

SELETIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha spicata* L. E *Melaleuca alternifolia* CHEEL EM *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) APÓS ALIMENTAÇÃO COM *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: EREBIDAE)

por

VALESKA ANDREA ÁTICO BRAGA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE)

RESUMO

Podisus nigrispinus é um predador generalista que atua no controle biológico de pragas desfolhadoras, como *Alabama argillacea*. Os óleos essenciais de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia* apresentam ação inseticida comprovada, mas seus efeitos sobre inimigos naturais são pouco conhecidos. Nesse contexto, a pesquisa objetivou: (i) investigar os efeitos por ingestão da DL₅₀ dos óleos essenciais de *M. spicata* (2,50 mg/g) e *M. alternifolia* (2,82 mg/g) após os períodos de 12, 24 e 48 horas sobre a histologia, histoquímica e imunohistoquímica do intestino médio de ninfas de quinto ínstar de *P. nigrispinus* e (ii) investigar o efeito por ingestão da DL₅₀ dos mesmos óleos na nutrição, avaliando-se os índices de proteínas, glicogênio, açúcares e lipídios, e na reprodução, utilizando-se os parâmetros: período de pré-oviposição, número de posturas, número de ovos, número de ovos por postura, percentagem de viabilidade dos ovos e longevidade de fêmeas. O óleo de *M. spicata* não provocou alterações histológicas, mas promoveu uma redução nos valores de carboidratos encontrados no intestino médio, nos períodos de 24 horas e 48 horas, e na viabilidade de ovos. Já o óleo de *M. alternifolia* causou mudanças histopatológicas, tais como alongamento das células colunares e lise celular, descritas como sintomas necróticos; redução no número de células regenerativas no período de 48 horas; redução

no quantitativo de carboidratos do tecido epitelial nos períodos de 24 e 48 horas; e alterações nutricionais e reprodutivas, sendo elas, respectivamente, o aumento na quantidade de proteínas e a redução do número de ovos por postura e a viabilidade de ovos. Dessa forma, não se recomenda a utilização do óleo de *M. alternifolia* em associação com o predador *P. nigrispinus*, visto que este demonstrou baixa especificidade. Porém, o óleo de *M. spicata* demonstra potencial de utilização, uma vez que não comprometeu características vitais.

PALAVRAS-CHAVE: Apoptose, curuquerê-do-algodoeiro, inseticida botânico, necrose, parâmetros biológicos, trato digestivo.

SELECTIVITY OF *Mentha spicata* L. E *Melaleuca alternifolia* CHEEL ESSENTIAL OILS
IN *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) FED WITH *Alabama*
argillacea (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: EREBIDAE)

por

VALESKA ANDREA ÁTICO BRAGA

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

ABSTRACT

Podisus nigrispinus is a generalist predator used in biological control to manage defoliating pests, such as *Alabama argillacea*. Essential oils *Mentha spicata* and *Melaleuca alternifolia* have a known insecticidal activity, but a conclusion to the extent of their effects on natural enemies has not been reached yet. With this consideration, the main goals of this research were: (i) to investigate the effects of *M. spicata* (2,50 mg/g) and *M. alternifolia* (2,82 mg/g) LD₅₀ ingestion after times of 12, 24 and 48 hours, regarding histology, histochemistry and immunohistochemistry of the median region of the *P. nigrispinus* midgut, fifth instar nymphs, and (ii) to investigate the effects of LD₅₀ of the same oils on nutritional parameters, evaluating the protein, glycogen, sugar and lipid rates, as well as their reproduction cycles, by using the following parameters: pre-oviposition period, number of postures, number of eggs, number of eggs per posture, percentage of viability of eggs and longevity in females. *M. spicata* did not cause any histological changes, rather induced a reduction in the values of carbohydrates found in the midgut after 24 and 48 hours and in *P. nigrispinus* eggs viability. However, the experiment with *M. alternifolia* oil resulted in histopathological changes, such as elongation of columnar cells and cell lysis, both described as necrotic changes; reduction of regenerative cells after 48 hours;

reduction in quantity of carbohydrates after 24 and 48 hours, besides nutritional and reproductive alterations, respectively, an increase in the quantity of proteins, as well as a reduction of the number of eggs per posture and the viability of eggs. Consequently, the association of the usage of *M. alternifolia* essential oil in fields with *P. nigrispinus* is not recommended, because they have demonstrated low specificity. However, *M. spicata* oil can be used, since has not compromised the subject's vital characteristics.

KEY WORDS: Apoptosis, cotton leaf worm, botanical insecticide, necrosis, biological parameters, digestive tract

SELETIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha spicata* L. E *Melaleuca
alternifolia* CHEEL EM *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)
APÓS ALIMENTAÇÃO COM *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: EREBIDAE)

por

VALESKA ANDREA ÁTICO BRAGA

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
Mestra em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2019

SELETIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha spicata* L. E *Melaleuca
alternifolia* CHEEL EM *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)
APÓS ALIMENTAÇÃO COM *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: EREBIDAE)

por

VALESKA ANDREA ÁTICO BRAGA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Glaucilane dos Santos Cruz – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

SELETIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha spicata* L. E *Melaleuca
alternifolia* CHEEL EM *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)
APÓS ALIMENTAÇÃO COM *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: EREBIDAE)

por

VALESKA ANDREA ÁTICO BRAGA

Orientadora: _____
Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Examinadores: _____
Glaucilane dos Santos Cruz – PNPd/CAPES

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

Aos meus pais,
Carlos Alberto Lima Braga e Vera Lúcia Gonzaga Ático Lima,
À minha família e a mim mesma,
Com amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

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

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

À minha orientadora, Professora Valéria Wanderley Teixeira, pela oportunidade e confiança em ter aceito me orientar. Bem como por todo o apoio, colaboração, paciência e dedicação prestados durante o desenvolvimento desse trabalho.

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

À minha co-orientadora, Glaucilane dos Santos Cruz, por todos os ensinamentos, por toda a paciência e por sempre estar de alto astral, fazendo todos ao seu redor rirem. E, sobretudo, pela amizade conquistada no decorrer desse período.

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

Ao Centro de Apoio à Pesquisa da UFRPE (CENAPESQ) pela disponibilização de equipamentos.

À Unidade de Controle Biológico (UCB) da Embrapa Algodão, Campina Grande/PB por ter disponibilizado insetos para as criações utilizadas.

A Marcelo Moura, por ter me auxiliado durante a graduação e acreditado em meu potencial, me apresentando a professora Valéria para que eu ingressasse na pós-graduação.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia de Insetos Andrezo, Carol, Clara, Cris, Hilton e Luan por todos os momentos de risadas e descontração no laboratório, fazendo deste um ambiente prazeroso de se trabalhar. Em especial a Andrezo, Carol, Cris e Hilton por toda a ajuda e apoio prestados no decorrer desse ano de pesquisa.

A Aline e Andrezo por todos os ensinamentos referentes a *Alabama argillacea* e a Cristiane pelos ensinamentos referentes a *Podisus nigrispinus*.

A Carolline e Edna por terem auxiliado na execução do procedimento de apoptose.

A Seu Luís por ter auxiliado no cultivo das plantas na casa de vegetação.

Ao laboratório de Controle Biológico, em especial a Anderson, pela disponibilização de *Tenebrio molitor* e *Podisus nigrispinus* quando as criações deram baixa, permitindo a finalização desse trabalho.

Aos meus pais, Carlos Alberto Lima Braga e Vera Lúcia Gonzaga Ático Lima, por todo o amor e apoio a minha formação acadêmica e a conclusão desse curso.

A minha irmã, Veruska Carla Ático Braga, por todo o apoio e por fazer parte da minha construção pessoal.

A meu sobrinho, Antônio Carlos Braga Xavier, com muito amor.

A meu namorado, Italo Victor de Assis Sobral, por toda a dedicação, apoio e ajuda prestada no decorrer desse curso. Por nunca ter deixado de acreditar no meu potencial e por todo o suporte oferecido. E, sobretudo, por sempre ter estado ao meu lado.

A meu amigo, Hugo Filho, por todo o apoio e por todos os momentos compartilhados na UFRPE e fora da universidade, que foram imprescindíveis para descontração dos momentos de estresse.

Em suma, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	10
2 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Mentha spicata</i> L. E <i>Melaleuca alternifolia</i> CHEEL SOBRE O INTESTINO MÉDIO DE <i>Podisus nigrispinus</i> (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO.....	28
AGRADECIMENTOS.....	32
LITERATURA CITADA.....	32
3 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Mentha spicata</i> L. E <i>Melaleuca alternifolia</i> CHEEL SOBRE A NUTRIÇÃO E REPRODUÇÃO DE <i>Podisus nigrispinus</i> (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)	47
RESUMO	48
ABSTRACT	49

INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS	56
DISCUSSÃO.....	57
AGRADECIMENTOS.....	59
LITERATURA CITADA.....	60
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é de grande importância comercial em todo o mundo e mais de 60 países são responsáveis por seu cultivo (Abrapa 2016). O Brasil é um dos cinco maiores produtores mundiais, junto com a China, Índia, Estados Unidos e Paquistão, além de ser um dos maiores exportadores. A região Centro-Oeste e Nordeste são as maiores produtoras, apresentando Mato Grosso e Bahia como os estados mais importantes, respectivamente (Conab 2018). Por outro lado, a presença de pragas é uma das maiores responsáveis pela queda na produtividade e pelos custos da cultura, devido ao uso de inseticidas para seu controle (Imea 2018).

Uma das principais espécies de pragas desfolhadoras presentes na cotonicultura é *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidae), comumente conhecida como curuquerê-do-algodoeiro (Rodrigues & Silvie 2016). É uma espécie nativa da América Central e do Sul e uma das principais pragas das fases inicial ou vegetativa do algodoeiro. Pode provocar elevados prejuízos à produção graças ao consumo de até 66 cm² de área foliar durante seu desenvolvimento, o que causa uma desfolha intensa das plantas e, conseqüentemente, reduz sua capacidade fotossintética. Sua ocorrência se dá durante todo o período de cultivo, mas sua população varia de acordo com as condições climáticas e a idade da planta. No Nordeste é considerada como praga-chave ou primária e pode surgir logo após a emergência das plantas (Miranda *et al.* 2002, Sujii *et al.* 2007).

Os ovos de *A. argillacea* apresentam aproximadamente 0,6 mm de diâmetro, coloração azul-esverdeada e morfologia circular e achatada. As lagartas apresentam o comprimento de até

40 mm e uma coloração que varia entre verde-amarelado e verde-escuro ou quase preto, com duas listras longitudinais e cabeça de cor amarela com pontuações pretas. Apresentam o hábito de saltarem em resposta ao toque e se locomovem como “mede palmo” (Almeida *et al.* 2008). Nas temperaturas de 20 e 25°C e fotoperíodo de 14 horas as lagartas apresentam seis ínstaes e nas temperaturas de 30 e 35°C com o mesmo fotoperíodo apresentam cinco instares (Kasten Júnior & Parra 1984).

As pupas apresentam um formato reniforme, são afiladas na parte posterior e tem uma coloração castanho-escuro (Almeida *et al.* 2008). Essa fase dura em média 8 ou 9 dias a 25°C e as pupas escurecem próximo a emergência dos adultos, que ocorre durante o período noturno (Kasten Júnior & Parra 1984). Os adultos são mariposas de hábito preferencialmente noturno, com aproximadamente 30 mm de envergadura, uma coloração marrom avermelhada e duas manchas reniformes nas asas anteriores (Parra *et al.* 1984, Almeida *et al.* 2008). O ciclo dessa espécie dura aproximadamente 26,88 dias quando em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 14 horas, na variedade IAC-17 (Kasten Júnior & Parra 1984).

Até aproximadamente a década de 1960 e 1970, o controle dessa e de outras pragas no cultivo do algodão era realizado principalmente pelo método químico, utilizando-se inseticidas sintéticos. A partir de 1970, a utilização desses produtos começou a reduzir, apesar de ainda haver seu intenso consumo, e houve um aumento no interesse da manutenção da qualidade do ecossistema, devido à constatação dos possíveis prejuízos ao meio ambiente e à saúde humana (Luttrell *et al.* 1994, Carneiro *et al.* 2015). Entre os danos ao ambiente, podem ser citados: o processo de degradação do solo, a partir de sua esterilização; os danos no sistema imunológico de animais; a redução na população de polinizadores; a contaminação de águas superficiais e subterrâneas; a morte de predadores naturais; a diminuição da diversidade de espécies

parasitoides, entre outros. Entre os agravos à saúde humana, pode haver intoxicações agudas ou crônicas (Sujii. *et al.* 2007, Carneiro *et al.* 2015).

Em um ecossistema natural, a população de herbívoros é controlada por inimigos naturais, tais como predadores e parasitoides, e por defesas intrínsecas a planta. No entanto, os inseticidas sintéticos citados anteriormente podem afetar esses insetos benéficos, fato que não deve ocorrer em um manejo integrado eficiente. Para isso, se faz necessária a utilização de produtos considerados seletivos, ou seja, produtos que controlem eficientemente os insetos praga, mas causem pouco ou nenhum impacto a outros organismos (Moura & Rocha 2006). Essa seletividade pode ser fisiológica ou ecológica. Na primeira, há a utilização de inseticidas mais tóxicos à praga que aos seus inimigos naturais. Já na segunda, visa-se alterar as formas de utilização dos inseticidas para minimizar a exposição do inimigo natural (Ripper *et al.* 1951, O'brien 1960).

O algodoeiro demonstra ser um hábitat adequado para diversas espécies predadoras de *A. argillacea*. Predadores nativos são importantes para o seu controle uma vez que, dentre os inimigos naturais, são considerados como a primeira linha de defesa das plantas contra fitófagos (Whitcomb 1981, Luttrell *et al.* 1994). Gravena & Cunha (1991) encontraram diversas espécies pertencentes às ordens: Coleoptera, Dermaptera, Hemiptera, Hymenoptera e Neuroptera. Entre as famílias de Hemiptera encontradas estava a Pentatomidae. Diversas espécies de percevejos pentatomídeos predam vários insetos de importância econômica, se alimentando por um mecanismo conhecido como digestão extra oral, onde inserem seus estiletes bucais no corpo da presa, causando uma paralisia progressiva (Azevedo *et al.* 2007, Pereira *et al.* 2008). As principais espécies de inimigos naturais de lagartas desfolhadoras presentes no Brasil são os percevejos generalistas pertencentes ao gênero *Podisus* (Zanuncio 1993).

Podisus possui um grande número de espécies entomófagas, em sua maioria generalistas, que se alimentam primariamente de lepidópteros e coleópteros. As espécies predadoras

pertencentes a esse gênero possuem potencial para uso no controle de *A. argillacea* (Gravena & Cunha 1991, Santos *et al.* 2015).

Podisus nigrispinus (Dallas) é um predador generalista encontrado na região neotropical, que apresenta uma alta taxa de predação e dispersão e pode ser criado em laboratório utilizando presas alternativas ou uma dieta artificial (Torres *et al.* 2006). As ninfas e adultos se alimentam de larvas, pupas e adultos de lepidópteros, sendo utilizado no controle biológico de pragas em culturas de relevância econômica, como a de algodão, predando *A. argillacea* (Medeiros *et al.* 2003, Torres *et al.* 2006, Pereira *et al.* 2009).

P. nigrispinus também está presente em cultivos de tomate, predando *Chrysodeixis chalcites* (Esper) e *Spodoptera* spp. em cultivos protegidos; de soja, predando *Anticarsia gemmatalis* Hübner e cultivo orgânico de brássicas consumindo *Plutella xylostella* (L.) (De Clercq *et al.* 1998, De Clercq *et al.* 2000, Ferreira *et al.* 2008, Silva-Torres *et al.* 2010).

Quando em temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de 70–85% e fotoperíodo de 12h, o ciclo de vida dessa espécie apresenta as fases de ovo, cinco estádios ninfais e a fase adulta, que emerge 18 a 30 dias após a oviposição. Ninfas de primeiro e segundo ínstaes possuem coloração marrom escura e as de quarto e quinto ínstaes apresentam coloração vermelha e preta. Nos adultos, há a presença de asas (hemiélitro) e espinhos laterais no pronoto. Os machos apresentam coloração esverdeada e são geralmente menores que as fêmeas, que possuem cor marrom-avermelhada ou pálido-esverdeada. A oviposição é realizada em pequenas massas de ovos, contendo até 40 unidades (Torres *et al.* 2006, Simonato *et al.* 2014).

Fêmeas criadas em laboratório na temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 14 horas e alimentadas com *Tenebrio molitor* Linnaeus apresentaram uma taxa de oviposição de até 565 ovos durante seu ciclo de vida e quando alimentadas com *Diatraea saccharalis* Fabricius, em temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas apresentaram uma taxa de oviposição de até 816

ovos (Espindula *et al.* 2006, Bortoli *et al.* 2016). Quando alimentadas com lagartas de *A. argillacea* em temperatura média de 25°C e fotoperíodo de 14 horas, a oviposição pode ser de até 200 ovos, mas a maior capacidade de oviposição ocorre entre 8 e 18 dias de idade, com uma média de aproximadamente 9 ovos/dia (Medeiros *et al.* 2000, Torres & Zanuncio 2001).

As ninfas de primeiro ínstar dessa espécie não se alimentam e as de segundo, terceiro, quarto e quinto ínstars, quando alimentadas diariamente com lagartas de *A. argillacea* em folhas de algodoeiro, apresentaram uma duração média de 4; 3,6; 3,4 e 6,2, respectivamente, sob as condições de campo de $25,8 \pm 4,8^\circ\text{C}$ e $78,1 \pm 20,1\%$ de umidade relativa (Evangelista Jr. *et al.* 2003, Oliveira *et al.* 2002). A longevidade de fêmeas de *P. nigrispinus*, quando criadas em laboratório a 25°C e fotoperíodo de 14 horas e alimentadas com pupas de *T. molitor*, varia de 42 a 55,5 dias (Espindula *et al.* 2006).

Quando as ninfas e adultos do predador *P. nigrispinus* foram criados em laboratório na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e alimentados com as presas *S. frugipereda*, *A. gemmatilis*, *D. saccharalis*, *T. molitor* e *Musca domestica* Linnaeus, observou-se um consumo diário de, respectivamente, 1,11; 1,12; 1,11; 1,06 e 1,46 para as ninfas e 1,25; 1,24; 1,25; 1,20 e 1,66 para adultos (Bortoli *et al.* 2016). No experimento realizado por Oliveira *et al.* (2002) em plantas de algodão, a $28 \pm 4,8^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, as fêmeas de *P. nigrispinus* predaram diariamente aproximadamente 1,11 lagartas e um total aproximado de 43 lagartas de *A. argillacea* durante a fase adulta e as ninfas que originaram as fêmeas predaram uma média de 54,7 lagartas durante a fase ninfal.

Portanto, a manutenção desse e de outros inimigos naturais no agroecossistema é de extrema importância e traz muitos benefícios, visto que possibilita a regulação da população de pragas abaixo do nível de dano econômico (Fadini *et al.* 2004). Entretanto, o uso de inseticidas com baixa seletividade expõe esses insetos à contaminação pelos compostos químicos utilizados, pois,

uma vez que se alimentam de presas contaminadas, podem ingerir doses dos compostos (Ruberson *et al.* 1998).

Martínez *et al.* (2018) ao tratar por ingestão adultos de *P. nigrispinus* com a CL_{50} , 0,468 $\mu\text{g L}^{-1}$, do inseticida permetrina observaram redução em sua sobrevivência após 72 horas (47,1% em comparação ao controle com 95,6%). Além disso, os autores relataram ter encontrado danos nas células do tecido epitelial do intestino médio, tais como a presença de grandes vacúolos e de autofagossomos. Devido a esses efeitos sobre organismos não alvo, as pesquisas referentes à utilização de inseticidas seletivos estão crescendo em todo o mundo, com ênfase nos produtos de origem natural.

As plantas produzem e utilizam substâncias químicas de defesa contra a herbivoria que podem ter uma ação repelente e/ou inseticida. Esses produtos derivam do metabolismo secundário da planta, sendo essenciais para sua manutenção no ecossistema (Taiz & Zeiger 2006). A utilização desses compostos demonstra viabilidade para o controle de pragas e é uma prática antiga, registrada desde o período do Império Romano, onde eram empregados para o controle de piolhos em crianças pela utilização do pó de flores de piretro. Porém, o uso desses compostos começou a declinar quando se iniciou a produção e o uso de inseticidas sintéticos (Addor 1995, Kumar 2011).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários com ação inseticida e sua utilização no controle de insetos-praga pode provocar mortalidade, repelência, efeitos no crescimento, redução na oviposição e na emergência de adultos (Lale & Abdulrahman 1999, Pascual-Villalobos & Ballesta-Acosta 2003, Boeke *et al.* 2004, Ketoh *et al.* 2005). Além disso, substâncias encontradas em alguns óleos essenciais podem agir no sistema nervoso dos insetos, interferindo na transmissão normal de impulsos nervosos, no sistema neuroendócrino, no processo normal de

ecdise e/ou metamorfose, ou no metabolismo respiratório dos insetos, atuando na síntese de ATP (Menezes 2005).

Os efeitos sobre a reprodução estão geralmente associados a desordens alimentares e a deficiências nutricionais (Milano *et al.* 2010, Cruz *et al.* 2017). Nesse contexto, o óleo essencial de erva doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) provoca inibição de oviposição do predador *Euborellia annulipes* (Lucas), interferindo no funcionamento de seu sistema reprodutor, e redução na viabilidade de seus ovos (Silva *et al.* 2009). O óleo de cravo da Índia [*Syzygium aromaticum* (L.)] reduz a oviposição e causa alterações histológicas e histoquímicas nas gônadas de *S. frugiperda* (Cruz *et al.* 2015).

Assim, a reprodução e, conseqüentemente, a sobrevivência desses animais são afetadas diretamente pela aquisição de nutrientes. Por isso, os estudos ligados à sua nutrição vêm ganhando maior importância nas últimas décadas, visto que muitos dos aspectos biológicos, incluindo comportamento, fisiologia e ecologia, estão ligados a um contexto alimentar (Panizzi & Parra 2009). As dietas alimentares apresentam, portanto, importantes efeitos no desempenho biótico dos insetos (Santos *et al.* 2000).

Os alimentos e nutrientes ingeridos pelos insetos são armazenados no corpo gorduroso, um tecido de reserva de carboidratos, lipídios, proteínas e outros metabólicos (Chapman 2013). As reservas de glicogênio e triglicérides determinam seu potencial de atividade e longevidade (Nayar & Sauerman 1972). Os carboidratos são uma grande fonte de energia e participam do desenvolvimento cuticular, das estruturas reprodutivas e do processo previtelogênico (Arrese *et al.* 2010, Chapman 2013). Os lipídeos são importantes reservas energéticas que são utilizadas em atividades que exigem grande esforço metabólico, como uma maior tolerância a temperaturas mais baixas, metamorfose, voo prolongado, produção de ovos e longevidade, além de atuarem na composição de membranas celulares (Arrese *et al.* 2001, Bretas 2016). Já os aminoácidos e

proteínas, são importantes na fisiologia dos insetos porque participam da estrutura do tegumento e da síntese de hormônios e enzimas, além de possibilitarem que o corpo gorduroso sintetize a principal proteína que constitui o vitelo dos insetos, a vitelogenina, necessária para o sucesso reprodutivo das fêmeas (Kunkel & Nordin 1985, Klowden 2007).

Desse modo, o *fitness* dos insetos pode ser afetado diretamente por alterações em seu padrão alimentar, o que pode interferir em sua reprodução, sobrevivência e em seu estabelecimento na cultura (Cruz *et al.* 2016). Sendo assim, a aplicação de inseticidas pode prejudicar insetos fitófagos de duas maneiras: pela inibição da alimentação (atuando como agente antialimentar), levando o animal a morte por inanição, ou pela atuação após a ingestão normal do alimento, onde o produto penetra no organismo por via oral e dificulta seu crescimento, desenvolvimento, reprodução e comportamento (Menezes 2005).

A ingestão de compostos tóxicos também pode afetar a imunologia dos insetos. O canal alimentar desses animais, principalmente o intestino médio, é uma das principais barreiras contra a entrada de patógenos em seu organismo. A contaminação por inseticidas pode promover alterações fisiológicas e histológicas nesse órgão, afetando o crescimento e desenvolvimento desses artrópodes, além de torná-lo mais susceptível a entrada de agentes externos, prejudicando, assim, sua imunidade (Chiang *et al.* 1986, Correia *et al.* 2009). Silva *et al.* (2017), ao analisarem alterações histológicas no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) causadas a partir do tratamento com o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, observaram algumas mudanças, tais como desorganização estrutural do epitélio, protusões e extrusões nas células colunares e alongamento celular.

Além da eficiência já conhecida dos óleos essenciais, demonstrada nos exemplos supracitados, eles também trazem como vantagem uma maior seguridade ambiental e à saúde humana, pois, devido a sua alta volatilidade, apresentam uma menor persistência no ambiente e

nos alimentos (Menezes 2005, Gnankiné 2017). Ademais, há uma maior seletividade aos vertebrados, pois apresentam ação nos receptores de octopamina dos insetos e tais receptores estão ausentes em vertebrados (Chagas *et al.* 2002, Menezes 2005, Tripathi *et al.* 2009, Gnankiné 2017). Devido a estas características e ao fato de apresentarem uma boa eficiência, esses inseticidas naturais apresentam potencial para serem utilizados no Manejo Integrado de Pragas (Torres *et al.* 2001).

A espécie *Melaleuca alternifolia* Cheel pertence à família Myrtaceae, é nativa da Austrália e seu óleo apresenta ação inseticida e medicinal comprovadas (Riedl, 1997, Gustafson *et al.* 1998). Liao *et al.* (2016) testaram diferentes concentrações desse óleo em lagartas de terceiro ínstar de *Helicoverpa armigera* Hübner, outra praga importante nos cultivos de algodão, e na concentração de 40 mg/mL notaram uma redução da alimentação de folhas de algodão de 97,8% em 24 horas e uma mortalidade, a partir de contato tóxico, de 73,33; 90 e 93,33% após 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Callander & James (2011) diluíram diferentes concentrações desse óleo e testaram sua toxicidade usando larvas da mosca *Lucilia cuprina* (Wiedemann). Em larvas de primeiro ínstar concentrações a partir de 0,9% causaram uma mortalidade de 100%. Já em larvas de segundo e terceiro ínstars, observaram uma mortalidade de 100% nas concentrações de 2,5 e 10%, respectivamente.

O gênero *Mentha* é formado por plantas herbáceas amplamente conhecidas por suas propriedades medicinais e aromaterapêuticas (Dai 1981). A espécie *Mentha spicata* L. é comestível e contém propriedades medicinais e inseticidas comprovadas. Pavela (2005) utilizou este óleo sobre *Spodoptera littoralis* Bois. e observou uma mortalidade de aproximadamente 50% ao utilizar a concentração de 0.1 µL/lagarta. Govindarajan *et al.* (2012) trataram larvas das espécies de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say, *Aedes aegypti* (L.), e *Anopheles stephensi* Liston com diferentes concentrações desse óleo, sendo elas: 25, 50, 75, 100 e 125 ppm. Na

máxima concentração testada, os autores alcançaram uma mortalidade de $96.8 \pm 1.2\%$ em *C. quinquefasciatus*, $98.1 \pm 1.2\%$ em *A. aegypti* e $99.6 \pm 1.6\%$ em *A. stephensi*

Devido a todos esses efeitos supracitados, sabe-se que os inseticidas naturais, como os óleos essenciais, são capazes de causar diferentes danos aos organismos dos insetos-praga. Entretanto, é essencial que os produtos utilizados para o controle desses fitófagos sejam seletivos, para que não causem alterações em outros animais, tais como os inimigos naturais. Tendo isso em vista, se faz necessária a avaliação dos possíveis efeitos do uso de óleos essenciais para o controle de pragas sobre seus inimigos naturais. Neste trabalho, esse objetivo será alcançado a partir de análises reprodutivas, nutricionais e morfofisiológicas de *P. nigrispinus* alimentados com lagartas de *A. argillacea* tratadas por contato tópico com a DL_{50} dos óleos de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia*.

Literatura Citada

- Abrapa. 2016.** www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-mundo.aspx. Acesso em: 19/11/2018.
- Addor, R.W. 1995.** Insecticides, p. 1-62. In C.R.A. Godfrey (ed.), *Agrochemicals from Natural Products*. New York, Marcel Dekker, 62p.
- Almeida, R.P., C.A.D. Silva & F.S. Ramalho. 2008.** Manejo integrado de pragas do algodão, p. 7-8. In N.E.M. Beltrão. & D.M.P. Azevedo (ed.), *O agronegócio do algodão no Brasil*. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 1098p.
- Arrese, E.L., L.E. Canavoso, Z.E. Jouni, J.E. Pennington & K. Tsuchida. 2001.** Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 7-17.
- Azevedo, D.O., J.C. Zanuncio, J.S. Zanuncio Jr., G.F. Martins, S. Marques-Silva, M.F. Sossai & J.E. Serrão. 2007.** Biochemical and morphological aspects of salivary glands of the predator *Brontocoris tabidus* Signoret, (Heteroptera, Pentatomidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50: 469-477.

- Boeke, S.J., I.R. Baumgart, J.J.A. van Loon, A. van Huis, M. Dicke & D.K. Kossou. 2004.** Toxicity and repellence of African plants traditionally used for the protection of stored cowpea against *Callosobruchus maculatus*. J. Stored Prod. Res. 40: 423-438.
- Bortoli, S.A., A.M. Vacari, V.L. Laurentis, C.P. Bortoli, R.F. Santos & A.K. Otuka. 2016.** Selection of prey to improve biological parameters of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) in laboratory conditions. Braz. J. Biol. 76: 307-314.
- Bretas, J.A.C. 2016.** Corpo gorduroso de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Tese de Doutorado, UFRRJ, Seropédica, 66p.
- Callander, J.T. & P.J. James. 2012.** Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. Vet. Parasitol. 184: 271-278.
- Carneiro, F.F., L.G.S. Augusto, R.M. Rigotto, K. Friedrich & A.C. Búrigo. 2015.** Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. São Paulo, Expressão Popular, 628 p.
- 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: structures and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Chiang A.S., D.F. Yen & W.K. Peng. 1986.** Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 47: 333-339
- Conab. 2018.** <http://www.conab.gov.br/> Acesso em: 26/10/2018.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, Á.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: 1-9.
- Cruz, G.S., C.W. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A.C.T. Teixeira, A.C. Araújo, T.J.S. Alves, F.M. Cunha & M.O. Breda. 2015.** Alteraciones Histológicas e Histoquímicas Provocadas por el Aceite Esencial de Clavo de Olor en las Gónadas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Int. J. Morphol. 33: 1393-1400.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.S.C. Lopes, D.R.S. Barbosa, M.O. Breda, K.A. Dutra, C.A. Guedes, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Sublethal Effects of Essential Oils From *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales:Apiaceae) on the

Biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 109: 660-666.

Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, L.M. Silva, K.A. Dutra, C.A. Guedes, J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, B.C. Araújo & Á.A.C. Teixeira. 2017. Chemical composition and insecticidal activity of the essential oils of *Foeniculum vulgare* Mill., *Ocimum basilicum* L., *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex Bailey, *Eucalyptus citriodora* Hook and *Ocimum gratissimum* L. and their Major components on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Essent. Oil Bear. Pl. 20: 1360–1369.

Dai, K.M. 1981. A preliminary study on species of genus *Mentha* cultivated in China. Acta Pharm. Sin. B. 11: 849–859.

De Clercq, P., F. Melevede, I. Mesidagh, K. Vandendurpel, J. Mohaghegh & D. Degheele. 1998. Predation on the tomato looper *Chrysodeixis chalcites* (Esper) (Lep., Noctuidac) by *Podisus maculiventris* (Say) and *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). J. Appl. Entomol. 122: 93-98.

De Clercq, P., J. Mohaghegh & L. Tirry. 2000. Effects of host plant on the functional response of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Biol. Control. 18: 65–70.

Espindula, M.C., H.N. Oliveira, M. Campanharo, P.L. Pastori & G.C. Magevski. 2006. Influência da massa corporal sobre características reprodutivas e longevidade de fêmeas de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). Idesia. 24: 19-25.

Evangelista Jr., W.S., M.G.C. Gondim Jr., J.B. Torres & E.J. Marques. 2003. Efeito de plantas daninhas e do algodoeiro no desenvolvimento, reprodução e preferência para oviposição de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). Neotrop. Entomol. 32: 677-684.

Fadini, M.A.M., A. Pallini & M. Venzon. 2004. Controle de ácaros em sistema de produção integrada de morango. Cien. Rural. 34: 1271-1277.

Ferreira, J.A.M., J.C. Zanuncio, J.B. Torres & A.J. Molina-Rugama. 2008. Predatory behavior of *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Hemiptera, Pentatomidae) on different densities of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) larvae. Biocontrol Sci. Technol. 18: 711-719.

Gnankiné, O. & I.H.N. Bassolé. 2017. Essential oils as an alternative to pyrethroids' resistance against *Anopheles* species complex giles (Diptera: Culicidae). Molecules. 22: 1-23.

Govindarajan, M., R. Sivakumar, M. Rajeswari & K. Yogalakshmi. 2012. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. Parasitol Res. 110: 2023-2032.

Gravena, S. & H.F. Cunha. 1991. Predation of cotton leafworm first instar larvae, *Alabama argillacea* (Lep.: Noctuidae). Entomophaga. 6: 418-491.

- Gustafson, J.E., Y.C. Liew, S. Chew, J. Markham, H.C. Bell & J.R. Warmington. 1998.** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 26: 194-198.
- Imea. 2017.** <http://www.imea.com.br/> Acesso em: 26/10/2018.
- Kasten Júnior, P. & J.R.P. Parra. 1984.** Bioecologia de *Alabama argillacea* I. Biologia em diferentes temperaturas, na cultivar de algodoeiro IAC-17. Pesqu. Agropec. Bras. 19: 269-280.
- Ketoh, G.K., H.K. Koumaglo & I.A. Glitho. 2005.** Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. (Poaceae), and the wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). J. Stored Prod. Res. 41: 363-371.
- Klowden, M.J. 2007.** Physiological Systems in Insects. New York, Academic Press, 668p.
- Kumar, P., S. Mishra, A. Malik & S. Satya. 2011.** Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. Ind. Crops Prod. 34: 802–817.
- Kunkel, J.G. & J.H. Nordin. 1985.** Yolk Proteins, p. 83-111. In G.A. Kerkut & L.I. Gilbert (eds.), Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford, Pergamon Press, 111p.
- Lale, N.E.S. & H.T. Abdulrahman. 1999.** Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed oil obtained by different methods and neem powder for the management of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. J. Stored Prod. Res. 35: 135-143.
- Liao, M., J.J. Xiao, L.J. Zhou, X. Yao, F. Tang, R.M. Hua, X.W. Wu & H.Q. Cao. 2016.** Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on the *Helicoverpa armigera*. J. Appl. Ent. 140: 1-8.
- Luttrell, R.G., G.P. Fitt, F.S. Ramalho & E.S. Sugonyaev. 1994.** Cotton pest management: Part 1. A worldwide perspective. Annu. Rev. Entomol. 39: 517-526.
- Martínez, L.C., A. Plata-Rueda, G.D.S. Neves, W.G. Gonçalves, J.C. Zanuncio, H. Bozdoğan & J.E. Serrão. 2018.** Permethrin induces histological and cytological changes in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. Chemosphere. 212: 629-637.
- Medeiros, R.S., F.S. Ramalho, J.C. Zanuncio & J.E. Serrão. 2003.** Effect of temperature on life table parameters of *Podisus nigrispinus* (Het., Pentatomidae) fed with *Alabama argillacea* (Lep., Noctuidae) larvae. J. Appl. Entomol. 127: 209-213.
- Medeiros, R.S., F.S. Ramalho, W.P. Lemos & J.C. Zanuncio. 2000.** Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). J. Appl. Entomol. 124: 319-324.

- Menezes, E.L.A. 2005.** Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 58p.
- Milano, P., E. Bertini 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: 171-180.
- Miranda, J.E., J.E.M. Oliveira, K.C.G. Rocha & M. Furlan. 2002.** Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Bras. Ol. Fibros. 6: 557-563.
- Moura, A.P. & L.C.D. Rocha. 2006.** Seletivos e eficientes. Pelotas, Embrapa Hortaliças, 8p.
- Nayar, J.K & D.M. Sauerman. 1972.** Flight performance and fuel utilization as a function of age in female *Aedes taeniorhynchus*. Entomol. Res. Center. 7: 27-35.
- O'Brien, R. D. 1960.** Toxic phosphorus esters. New York, Academic, 434p.
- Oliveira, J.E.M., J.B. Torres, A.F. Carrano-Moreira & F.S. Ramalho. 2002.** Biologia de *Podisus nigrispinus* predando lagartas de *Alabama argillacea* em campo. Pesq. Agropec. Bras. 37: 7-14.
- Panizzi, A.R. & J.R.P. Parra. 2009.** A bioecologia e a nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas, p. 1107-1139. In: A.R. Panizzi & J.R.P. Parra. Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Londrina, Embrapa Soja, 1139p.
- Parra, J.R.P., S. Silveira Neto, J.R.P. Kasten Júnior & O. Brunini. 1984.** Bioecologia de *Alabama argillacea* II. Evolução populacional em seis regiões do estado de São Paulo, com base em suas exigências térmicas. Pesq. Agrop. Bras. 19: 417-421.
- Pascual-Villalobos, M.J. & M.C. Ballesta-Acosta. 2003.** Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. Biochem. Syst. Ecol. 31: 673-679.
- Pavela, R. 2005.** Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. Fitoterapia. 76: 691-696.
- Pereira A.C.R.L., J.V. de Oliveira; M.G.C. Gondim Junior & C.A.G. Câmara. 2008.** Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Ciênc. agrotec. 32: 717-724.
- Pereira, A.I.A., F.S. Ramalho, C.M. Bandeira, J.B. Malaquias & J.C. Zanuncio. 2009.** Age dependent fecundity of *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Hemiptera, Pentatomidae) with sublethal doses of gammacyhalothrin. Braz. Arch. Biol. Technol. 52: 1157-1166.

- Riedl, R.W. 1997.** Practical methods for using tea tree oil. *Ballina. Agro. Food Ind. Hi. Tech.* 8: 34-36.
- Ripper, W.E., R.M. Greenslade & G.S. Hartley. 1951.** Selective insecticides and biological control. *J. Econ. Entomol.* 44: 448-459.
- Rodrigues, S.M.M. & P.J. Silvie. 2016.** Índices faunísticos de artrópodes-praga e inimigos naturais nos sistemas de plantio convencional e adensado do algodoeiro. Campina Grande, Embrapa Algodão, 22p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento 98).
- Ruberson, J.R., H. Nemoto & Y. Hirose. 1998.** Pesticides and conservation of natural enemies, p. 207-220. In P. Barbosa (ed.), *Conservation of biological control.* San Diego, Academic Press, 396p.
- Santos, B.D.B., F.S. Ramalho, J.B. Malaquias, A.C.S. Lira, J.K.S. Pachú, F.S. Fernandes & J.C. Zanuncio. 2015.** How predation by *Podisus nigrispinus* is influenced by developmental stage and density of its prey *Alabama argillacea*. *Entomol. Exp. Appl.* 158: 142–151.
- Santos, G.P., T.V. Zanuncio & J.C. Zanuncio. 2000.** Desenvolvimento de *Thyrintina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) em folhas de *Eucalyptus urophylla* e *Psidium guajava*. *Na. Soc. Entomol. Brasil.* 29: 13-22.
- Silva, A.B., J.L. Batista & C.H. Brito. 2009.** Influência de produtos de origem vegetal na oviposição e no desenvolvimento embrionário de *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae). *Eng. Amb.* 6: 54-65.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A. Ferraz Navarro & A.A.C. Teixeira. 2017.** Effects of citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) midgut and fat body. *Biotech. Histochem.* 10: 1-13.
- Silva-Torres, C.S.A., I.V.A.F. Pontes, J.B. Torres & R. Barros. 2010.** New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 39: 835-838.
- Simonato, J., J.F.J. Grigolli & H.N. Oliveira. 2014.** Controle biológico de insetos-praga na soja, p. 178-193. In A.L.F. Lourenção, J.F.J. Grigolli, A.M. Melotto, C. Pitol, D.C. Gitti & R. Roscoe (ed.), *Tecnologia e produção: Soja.* Maracaju, Embrapa Agropecuária Oeste, 193p.
- Sujii, E.R., V.A. Beserra, P.H. Ribeiro, P.V. da Silva-Santos, C.S.S. Pires, F.G.V. Schmidt, E.M.G. Fontes & R.A. Laumann. 2007.** Comunidade de inimigos naturais e controle biológico natural do pulgão, *Aphis gossypii* glover (Hemiptera: Aphididae) e do curuquerê, *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodoeiro no Distrito Federal. *Arq. Inst. Biol.* 74: 329-336.
- Taiz, L. & E. Zeiger. 2006.** Fisiologia vegetal. Porto Alegre, Artmed, 722p.

- Torres, J.B. & J.C. Zanuncio. 2001.** Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus*. *BioControl*. 46: 469-480.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.A. Moura. 2006.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in *Eucalyptus* Forest in Brazil. *CAB Rev.* 1: 1-18.
- Tripathi, A.K., S. Upadhyay, M. Bhuiyan & P.R. Bhattacharya. 2009.** A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *J. Pharmacognosy and Phytother.* 1: 52-63.
- Whitcomb, W.H. 1981.** The use of predators in insect control, p. 105-123. In D. Pimentel (ed.), *CRC handbook of pest management in agriculture*. Boca Raton, CRC, 123p.
- Zanuncio, J.C., R.N.C. Guedes, J.F. Garcia & L.A. Rodrigues. 1993.** Impact of two formulations of deltamethrin in aerial application against *Eucalyptus caterpillars* and their predaceous bugs. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent.* 58: 477-481.

CAPÍTULO 2

EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha spicata* L. E *Melaleuca alternifolia* CHEEL SOBRE O INTESTINO MÉDIO DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

VALESKA A. Á. BRAGA¹, VALÉRIA W. TEIXEIRA^{1,2}, GLAUCILANE S. CRUZ¹ E ÁLVARO A. C.
TEIXEIRA²

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

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

¹Braga V.A.Á., V.W. Teixeira, G.S. Cruz & A.A.C. Teixeira. Efeito dos óleos essenciais de *Mentha spicata* L. e *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre o intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). A ser submetido.

RESUMO – Os óleos essenciais vêm sendo bastante estudados atualmente por representarem uma alternativa promissora ao uso de inseticidas sintéticos. Porém, pesquisas voltadas aos possíveis efeitos sobre inimigos naturais ainda são escassas. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da DL₅₀ dos óleos essenciais de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia* na histologia; histoquímica, a partir da análise de proteínas e carboidratos, e imuno-histoquímica, a partir da avaliação de apoptose celular, do intestino médio de ninfas de quinto ínstar de *Podisus nigrispinus*, após 12, 24 e 48 horas da ingestão de lagartas de *Alabama argillacea* tratadas com os respectivos óleos. O óleo de *M. spicata* não ocasionou alterações histológicas ou imuno-histoquímicas ao inseto. Porém, houve redução na quantidade de carboidratos nos períodos de 24 e 48 horas. O óleo de *M. alternifolia* provocou, após 24 horas, um alongamento das células digestivas e, após 48 horas, lise celular com liberação de material para o lúmen, sugerindo necrose tecidual. O estudo imunohistoquímico não revelou processo apoptótico. Houve redução nos níveis de carboidratos neutros nos períodos de 24 e 48 horas e na quantidade de células regenerativas, quando comparadas ao controle, após o período de 48 horas. Esses resultados demonstram o potencial de uso do óleo de *M. spicata* para o controle de *A. argillacea* em campos de algodoeiro em associação com o controle biológico utilizando-se o percevejo generalista *P. nigrispinus*, uma vez que não promoveram modificações em características vitais. Porém, torna-se inviável o uso de óleo essencial de *M. alternifolia* por ser extremamente tóxico ao predador.

PALAVRAS-CHAVE: Inseticida botânico, intestino médio, predador, MIP

EFFECTS OF *Mentha spicata* L. AND *Melaleuca alternifolia* CHEEL ESSENTIAL OILS IN
Podisus nigrispinus (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) MIDGUT

ABSTRACT – Essential oils have been widely studied nowadays, as they represent a promising alternative to the excessive use of synthetic insecticides. However, the research looking for possible effects on natural enemies are still scarce. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of *Mentha spicata* and *Melaleuca alternifolia* LD₅₀, on histology, histochemistry, by proteins and carbohydrates analysis, and immunohistochemistry, by apoptosis analyses of *Podisus nigrispinus* midgut, after 12, 24 and 48 hours of *Alabama argillacea* ingestion treated with the respective oils. *M. spicata* essential oil did not cause any histological or immunohistochemical changes to the insect. However, induced a reduction in the values of carbohydrates found in the midgut. *M. alternifolia* oil caused, after 24 hours, an elongation of the digestive cells and, after 48 hours, cell lysis with material release to the lumen, both necrotic symptoms. The immunohistochemical study revealed no apoptotic process. In addition, the oil caused reductions in neutral carbohydrate levels after 24 and 48 hours and reduction in the number of regenerative cells after 48 hours, when compared to the control. These results show the potential use of *M. spicata* oil for the control of *A. argillacea* in cotton fields, since has not compromised the subject's vital characteristics. However, it becomes impracticable to use essential oil of *M. alternifolia* because it is extremely toxic to the predator.

KEY WORDS: Botanical insecticide, midgut, predator, IPM

Introdução

Podisus nigrispinus (Dallas) é um predador generalista que apresenta grande importância no controle biológico de pragas em diversas culturas (Medeiros *et al* 2000). É encontrado na região neotropical, sendo nativo no Brasil, e apresenta uma alta taxa de predação e dispersão (Torres *et al.* 2006).

Percevejos predadores podem se contaminar com produtos químicos utilizados para o controle de pragas durante seu comportamento de busca ativa de presas. A contaminação pode acontecer a partir do resíduo seco do produto sobre a planta durante a higiene corporal, utilizando-se os tarsos, ou pela alimentação de presas contaminadas. Por isso, esses animais são mais suscetíveis a baixas concentrações dos inseticidas que as suas presas (Ruberson *et al.*1998). A preservação desses e outros inimigos naturais é extremamente necessária para o estabelecimento de um equilíbrio biológico no agroecossistema. Além disso, promove o benefício da redução dos efeitos indesejados do uso inadequado de inseticidas químicos e dos custos de produção (Soares & Busoli 2000).

O tratamento com inseticidas leva a modificações no organismo dos insetos, dentre elas, em seu canal alimentar, representado principalmente pelo intestino médio. Esse órgão é a principal região de digestão e absorção de nutrientes e nele há a síntese e secreção de enzimas e hormônios (Chapman 2013). Além disso, graças à presença de uma matriz peritrófica presente entre o lúmen e as células epiteliais, se torna uma das principais barreiras mecânicas contra a entrada de patógenos ou partículas estranhas no organismo (Chapman 2013, Gutiérrez-Cabrera *et al.* 2015).

Dessa forma, alterações no intestino médio tais como em sua fisiologia ou histologia, podem ocorrer devido à contaminação por inseticidas, uma vez que na região ocorre o contato entre o meio interno e o ambiente, e culminam em um aumento da suscetibilidade, desencadeando um prejuízo imunológico ao animal (Levy *et al.* 2004, Martins *et al.* 2006, Correia *et al.* 2009,

Catae *et al.*, 2014). Dentre esses efeitos, podem ocorrer modificações histológicas ou histoquímicas no tecido desse órgão e, além disso, a exposição a esses compostos tóxicos pode ocasionar lesões celulares dos tipos apoptótica ou necrótica (Turrens 2003, Ashe & Berry 2003, Correia *et al.* 2009).

Os efeitos destacados não são observados apenas em inseticidas sintéticos, mas também nos naturais, a exemplo dos óleos essenciais (Correia *et al.* 2009, Silva *et al.* 2017). Esses são elementos voláteis presentes em órgãos das plantas que possuem grande importância para a sua sobrevivência no ambiente, devido à defesa contra microrganismos e predadores (Siani *et al.* 2000). Entretanto, por serem naturais, possuem a vantagem de apresentar impacto reduzido quando comparados aos inseticidas sintéticos e demonstram ser uma alternativa promissora para o controle de insetos praga (Cruz *et al.* 2017, Gnankiné 2017). Os óleos de *Mentha spicata* L. e *Melaleuca alternifolia* Cheel apresentam ação inseticida comprovada para diversas pragas de importância agrícola (Pavela 2005, Callander & James 2011, Govindarajan *et al.* 2012, Liao *et al.* 2016). Entretanto, devido à escassez, estudos testando os seus efeitos sobre inimigos naturais precisam ser realizados.

Dentro desse contexto, esse trabalho objetivou avaliar a seletividade dos óleos essenciais de *M. spicata* e *M. alternifolia* contra o predador *P. nigrispinus*, após a ingestão da praga desfolhadora de algodoeiro *Alabama argillacea* (Hübner) tratadas com a DL₅₀ dos respectivos óleos. Para isso, foram analisados parâmetros histofisiológicos da região mediana de seu intestino.

Material e Métodos

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

Plantio de Algodão. O cultivo do algodão foi conduzido em casa de vegetação do Setor de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da UFRPE. Para a manutenção da criação e condução dos experimentos de *A. argillacea*, plantas de algodão da variedade BRS Safira foram mantidas em casa de vegetação. Para isso, foram utilizados vasos de capacidade de 5 litros contendo solo. A adubação de fundação foi feita utilizando a formulação NPK (10-10-10), e quinzenalmente adubação de manutenção utilizando NPK e uréia.

Criação de *Alabama argillacea*. As lagartas de *A. argillacea* foram mantidas em gaiolas de PVC (20 cm de altura x 15 cm de diâmetro), cuja abertura superior foi coberta com um tecido fino do tipo voil e a base forrada com papel sulfite. No interior das gaiolas foram fornecidas diariamente folhas de algodoeiro para a alimentação das lagartas. Os adultos também foram mantidos nessas gaiolas, onde essas eram revestidas internamente por papel sulfite, tanto na base, quanto nas laterais. A abertura superior da gaiola foi coberta com plástico filme e a alimentação foi realizada com solução de mel a 10%, mel + levedo (1:1) e água.

Obtenção e Criação de *Podisus nigrispinus*. Os percevejos utilizados nos bioensaios foram oriundos da Unidade de Controle Biológico da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Campina Grande, Paraíba, e criados seguindo a metodologia adaptada de Oliveira *et al.* (2004) e Zanuncio *et al.* (2001). Foram mantidos a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5\%$ de U.R. e fotofase de 12:12 (luz:escuro), alimentados com larvas e pupas de *Tenebrio molitor* Linnaeus.

Obtenção dos Óleos Essenciais. Os óleos essenciais de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia* foram obtidos da empresa Ferquima Ind. E Com. Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). As informações técnicas desses produtos e seus parâmetros de qualidade (coloração, pureza, odor, densidade a 20°C e índice de refração a 20°C) são descritos em relatório técnico fornecido pela empresa, conforme site <<http://ferquima.com.br>>.

Bioensaio. Para a montagem do bioensaio, os insetos foram separados em três diferentes grupos, sendo um controle e dois tratados. Os tratamentos consistiram na diluição dos óleos de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia* em acetona na Dose Letal 50 (DL₅₀), correspondendo a 2,50 e 2,82 mg/g de inseto, respectivamente. As Doses Letais foram determinadas previamente a partir de testes preliminares por contato tópico (Tabela 1). Para o tratamento controle foi utilizado acetona pura. A aplicação tópica foi realizada na região protorácica de lagartas de terceiro ínstar de *Alabama argillacea*, sendo aplicado 1,0 µL dos compostos com o auxílio de uma seringa Hamilton™ 50 µL. Após o tratamento, as lagartas foram oferecidas como alimento para ninfas de quinto ínstar de *P. nigrispinus* com até 48 horas de idade. Os períodos de análise determinados foram: 12, 24 e 48 horas após a implantação do bioensaio. Até esses períodos serem atingidos, as ninfas foram alimentadas com larvas de *T. molitor* não tratadas e com algodão umedecido com água. A alteração da espécie de presa foi realizada porque a alimentação realizada apenas com *A. argillacea* demandaria uma quantidade maior de indivíduos. Todo o experimento foi realizado a temperatura de $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12h.

Análise Histológica da Região Mediana do Intestino Médio de Ninfas de Quinto Ínstar de *Podisus nigrispinus*. Após cada período ser concluído, as ninfas foram imobilizadas à temperatura de 4°C e dissecadas sob estereomicroscópio (marca QUIMIS - modelo 1069). O intestino médio de *P. nigrispinus* se apresenta dividido em três regiões: anterior, mediana e posterior (Fialho *et al.* 2012). Nesse trabalho, utilizou-se a região mediana do intestino médio. Essa foi fixada em formol tamponado a 10% por 24h e em seguida conservada em álcool 70%. Posteriormente, foi realizada sua clivagem e desidratação em banhos crescentes de álcool etílico (80, 90, 95 e 100%) com duração de 10 minutos cada, seguida da inclusão em historesina. Secções de cortes de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo semi-automático Leica® 2035. Os cortes foram corados com o Azul de Toluidina para análise morfológica do tecido. Em

cada período de análise foram utilizados três insetos para cada tratamento, totalizando nove insetos avaliados.

As lâminas histológicas coradas com Azul de Toluidina também foram utilizadas para a contagem de células regenerativas. A quantificação foi realizada em quatro seções por lâmina utilizada, sendo uma lâmina para cada bloco e três blocos para cada tratamento, totalizando três indivíduos e 12 seções para cada tratamento. Os valores contabilizados foram transformados em raiz ($x+0,5$) para assumir normalidade e homogeneidade e submetidos à análise de variância, sendo posteriormente comparados pelo teste de Tukey HSD a 5% de significância, através do programa SAS PROC PROBIT (SAS Institute 2002).

Histoquímica da Região Mediana do Intestino Médio de Ninfas de Quinto Ínstar de *Podisus nigrispinus*. A metodologia utilizada para coleta e corte do órgão foi a mesma utilizada para a preparação de lâminas histológicas. Para a detecção de compostos proteicos e de carboidratos foram utilizados, respectivamente, os corantes Xylidine Ponceau e o Ácido Periódico de Schiff (P.A.S) (Pearse 1960, Junqueira & Junqueira 1983). Para cada tratamento foram utilizadas três lâminas, totalizando nove lâminas avaliadas. Essas foram examinadas com fotomicroscópio Leica® e as imagens foram capturadas e digitalizadas pelo software Leica Image Manager 50. Em cada das lâminas, quatro campos foram analisados, totalizando 12 campos por tratamento.

As imagens capturadas foram submetidas ao programa editor de imagens GIMP® 2.8 (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms) que converte as imagens digitais para uma escala de cinza (preto e branco). Essa segmentação das cores permite a mensuração dos valores de pixels referentes a marcação selecionada no tecido (Solomon 2009). Os dados computados de proteína para os períodos de 12 e 24 horas e de carboidrato nos períodos de 12 e 48 horas foram transformados em raiz ($x+0,5$) para assumir normalidade e homogeneidade, em seguida foi feita a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de

significância. Os dados de proteína do período de 48 horas assumiram normalidade e homogeneidade e seguiram para o teste de Tukey HSD a 5%. Já os dados de carboidratos do período de 24 horas não assumiram normalidade e homogeneidade, sendo submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa SAS PROC PROBIT (SAS Institute 2002).

Apoptose por Imunofluorescência. Como indicador de apoptose foi utilizado o método TUNEL, a partir de kits comerciais (ApopTag[®] Red In Situ Apoptosis Detection Kit – S7165 – Millipore Corporation). A região mediana do intestino médio das ninfas foi coletada e colocada em formol tamponado a 10% por 24 horas e em seguida conservada em álcool 70%. Posteriormente, foi realizada a desidratação em banhos crescentes de álcool etílico (80, 90 e 100%), com duração de 20 minutos cada. Em seguida, foram diafanizados, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em um micrótomo tipo Minot (LEICA RM 2035), colocados em banho-maria e coletados com lâminas silanizadas. Os cortes foram inicialmente desparafinizados e hidratados e, logo em seguida, incubados em Tampão fosfato-salino – PBS (pH 7,4 a 0,1 M) à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a recuperação antigênica utilizando-se a Proteinase K (20 µg/mL). Os cortes foram então lavados em PBS e receberam o tampão de equilíbrio para posterior incubação com enzima TdT a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. Aplicou-se solução Stop e em seguida as lâminas foram lavadas em PBS (pH 7,4 a 0,1 M) e incubadas com a anti-digoxigenina conjugada à Rodamina por 30 minutos em câmara úmida. Houve um novo banho em PBS e a montagem utilizando o meio antifading associado ao corante azul fluorescente diamidino-2-fenilindole (DAPI), para marcação dos núcleos das células. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência com varredura a laser (Modelo LSM 700 Carl Zeiss) no Cenapesq (Centro de Apoio à Pesquisa da

UFRPE), nos filtros: 415 nm (azul) e o 735 nm (vermelho), com câmera acoplada e Software Zen integrado. Todas as fotos foram tiradas com a resolução de 1.048 x 1.048.

Resultados

Histologia da Região Mediana do Intestino Médio e Quantificação das Células

Regenerativas. Em todos os tratamentos e em todos os períodos (12, 24 e 48 horas) a parede da região mediana do intestino médio de ninfas de quinto ínstar de *P. nigrispinus* apresentou uma camada simples de células epiteliais, formada por dois tipos celulares: células colunares e células regenerativas. Essa última foi encontrada na base do epitélio e se apresentou de forma isolada ou agrupada, com formação de ninhos. Abaixo da região epitelial, são encontradas duas camadas de músculos, a mais interna é a de músculos circulares e a mais externa é a de músculos longitudinais. Entre o lúmen e o epitélio pode ser evidenciada a presença de uma membrana perimicrovilar (Figs. 1, 2 e 3). Além disso, também foi possível observar a presença de protusões no grupo controle no período de 48 horas (Figs. 3B e 3C), no tratamento de *M. spicata* nos períodos de 12 (Fig. 1E), 24 (Figs. 2E e 2F) e 48 horas (Figs. 3E e 3F) e no de *M. alternifolia* no período de 24 horas (Figs. 2H e 2I) e extrusões citoplasmáticas, cujos fragmentos são encontrados no lúmen, no grupo controle em 48 horas (Figs. 3B e 3C) e de *M. spicata* em 48 horas (Fig. 3E). O epitélio também demonstrou a presença de vacúolos citoplasmáticos no grupo controle em 12 e 24 horas (Figs. 1C e 2C, respectivamente), *M. spicata* em 12, 24 e 48 horas (Figs. 1F, 2F e 3F, respectivamente) e em *M. alternifolia* nos períodos de 24 (Fig. 2I) e 48 horas (Fig. 3I) No grupo tratado com *M. alternifolia* após 24 horas foi observado um alongamento das células colunares (Fig. 2H e 2I) e após 48 horas observou-se a presença de lise de células epiteliais, com liberação de material celular para o lúmen (Fig. 3H e 3I).

Não houve diferenças significativas no número de células regenerativas nos períodos de 12 e 24 horas. Porém, após o período de 48 horas, a média obtida para o tratamento de *M. alternifolia* ($1,33 \pm 0,39$) mostrou-se significativamente inferior ao do grupo controle ($4,08 \pm 0,71$) e a *M. spicata* ($4,16 \pm 0,61$) (Tabela 1).

Histoquímica da Região Mediana do Intestino Médio. As células epiteliais da região mediana do intestino médio de ninfas de quinto ínstar de *P. nigrispinus* demonstraram reação positiva para ambos os corantes utilizados. Nas lâminas coradas com Xylidine Ponceau foi observada uma maior intensidade de coloração nos núcleos celulares (Fig. 4). Além disso, os conteúdos liberados para o lúmen do intestino a partir de protusão e extrusão celular também apresentaram uma coloração mais intensa (Fig. 4A e 4E). Após a quantificação de pixels e de suas respectivas análises estatísticas, foi possível afirmar que não houve diferença significativa no nível de proteínas entre os diferentes tratamentos realizados durante os três períodos de análise (período de 12 horas – $F = 0,35$; $P = 0,7050$; período de 24 horas – $F = 0,21$ $P = 0,8140$; período de 48 horas – $F = 1,30$; $P = 0,2874$) (Fig. 5A).

Quando corados com P.A.S., o epitélio intestinal demonstrou apresentar carboidratos neutros, notados a partir da presença de grânulos de glicogênio dispostos aleatoriamente no interior das células epiteliais. Além disso, a coloração também demonstrou intensidade na membrana perimicrovilar (Fig. 6). No tratamento realizado com *M. alternifolia* a coloração apresentou-se menos intensificada e foram observados menos grânulos de glicogênio corados (Figs. 6G, 6H e 6I). Essa diferenciação não foi suficiente para reduzir os resultados adquiridos pela quantificação de pixels após o período de 12 horas, visto que não apresentou diferença significativa quando comparado com o controle. *M. spicata* também não diferiu do controle durante esse período de análise ($F = 1,56$; $P = 0,2256$). Porém, após 24 horas os três grupos diferiram entre si, onde *M. spicata* ($24,12 \pm 3,76$) reduziu em relação ao controle ($44,98 \pm 6,87$) e

M. alternifolia ($10,33 \pm 1,54$) reduziu em comparação ao controle e *M. spicata* ($\chi^2 = 17,771$; $P = 0,0001$). Após 48 horas, os três grupos também diferiram entre si, onde *M. spicata* ($14,72 \pm 2,47$) e *M. alternifolia* ($6,99 \pm 1,14$) reduziram significativamente em relação ao controle ($26,22 \pm 2,33$) ($F = 22,04$; $P = 0,0001$) (Fig.7).

Apoptose por Imunofluorescência da Região Mediana do Intestino Médio. Os núcleos das células epiteliais da região mediana do intestino médio das ninfas de quinto ínstar de *P. nigrispinus* apresentaram fluorescência azul, demonstrando ausência de apoptose celular, a qual seria evidenciada a partir de fluorescência vermelha (Figs. 8 e 9). Sendo assim, não foi detectada atividade apoptótica em nenhum dos grupos trabalhados.

Discussão

A região mediana do intestino médio de ninfas de quinto ínstar de *Podisus nigrispinus* demonstrou adequação a descrições anteriormente relatadas por outros autores (Cunha 2012, Teixeira 2012, Fialho 2013).

Modificações histopatológicas no intestino de insetos durante a prática de controle de pragas são bastante conhecidas como consequência da utilização de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), onde suas toxinas são capazes de causar rupturas no tecido do canal alimentar das lagartas tratadas (Rausell *et al.* 2000). Porém, a aplicação de produtos químicos também pode causar alterações semelhantes. Costa *et al.* (2016) trataram por ingestão o coleóptero *Anthonomus grandis* Boheman com o inseticida regulador de crescimento lufenurom, utilizando a solução inseticida de 800 μL de Match[®] + 200 mL de água destilada, e observaram as seguintes alterações: desorganização tecidual, vacuolização e liberação de núcleos celulares para o lúmen.

O tratamento com óleos essenciais também já foi relatado como causador de deformidades desse tipo. *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) quando tratadas por ingestão com o óleo de

Azadirachta indica A. juss, conhecida popularmente como nim, nas concentrações de 0,5% e 1,0% apresentaram projeções do tecido epitelial para o lúmen (Correia *et al.* 2009).

A liberação de conteúdos celulares e as projeções do tecido epitelial para o lúmen, aqui observadas e denominadas respectivamente como extrusão e protusão celulares, foram observadas no epitélio das ninfas tratadas com os óleos de *M. spicata* e *M. alternifolia*. Porém, os epitélios das ninfas utilizadas como controle também apresentaram essas mesmas propriedades. Por isso, essas não foram aqui consideradas como modificações histopatológicas, uma vez que já estavam presentes nos animais saudáveis utilizados.

A ausência de apoptose celular demonstra que a contaminação causada não foi suficiente para provocar tal lesão. Porém, o alongamento das células colunares e a lise celular, ambos observados no tratamento de *M. alternifolia*, são histopatologias semelhantes a sintomas necróticos encontrados por outros autores. Silva *et al.* (2017) observaram o alongamento de células digestivas e a consequente estratificação do epitélio em lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* após o tratamento com óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor na concentração de 500mg/L e consideraram esse como um dos sintomas do processo necrótico. Costa *et al.* (2016) encontraram como sintoma de necrose em *A. grandis* após tratamento com lufenuron a perda da integridade da membrana plasmática e a consequente lise celular. Além disso, a ruptura de células epiteliais pode ocasionar a morte do inseto por septicemia devido à entrada de microrganismos na cavidade do corpo (Rausell *et al.* 2000).

Na região apical das células colunares do epitélio de insetos são encontradas microvilosidades. Em hemípteros, essas são revestidas por uma membrana extracelular, denominada membrana perimicrovilar, que apresenta função semelhante à membrana peritrófica de outros insetos, incluindo a proteção contra a entrada de microrganismos e outros agentes externos na cavidade interna do corpo (Silva *et al.* 2004, Terra *et al.* 2006). Além disso, aumenta a capacidade de

absorção de nutrientes de dietas diluídas (Billingsley & Downe 1988, Ferreira *et al.* 1988, Billingsley 1990, Terra & Ferreira 2005).

Tal estrutura se manteve presente nesse trabalho e esteve marcada durante as análises de proteínas e carboidratos, demonstrando haver a presença dessas moléculas, o que corrobora com descrições feitas anteriormente por outros autores (Silva *et al.* 2004, Terra *et al.* 2006). Roel *et al.* (2010) ao tratarem lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* com o óleo de *A. indica* nas concentrações de 0,006 e 0,05% observaram necrose celular associada com a degradação da matriz peritrófica. Aqui, apesar da membrana perimicrovilar ter se mantido íntegra, não foi suficiente para impedir os efeitos necróticos ocasionados pelo óleo de *M. alternifolia* sobre o epitélio.

As células regenerativas são responsáveis pela renovação de células epiteliais do intestino médio, sendo capazes de realizar a substituição celular após desgaste durante processos digestivos (Wanderley-Teixeira *et al.* 2006). Seu aumento está ligado à proliferação desse tipo celular e a sua diferenciação para renovação do tecido epitelial prejudicado (Spies & Spence 1985). Porém, a redução na quantidade dessas células observada no tratamento de *M. alternifolia* pode estar relacionada com a incapacidade de regeneração tecidual causada por um efeito tóxico da contaminação com o óleo, capaz de prejudicar atividades vitais do inseto. Resultados semelhantes foram encontrados por Osman *et al.* (2016), que observaram menores quantidades de células regenerativas quando trataram, por ingestão, larvas de quarto ínstar de *Trogoderma granarium* Everts com 0,5 mL do óleo essencial de *Carum carvii* L.

Em relação às análises histoquímicas, a coloração mais intensa das áreas de protusão e extrusão celular durante a marcação de proteínas demonstra que o conteúdo contém origem proteica, sendo provavelmente constituído de enzimas digestivas. Dessa maneira, o material excretado para dentro do órgão a partir desses processos faz parte da digestão de alimentos.

Já a presença de grânulos de glicogênio nas células epiteliais está relacionada à reserva de carboidratos intracelulares, visando prover a energia necessária para atividades metabólicas no organismo do inseto (Fialho *et al.* 2009). Dessa forma, a redução nos níveis de carboidratos observada nesse trabalho pode afetar o metabolismo energético do organismo.

Diante do exposto, não se recomenda o uso do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em associação com o controle biológico utilizando *Podisus nigrispinus* para controlar *Alabama argillacea*, uma vez que este causou efeitos histopatológicos e histoquímicos no epitélio do predador. Por outro lado, é possível afirmar que o óleo essencial de *Mentha spicata* pode ser utilizado no controle de pragas que possuam como predador o percevejo *P. nigrispinus*, uma vez que o parâmetro alterado não é responsável por uma característica vital do organismo. No entanto, se vê necessária a realização de mais estudos para testar a seletividade desse óleo em *P. nigrispinus*, para garantir a eficácia no controle de *A. argillacea* a partir da associação de diferentes táticas: aplicação do óleo de *M. spicata* e utilização do predador *P. nigrispinus*. Dessa forma, os danos provocados pelo uso excessivo de inseticidas sintéticos de amplo espectro podem ser reduzidos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos também a Unidade de Controle Biológico (UCB) da Embrapa Algodão, Campina Grande/PB pelo suporte para o desenvolvimento deste estudo e ao Centro de Apoio à Pesquisa da UFRPE (CENAPESQ) pela disponibilização de equipamentos.

Literatura Citada

- Ashe, P.C. & M.D. Berry. 2003.** Apoptotic signaling cascades. *Prog. Neurop. Biol. Psych.* 27: 199-214.
- Billingsley, P.F. & A.E.R. Downe. 1988.** Ultrastructural localisation of cathepsin B in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 17: 295-302.
- Billingsley, P.F. 1990.** The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Ann. Rev. of Entomol.* 35: 219-248.
- Callander, J.T. & P.J. James. 2012.** Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. *Vet. Parasitol.* 184: 271-278.
- Catae, A.F., T.C. Roat, R.A. Oliveira, R.C.F. Nocelli & O. Malaspina. 2014.** Cytotoxic effects of thiamethoxan in the midgut and malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.* 77: 274-281.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structures and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Cloyd, R. 2012.** Indirect effects of pesticides on natural enemies, p. 1-24. In R.P. Soundararajan (eds.), *Pesticides - Advances in chemical and botanical pesticides*. IntechOpen, 382p.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, Á.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: 1-9.
- Costa, H.N., F.M. da Cunha, G.S. Cruz, C.G. D'assunção, G.G. Rolim, M.E.G. Barros, M.O. Breda, Á.A.C. Teixeira & V.W. Teixeira. 2016.** Lufenuron impact upon *Anthonomus grandis* bohemian (Coleoptera: Curculionidae) midgut and its reflection in gametogenesis. *Pest. Biochem. Physiol.* 137: 71-80.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, L.M. Silva, K.A. Dutra, C.A. Guedes, J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, B.C. Araújo & Á.A.C. Teixeira. 2017.** Chemical composition and insecticidal activity of the essential oils of *Foeniculum vulgare* Mill., *Ocimum basilicum* L., *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex Bailey, *Eucalyptus citriodora* Hook and *Ocimum gratissimum* L. and their major components on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 20: 1360–1369.
- Cunha, F.M., F.H. Caetano, V. Wanderley-Teixeira, J.B. Torres, A.A.C. Teixeira & L.C. Alves. 2012.** Ultra-structure and histochemistry of digestive cells of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with prey reared on Bt-cotton. *Micron.* 43: 245-250.

- Ferreira, C., A.F. Ribeiro, E.S. Garcia & W.R. Terra. 1988.** Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochem.* 18: 521–530.
- Fialho, M.C.Q., J.C. Zanuncio, C.A. Neves, F.S. Ramalho & J.E. Serrão. 2009.** Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102: 119-27.
- Fialho, M.C.Q., N.R. Moreira, J.C. Zanuncio, A.F. Ribeiro, W.R. Terra & J.E. Serrão. 2012.** Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Insect Physiol.* 58: 850-856.
- Fialho, M.C.Q., W.R. Terra, N.R. Moreira, J.C. Zanuncio & J.E. Serrão. 2013.** Ultrastructure and immunolocalization of digestive enzymes in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Arthr. Struct. Develop.* 42: 277-285.
- Gnankiné, O. & I.H.N. Bassolé. 2017.** Essential oils as an alternative to pyrethroids' resistance against *Anopheles* species complex giles (Diptera: Culicidae). *Molecules.* 22: 1-23.
- Govindarajan, M., R. Sivakumar, M. Rajeswari & K. Yogalakshmi. 2012.** Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitol. Res.* 110 :2023-2032.
- Gutiérrez-Cabrera, A.E., A. Córdoba-Aguilar, E. Zenteno, C. Lowenberger & B. Espinoza. 2015.** Origin, evolution and function of the hemipteran perimicrovillar membrane with emphasis on Reduviidae that transmit Chagas disease. *Bull. Entomol. Res.* 106: 279-291.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira, 1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Guanabara Koogan, 123p.
- Levy, S.M., A.M.F. Falleiros, E.A. Gregório, N.R. Arrebola & L.A. Toledo. 2004.** The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz. J. Biol.* 64: 633-638.
- Liao, M., J.J. Xiao, L.J. Zhou, X. Yao, F. Tang, R.M. Hua, X.W. Wu & H.Q. Cao. 2016.** Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on the *Helicoverpa armigera*. *J. App. Entomol.* 140: 1-8p.
- Martins, G.F., L.A.O. Neves & J.E. Serrão. 2006.** The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron.* 37: 161-168.
- Medeiros, R.S., F.S. Ramalho, W.P. Lemos & J.C. Zanuncio. 2000.** Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). *J. Appl. Entomol.* 124: 319-324.

- Oliveira, H.N., D. Pratisoli, E.P. Pedruzzi & M.C. Espindula. 2004.** Development of the predator *Podisus nigrispinus* fed on *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Pesqu. Agropec. Bras.* 39: 947-951.
- Osman, S.E.I., M.H. Swidan, D.A. Kheirallah & F.E. Nour. 2016.** Histological effects of essential oils, their monoterpenoids and insect growth regulators on midgut, integument of larvae and ovaries of khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. *J. Biol. Sci.* 16: 93-101.
- Pavela, R. 2005.** Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia.* 76: 691-696.
- Pearse, A.G.E. 1960.** Histochemistry: theoretical and applied. London, Churchill, 998p.
- Rausell, C., N. Decker, I. García-Robles, B. Escriche, Van E. Kerkhove, M.D. Real & A.C. Martínez-Ramírez. 2000.** Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins of the midgut of the nun moth *Lymantria monacha*. *J. Invertebr. Pathol.* 75: 288-291.
- Roel, A.R., D.M. Dourado, R. Matias, K.R.A. Porto, A.V. Bednaski & 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.
- Ruberson, J.R., H. Nemoto & Y. Hirose. 1998.** Pesticides and conservation of natural enemies, p. 207-220. In P. Barbosa (ed.), Conservation of biological control. San Diego, Academic Press, 396p.
- SAS Institute. 2002.** User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute INC., Cary, NC.
- Siani A.C., A.L.F. Sampaio, M.C. Sousa, M.G.M.O. Henriques & M.F.S. Ramos. 2000.** Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. *Biotecnolog. Cienc. Desenvol.* 16: 38-43.
- Silva, C.P., J.R. Silva, F.F. Vasconcelos, M.D.A. Petretski, R.A. Damatta, A.F. Ribeiro, & W.R. Terra. 2004.** Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthropod Struct. Dev.* 33: 139-148.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A. Ferraz Navarro & A.A.C. Teixeira. 2017.** Effects of citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) midgut and fat body. *Biotech. & Histochem.* 93: 36-48.
- Soares, J.J. & A.C. Busoli. 2000.** Efeito de inseticidas em insetos predadores em culturas de algodão. *Pesqu. agropec. Bras.* 35: 1889-1894.
- Solomon, R.W. 2009.** Free and open source software for manipulation of digital images. *Am. J. Roentgenol.* 192: 330-334.

- 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.
- Teixeira, A.D. 2012.** Degeneração e regeneração celular no intestino médio do predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) durante o desenvolvimento pós-embrionário. Dissertação de mestrado, UFV, Viçosa, 44p.
- Terra, W.R. & C. Ferreira. 2005.** Biochemistry of digestion, p. 171–224 in L.I. Gilbert, L.I., K. Latrou & S.S. Gill (eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford, Elsevier, 224p.
- Terra, W.R., R.H. Costa & C. Ferreira. 2006.** Plasma membranes from insect midgut cells. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 78: 255-269.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.A. Moura. 2006.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in *Eucalyptus* forest in Brazil. *CAB Rev.* 1: 1-18.
- Turrens, J.F. 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 55: 335–344.
- Wanderley-Teixeira, V., A.A.C. Teixeira, F.M. Cunha, M.K.C.M. Costa, A.F.S.L. Veiga & J.V. Oliveira. 2006.** Histological description of the midgut and the pyloric valve of *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). *Braz. J. Biol.* 66: 1045-1049.
- Zanuncio, J.C., A.J. Molina-Rugama & J.E. Serrão. 2001.** Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with combinations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. *Biocontrol. Sci. Tech.* 11: 331-337.

Tabela 1. Toxicidade dos óleos essenciais de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia* em lagartas de terceiro ínstar de *Alabama argillacea* submetidas ao contato tópico. Temp.: $25,2 \pm 1,4$ °C, UR: $67 \pm 0.7\%$, e fotoperíodo de 12h.

Tratamentos	N	GL	Inclinação da reta (\pm EP)	DL ₅₀ (IC 95%)	RT ₅₀	DL ₉₀ (IC 95%)	RT ₉₀	χ^2
<i>Mentha spicata</i>	180	4	5,08 \pm 0,70	2,50 (2,24-2,75)	1,58	4,46 (3,88-5,56)	1,50	3,69
<i>Melaleuca alternifolia</i>	150	3	4,04 \pm 0,60	2,82 (2,44-3,23)	1,40	5,85 (4,80-8,15)	1,14	2,64

N= número de insetos usados no teste; GL= grau de liberdade; EP = erro padrão da média; IC = intervalo de confiança; RT = razão de toxicidade; χ^2 = Qui-quadrado.

Tabela 2. Número de células regenerativas na região mediana do intestino de ninfas de quinto ínstar de *P. nigrispinus* submetidos à alimentação de lagartas de *A. argillacea* tratadas com a DL₅₀ dos óleos de *M. spicata*, 2,50 mg/g de inseto, e *M. alternifolia*, e 2,82 mg/g de inseto. Temp.: 25°C, UR: 70% e fotofase de 12h.

Tratamento	Período de avaliação (\pm EP) ¹		
	Após 12 h	Após 24 h	Após 48 h
Controle	2,41 \pm 0,54 a	3,50 \pm 0,95 a	4,08 \pm 0,71 a
<i>M. spicata</i>	3,66 \pm 0,79 a	3,91 \pm 0,63 a	4,16 \pm 0,61 a
<i>M. alternifolia</i>	1,66 \pm 0,46 a	2,83 \pm 1,14 a	1,33 \pm 0,39 b
	F = 2,93; P = 0,0672	F = 0,77; P = 0,4728	F = 10,39; P = 0,0003

¹Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0.05).

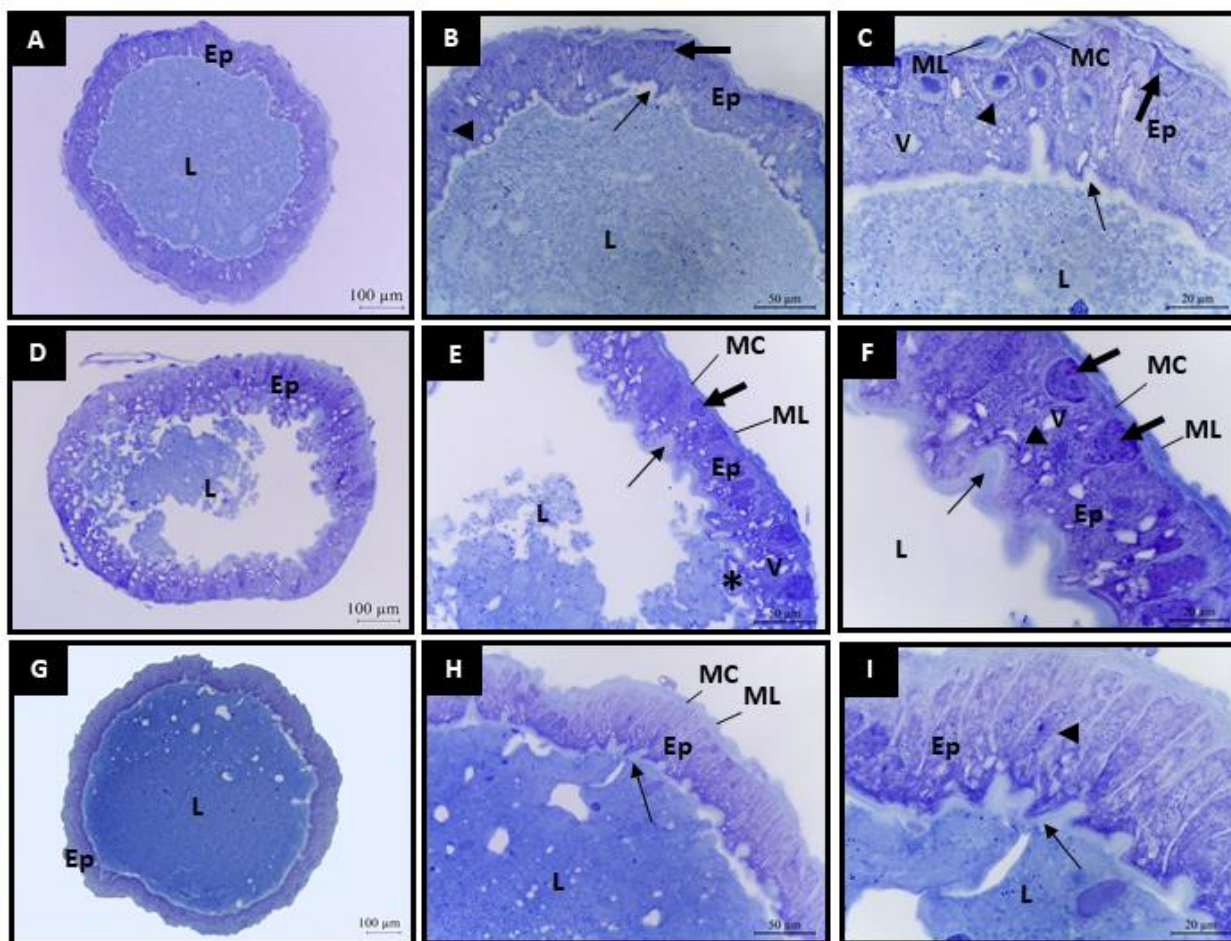


Figura 1. Microscopia de luz da região mediana do intestino de ninfas de quinto ínstar de *Podisus nigrispinus*, 12 h após a alimentação com lagartas tratadas. A, B e C – controle; D, E e F – *Mentha spicata*; G, H e I – *Melaleuca alternifolia*. Coloração com Azul de Toluidina. L – Lúmen, Seta longa – membrana perimicrovilar, Ep – epitélio simples, Ponta de seta – núcleo da célula colunar, Seta larga – célula regenerativa, ML – músculo longitudinal, MC – músculo circular, Asterisco – protusão celular. Barras = 100μm, 50μm e 20 μm.

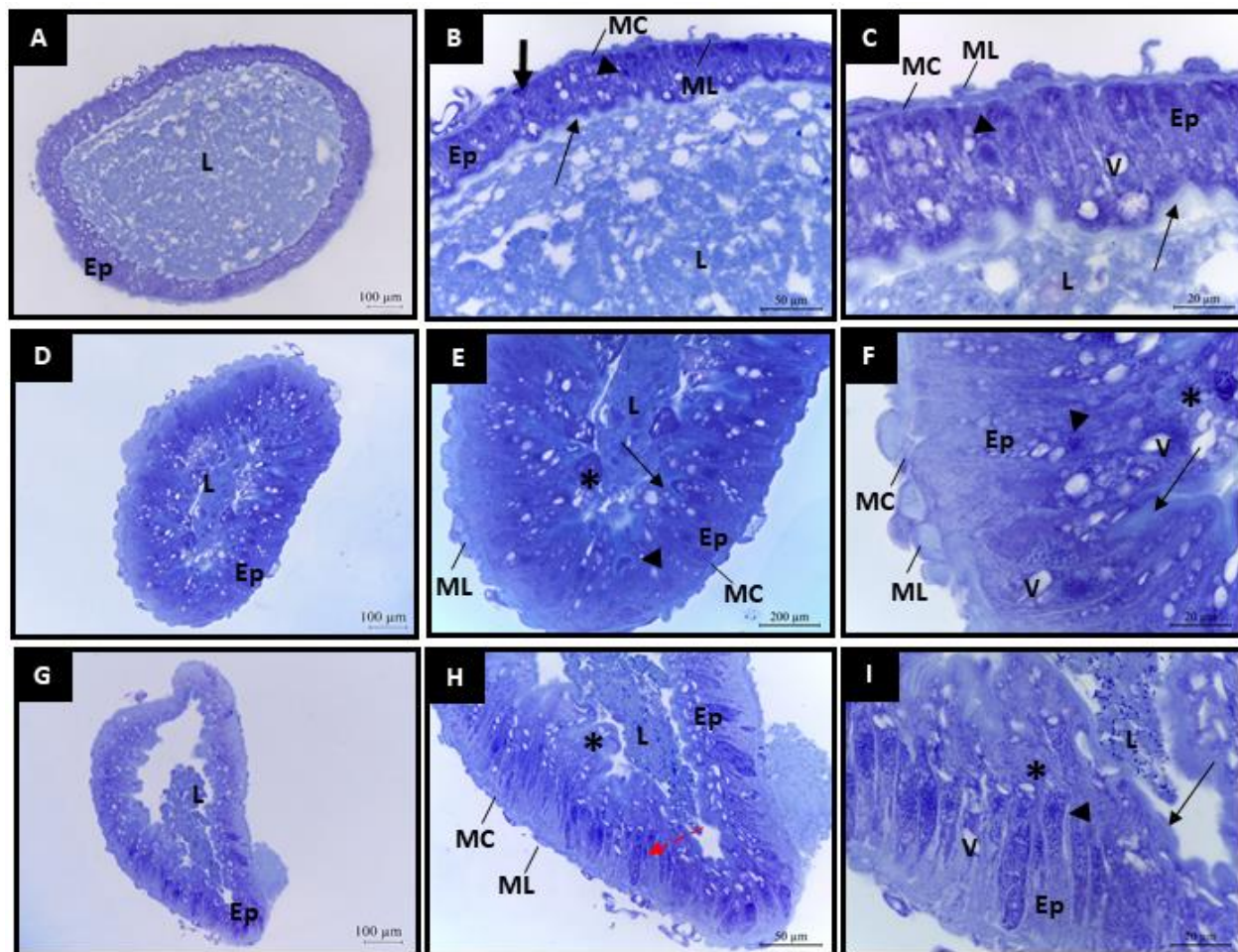


Figura 2. Microscopia de luz da região mediana do intestino de ninfas de quinto ínstar de *Podisus nigrispinus*, 24 h após a alimentação com lagartas tratadas. A, B e C – controle; D, E e F – *Mentha spicata*; G, H e I – *Melaleuca alternifolia* – observar alongamento das células colunares. Coloração com Azul de Toluidina. L – Lúmen, Seta longa – membrana perimicrovilar, Ep – epitélio simples, Ponta de seta – núcleo da célula colunar, Seta larga – célula regenerativa, ML – músculo longitudinal, MC – músculo circular, Asterisco – protusão celular, Seta pontilhada vermelha – células colunares alongadas. Barras = 100µm, 50µm e 20 µm.

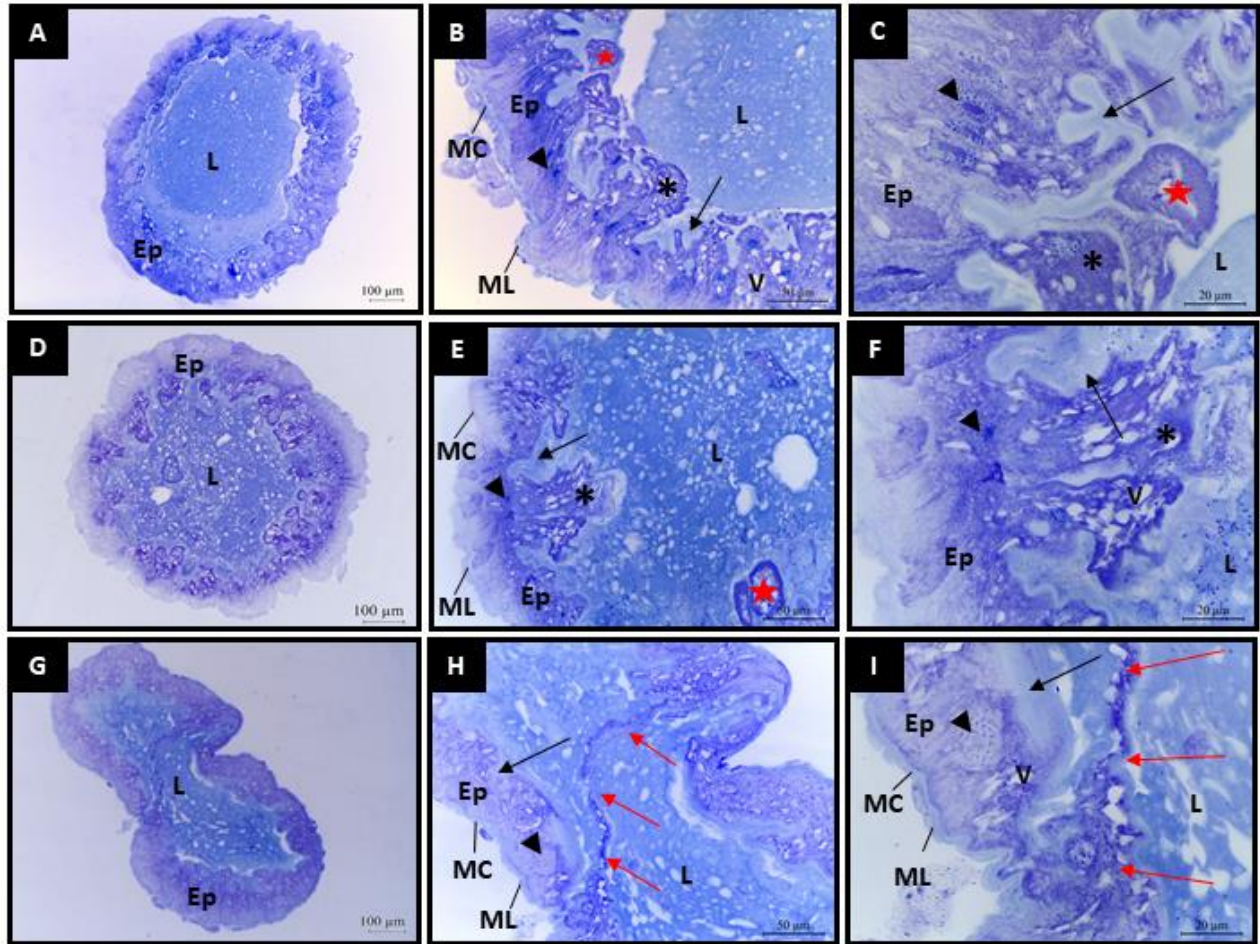


Figura 3. Microscopia de luz da região mediana do intestino de ninfas de quinto ínstar de *Podisus nigrispinus*, 48 h após a alimentação com lagartas tratadas. A, B e C – controle; D, E e F – *Mentha spicata*; G, H e I – *Melaleuca alternifolia*. Coloração com Azul de Toluidina. L – Lúmen, Seta longa – membrana perimicrovilar, Ep – epitélio simples, Ponta de seta – núcleo da célula colunar, Seta vermelha – lise celular, ML – músculo longitudinal, MC – músculo circular, Asterisco – protusão celular, Estrela – extrusão celular. Barras = 100μm, 50μm e 20 μm.

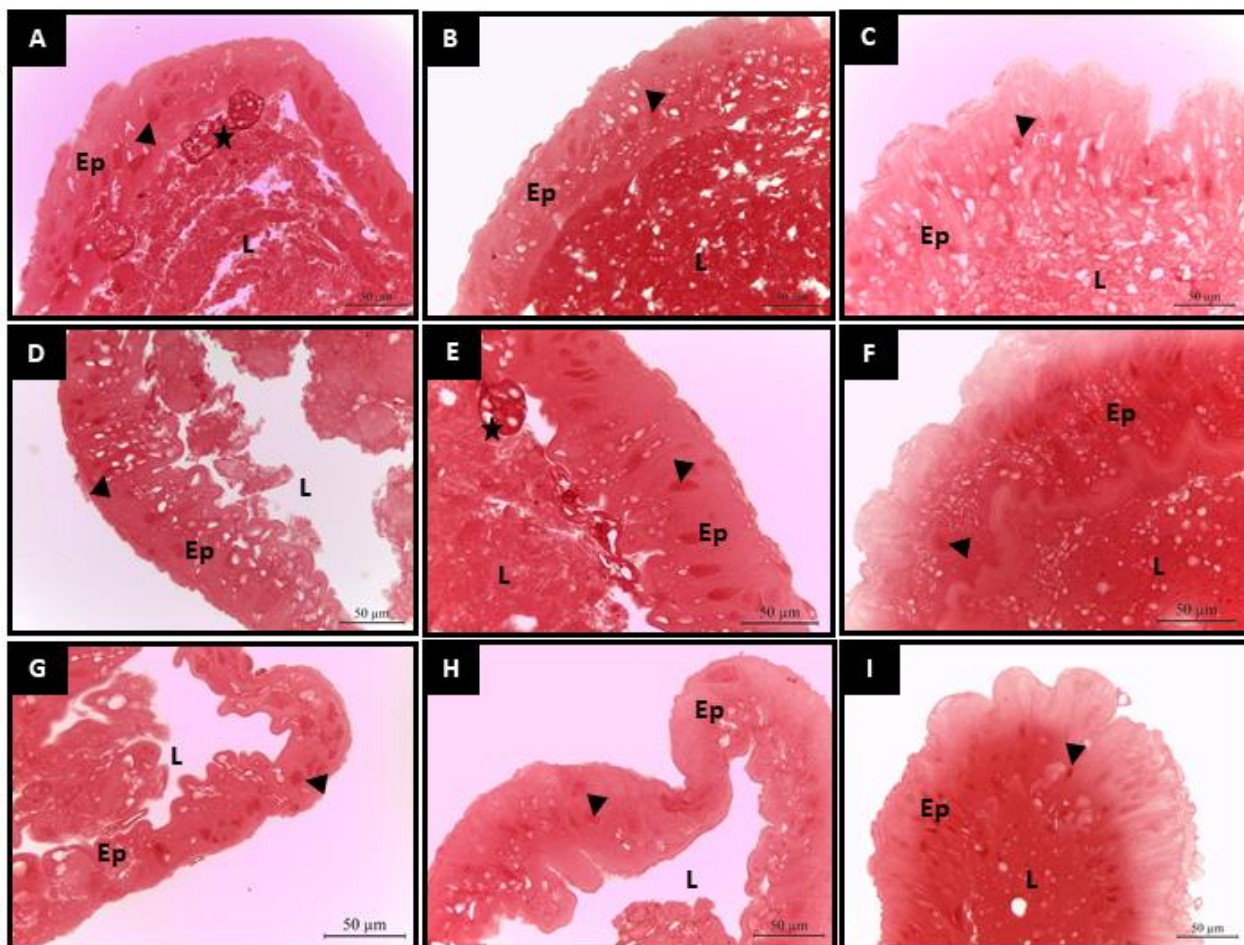


Figura 4. Histoquímica da região mediana do intestino médio de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* para proteínas totais. A – controle após 12 h; B – controle após 24 h; C – controle após 48 h; D – tratado com *Mentha spicata* após 12h; E – *Mentha spicata* após 24 h; F – *Mentha spicata* após 48; G – tratado com *Melaleuca alternifolia* após 12 h; H – *Melaleuca alternifolia* após 24 h; I – *Melaleuca alternifolia* após 48 h. L – Lúmen, Ep – epitélio simples, Ponta de seta – núcleo da célula colunar, Estrela – protusões celulares demonstrando a presença de conteúdo proteico. Coloração com Xylidine Ponceau. Barra = 50µm.

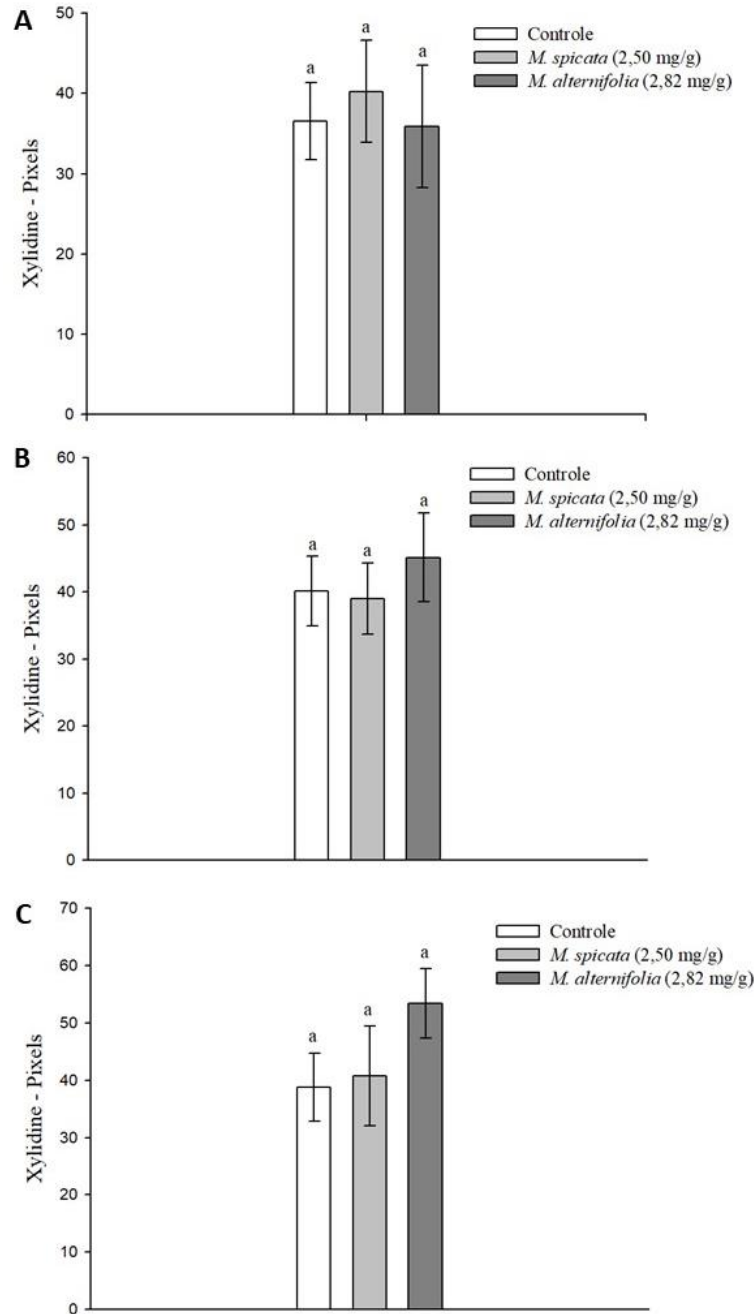


Figura 5. Quantidade de pixels (média ± EP) para proteína total encontradas no epitélio da região mediana do intestino médio de ninfas de quinto ínstar de *Podisus nigrispinus*. A – após 12 horas, B – após 24 horas e C – após 48 horas. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey HSD a 5% de significância ($P > 0,05$).

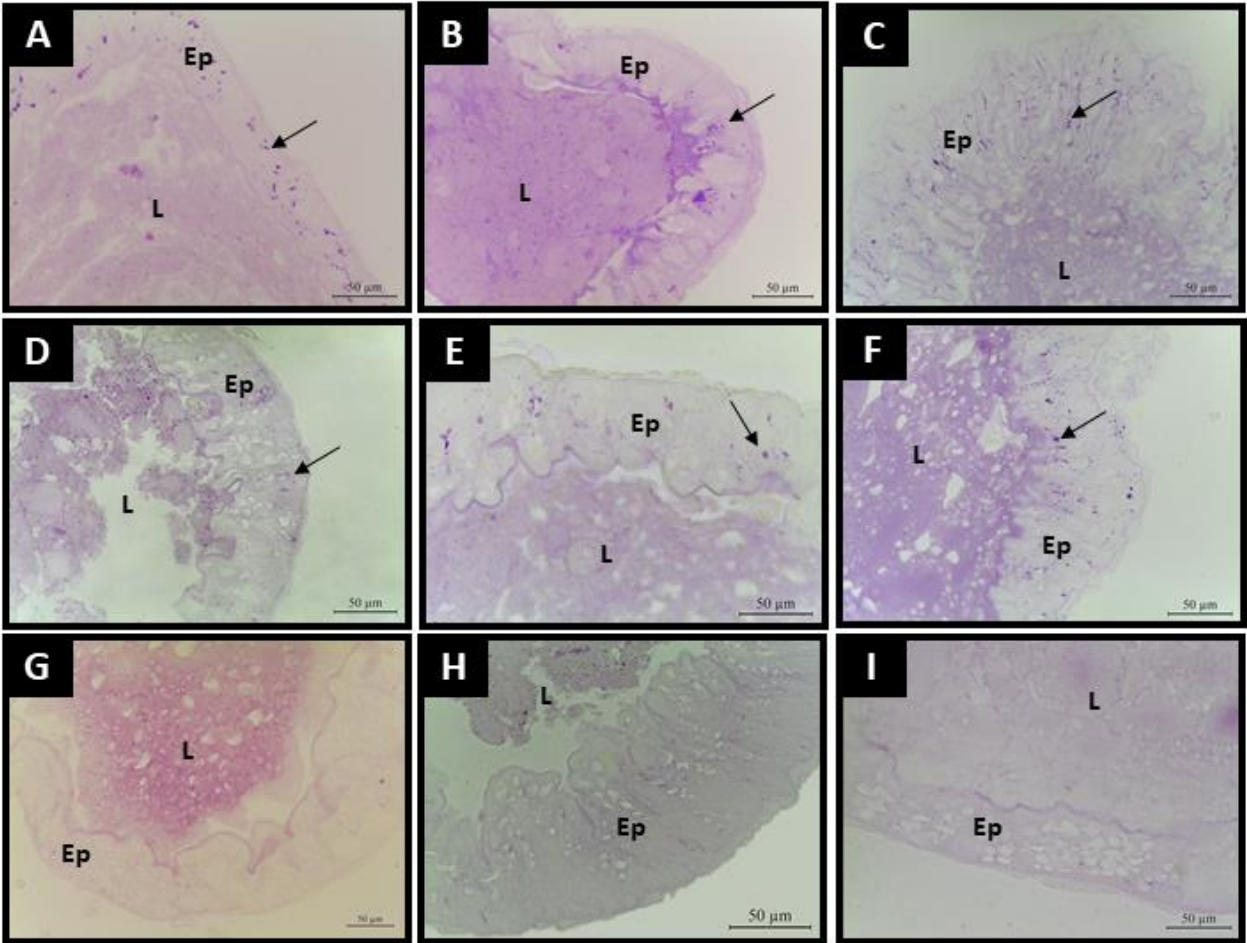


Figura 6. Histoquímica da região mediana do intestino médio de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* para carboidratos neutros. A – controle após 12 h; B – controle após 24 h; C – controle após 48 h; D – tratado com *Mentha spicata* após 12h; E – *Mentha spicata* após 24 h; F – *Mentha spicata* após 48; G – tratado com *Melaleuca alternifolia* após 12 h; H – *Melaleuca alternifolia* após 24 h; I – *Melaleuca alternifolia* após 48 h. L – Lúmen, Ep – epitélio simples, Seta – grânulos de glicogênio. Coloração com Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.). Notar quase ausência de grânulos de glicogênio no tratamento com *Melaleuca alternifolia*. Barra = 50µm.

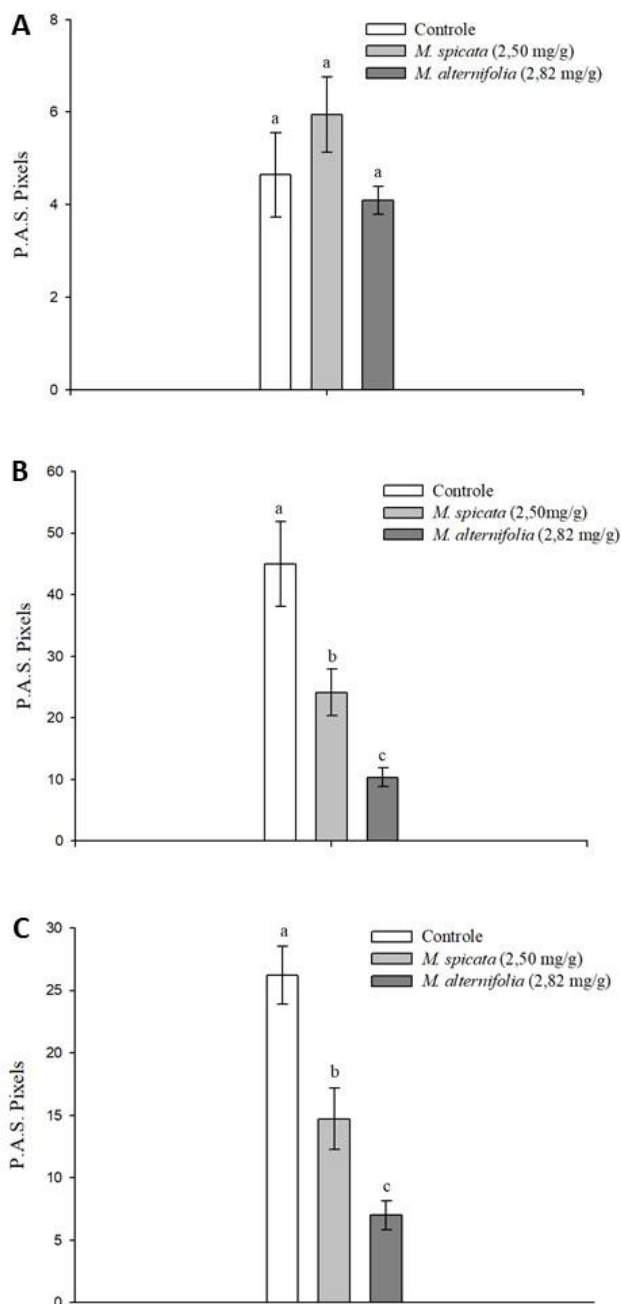


Figura 7. Quantidade de pixels (média ± EP) para carboidratos neutros encontrados no epitélio da região mediana do intestino médio de ninfas de quinto ínstar de *Podisus nigrispinus* 12. A – após 12 horas, B – após 24 horas e C – após 48 horas. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância ($P > 0,05$).

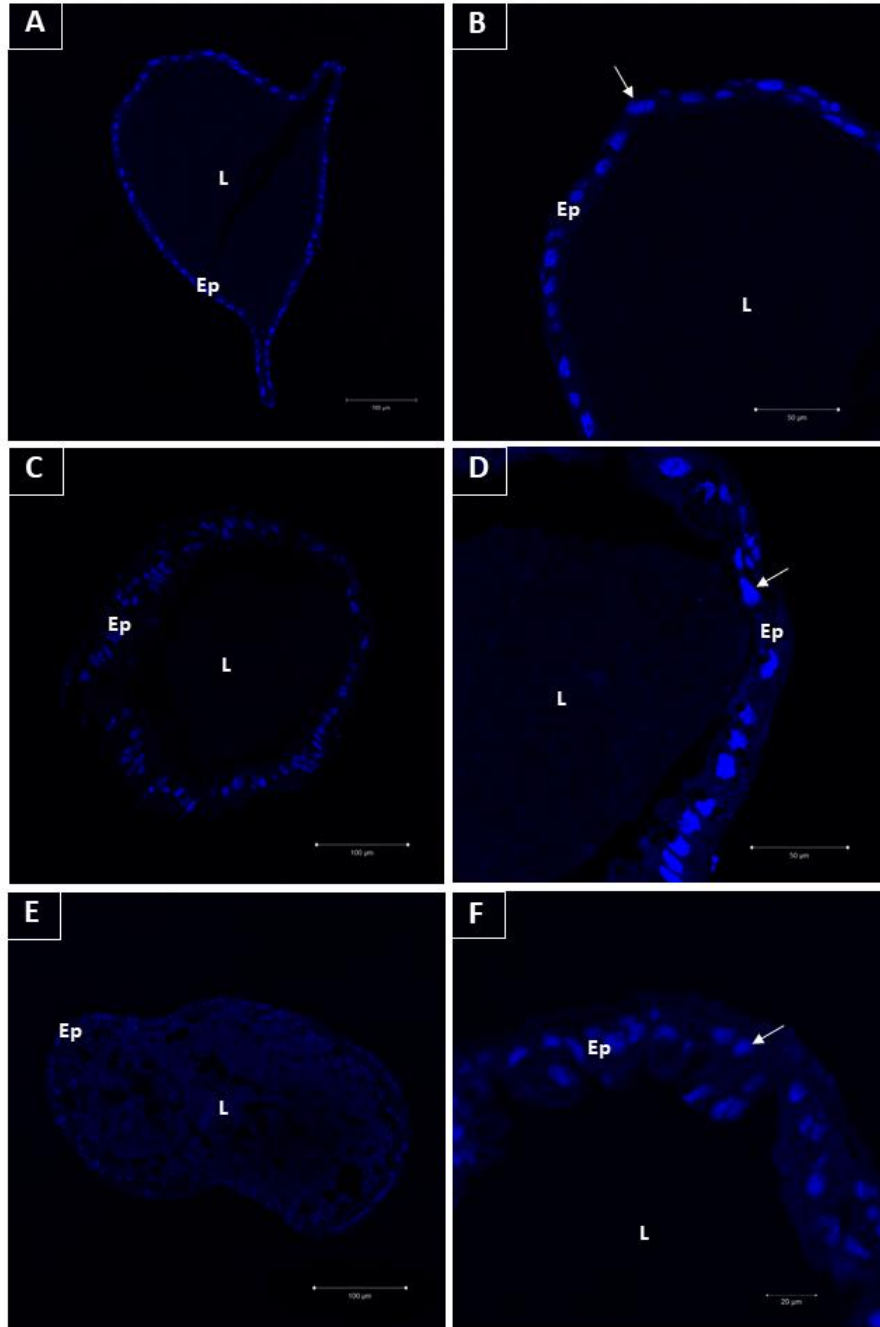


Figura 8. Imunofluorescência para detecção de apoptose de células epiteliais da região mediana do intestino de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus*, 12 h após a alimentação com lagartas tratadas. A e B – controle; C e D – *Mentha spicata*; E e F – *Melaleuca alternifolia*. L – Lúmen, Ep – epitélio simples, Seta – núcleo da célula digestiva. Barras =100μm e 50μm.

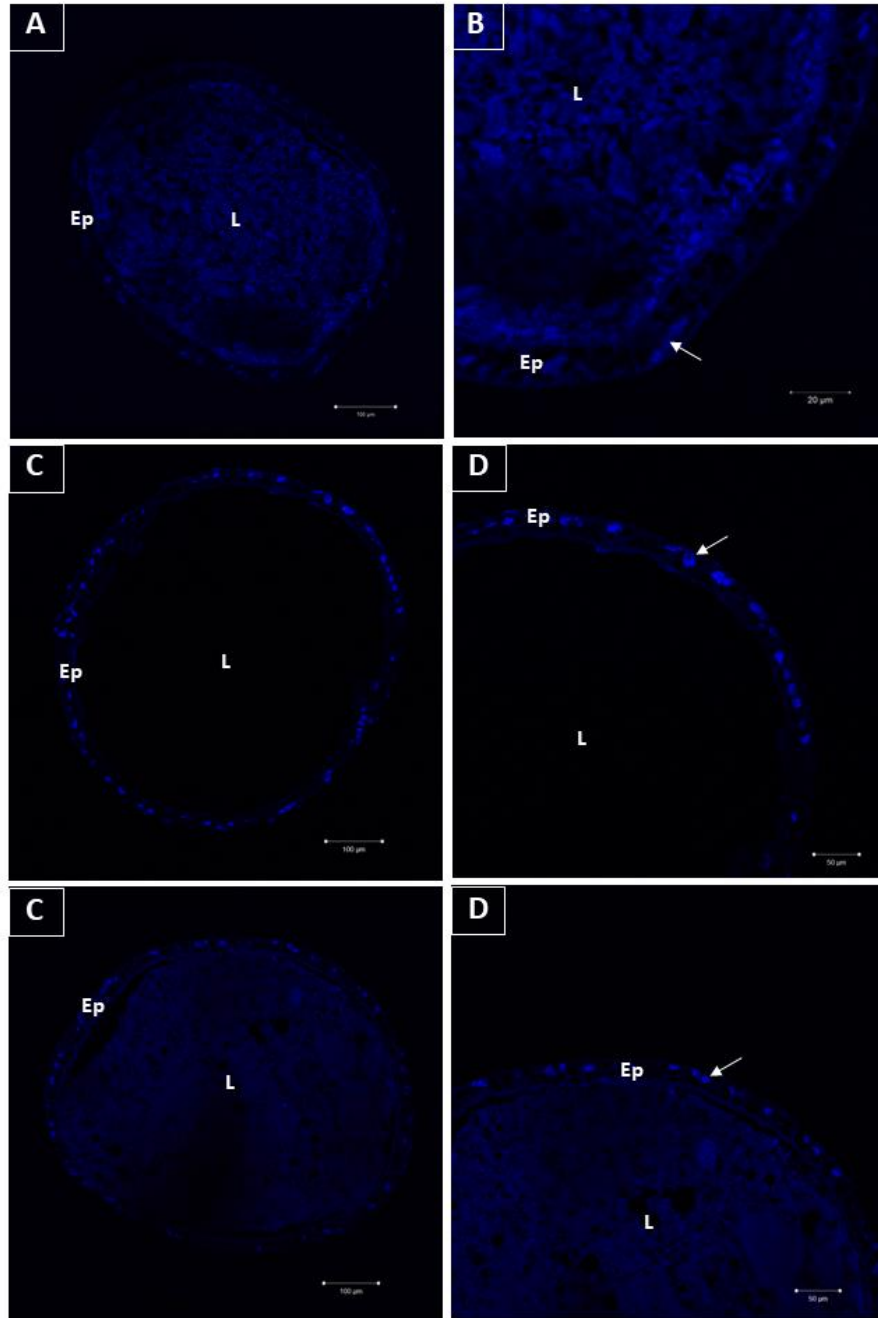


Figura 9. Imunofluorescência para detecção de apoptose de células epiteliais da região mediana do intestino de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus*, 48 h após a alimentação com lagartas tratadas. A e B – controle; C e D – *Mentha spicata*; E e F – *Melaleuca alternifolia*. L – Lúmen, Ep – epitélio simples, Seta – núcleo da célula digestiva Barras = 100μm e 50μm.

CAPÍTULO 3

EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha spicata* L. E *Melaleuca alternifolia*
CHEEL SOBRE A NUTRIÇÃO E REPRODUÇÃO DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS)
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

VALESKA A. Á. BRAGA¹, VALÉRIA W. TEIXEIRA^{1,2}, GLAUCILANE S. CRUZ¹ E ÁLVARO A. C.
TEIXEIRA²

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

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

¹Braga V.A.A., V.W. Teixeira, G.S. Cruz & A.A.C. Teixeira. Efeito dos óleos essenciais de *Mentha spicata* L. e *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre a nutrição e reprodução de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). A ser submetido.

RESUMO – Para a execução eficiente do Manejo Integrado de Pragas é necessário o uso de inseticidas menos tóxicos aos inimigos naturais e ao meio ambiente. Nesse contexto, o uso de inseticidas botânicos, a exemplo dos óleos essenciais, vem sendo apontado como uma potencial ferramenta para o controle de pragas. Assim, objetivou-se avaliar os possíveis efeitos por ingestão da DL₅₀ dos óleos essenciais de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia* na nutrição e reprodução de *Podisus nigrispinus* após a alimentação com *Alabama argillacea* tratadas com os respectivos óleos. Para isso, avaliou-se os índices de proteínas, glicogênio, açúcares e lipídios e, na reprodução, foram utilizados os parâmetros de: período de pré-oviposição, número de posturas, número de ovos, número de ovos por postura, percentagem de viabilidade dos ovos e longevidade de fêmeas. O óleo de *M. spicata* não provocou alterações nutricionais significativas, porém, causou redução na viabilidade de ovos. Já *M. alternifolia* provocou um aumento na quantidade de proteínas, redução na viabilidade de ovos e no número de ovos por postura. No entanto, essas alterações não foram responsáveis por modificar características vitais do predador. Sendo assim, com base nos dados obtidos, pode-se afirmar que os óleos de *M. spicata* e *M. alternifolia* podem ser utilizados em associação com *P. nigrispinus* em um manejo integrado de *Alabama argillacea*, contanto que haja um estudo ecológico prévio.

PALAVRAS-CHAVE: Predador, reprodução, óleo essencial, nutrição, MIP

EFFECTS OF *Mentha spicata* L. AND *Melaleuca alternifolia* CHEEL ESSENTIAL OILS
IN *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) NUTRITION AND
REPRODUCTION

ABSTRACT – In order to achieve an efficient Integrated Pest Management, it is necessary to use less toxic insecticides to natural predators and to the environment. In this context, the use of botanical insecticides, such as essential oils, has been pointed out as a potential tool for pest control. Therefore, the main goal of this study was to evaluate the possible effects of *Mentha spicata* and *Melaleuca alternifolia* LC₅₀ essential oils over nutrition and reproduction rates of *Podisus nigrispinus*, fed with *Alabama argillacea* treated with the aforementioned oils. The nutritional parameters were protein, glycogen, sugar and lipid rates, and, on reproduction, the parameters were: pre-oviposition period, number of postures, number of eggs, number of eggs per posture, percentage of viability of eggs and longevity of females. Results have come to show *M. spicata* did not provoke significant nutritional changes, although it caused a reduction in egg viability. On the other hand, *M. alternifolia* caused an increase in the amount of proteins, reduction in the viability of eggs and reduction in the number of eggs per posture. Nevertheless, these changes were not responsible for modifying vital characteristics from the predator. Therefore, based on the data, *Mentha spicata* and *Melaleuca alternifolia* essential oils can be used, in association with *Podisus nigrispinus*, in an integrated management of *Alabama argillacea*, provided that ecological studies be made.

KEY WORDS: predator, reproduction, essential oil, nutrition, IMP

Introdução

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) procura reduzir as perdas econômicas causadas às culturas a partir da utilização de práticas ecológica e economicamente seguras, conservando recursos naturais e o meio ambiente (Naranjo *et al.* 2015). Para a execução eficiente do MIP, portanto, é necessário o uso de inseticidas menos tóxicos aos inimigos naturais e ao ecossistema (Evangelista *et al.* 2002). Nesse contexto, o uso de inseticidas botânicos, a exemplo dos óleos essenciais, vem sendo apontado como uma potencial ferramenta para o controle de pragas e, conseqüentemente, para substituição dos inseticidas sintéticos (Cruz *et al.* 2017).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas que apresentam, dentre outras funções, ação inseticida. Ao utilizá-lo no controle de pragas, diversos efeitos podem ser ocasionados, dentre eles alterações na longevidade, reprodução, fecundidade e/ou fertilidade, taxa de emergência, tempo de desenvolvimento e nutrição dos insetos (Milano *et al.* 2010, Cloyd 2012). Dentre esses, estudos que avaliem parâmetros bioquímicos nutricionais são fundamentais para investigar os possíveis efeitos tóxicos causados (Sharma *et al.* 2011).

Os óleos advindos das espécies vegetais *Mentha spicata* L. e *Melaleuca alternifolia* Cheel apresentam ação inseticida comprovada para diversos insetos (Pavela 2005, Callander & James 2012, Govindarajan *et al.* 2012, Liao *et al.* 2016). Embora atualmente tenha aumentado o número de estudos para demonstrar a eficiência de óleos essenciais no controle de pragas, ainda são encontrados poucos produtos comerciais que sejam baseados nesses metabólitos. Um dos fatores responsáveis por isso é a baixa quantidade de estudos relacionando-os com organismos não-alvo (Pavela & Benelli 2016). Por isso, pesquisas avaliando seus efeitos sobre inimigos naturais são de grande importância.

Entre os inimigos naturais, os predadores são considerados a primeira linha de defesa contra espécies fitófagas (Oliveira *et al.* 2002). *Podisus nigrispinus* (Dallas), bem como outros

percevejos pertencentes à família Pentatomidae, é um predador generalista encontrado naturalmente em diversos agroecossistemas e que age no controle natural de pragas desfolhadoras de culturas de algodoeiro, sendo de grande importância no controle biológico de *Alabama argillacea* (Hübner) (Molina-Rugama *et al.* 1998, Medeiros *et al.* 2000, Oliveira *et al.* 2002, Reis *et al.* 2018). Essa espécie é uma das principais pragas desfolhadoras presentes na cotonicultura, capaz de reduzir a capacidade fotossintética da planta devido a uma desfolha intensa (Miranda *et al.* 2002, Sujii *et al.* 2007).

Dessa maneira, objetivou-se aqui avaliar os possíveis efeitos dos óleos essenciais de *M. spicata* e *M. alternifolia* na nutrição e reprodução de *P. nigrispinus* após o tratamento e alimentação de *A. argillacea* tratadas e não tratadas com as DL₅₀ dos respectivos óleos.

Material e Métodos

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

Plantio de Algodão. O cultivo do algodão foi conduzido em casa de vegetação do Setor de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da UFRPE. Para a manutenção da criação e condução dos experimentos de *A. argillacea*, plantas de algodão da variedade BRS Safira foram mantidas em casa de vegetação. Para isso, foram utilizados vasos de capacidade de 5 litros contendo solo. A adubação de fundação foi feita utilizando a formulação NPK (10-10-10), e quinzenalmente adubação de manutenção utilizando NPK e uréia.

Criação de *Alabama argillacea*. As lagartas de *A. argillacea* foram mantidas em gaiolas de PVC (20,0 cm de altura x 15 cm de diâmetro), cuja abertura superior foi coberta com um tecido fino do tipo voil e a base forrada com papel sulfite. No interior das gaiolas foram fornecidas

diariamente folhas de algodoeiro para a alimentação das lagartas. Os adultos também foram mantidos nessas gaiolas, onde houve o revestimento interno com papel sulfite, tanto na base, quanto nas laterais. A abertura superior da gaiola foi coberta com plástico filme e a alimentação foi realizada com solução de mel a 10%, mel + levedo (1:1) e água.

Obtenção e Criação de *Podisus nigrispinus*. Os percevejos utilizados nos bioensaios foram oriundos da Unidade de Controle Biológico da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Campina Grande, Paraíba, e criados seguindo a metodologia adaptada de Oliveira *et al.* (2004) e Zanuncio *et al.* (2001). Foram mantidos a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5\%$ de U.R. e fotofase de 12:12 (luz:escuro), alimentados com larvas e pupas de *Tenebrio molitor* Linnaeus.

Obtenção dos Óleos Essenciais. Os óleos essenciais de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia* foram obtidos da empresa Ferquima Ind. E Com. Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). As informações técnicas desses produtos e seus parâmetros de qualidade (coloração, pureza, odor, densidade a 20°C e índice de refração a 20°C) são descritos em relatório técnico fornecido pela empresa, conforme site <<http://ferquima.com.br>>.

Tratamento de *Alabama argillacea*. Para a montagem do bioensaio, foram utilizadas lagartas de terceiro ínstar de *A. argillacea* separadas em três diferentes grupos, sendo um controle e dois tratados. Os tratamentos consistiram na diluição dos óleos de *M. spicata* e *M. alternifolia* em acetona na Dose Letal 50 (DL₅₀), correspondendo a 2,50 e 2,82 mg/g de inseto, respectivamente. As Doses Letais foram determinadas previamente a partir de testes preliminares por contato tópico (Tabela 1). Para o tratamento controle foi utilizado acetona pura. A aplicação tópica foi realizada na região protorácica, sendo aplicado 1,0 μL dos compostos com o auxílio de uma seringa Hamilton TM 50 μL . As lagartas devidamente tratadas foram utilizadas para a execução dos ensaios seguintes.

Ensaio Bioquímico. Fêmeas de *P. nigrispinus* foram isoladas logo após a emergência e mantidas em jejum durante 24 horas, para garantir o completo consumo das lagartas tratadas. Após ser atingido esse tempo, as fêmeas foram pesadas e selecionadas aquelas que apresentaram valores entre 30 e 40 mg, para reduzir a influência da massa do inseto nos resultados obtidos. Posteriormente, foram alimentadas com lagartas de terceiro ínstar de *A. argillacea* tratadas e após todo o seu consumo, a alimentação passou a ser realizada com larvas de *T. molitor* e com chumaço de algodão umedecido com água destilada. A alteração da espécie de presa foi realizada porque a alimentação realizada apenas com *A. argillacea* demandaria uma quantidade maior de indivíduos. O experimento foi realizado a temperatura de $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

Após 48 horas da instalação do experimento, as fêmeas foram maceradas em tampão fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,1 M), na proporção de 1 inseto/1 mL de tampão, caracterizando uma repetição. O macerado foi coletado com um pipetador automático de 1,0 mL e armazenado e etiquetado em tubos do tipo Eppendorf de 2 mL. Todo procedimento foi efetuado em baixa temperatura, para evitar a oxidação do material. Cada tratamento (controle, *M. spicata* e *M. alternifolia*) consistiu de 10 repetições, totalizando 30 repetições analisadas.

Posteriormente, ocorreu o preparo para análise de proteínas, lipídios, açúcares e glicogênio. As amostras foram primeiramente centrifugadas por 3 minutos a 3000 rpm e em seguida foram coletados 100 μL de cada amostra para análise das proteínas solúveis totais e 200 μL para as análises de lipídios, açúcar total e glicogênio.

Extração e Quantificação das Proteínas Solúveis Totais. As proteínas solúveis totais foram determinadas a partir do método de Bradford (1976). Os 100 μL de cada amostra de macerado foram transferidos para tubos de vidro de centrifugação, adicionando-se o corante Bradford até alcançar o volume de 5 mL. As misturas foram então homogêneas em agitador tipo vórtex e

em seguida permaneceram em repouso por 2 minutos em ambiente com ausência de luz. Posteriormente, verificou-se a absorvância em espectrofotômetro UV visível/190-1000 nm Biospectro SP-220 em comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa SAS PROC PROBIT (SAS Institute 2002).

Extração e Quantificação de Lipídio, Açúcar Total e Glicogênio. Os conteúdos de lipídio, açúcar total e glicogênio foram avaliados utilizando o método de Van Handel (1985a, b), onde 200 µL do macerado homogeneizado foram acrescidos de 200 µL de sulfato de sódio e 800 µL de clorofórmio e metanol (1:1), e centrifugado a 3000 rpm durante 3 min. O precipitado foi utilizado para a análise de glicogênio, e o sobrenadante foi transferido para um microtúbulo onde foi acrescentado 600 µL de água destilada e centrifugado a 3000 rpm durante 3 minutos. O precipitado foi utilizado para a análise de lipídios e o sobrenadante para análise de açúcar total. O lipídio foi tratado com reagente ácido fosfórico/vanilina enquanto que o açúcar total e o glicogênio, tratados com reagente ácido sulfúrico/antrona. Posteriormente, verificou-se a absorvância em espectrofotômetro UV visível/190-1000 nm Biospectro SP-220 em comprimento de onda de 625 nm. A unidade de leitura utilizada foi µg/mL. Os resultados de lipídio total foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa SAS PROC PROBIT (SAS Institute 2002). Já os valores referentes a glicogênio e açúcar total foram transformados em raiz ($x+0,5$) para assumir normalidade e homogeneidade, sendo posteriormente submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey HSD a 5% de significância, através do programa SAS PROC PROBIT (SAS Institute 2002).

Ensaio de Reprodução. Adultos machos e fêmeas de *P. nigrispinus* foram isolados logo após a emergência e pesados, sendo utilizadas fêmeas com massa variando entre 45 e 70 mg e machos

com massa entre 30 e 40 mg, para evitar que grandes diferenças nas massas desses insetos influenciassem os resultados reprodutivos. Em seguida, os adultos foram alimentados com lagartas de terceiro ínstar de *A. argillacea* tratadas e foram mantidos em tubos de ensaio de fundo chato (85 mm x 25 mm) durante cinco dias, para que houvesse completa maturação sexual. A alimentação foi realizada diariamente com larvas de *T. molitor* e um chumaço de algodão umedecido com água destilada. A alteração da espécie de presa foi realizada porque a alimentação realizada apenas com *A. argillacea* demandaria uma quantidade maior de indivíduos. Após o tempo necessário ser atingido, os casais foram formados com indivíduos escolhidos randomicamente. O acasalamento ocorreu em potes plásticos de 500 mL forrados com papel sulfite, utilizado como local de oviposição. Na tampa do recipiente continham dois orifícios, um para fornecimento de alimento e outro para a colocação de um tubo de plástico, tipo anestésico, contendo água destilada e vedado com chumaço de algodão, para o fornecimento contínuo de água e manutenção da umidade. Diariamente os casais foram avaliados e alimentados com pupas de *T. molitor* e foram mantidos sob análise até os 20 dias subsequentes ao início do período de oviposição. Esse período de análise foi determinado a partir da observação de que *P. nigrispinus* quando alimentado diariamente apresenta um período reprodutivo de aproximadamente 20 dias (Molina-Rugama *et al.* 1998, Oliveira *et al.* 2002). As posturas foram coletadas diariamente e colocadas em placas de Petri de plástico (60mm x 15mm) para avaliação diária de eclosão. Foram consideradas posturas cada agregado de ovos postos pelas fêmeas. Ovos colocados espaçadamente também foram considerados distintamente.

Os parâmetros avaliados foram: período de pré-oviposição, número de posturas por fêmea, número de ovos por fêmea, número de ovos por postura, percentagem de viabilidade dos ovos, isto é, percentual de eclosão de ovos em relação ao número total de ovos depositados por cada fêmea, e longevidade de fêmeas durante os 20 dias de análise. Os resultados de período de pré-

oviposição, número de posturas por fêmea, número de ovos por fêmea e número de ovos por postura foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa SAS PROC PROBIT (SAS Institute 2002). Os dados de viabilidade de ovos e longevidade de fêmeas em 20 dias não assumiram normalidade e homogeneidade e foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância utilizando o mesmo programa.

Resultados

Ensaio Bioquímicos. A quantificação de proteínas totais das fêmeas demonstrou que o óleo de *M. alternifolia* promoveu um aumento ($29,92 \pm 3,01$) quando comparadas ao controle ($13,94 \pm 1,86$). Já as tratadas com o óleo de *M. spicata* ($20,00 \pm 3,52$) não diferiram dos outros tratamentos ($F = 7,81$; $P = 0,0021$) (Fig. 1). Na quantificação de glicogênio, *M. spicata* ($17,07 \pm 5,55$) e *M. alternifolia* ($41,37 \pm 7,35$) não diferiram do controle ($31,57 \pm 8,05$) ($F = 4,43$; $P = 0,0217$). Porém, os dois tratamentos diferiram entre si, havendo um aumento nos valores de *M. alternifolia* em relação a *M. spicata* ($F = 4,43$; $P = 0,0217$) (Fig. 2). As quantidades de açúcar total ($F = 1,01$; $P = 0,3773$) e lipídio total ($F = 0,53$; $P = 0,5938$) não diferiram entre os diferentes tratamentos e o controle (Figs. 3 e 4).

Ensaio de Reprodução. Os parâmetros de período de pré-oviposição ($F = 3,00$; $P = 0,0666$), número de posturas por fêmea ($F = 0,11$; $P = 0,8925$), número de ovos por fêmea ($F = 3,36$; $P = 0,0499$) e longevidade das fêmeas em 20 dias ($\chi^2 = 0,5635$; $P = 0,7545$) não diferiram entre os diferentes tratamentos. A avaliação do número de ovos por postura demonstrou uma redução no tratamento com *M. alternifolia* ($9,46 \pm 0,79$) quando comparado ao controle ($13,94 \pm 0,71$), enquanto *M. spicata* ($11,55 \pm 1,26$) não diferiu dos dois tratamentos ($F = 5,49$; $P = 0,0100$). Já em relação à viabilidade de ovos, os tratamentos com os óleos resultaram em uma redução na

eclosão ($67,44 \pm 11,51$ em *M. alternifolia* e $65,96 \pm 9,19$ em *M. spicata*), quando comparados ao controle ($90,32 \pm 1,73$) ($\chi^2 = 0,0915$; $P = 0,7623$) (Tabela 1).

Discussão

Modificações na absorção de nutrientes desencadeiam desordens alimentares e/ou deficiências nutricionais e essas são capazes de provocar alterações reprodutivas, tais como redução do número e da viabilidade de ovos (Milano *et al.* 2010, Cruz *et al.* 2017). Essas mudanças são de grande importância porque prejudicam a perpetuação da espécie no ambiente (Tena-Sempere 2008). Dessa maneira, o desempenho biológico dos insetos é influenciado pela obtenção adequada de nutrientes (Sarfraz *et al.* 2006, Cruz *et al.* 2017).

O aumento no teor de proteínas nas fêmeas tratadas com o óleo essencial de *M. alternifolia* demonstra um acúmulo dessas moléculas em seu organismo. O mesmo foi observado por Dutra (2018) ao tratar por contato tópico *S. frugiperda* com a DL_{50} (4,18 mg/g) e DL_{70} (7,62 mg/g) do óleo essencial de *Piper marginatum* Jacq, onde o estresse causado pela contaminação desse produto acarretou no acúmulo dessas moléculas. Aqui, esse fato pode ter ocorrido devido a uma maior produção de enzimas digestivas na tentativa de degradar o óleo de *M. alternifolia*, uma vez que essa região é descrita por Fialho *et al.* (2012) como sendo também local de digestão de nutrientes. Outra possível explicação é que o estresse ligado a exposição por inseticidas também afeta as proteínas a partir de um aumento na produção de enzimas de detoxificação, tais como citocromo P450, glutatona-S-transferases e hidrolases que desempenham importantes funções no metabolismo desses compostos (Yu, 2004).

O tratamento com *M. alternifolia* também levou a uma redução na viabilidade de ovos. Dessa forma, o aumento nos níveis de proteína, citado anteriormente, não pode estar ligado a uma maior produção de proteínas reprodutivas, como a vitelogenina. Sendo assim, a redução na

eclosão deve estar relacionada a uma baixa fertilidade dos adultos ocasionada pela ingestão desses óleos. Ou pode ter ocorrido a realização de poucas cópulas entre os casais desses tratamentos, visto que, segundo Torres & Zanuncio (2001), fêmeas de *P. nigrispinus* que copulam menos de três vezes, vão acabar seu estoque de espermatozoides antes do fim da vida reprodutiva. Ou seja, elas necessitam de cópulas repetidas para manutenção da fertilidade. Sendo assim, a postura pode continuar ocorrendo, demonstrando manutenção da fecundidade da fêmea, mas os ovos não eclodem, devido à baixa fertilidade.

A taxa de eclosão de *P. nigrispinus* também foi reduzida em estudos realizados por outros autores. Poderoso *et al.* (2016) ao imergirem os ovos em diferentes concentrações (0, 1, 3, 5, 7 e 10%) dos extratos de *Annona squamosa* L. e *Ricinus communis* L. e flores de *Azadirachta indica* A. Juss obtiveram uma redução na eclosão de ninfas. Os autores concluíram que, apesar de esses extratos possuírem ação inseticida, o seu uso deve considerar possíveis danos a esse inimigo natural. Evangelista *et al.* (2002) trabalharam com o efeito de contato residual e com a associação do contato residual com ingestão de lufenurum nas concentrações de 10 e 50 g de i.a./ha e constataram que a viabilidade de ovos de *P. nigrispinus* foi afetada por ambas vias de contaminação estudadas. O déficit nesse parâmetro apresenta grande impacto porque a fecundidade e a fertilidade nos insetos são responsáveis por determinar o tamanho da população descendente (Stark & Banks 2003).

Nesse trabalho, os tratamentos com os óleos de *M. spicata* e *M. alternifolia* não provocaram redução significativa no número de ovos postos por fêmea. Diminuição desse parâmetro foi observada por Cruz *et al.* (2017) após submeterem lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* ao tratamento tópico com a DL₅₀ de dois componentes de óleos essenciais: trans-anethole, limoneno e a combinação de trans-anethole + limoneno. Em seus resultados, foi notada uma deficiência nutritiva que desencadeou um prejuízo na reprodução dessa espécie, onde houve

redução no período de oviposição e no número de ovos. Dessa maneira, a qualidade e quantidade de alimento é capaz de afetar parâmetros como número de ovos, sobrevivência, longevidade e viabilidade (Zanuncio *et al.* 2002). Já em relação à redução do número de ovos por postura encontrada aqui no grupo tratado com o óleo de *M. alternifolia*, essa se deu principalmente porque as fêmeas depositavam pouca quantidade de ovos por postura.

Estudos relacionando parâmetros nutritivos e reprodutivos também foram executados por Cruz *et al.* (2015). Esses autores trabalharam com *S. frugiperda* e realizaram o tratamento com o óleo de *Syzygium aromaticum* (L.) na concentração de 50 mg/L. Os autores obtiveram uma redução no quantitativo de proteínas e carboidratos neutros nos ovários das fêmeas e conseqüentemente um decréscimo na capacidade reprodutiva, onde houve redução no número de ovos e na eclosão dos mesmos. Aqui, no entanto, isso não foi observado, visto que os óleos estudados não levaram a redução de nenhum dos nutrientes avaliados nas fêmeas, quando comparados aos grupos controle. Dessa forma, as alterações reprodutivas não podem ser justificadas pela nutrição animal.

Estudos que avaliem o efeito de óleos essenciais sobre organismos não-alvo merecem destaque para que se possa determinar o seu potencial de uso no Manejo Integrado de Pragas. Mediante o exposto, não se exclui a possibilidade de utilização dos óleos de *M. spicata* e *M. alternifolia* para o controle de *A. argillacea* em campos contendo o predador *P. nigrispinus*, uma vez que não foram identificadas alterações em características vitais. Porém, seu uso deve considerar possíveis danos a esse inimigo natural, por causar redução nas gerações subsequentes.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos também a

Unidade de Controle Biológico (UCB) da Embrapa Algodão, Campina Grande/PB pelo suporte para o desenvolvimento deste estudo e ao Centro de Apoio a Pesquisa da UFRPE (CENAPESQ) pela disponibilização de equipamentos.

Literatura Citada

- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Callander, J.T. & P.J. James. 2012.** Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. *Vet. Parasitol.* 184: 271-278.
- Cloyd, R. 2012.** Indirect effects of pesticides on natural enemies, p. 1-24. In R.P. Soundararajan (eds.), *Pesticides - Advances in chemical and botanical pesticides*. IntechOpen, 382p.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, Á.A.C. Teixeira, A.C. Araújo, T.J.S. Alves, F.M. Cunha & M.O. Breda. 2015.** Histological and histochemical changes by clove essential oil upon the gonads of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Morphol.* 33: 1393-1400.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, L.M. Silva, K.A. Dutra, C.A. Guedes, J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, B.C. Araújo & Á.A.C. Teixeira. 2017.** Chemical composition and insecticidal activity of the essential oils of *Foeniculum vulgare* Mill., *Ocimum basilicum* L., *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex Bailey, *Eucalyptus citriodora* Hook and *Ocimum gratissimum* L. and their major components on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. ESSENT. OIL BEAR. PL.* 20: 1360-1369.
- Dutra, K.A. 2018.** Avaliação dos óleos essenciais de Piperaceae sobre a toxicidade e parâmetros fisiológicos em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e efeito sinérgico dos seus componentes majoritários. Tese de Doutorado, UFRPE, Recife, 127p.
- Evangelita Jr., W.S., C.S.A. Silva-Torres & J.B. Torres. 2002.** Toxicidade de lufenuron para *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotrop. Entomol.* 31: 319-326.
- Govindarajan, M., R. Sivakumar, M. Rajeswari & K. Yogalakshmi. 2012.** Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitol. Res.* 110: 2023–2032.
- Liao, M., J.J. Xiao, L.J. Zhou, X. Yao, F. Tang, R.M. Hua, X.W. Wu & H.Q. Cao. 2016.** Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on the *Helicoverpa armigera*. *J. App. Ent.* 140: 1-8.

- Medeiros, R.S., F.S. Ramalho, J.E. Serrão & J.C. Zanuncio. 2003.** Temperature influence on the reproduction of *Podisus nigrispinus*, a predator of the noctuid larva *Alabama argillacea*. *Biocontrol*. 48: 695-704.
- Medeiros, R.S., F.S. Ramalho, W.P. Lemos & J.C. Zanuncio. 2000.** Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). *J. Appl. Entomol.* 124: 319-324.
- Milano, P., E.B. Filho, J.R.P. Parra, M.L. Oda & F.L. Cônsoli. 2010.** Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade nas espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae. *Neotrop. Entomol.* 39: 172-180.
- Miranda, J.E., J.E.M. Oliveira, K.C.G. Rocha, M. Furlan. 2002.** Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Bras. Ol. Fibros.* 6: 557-563.
- Molina-Rugama, A.J., J.C. Zanuncio, D. Pratissoli & I. Cruz. 1998.** Efeito do intervalo de alimentação na reprodução e na longevidade do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Na. Soc. Entomol. Brasil.* 27: 77-84.
- Naranjo, S.E., P.C. Ellsworth & G.B. Frisvold. 2015.** Economic value of biological control in Integrated Pest Management of managed plant systems. *Annu. Rev. Entomol.* 60: 621-645.
- Oliveira, H.N., D. Pratissoli, E.P. Pedruzzi & M.C. Espindula. 2004.** Development of the predator *Podisus nigrispinus* fed on *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Pesqu. Agropecu. Bras.* 39: 947-951.
- Oliveira, J.E.M., J.B. Torres, A.F. Carrano-Moreira & F.S. Ramalho. 2002.** Biologia de *Podisus nigrispinus* predando lagartas de *Alabama argillacea* em campo. *Pesqu. Agropec. Bras.* 37: 7-14.
- Pavela, R. & G. Benelli. 2016.** Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci.* 21: 1000-1007.
- Pavela, R. 2005.** Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia* 76: 691-696.
- Poderoso, J.C.M., M.E. Correia-Oliveira, T.X. Chagas, J.C. Zanuncio & G.T. Ribeiro. 2016.** Effects of plant extracts on developmental stages of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Fla. Entomol.* 99: 113-116.
- Reis, T.C., M.A. Soares, J.B. Santos, C.A. Santos, J.E. Serrão, J.C. Zanuncio & E.A. Ferreira. 2018.** Atrazine and nicosulfuron affect the reproductive fitness of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Na. Acad. Bras. Ciênc.* 90: 3625-3633.
- Sarfraz, M., L.M. Dossall & B.A. Keddie. 2006.** Diamondback moth-host plant interactions: Implications for pest management. *Crop Prot.* 25: 625-639.

- SAS Institute. 2002.** User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute INC., Cary, NC.
- 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. *Asina. Pac. J. Trop. Med.* 4: 301-304.
- Stark, J.D. & J.E. Banks. 2003.** Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 505-519.
- Sujii, E.R., V.A. Beserra, P.H. Ribeiro, P.V. da Silva-Santos, C.S.S. Pires, F.G.V. Schmidt, E.M.G. Fontes & R.A. Laumann. 2007.** Comunidade de inimigos naturais e controle biológico natural do pulgão, *Aphis gossypii* glover (Hemiptera: Aphididae) e do curuquerê, *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodoeiro no Distrito Federal. *Arq. Inst. Biol.* 74: 329-336.
- Tena-Sempere, M. 2008.** Ghrelin as a pleotrophic modulator of gonadal function and reproduction. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 4: 666-674.
- Torres, J.B. & J.C. Zanuncio. 2001.** Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus*. *BioControl.* 46: 469-480.
- Van Handel, E. 1985a.** Rapid determination of total lipidis 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.
- Yu, S.J. 2004.** Detoxification Mechanisms in Insects, p. 1187-1201. In J.L. Capinera (ed.) *Encyclopedia of Entomology.* New York, Springer, 1201p.
- Zanuncio, J.C, S.A. Mourão, L.C. Martínez, C.F. Wilcken, F.S. Ramalho, A. Plata-Rueda, M.A. Soares & J.E. Serrão. 2016.** Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Sci. Rep.* 6: 1-8.
- Zanuncio, J.C., A.J. Molina-Rugama & J.E. Serrão. 2001.** Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with combinations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. *Biocontrol Sci. Tech.* 11: 331-337.
- Zanuncio, J.C., A.J. Molina-Rugama, G.P. Santos & F.S. Ramalho. 2002.** Effect of body weight on fecundity and longevity of the stinkbug predator *Podisus rostralis*. *Pesqui. Agropecu. Brasileira.* 37: 1225-1230.

Tabela 1. Toxicidade dos óleos essenciais de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia* em lagartas de terceiro ínstar de *Alabama argillacea* submetidas ao contato tóxico. Temp.: $25,2 \pm 1,4$ °C, UR: $67 \pm 0.7\%$, e fotoperíodo de 12h.

Tratamentos	N	GL	Inclinação da reta (\pm EP)	DL ₅₀ (IC 95%)	RT ₅₀	DL ₉₀ (IC 95%)	RT ₉₀	χ^2
<i>Mentha spicata</i>	180	4	5,08 \pm 0,70	2,50 (2,24-2,75)	1,58	4,46 (3,88-5,56)	1,50	3,69
<i>Melaleuca alternifolia</i>	150	3	4,04 \pm 0,60	2,82 (2,44-3,23)	1,40	5,85 (4,80-8,15)	1,14	2,64

N= número de insetos usados no teste; GL= grau de liberdade; EP = erro padrão da média; IC = intervalo de confiança; RT = razão de toxicidade; χ^2 = Qui-quadrado.

Tabela 2. Período de pré-oviposição, número de posturas por fêmea, número de ovos por fêmea, número de ovos por postura, viabilidade de ovos e longevidade em vinte dias de adultos de *P. nigrispinus* alimentados com lagartas de terceiro ínstar de *A. argillacea* tratadas com a DL₅₀ dos óleos de *M. spicata*, 2,50 mg/g de inseto, e *M. alternifolia*, 2,82 mg/g de inseto. Temp.: 25°C, UR: 70% de UR e fotofase de 12h.

Tratamentos	Parâmetros reprodutivos (\pm EP) ¹					
	Período pré-oviposição	Nº de posturas/fêmea	Nº de ovos/fêmea	Nº de ovos/postura	Viabilidade de ovos (%)	Longevidade em 20 dias
Controle	5,00 \pm 0,53 a	14,70 \pm 0,70 a	202,50 \pm 9,19 a	13,94 \pm 0,71 a	90,32 \pm 1,73 a	19,70 \pm 0,15 a
<i>M. spicata</i>	6,40 \pm 0,45 a	14,10 \pm 0,93 a	157,20 \pm 13,89 a	11,55 \pm 1,26 ab	65,96 \pm 9,19 b	18,90 \pm 0,54 a
<i>M. alternifolia</i>	4,90 \pm 0,45 a	14,90 \pm 1,78 a	146,90 \pm 22,46 a	9,46 \pm 0,79 b	67,44 \pm 11,51 b	16,60 \pm 1,97 a
	F = 3,00; P = 0,0666	F = 0,11; P = 0,8925	F = 3,36; P = 0,0499	F = 5,49; P = 0,0100	$\chi^2 = 7,134$; P = 0,0282	$\chi^2 = 0,563$; P = 0,7545

¹Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0.05) ou Kruskal-Wallis (P > 0.05).

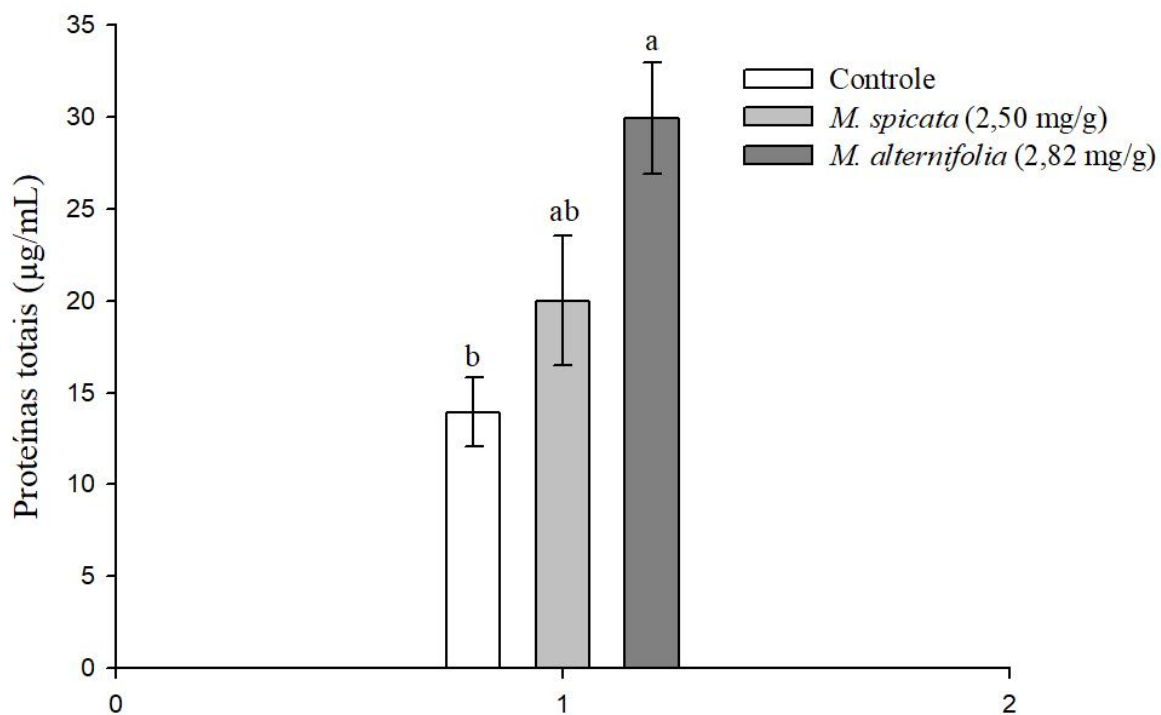


Figura 1. Quantidade de proteínas totais (médias \pm erro padrão) de fêmeas de *Podisus nigrispinus* submetidas a alimentação de lagartas de terceiro ínstar de *Alabama argillacea* tratadas com a DL₅₀ dos óleos de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia*. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

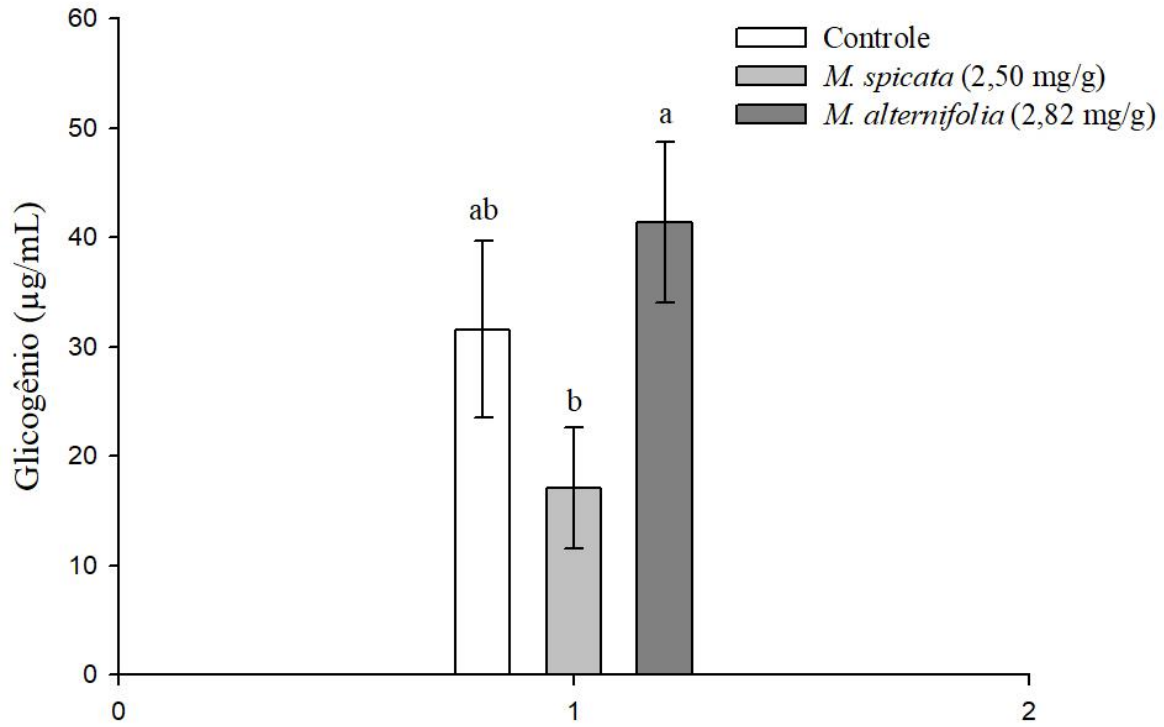


Figura 2. Quantidade de glicogênio (médias \pm erro padrão) de fêmeas de *Podisus nigrispinus* submetidas a alimentação de lagartas de terceiro ínstar de *Alabama argillacea* tratadas com a DL₅₀ dos óleos de *Mentha spicata* e *Melaleuca alternifolia*. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

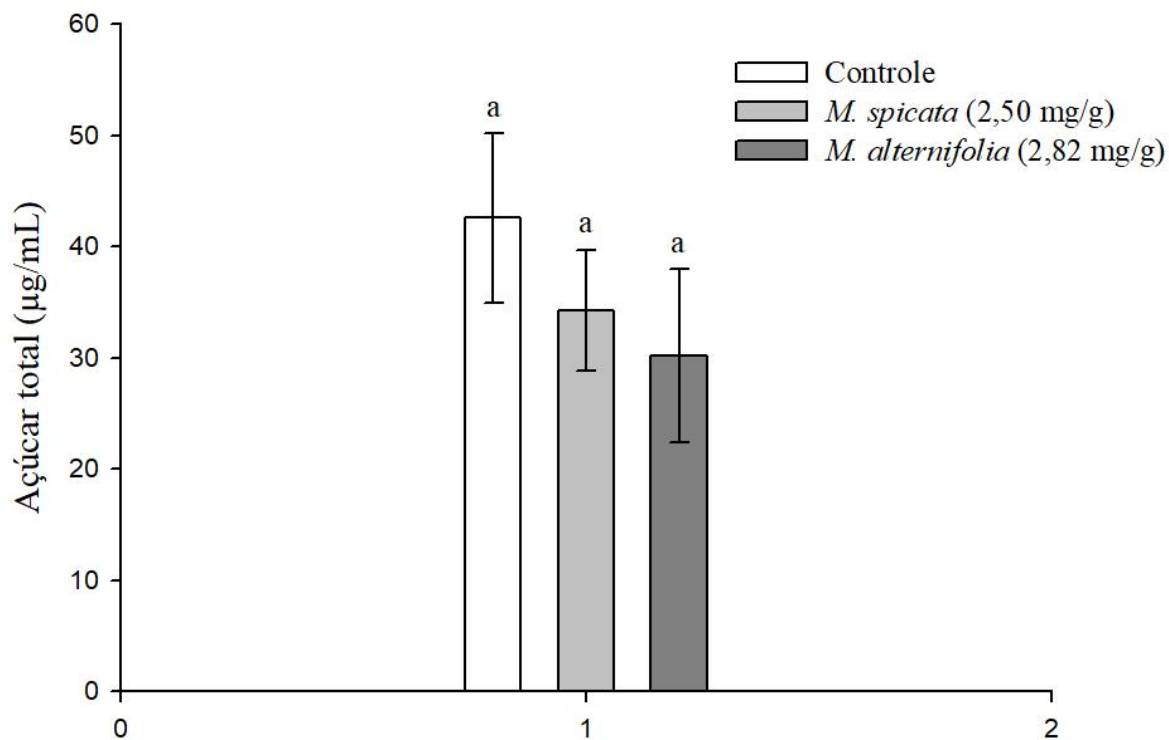


Figura 3. Quantidade de açúcar total (médias \pm erro padrão) de fêmeas de *Podisus nigrispinus* submetidas a alimentação de lagartas de terceiro ínstar de *Alabama argillacea* tratadas com a DL₅₀ dos óleos de *Mentha spicata*, 2,50 mg/g de inseto, e *Melaleuca alternifolia*, 2,82 mg/g de inseto. Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

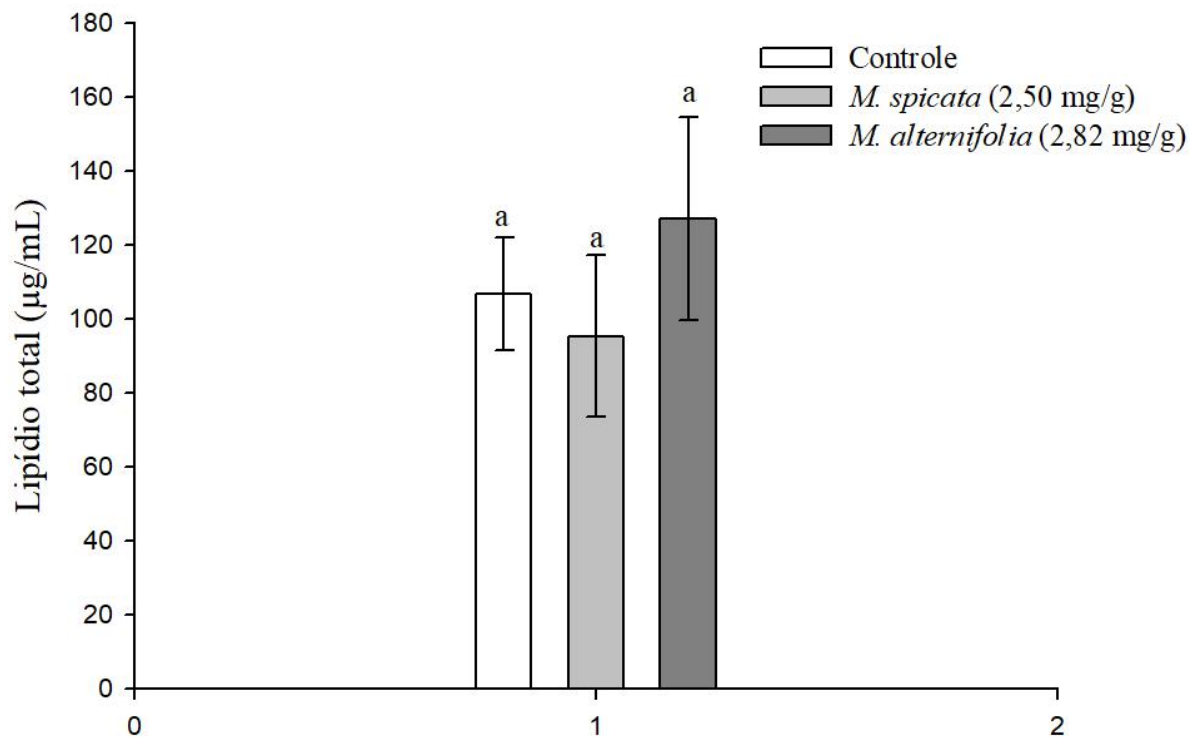


Figura 4. Quantidade de lipídio total (médias \pm erro padrão) de fêmeas de *Podisus nigrispinus* submetidas a alimentação de lagartas de terceiro ínstar de *Alabama argillacea* tratadas com a DL₅₀ dos óleos de *Mentha spicata*, 2,50 mg/g de inseto, e *Melaleuca alternifolia*, 2,82 mg/g de inseto. Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises aqui realizadas revelaram que a DL₅₀ do óleo essencial de *Mentha spicata* (2,50 mg/g) provocou redução na quantidade de carboidratos no tecido epitelial da região mediana do intestino médio nos períodos de 24 e 48 horas e redução da viabilidade de ovos de *Podisus nigrispinus*. Já o óleo de *Melaleuca alternifolia* (2,82 mg/g) causou alongamento das células digestivas após o período de 24 horas e lise celular após o período de 48 horas, sendo esses considerados como sintomas de necrose do tecido epitelial. Além disso, houve um aumento no quantitativo de proteínas nas fêmeas e reduções no quantitativo de carboidratos do intestino médio após os períodos de 24 e 48 horas, no número de células regenerativas após o período de 48 horas, no número de ovos por postura e na viabilidade de ovos. Dessa forma, o óleo de *M. alternifolia* não apresenta potencial de uso no Manejo Integrado de *Alabama argillacea* quando em associação com o controle biológico utilizando o predador *Podisus nigrispinus*. Entretanto, as alterações causadas pelo óleo de *M. spicata* não são responsáveis por prejudicar características vitais do organismo e, por isso, não se descarta a hipótese de sua utilização em campo, contanto que mais experimentos sejam realizados. Estudos como esse são de fundamental importância para garantir que produtos químicos utilizados no controle de pragas agrícolas não sejam responsáveis por causar danos a outros organismos. Favorecendo assim, a capacidade de manter a produção e os benefícios econômicos de forma ambientalmente sustentável.