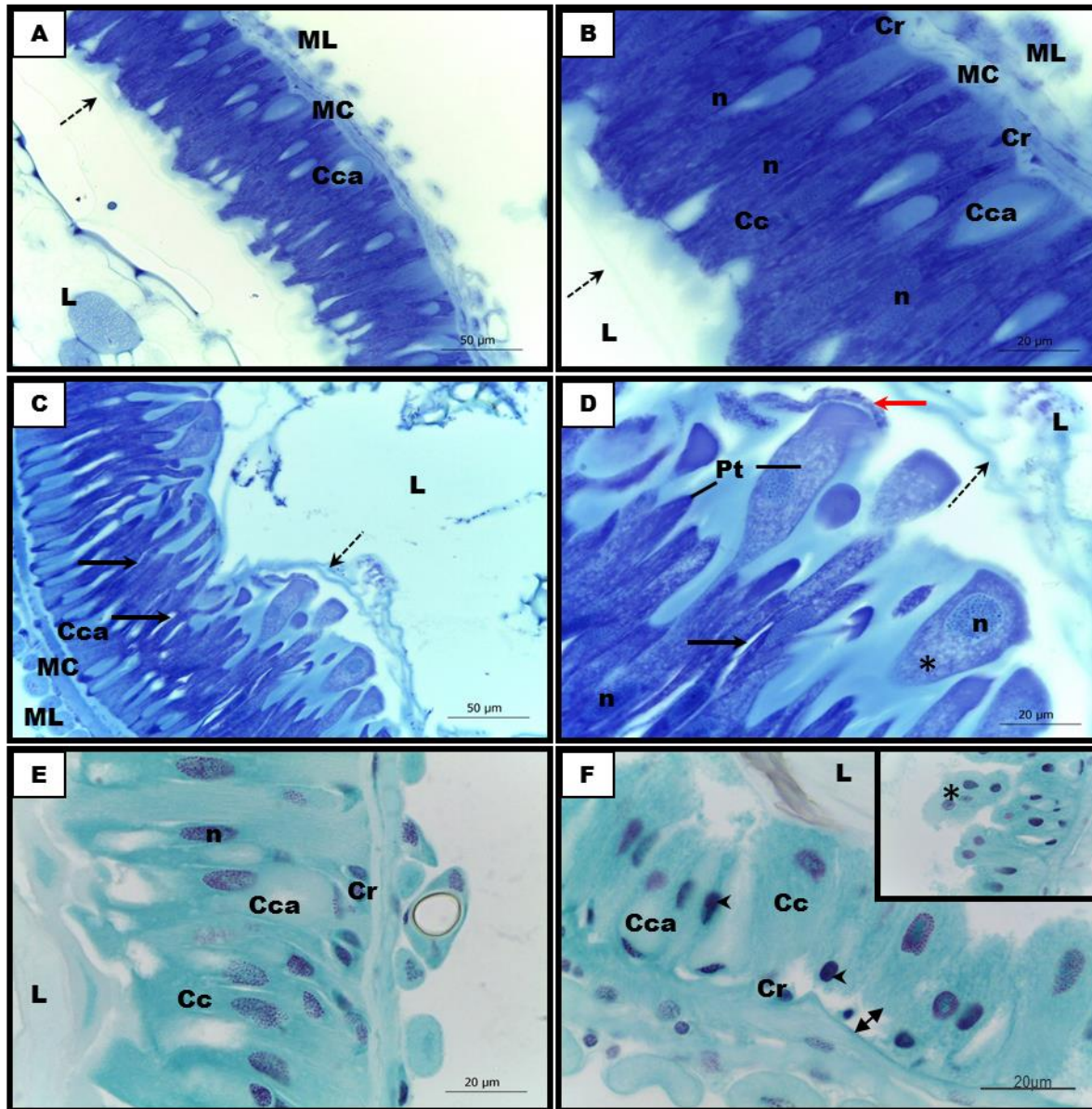


Figura 2. Intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* de terceiro instar. (A - B) controle. Observar constituição histológica: camada de músculo longitudinal (ML) e músculo circular (MC), apoiando o epitélio formado por células colunares (Cc) com núcleo central (n), células caliciformes (Cca), células regenerativas (Cr), e matriz peritrófica (seta pontilhada). (C - D) tratamento com 50mg/mL do óleo de citronela. Visualizar estratificação epitelial, com presença de protusões (pt) nas células colunares caracterizadas pela presença de microvilos (seta vermelha), extrusão celular (asterisco) e espaço intercelular (seta longa). Coloração azul de toluidina. (E) controle. (F) tratado, observar presença de núcleos picnóticos (ponta de seta), afastamento das células da camada muscular (seta com duas pontas) e Lúmen (L). Coloração Feulgen.

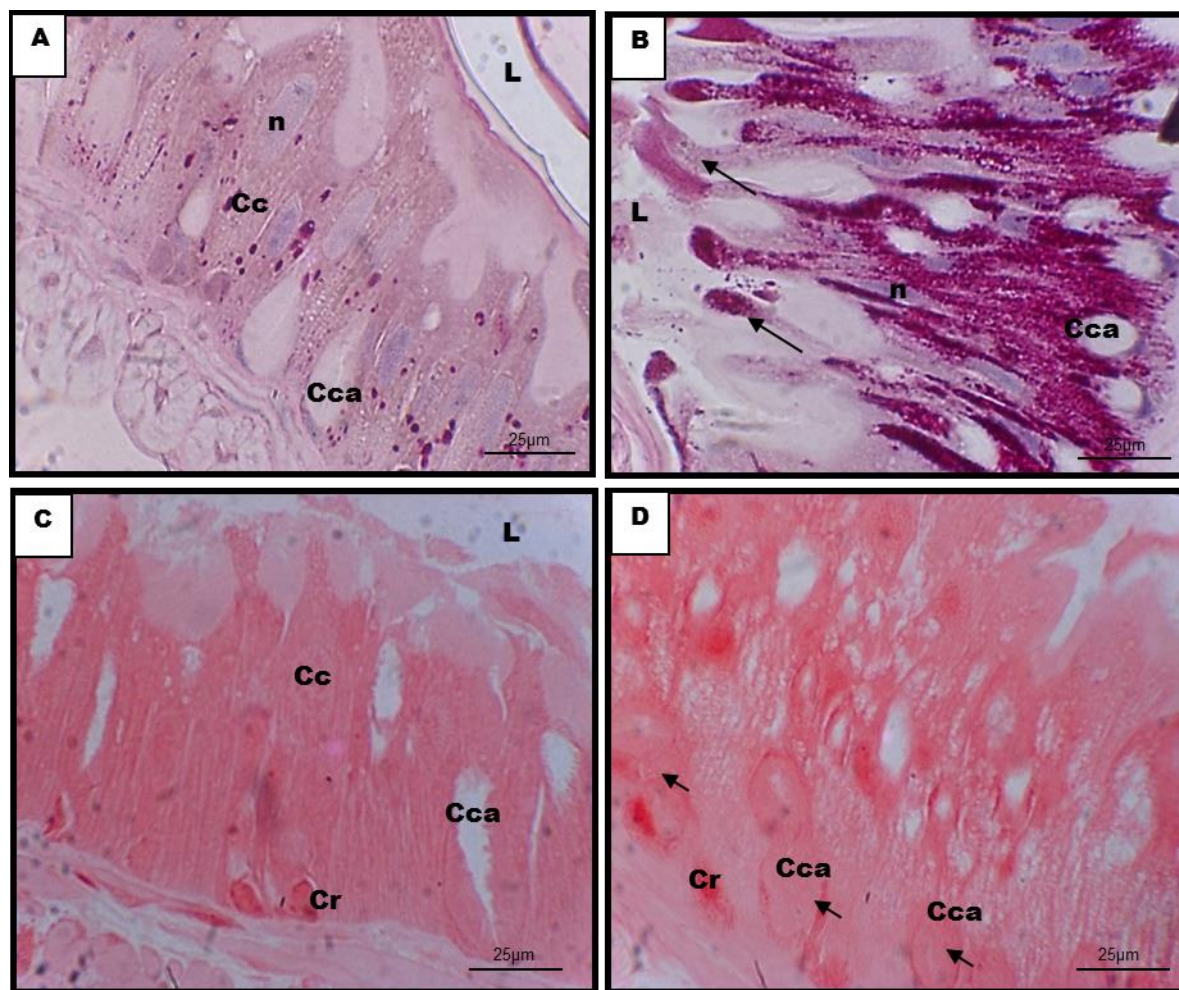


Figura 3. Histoquímica do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* de terceiro instar. (A) controle. Observar alguns grânulos de glicogênio dispersos no citoplasma das células (B) tratamento com 50mg/mL do óleo de citronela. Notar grande quantidade de grânulos de glicogênio no citoplasma das células. Coloração com P.A.S. (C) controle. (D) tratamento com 50mg/mL do óleo de citronela. Notar maior reação do corante Xylidine Ponceau no grupo tratado. Células colunares (Cc), núcleo (n), células caliciformes (Cca), células regenerativas (Cr).

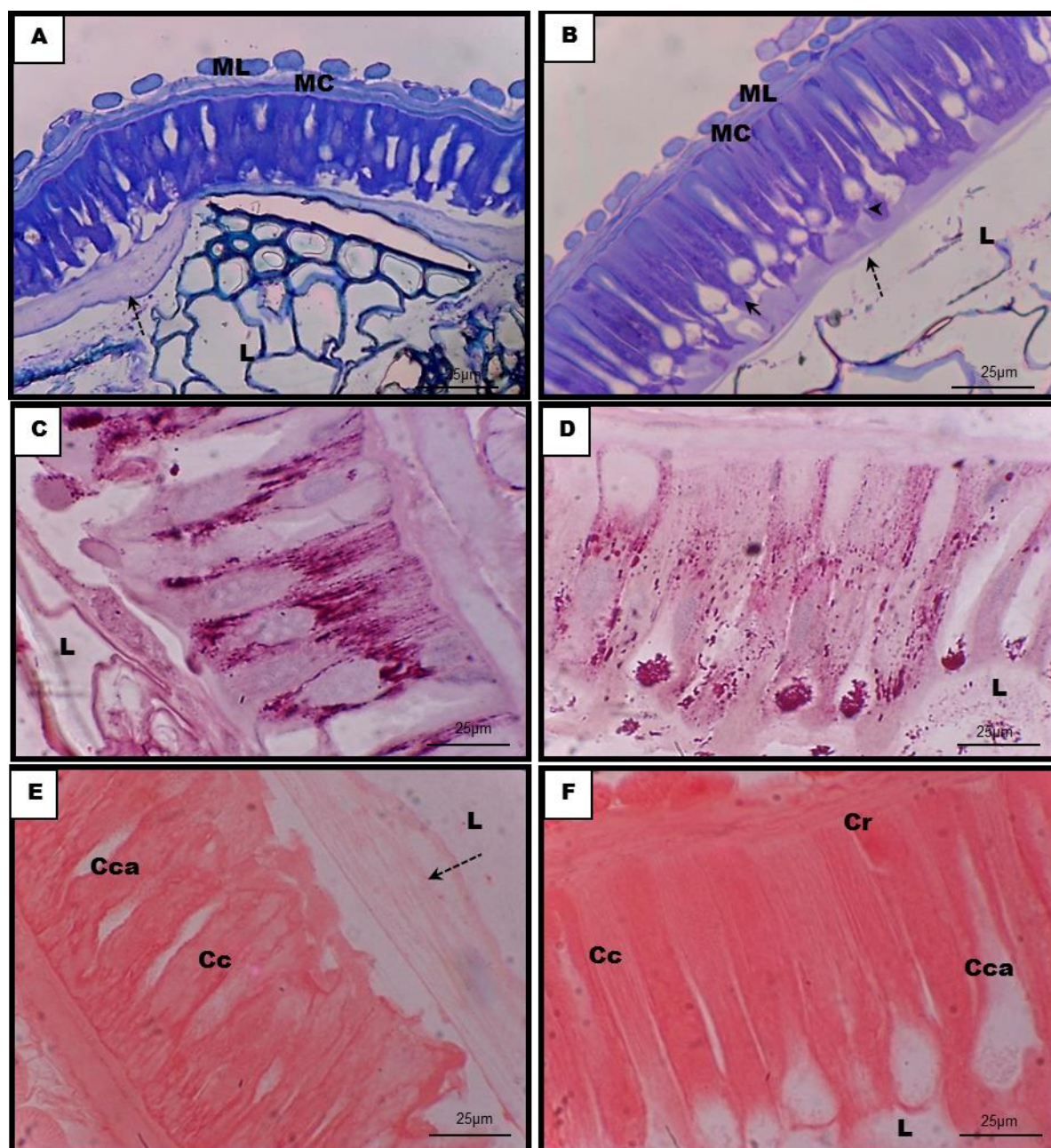


Figura 4. Intestino médio de lagartas *S. frugiperda* de sexto instar. (A) controle. (B) tratamento com 50mg/mL de óleo de citronela. Coloração Azul de toluidina. (C) controle. (D) tratado com 50mg/mL de óleo de citronela. Coloração P.A.S. (E) controle. (F) tratado com 50mg/mL de óleo de citronela. Coloração Xylidine Ponceau. Músculo longitudinal (ML), músculo circular (MC), Células colunares (Cc), núcleo (n), células caliciformes (Cca), células regenerativas (Cr), matriz peritrófica (seta pontilhada), lúmen (L).

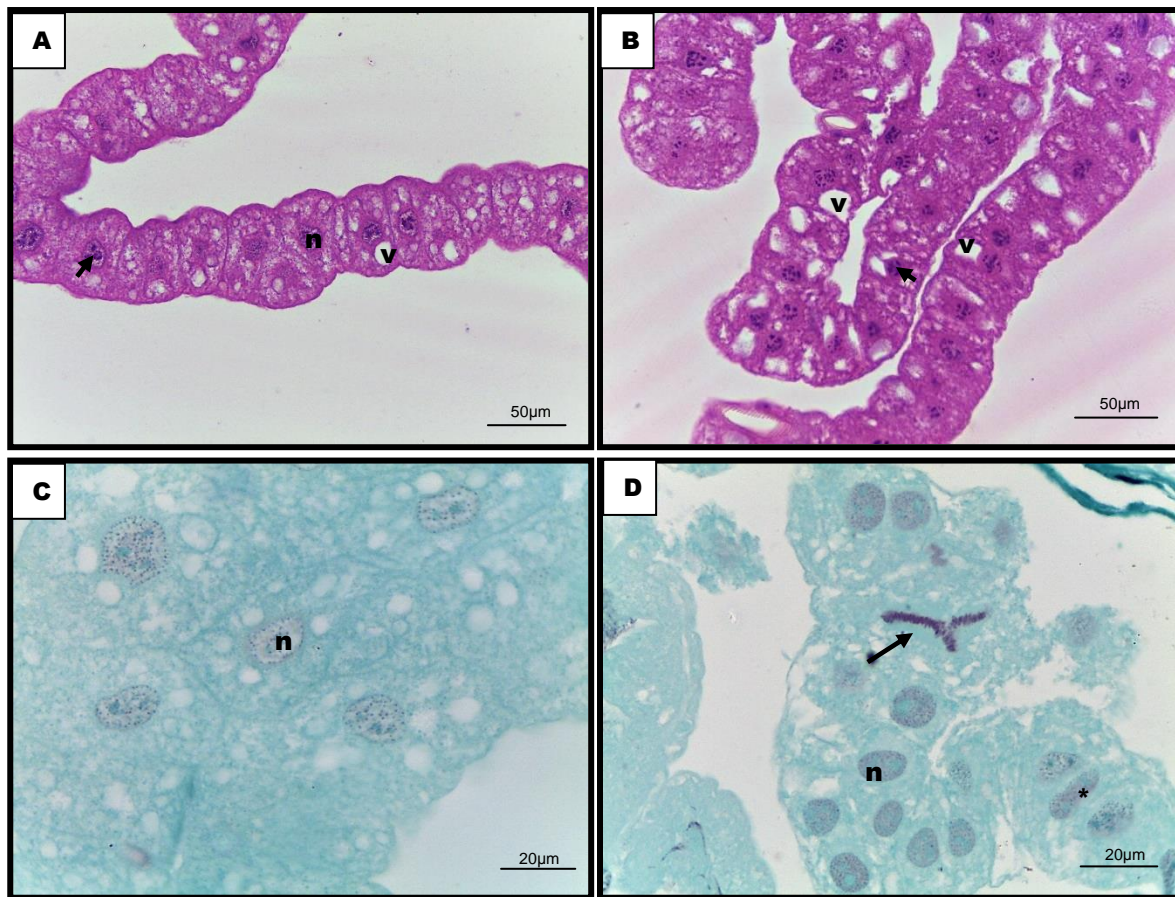


Figura 5. Morfologia do corpo gorduroso de lagartas *S. frugiperda* de sexto instar. (A) controle. Trofócitos justapostos, com grande quantidade de vesículas no citoplasma (v) e núcleos (n) com nucléolos (seta curta). e (B) tratamento com 50mg/mL do óleo de citronela. Observar aumento do tamanho e número de vesículas. Coloração Hematoxilina-Eosina. (C) controle observar trofócitos apresentando núcleos bastante eucromáticos. (D) tratamento com 50mg/mL do óleo de citronela. Evidenciar núcleos mais condensados, e alguns com morfologia alongada (asterisco) e cromossomos condensados (seta longa). Coloração pela técnica de Feulgen.

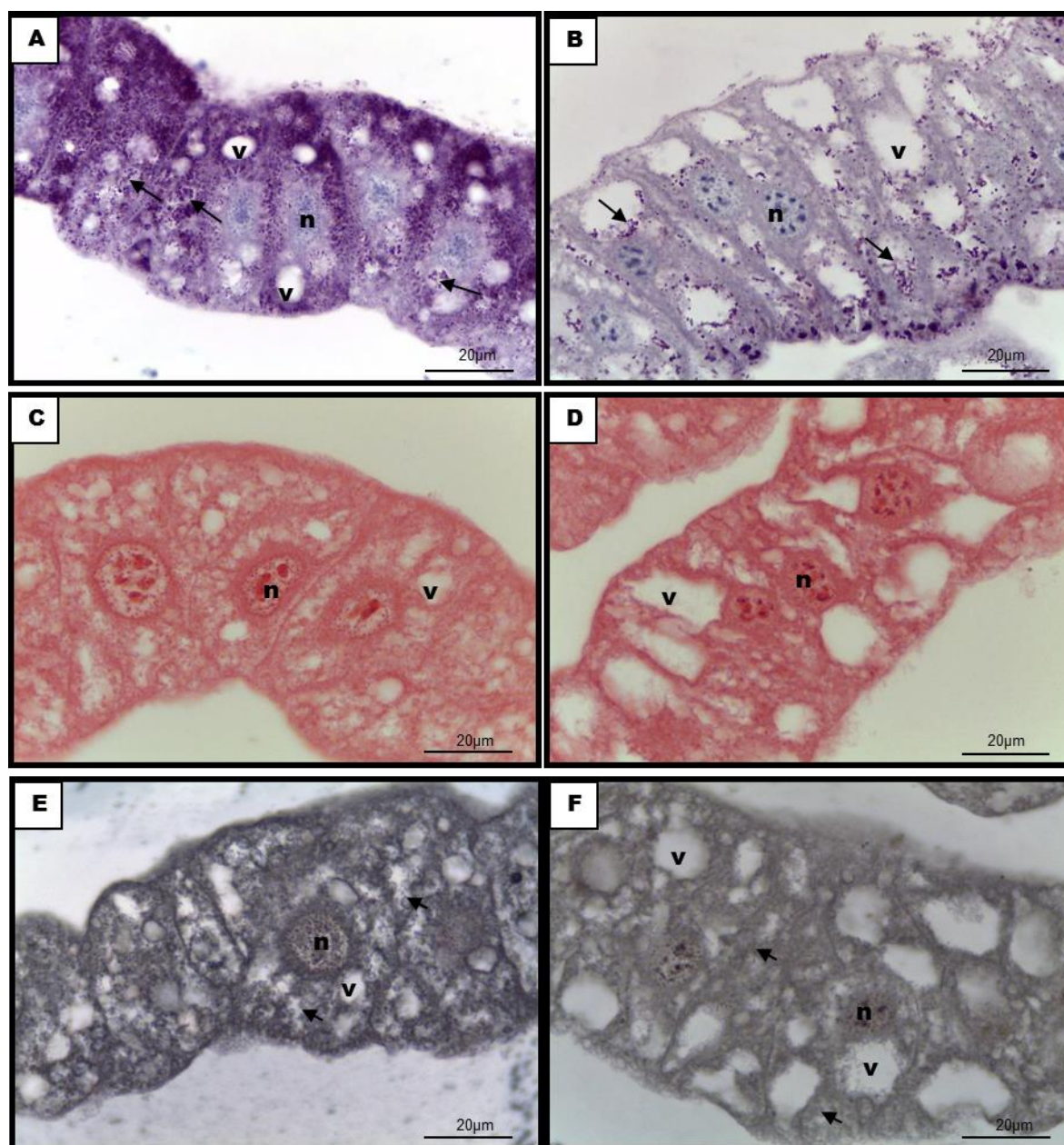


Figura 6. Histoquímica do corpo gorduroso (controle e tratado) de lagartas *S. frugiperda* de sexto instar. (A – B) controle e tratamento com 50mg/mL do óleo de citronela, respectivamente. Grande quantidade de glicogênio no citoplasma, com redução considerável no tratado. Glicogênio no interior de vacúolos (seta grande). Coloração com Ácido Periódico de Schiff. (C – D) controle e tratado, respectivamente. Proteína distribuída por todo citoplasma. Coloração Xylidine Ponceau. (E – F) controle e tratado, respectivamente. Lipídios distribuídos no citoplasma. Gotículas de lipídios (setas curtas). Coloração Sudan Black. Núcleo (n), vacúolos (v).

CAPÍTULO 3

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) TRATADAS COM DOSE SUBLETAL DO ÓLEO DE CITRONELA *Cymbopogon winterianus* JOWITT E SEU REFLEXO NA REPRODUÇÃO

Cristiane T. S. Silva¹, Valéria Wanderley-Teixeira², Franklin M. Cunha¹, José V. Oliveira¹,
Kamilla A. Dutra¹, Daniela Maria A.F. Navarro³ E Álvaro A.C. Teixeira²

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

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

³Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Química Fundamental, Universidade
Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-
PE, Brazil

Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. da Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. Parâmetros bioquímicos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) tratadas com dose subletal do óleo de citronela *Cymbopogon winterianus* Jowitt e seu reflexo na reprodução. Submetido a Pesticide Biochemistry and Physiology.

RESUMO – *Spodoptera frugiperda* é a principal praga do milho no Brasil. Buscas por novos métodos de controle que minimizem os efeitos adversos dos inseticidas sintéticos, promoveram o ressurgimento dos inseticidas botânicos. O óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus*) mostra ser eficiente como repelente e inseticida. Assim, avaliou-se mudanças no perfil bioquímico de lagartas tratadas com este óleo e seu reflexo na reprodução. Folhas de milho imersas em concentração de 50mg/mL foram oferecidas às lagartas de terceiro instar por 24h e avaliadas no sexto instar para estimativas dos níveis de proteínas, lipídeos, açúcares e glicogênio. Testículos e ovários de adultos após 24h de emergência foram coletados para análise histológica e histoquímica. Também foi observado o número de ovos e taxa de eclosão. Lagartas tratadas com o óleo apresentaram redução de proteína, lipídeos e açúcares totais e aumento de glicogênio. Testículo dos insetos do controle apresentou revestimento de tecido conjuntivo e cistos com abundantes espermatozoides. No entanto, no tratado com o óleo verificou-se intensa vacuolização periférica e redução de carboidratos neutros. Os ovários dos insetos do tratamento controle apresentaram-se com morfologia característica da espécie. Já os ovários dos insetos do tratamento com óleo apresentaram estratificação e afastamento das células foliculares, menor desenvolvimento das células nutrízes, menor quantidade de vitelo, bainha conjuntiva mais delgada e redução de proteínas e carboidratos neutros. Os ovos oriundos dos casais tratados com o óleo foram inviáveis. Portanto, o óleo de citronela em dose subletal altera o perfil bioquímico de lagartas de *S. frugiperda*, causando danos a sua histofisiologia reprodutiva.

PALAVRAS-CHAVE: lagarta-do-cartucho, óleo de citronela, metabolismo, testículo, ovários

BIOCHEMISTRY PARAMETERS OF *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) TREATED WITH
SUBLETHAL DOSE OF CITRONELLA OIL *Cymbopogon winterianus* JOWITT AND ITS
REFLECTION ON REPRODUCTION

ABSTRACT – *Spodoptera frugiperda* is the main pest of corn in Brazil. Searches for new control methods that minimize adverse effects of synthetic insecticides, promoted the resurgence of botanical insecticides. Citronella Oil (*Cymbopogon winterianus*) shows to be effective as repellent and insecticide. Thus, evaluated the changes in biochemistry parameters of treated larvae with this oil and its impact on reproduction. Corn leaves dippes in concentration of 50mg/mL were offered to third instar larvae and evaluated in sixth instar for estimate proteins, lipids, sugars and glycogen. Adults testis and ovarioles after 24h of emergency were collected for histological and histochemical analysis. Also was observed the number of eggs and hatching rate. Treated larvae with citronella oil showed reduction of total protein, lipids and sugars and increased glycogen. Testis of control insects presented lining connective tissue and cysts with abundant sperms. However, in treatment with oil there was intense peripheral vacuolation and reduction of neutral carbohydrates. The ovarioles of the control treatment insects presented with characteristic morphology of the species. Already the ovarioles of insects treated with oil showed stratification and removal of follicular cells, cells nurses less developed, smaller amount of yolk, sheath conjunctiva thinner and reduction of protein and neutral carbohydrates. The eggs came of couples treated with oil were unviable. Therefore, citronella oil in sublethal dose alters the biochemistry profile of armyworm, damaging their reproductive histophysiology.

KEY WORDS: armyworm, citronella oil, metabolism, testis, ovarioles

Introdução

Caracterizada como uma praga polífaga, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), alimenta-se de mais de 80 espécies de plantas, acometendo várias culturas de importância econômica e em diversos países, sendo conhecida no Brasil como principal praga do milho (Cruz 1995, Capinera 2001, Pogue 2002). Seu controle é feito, geralmente, com o emprego de inseticidas sintéticos, que apesar de eficientes, promovem diversos problemas ao agroecossistema e deixam resíduos tóxicos nos alimentos (Cruz 1995, Roel *et al.* 2000).

O emprego do Manejo Integrado de Pragas (MIP) proporcionou o ressurgimento da utilização dos inseticidas botânicos como uma alternativa viável e vantajosa no controle de pragas (Roel *et al.* 2000, Bogorni & Vendramim 2005, Isman 2006). A citronela de Java, *Cymbopogon winterianus* Jowitt, tem grande importância no Brasil devido à produção de seu óleo essencial (Martins 2006), e tem despertado interesse agrícola devido às referências sobre sua ação repelente e inseticida. Labinas & Crocomo (2002) mostraram que o óleo de citronela provocou deterrência alimentar e mortalidade em lagartas de *S. frugiperda*, através de testes de ingestão e/ou contato tópico.

A obtenção dos recursos nutricionais, como proteínas, lipídeos e carboidratos, que serão posteriormente empregados na sustentação das atividades reprodutivas, é variada em muitos lepidópteros, como no caso de *S. frugiperda*, onde os nutrientes acumulados durante a fase imatura são imprescindíveis na reprodução (Jervis & Ferns 2004, Milano *et al.* 2010).

Os inseticidas, sintéticos ou naturais, são capazes de provocar alterações no metabolismo dos insetos, prejudicando assim sua capacidade fisiológica (Orr & Downer 1982). Sharma *et al.* (2011) ressaltaram a importância de investigações sobre as mudanças nos parâmetros fisiológicos, a fim de avaliar e prever o efeito tóxico de fitoquímicos sobre a fisiologia dos insetos, tendo estes autores demonstrado alterações nos níveis bioquímicos de *Anopheles stephensi* (Liston) e *Culex*

quinquenfasciatus (Say) quando tratados com extratos de *Artemisia annua* (Linn.) e *Azadirachta indica* A. Juss.

O efeito de alguns inseticidas botânicos em doses subletais, exercendo alterações no sistema reprodutivo de insetos, tem sido citado na literatura. Alves *et al.* (2014) relataram alterações histopatológicas em testículos de lagartas e adultos, e ovários de adultos de *S. frugiperda* quando alimentadas com folhas de milho tratadas com *Piper hispidinervum* Jacq. Medina *et al.* (2004) verificaram a inibição da oogênese em *Chrysoperla carnea* (Stephens), tratada com Azadirachtin.

A influência dos efeitos e o modo de ação dos inseticidas são dependentes da concentração utilizada, de maneira que a morte ocorre nas concentrações maiores e os efeitos menos intensos e mais duradouros nas menores (Roel 2001). Assim, esta pesquisa objetivou avaliar as alterações provocadas por dose subletal do óleo de citronela, *C. winterianus*, nos parâmetros bioquímicos de *S. frugiperda* e seu reflexo na sua reprodução.

Material e Métodos

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/DMFA e no Centro de Apoio à Pesquisa/ Cenapesq da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Obtenção dos Insetos. Os insetos foram obtidos da criação estoque do laboratório de Histologia da UFRPE, onde as lagartas foram alimentadas com dieta artificial modificada para *Spodoptera*, segundo Busato *et al.* (2006), e os adultos com solução de mel a 10%, os quais foram mantidos em câmaras climatizadas do tipo B.O.D. a 25°C±0,2, 70% de UR e fotofase de 12h.

Para os experimentos, as lagartas foram alimentadas com folhas de milho híbrido duplo AG105, cultivados em casa de vegetação com duas plantas por vasos de 5L com solo misturado com húmus (2:1), acrescentando 12,1g N, P, K (formulação de 4:14:8).

Obtenção e Análise Cromatográfica do Óleo. O óleo essencial de citronela (*C. winterianus*) foi oriundo da Universidade Federal da Paraíba – Campus Bananeiras. A cromatografia foi realizada no Laboratório de Ecologia Química, do Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco.

O óleo essencial de citronela foi diluído em hexano e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em um sistema quadrupólo CG/EM da série Agilent 5975C (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), na qual a alíquota de 1 µL foi injetada em split 1:20. As condições de CG foram: hélio como gás carreador; temperatura inicial de 60°C por 3min, aumentando 2,5°C/min até 240°C e mantida nesta temperatura por 10 min. Espectrometria de massa: a 200°C e os espectros de massa registrados em 70eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5scan^{-s} de m/z 20-350.

Bioensaios. Para realização dos bioensaios, pedaços de folhas de milho de 20 a 40 dias de idade foram imersas na solução contendo o óleo essencial de citronela (50mg óleo essencial + 98mL água destilada + 2mL de DMSO) e para o grupo controle foram imersas apenas em solução de 98mL água destilada e 2mL de DMSO, e colocadas para secar em temperatura ambiente, e posteriormente oferecidas às lagartas de *S. frugiperda* com 10 dias de idade (3° instar), durante 24 horas, após esse intervalo de tempo, as lagartas passaram a ser alimentadas com folhas de milho não tratadas até o 6° instar. Cada tratamento constou de 60 lagartas individualizadas em potes plásticos de 80mL com tampa.

Testes Bioquímicos. Foram utilizadas lagartas de sexto instar inteiras maceradas em 5mL de tampão fosfato cada para determinação dos seguintes parâmetros:

Proteínas totais. Foram utilizados 200µL do macerado e acrescido mais 300µL de tampão fosfato e centrifugado a 2000 rpm durante 2min. Para quantificação foi utilizado o método de Bradford (1976) e analisado em espectrofotômetro a 595nm.

Glicogênio, Lipídeo e Açúcar. O conteúdo de glicogênio, açúcar e lipídeo foram avaliados, segundo o método de Van Handel (1985a, b). 200µL do homogeneizado foi acrescido de 200µL de sulfato de sódio mais 800µL de metanol e clorofórmio (1:1), e centrifugado a 2000rpm durante 2 min. O precipitado foi usado para a análise de glicogênio, e o sobrenadante transferido para outro tubo de ensaio, onde foram separados o lipídeo e o açúcar. O lipídeo foi analisado por espectrofotometria usando o método de ácido fosfórico-vanilina, enquanto que açúcar e glicogênio usando o método de ácido sulfúrico-antrona. A absorbância foi lida a 625 nm.

Foram utilizadas 10 repetições em duplicata por tratamento. Após as médias obtidas, os dados foram submetidos ao Test-t usando o programa SAS (SAS Institute, 2001).

Análise Histológica e Histoquímica das Gônadas de Adultos. Foram coletados ovaríolos e testículos de adultos de *S. frugiperda*, após 24h de emergência. Estes foram fixados em formol 10% por 24h e desidratados em banhos crescentes de álcool etílico (70 - 100%) por 10 min cada, embebidos em álcool+historesina (1:1) por 24h e incluídos em historesina Leica[®]. Cortes com 5 e 7µm de espessura foram obtidos em micrótomo LEICA RM2035. Os cortes foram submetidos às técnicas de coloração de Hematoxilina-Eosina (H-E) para morfologia, Tricômico de Mallory para colágeno, Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) para detecção de polissacarídeos neutros e Xylidine Ponceau para proteínas totais. A análise histológica e histoquímica foram realizadas utilizando-se um fotomicroscópio de luz de marca LEICA DM500.

Oviposição e Porcentagem de Lagartas Eclodidas. Para a contagem de ovos, foram formados 10 casais com adultos de *S. frugiperda*, recém-emergidos do tratamento controle, e cinco casais com adultos recém-emergidos do tratamento com óleo de citronela, em virtude da alta mortalidade dos insetos. Os casais foram acondicionados em gaiolas de tubo PVC de 10x15cm, recobertas com plástico filme e revestidas internamente com papel contínuo, como substrato para oviposição. O papel que recobria a gaiola foi trocado todos os dias para a coleta das massas de ovos. Fez-se a contagem de ovos postos e do número de lagartas eclodidas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste-T pelo programa SAS (SAS Institute, 2001).

Resultados

Composição Química do Óleo Essencial. A imagem do óleo de citronela, *C. winterianus*, revelou a presença de 62 compostos, dos quais, citrônial, geraniol e citrônolol apresentaram-se como compostos majoritários com 35,47%, 21,83% e 10,94%, respectivamente (Tabela 1).

Parâmetros Bioquímicos. Os testes bioquímicos mostraram que as lagartas de sexto instar do controle apresentaram níveis maiores de proteínas totais, $18,01 \pm 2,13 \mu\text{g/mL}$, do que as tratadas com óleo de citronela, $8,16 \pm 1,60 \mu\text{g/mL}$ ($t=3,68$; $P=0,0017$). Os níveis lipídicos nas lagartas do controle, $22,80 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$, também foram maiores em relação ao tratado, $16,38 \pm 2,19 \mu\text{g/mL}$ ($t=2,46$; $P=0,0255$), assim como, os níveis de açúcar também obtiveram uma redução do grupo tratado, com $44,54 \pm 4,86 \mu\text{g/mL}$, em relação ao controle com $69,06 \pm 6,35 \mu\text{g/mL}$ ($t=-3,06$; $P=0,0074$). No entanto, o níveis de glicogênio foi maior em lagartas tratadas com óleo de citronela, $166,35 \pm 23,30 \mu\text{g/mL}$, em relação ao controle, $89,43 \pm 17,03 \mu\text{g/mL}$ ($t=-2,66$; $P=0,0185$) (Fig. 1).

Histologia e Histoquímica dos Testículos de Adultos. Os testículos dos adultos provenientes do tratamento controle apresentaram-se revestidos por tecido conjuntivo, porém sem formação de septos, e conseqüentemente, sem os folículos testiculares característicos da fase larval, sendo verificada apenas abundância de cistos ricos em espermatozoides (Fig. 2A).

Os testículos dos adultos oriundos do tratamento com citronela exibiram o mesmo padrão morfológico do controle, contudo, evidenciou-se uma intensa vacuolização na periferia do órgão (Fig. 2B).

Em relação à detecção de carboidratos neutros, o testículo dos adultos do tratamento controle apresentou maior quantidade do que os observados nos adultos do tratamento com o óleo de citronela, devido a sua maior positividade ao P.A.S. (Figs. 2C e 2D). Aparentemente, ambos os tratamentos não apresentaram diferença na detecção de proteína pela Xylidine Ponceau (Figs. 2E e 2F).

Histologia e Histoquímica dos Ovariolos. Nos ovariolos dos insetos do tratamento controle, a região vitelária se apresentou bem desenvolvida, sendo o oócito revestido por um epitélio constituído de células foliculares, as quais possuem morfologia cuboide e núcleo esférico e central. Entre os ovócitos são encontradas células nutrízes, caracterizando o ovaríolo como meroístico politrófico. Estas células apresentaram citoplasma bastante volumoso e núcleo irregular. Revestindo os ovariolos há uma bainha de tecido conjuntivo (Fig. 3A). Já os ovariolos dos insetos do tratamento com óleo de citronela apresentaram alterações morfológicas caracterizadas por estratificação das células foliculares, presença de lacunas circundadas por epitélio no interior do vitelário, espaços sem vitelo, células nutrízes pouco desenvolvidas e bainha conjutiva mais delgada (Fig. 3B)

Ambos os ovariolos dos insetos do tratamento controle e tratamento com óleo de citronela, apresentaram positividade ao PAS, entretanto, no tratamento controle verificou-se reação mais

intensa caracterizando maior quantidade de polissacarídeos neutros (Figs. 3C e 3D). O mesmo efeito foi evidenciado para coloração com a Xylidine Ponceau (Figs. 3E e 3F).

Número de Ovos Postos e Porcentagem de Lagartas Eclodidas. O número de ovos postos por adultos oriundos do controle foi significativamente maior que os oriundos do tratamento com óleo de citronela, com taxa de viabilidade acima de 90%. Quanto aos ovos dos adultos provenientes do tratamento com óleo de citronela se mostraram inviáveis, visto que não houve eclosão de lagartas (Tabela 2).

Discussão

O citronelal, geraniol e citronelol foram detectados, respectivamente, como compostos majoritários do óleo essencial de *C. winterianus*. Estes compostos são classificados como monoterpenos, tendo o citronelal e o geraniol sido reportados com propriedades repelente e inseticida (Isman 2006, Chen & Viljoen 2010).

As mudanças na quantificação referente às proteínas, lipídeos, açúcares e glicogênio totais das lagartas de *S. frugiperda*, no sexto instar, provocadas pelo óleo essencial de citronela (*C. winterianus*), confirmam a propriedade dos inseticidas botânicos de interferir no perfil bioquímico dos insetos. Esses dados são reforçados pelos resultados obtidos por Senthilkumar *et al.* (2009), que relataram diminuição de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácido nucleicos em larvas de *A. stephensi* quando submetidas a diversos extratos vegetais. Sharma *et al.* (2011) evidenciaram a redução de proteínas, lipídeos e carboidratos em larvas *C. quinquefasciatus* e redução de proteínas e lipídeos, e aumento de carboidratos em larvas de *A. stephensi* tratadas com extrato de *A. annua*. O óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Miller reduziu estes mesmos constituintes químicos em lagartas de *Glyphodes pyloalis* Walker, segundo Yazdani *et al.* (2013).

Os lipídeos são grandes fontes de energia dos insetos, possuem funções estruturais, como fosfolipídeos das membranas celulares, e metabólicas. São obtidos através da digestão ou a partir de aminoácidos e açúcares simples, e armazenados no corpo gorduroso, principalmente como triglicerídeos (Gillott 2005, Chapman 2013). A redução de lipídeos totais em insetos é induzida por condições fisiológicas de estresse promovidas por extratos vegetais (Senthilkumar *et al.* 2009). Sharma *et al.* (2011) supõem que inseticidas botânicos apresentam efeito sobre o metabolismo lipídico e peroxidação, e a redução de lipídeo no insetos se deve à mudança no metabolismo da energia para o catabolismo de lipídeos como o resultado de estresse ao inseticida. Esse efeito também pode ser provenientes da menor absorção de lipídios pelas células colunares do intestino médio, em decorrência dos danos causados pelo óleo de citronela nessa região, assim como observamos em nossos trabalhos (dados não publicados).

As proteínas podem ter fins estruturais, enzimáticos, no transporte e armazenamento de moléculas, e como receptores (Chapman 2013). A síntese de proteínas nos estágios juvenis tardios de insetos holometabólicos e em fêmeas adultas é feita principalmente no corpo gorduroso (Gillott 2005). Sharma *et al.* (2011) propuseram que o declínio no teor de proteína é provavelmente devido à interferência inseticida do extrato com os hormônios que regulam a síntese proteica.

Carboidratos são importantes fontes energéticas dos insetos, além de funções estruturais, podem ser convertidos em lipídeos e participar da síntese de aminoácidos (Chapman 2013). A trealose é o principal açúcar circulante na hemolinfa do inseto, como fonte de energia imediata (Gillott 2005). Thompson (2003) observou que a síntese e degradação da trealose na hemolinfa estão sob controle hormonal envolvendo ambos os fatores hiper e hipotrealosêmico, e sua concentração é extremamente dependente das condições ambientais, estado fisiológico e nutricional do inseto. Assim a redução de açúcar em lagartas de *S. frugiperda* tratadas com citronela, também devem ter ocorrido devido ao estresse provocado pelo óleo.

Outro importante carboidrato é o glicogênio, armazenado no corpo gorduroso, que também pode ser encontrado no músculo, intestino e outros tecidos dos insetos (Oliveira & Cruz-Ladim 2003, Gillott 2005). Assim, como em nossos resultados, Berni *et al.* (2009) observaram o aumento nos níveis de glicogênio em *Ceratitis capitata* (Wied.) quando tratadas com Floxina B, no entanto foi notada uma realocação deste carboidrato nos tecidos deste inseto, reduzindo percentualmente no corpo gorduroso e músculos. Esta realocação também parece ter ocorrido em *S. frugiperda*, pois apesar do aumento de glicogênio nas lagartas (inteiras), em testes histoquímicos do corpo gorduroso observamos uma redução de glicogênio neste tecido (dados não publicados).

A presença de vacuolizações nos testículos de adultos de *S. frugiperda* ocasionada pelo óleo de citronela se assemelham aos danos provocados por Lufenuron nos testículos de *Schistocerca gregaria* (Forsk.), descritos por Ghazawy (2012), onde o epitélio testicular tornou-se mais espesso, vacuolado e separado da bainha peritoneal e com aumento de detritos dos testículos. Alves *et al.* (2014) também verificaram alterações provocadas pelo óleo de *P. hispidinavum* em testículos de larvas de *S. frugiperda*, onde ocorreram redução de cistos, vacuolização de células, além de não visualização de espermátides e espermatozoides, enquanto que nos adultos foram verificadas redução nos feixes espermáticos.

As alterações ocorridas nos ovários de *S. frugiperda* tratadas com óleo de citronela, como formação desorganizada das células foliculares e espaços sem vitelo pelo afastamento destas, são comparáveis aos danos por Azadiractina, através de testes tópicos, que provocou a degeneração de oócitos de *Heteracris littoralis* Ramb., onde as células foliculares foram parcialmente destruídas, e o material do vitelo, não-homogêneo, apresentou-se com muitos vacúolos. Os epitélios foliculares foram irregularmente desenvolvidos, mostrando evidente separação do vitelo (Ghazawy *et al.* 2007). Ghazaway (2012) também verificou alterações histopatológicas nos ovários de *S. gregaria* tratadas com Lufenuron, exibindo redução de vitelo no oócito,

apresentado-se não homogêneo e vacuolizado, e com diminuição e desintegração das camadas de células epiteliais foliculares.

A redução de proteínas e carboidratos nos ovários de *S. frugiperda* corrobora com os resultados encontrados por Alves *et al.* (2014), que relatam redução destes nutrientes nos ovários desta mesma espécie quando tratadas com óleo de *P. hispidinervum*. Bonhag (1956) evidenciou, em ovários politróficos de *Anisolabis maritima* (Géné), a síntese de glicogênio pelas células nutrízes, e fornecido ao oócito através de suas pontes plasmáticas. Assim, a redução de glicogênio devem ter ocorrido devido ao menor desenvolvimento das células nutrízes nos ovários do tratamento com o óleo de citronela.

A redução de proteínas em lagartas de *S. frugiperda* tratadas com citronela resultou na redução de proteínas no vitelo dos seus ovários. Uma vez que, grande parte dos recursos utilizados na produção de oócito é obtida durante o estágio larval Gillott (2005). É durante a maturação sexual, em fêmeas de muitas espécies, que o corpo gorduroso sintetiza e secreta na hemolinfa as proteínas do processo de vitelogênese, tais como, vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica, catepsina B e lipoforina, principais proteínas precursoras do vitelo incorporadas aos ovócitos em desenvolvimento (Raikhel *et al.* 2002, Gillott, 2005).

A inviabilização dos ovos de *S. frugiperda*, decorrentes das posturas feitas por fêmeas do tratamento com o óleo de citrolena, provavelmente tenha ocorrido em função das lesões patológicas ocorridas nas gônadas e redução de nutrientes envolvidos no processo de reprodução. Pois, segundo Engelman (1998), a quantidade de nutrientes e metabólitos secundários obtidos durante o processo de diferenciação dos ovários pode provocar alterações no processo de vitelogênese, maturação de óvulos e, assim, produção de ovos.

Dessa forma, podemos concluir que o óleo de citronela, na dose de 50mg/mL, é capaz de alterar a composição bioquímica das lagartas de *S. frugiperda* ao serem submetidas a alimentação

com esta dose, considerada subletal. Provocando assim, alterações histofisiológicas no sistema reprodutor dos adultos, capazes de inviabilizar a oviposição destes, mostrando ser uma eficiente e promissora ferramenta no controle desta praga.

Literatura Citada

- 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. 2014.** Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. Biotech. Histochem. 89: 245-255.
- Berni, J., A. Rabossi, L.M. Pujol-Lereis, D.S. Tolmasky & L.A. Quesada-Allué. 2009.** Phloxine B affects glycogen metabolism in larval stages of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Pestic. Biochem. and Physiol. 95: 12-17.
- Bogorni, P.C. & J.D. Vendramim. 2005.** Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia spp* sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. Neotrop. Entomol. 34: 311-317.
- Bonhag, P.F. 1956.** The origin and distribution of periodic acid-Schiff-positive substances in the oocyte of the eanvig, *Anisolabis maritima* (Géné). J. Morphol. 99: 433-464.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Busato, G.R., M.S. Garcia, A.E. Loeck, M. Zart, A.M. Nunes, O. Bernardi & F.S. Andersson. 2006.** Adequação de uma dieta artificial para os biótipos "milho" e "arroz" de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Bragantia 65: 317-323.
- Capinera, J.L. 2001.** Handbook of vegetable pests. San Diego: Academic Press. 2700p.

- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Chen, W. & A.M. Viljoen. 2010.** Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. South Afr. J. Bot. 76: 643–651.
- Cruz, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45 p. (Circular Técnica, n. 21).
- Engelmann, F. 1998.** *In vitro* germplasm conservation. Acta Hort. 461: 41-47.
- Ghazawy, N. 2012.** Ultrastructural observations on the gonads and neurosecretory cells of *Schistocerca gregaria* after treatment with Lufenuron (CGA-184699). J. Orthop. Res. 21: 141-148.
- Ghazawy, N.A., E.D. El-Shranoubi, M.M. El-Shazly & K.M. Abdel Rahman. 2007.** Effects of azadirachtin on mortality rate and reproductive system of the grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera: Acrididae). J. Orthop. Res. 16: 57-65.
- Gillott, C. 2005.** Entomology. Dordrecht, Springer 834p.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51: 45-66.
- Jervis, M.A. & P.N. Ferns. 2004.** The timing of egg maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and of resource allocation. Oikos 107: 449-460.
- 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.
- Martins, R.M. 2006.** Estudio in vitro de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. Rev. Bras. Pl. Med. 8: 71-78.

- Medina P., F. Budia, P. del Estal & E. Vinuela. 2004.** Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* reproduction: toxicity and ultrastructural approach. J. Econ. Entomol. 97: 43-50.
- Milano, P., E. Berti-Filho, J.R.P. Parra, M.L. Oda & F.L. Cônsoli. 2010.** Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade de espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae. Neotrop. entomol. 39: 172-180.
- Oliveira, V.T.P. & C. Cruz-Landim. 2003.** Morphology and function of insect fat body cells: a review. Biociência 11: 195-205.
- Orr, G.L. & R.G.H. Downer. 1982.** Effect of lindane (c-Hexachlorocyclohexane) on carbohydrate and lipid reserves in the American cockroach, *Periplaneta americana* L. Pestic. Biochem. Physiol. 17: 89-95.
- Pogue, M.G. 2002.** A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée: (Lepidoptera: Noctuidae). Philadelphia, American Entomological Society, 202p.
- Raikhel, A.S., V.A. Kokozei, J. Zhu, D. Martin, S.F. Wang, C. Li, G. Sun, A. Ahmed, A. Dittmei & N.G. Attardo. 2002.** Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. Ins. Bioc. Mol. Biol. 32: 1275-1286.
- Roel, A.R. 2001.** Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. Rev. Int. Desenv. Local 1: 43-50.
- Roel, A.R., J.D. Vendramim, R.T.S. Frighetto & N. Frighetto. 2000.** Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). An. Soc. Entomol. Brasil 29: 799-808.
- SAS Institute. 2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.

- Senthilkumar, N., P. Varma & G. Gurusubramanian. 2009.** Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the Malarial Vector, *Anopheles stephensi* (Liston) Parasitol. Res. 104: 237-244.
- Sharma, P., L. Mohan, K.K. Dua & C.N. Srivastava. 2011.** Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. Asian Pac. J. Trop. Med. 4: 301-304.
- Thompson, S.N. 2003.** Trehalose - The Insect 'Blood' Sugar. Adv. Insect Physiol. 31: 205-285.
- 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.
- 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.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de citronela *C. winterianus* com suas respectivas porcentagens

	Compostos	I.R.¹	I.R.²	Área(%)
1	α –Pineno	932	932	0,01
2	Hepten-2-one<6-methyl-5>	989	981	0,06
3	Mirceno	991	988	0,07
4	α –Felandreno	1003	1002	0,02
5	O- Cimenol	1024	1022	0,02
6	Limoneno	1028	1024	3,90
7	(Z)- β -Ocimenol	1039	1032	0,01
8	Bergamotol	1054	1051	0,05
9	γ -Terpineno	1058	1054	0,02
10	Terpinoleno	1088	1086	0,07
11	Linalol	1100	1095	1,15
12	(Z)- Rose oxide	1111	1106	0,03
13	(E)- Rose oxide	1128	1122	0,01
14	Isopulegol	1145	1145	1,22
15	P- Menth-3-en-8-ol	1148	1145	0,06
16	Citronelol	1154	1148	35,47
17	Menthone (iso)	1165	1158	0,03
18	Isopulegol (neoiso)	1168	1167	0,08
19	Terpinen-4-ol	1177	1174	0,06
20	α –Terpineol	1190	1186	0,06
21	Metil Chavicol	1198	1195	0,04
22	<n>- Decanal	1206	1201	0,08
23	Citronelol	1229	1223	10,94
24	Neral	1242	1235	0,33
25	Geraniol	1256	1249	21,83
26	Geranial	1271	1264	0,50
27	(E)- Anethole	1286	1282	0,72
28	Thymol	1292	1289	0,03
29	Menthol <8-hydroxy-neo>	1333	1328	0,21
30	Citronelil acetato	1354	1350	2,51
31	Eugenol	1358	1356	0,82
32	Neryl acetato	1365	1359	0,03
33	α –Copaeno	1378	1374	0,02
34	Geranil acetato	1384	1379	3,15

35	β -Elemeno	1393	1389	1,67
36	(E)-Cariofileno	1422	1417	0,11
37	β -Copaeno	1432	1430	0,03
38	Muurola-3,5-diene <E>	1454	1451	0,03
39	α -Humuleno	1457	1452	0,11
40	Dauca-5,8-diene	1467	1471	0,03
41	Cadina-1(6),4-diene <E>	1478	1475	0,05
42	γ -Muurolene	1481	1478	0,14
43	Germacreno-D	1486	1484	1,93
44	β -Selineno	1491	1489	0,06
45	Muurola-4(14),5-diene <E>	1497	1493	0,05
46	Cubebol <epi>	1499	1493	0,13
47	α -Muuronelo	1505	1500	0,45
48	Germacreno – A	1510	1508	0,38
49	γ -Cadineno	1519	1513	0,36
50	δ -Cadineno	1528	1522	2,02
51	Cadina-1,4-diene <E>	1536	1533	0,05
52	α -Cadineno	1541	1537	0,08
53	Elemol	1553	1548	3,73
54	Germacreno D-4-ol	1579	1574	0,45
55	Eudesmol <5-epi-7-epi- α >	1607	1607	0,03
56	Cubenol <1-epi>	1631	1627	0,05
57	γ -Eudesmol	1634	1630	0,58
58	Muurolol <epi- α >	1644	1640	0,86
59	α -Muurolol	1649	1644	0,15
60	β -Eudesmol	1653	1649	0,33
61	α -Cadinol	1657	1652	1,61
62	Bulnesol	1671	1670	0,16
TOTAL				99,24

¹Índice de retenção.

²Constituintes listados por ordem de eluição em uma coluna nonopolar DB-5.

Tabela 2. Média de ovos postos e da taxa de eclosão de lagartas de *S. frugiperda* oriundas de lagartas do terceiro instar tratadas ou não com óleo de citronela (*C. winterianus*) durante 24h. Mantidos em câmaras climatizadas do tipo B.O.D. a 25°C±0,2, 70% de UR e fotofase de 12h.

Tratamento	N ¹	Média de ovos ± E.P ²	Taxa de eclosão ± E.P ²
Controle	10	814,0 ± 92,48 a	94,5 ± 1,84 a
Citronela 50mg/mL	5	67,8 ± 49,01 b	-
Estatística F ^P		5,51 ^{0,0001*}	8,32 ^{0,0001*}

*Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente.

¹N (número de repetições)

²E.P. (Erro Padrão).

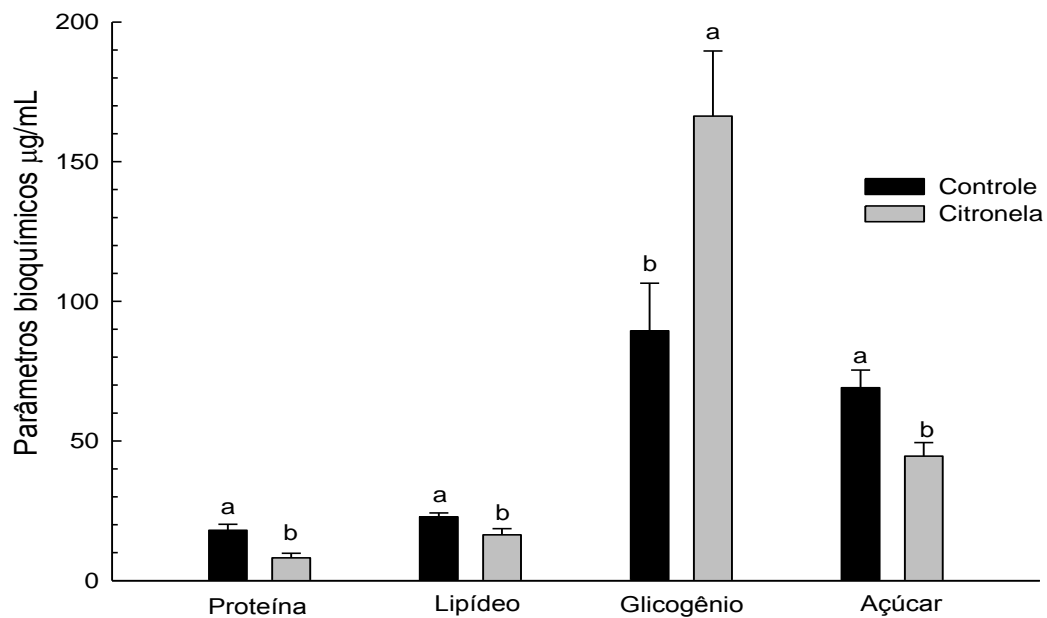


Figura 1. Níveis de proteína, lipídeos, glicogênio e açúcar em lagartas de *S. frugiperda* de sexto instar oriundas de lagartas do terceiro instar tratadas ou não com óleo de citronela (*C. winterianus*) durante 24h. Os dados foram obtidos das médias \pm E.P. de 10 lagartas. Médias com diferentes letras diferem significativamente.

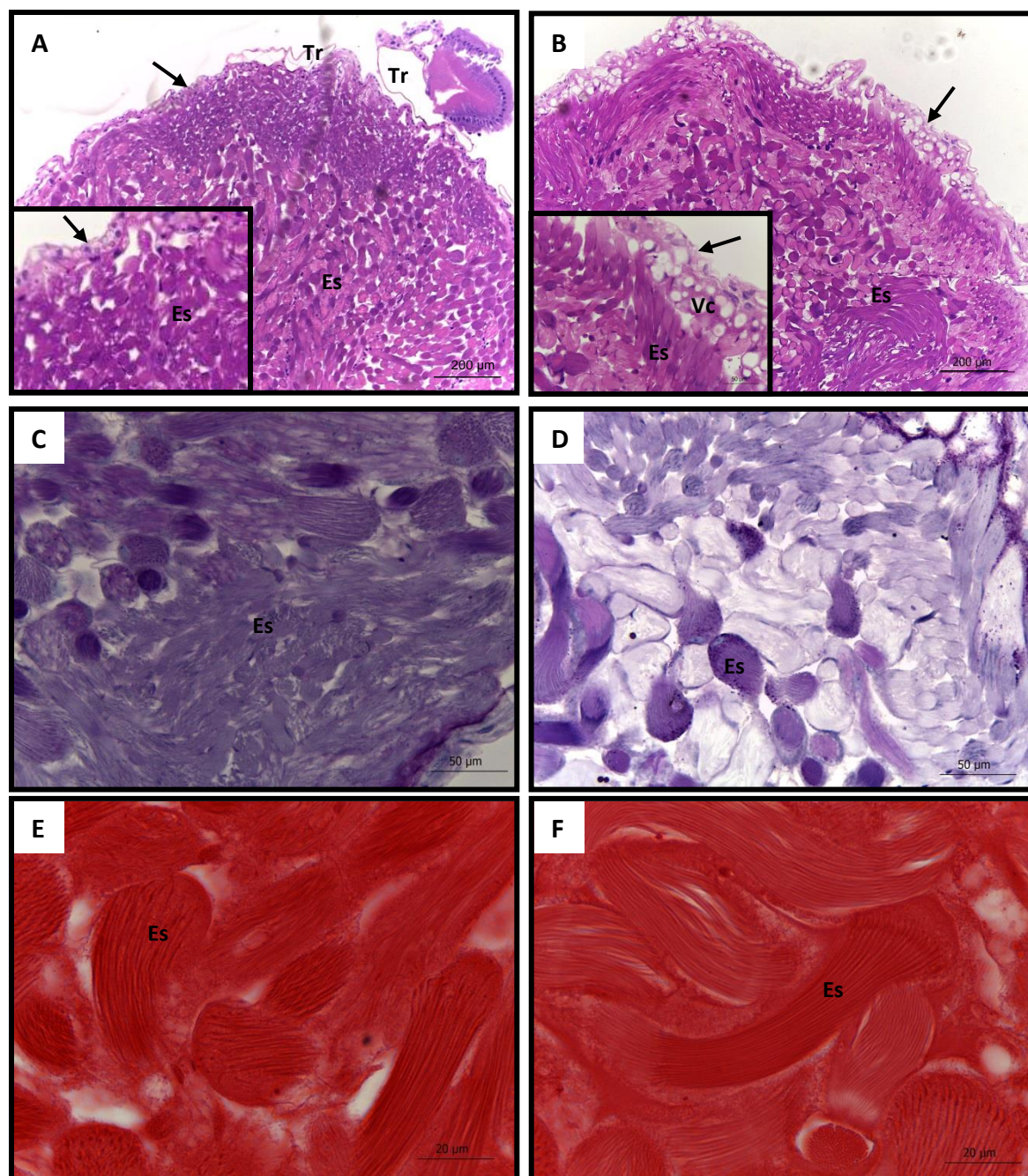


Figura 2. Testículo de adulto de *S. frugiperda*. (A) controle. Observar tecido conjuntivo (setas) recobrindo o órgão. No interior do testículo notar numerosos cistos com espermatozoides (Es). Em destaque, tecido conjuntivo (ponta de seta). Traqueíolas (Tr). (B) Tratamento com óleo de citronela. Em destaque, observar presença de numerosos vacúolos (Vc) na periferia do testículo. Coloração H-E. (C) Verificar maior positividade P.A.S. nos espermatozoides do tratamento controle em relação aos espermatozoides do tratamento com óleo de citronela (D). (E - F) controle e tratamento com citronela. Coloração Xylidine Ponceau.

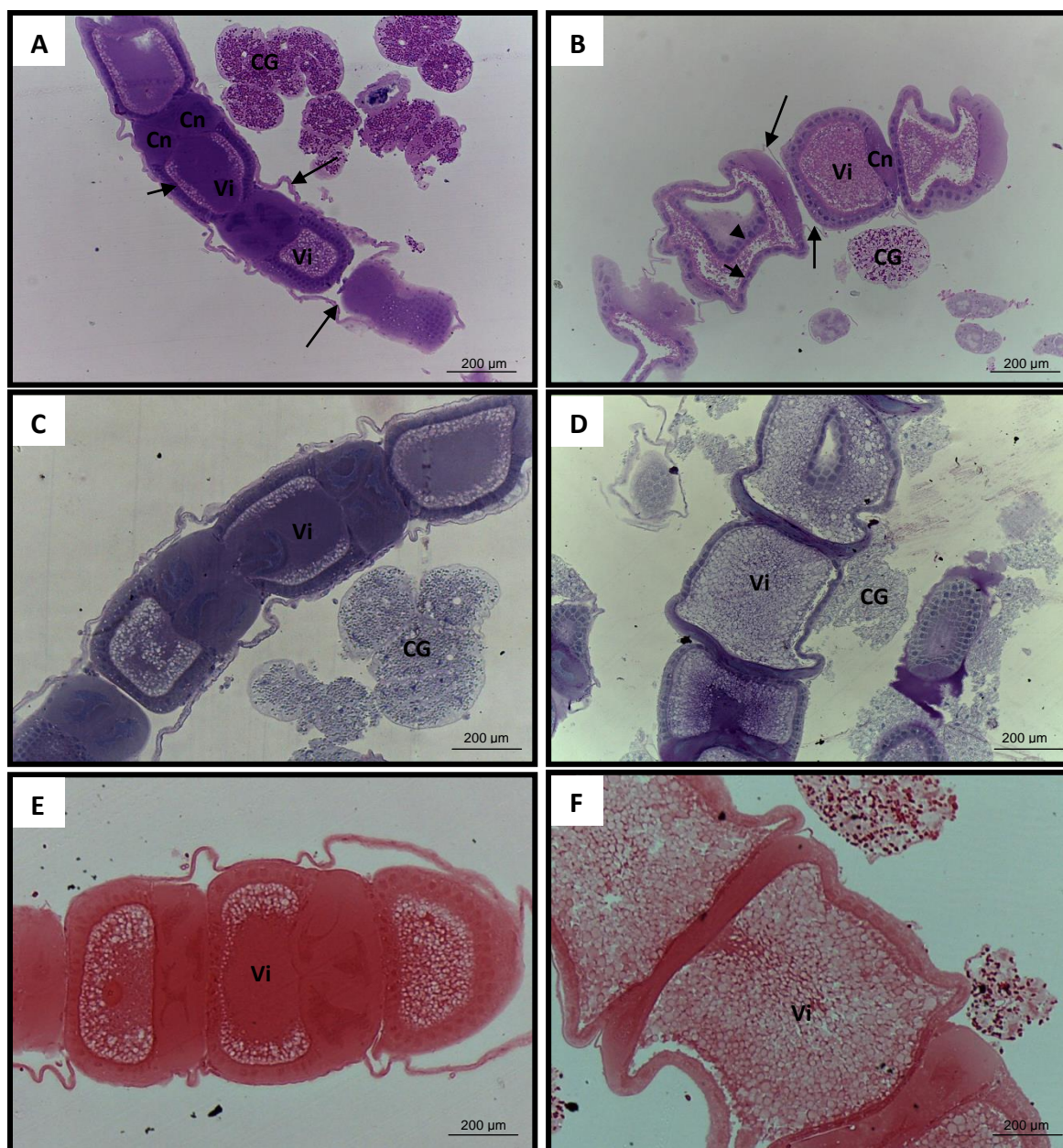


Figura 3. Ovari6los de adulto de *S. frugiperda*. (A) controle. Observar 66lulas nutrizes caracter6stico de ovari6lo mero6stico politr6fico (Cn). Notar ainda tecido conjuntivo (setas longa) recobrindo o 6rg6o, 66lulas foliculares (seta curta) revestindo o o6cito rico em vitelo (Vi) e corpo gorduroso (CG) pr6ximo ao 6rg6o. (B) Tratamento com 6leo de citronela. Evidenciar menor desenvolvimento das 66lulas nutrizes (Cn), estratifica66o das 66lulas foliculares (ponta de seta), redu66o do vitelo (Vi) e bainha de revestimento mais delgada (seta longa). Colora66o H-E. (C) Verificar maior positividade P.A.S. nos ovari6los do tratamento controle em rela66o aos do tratamento com 6leo de citronela (D). Verificar maior detec66o de prote6nas no controle (E) em rela66o ao tratamento com citronela (F). Colora66o Xylidine Ponceau.