

BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA COMPARADA DE POPULAÇÕES DE *Anthonomus grandis*
BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSTAS A PIRETROIDES E ÓLEOS
ESSENCIAIS

por

HILTON NOBRE DA COSTA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira UFRPE)

RESUMO

A pesquisa objetivou: (i) avaliar os efeitos do piretroide lambda-cialotrina no estresse oxidativo, na imunohistoquímica intestinal e na morfologia e histoquímica do intestino médio e gônadas em três populações de *Anthonomus grandis*; (ii) investigar a influência do piretroide beta-ciflutrina e das DL₅₀ e DL₇₀ dos óleos essenciais de *Juniperus virginiana* e *Melaleuca alternifolia* nos parâmetros nutricionais, na morfohistoquímica do intestino médio e gônadas de duas populações do respectivo inseto. A contaminação pelo piretroide se deu por ingestão dos botões florais imersos nas soluções inseticidas e dos óleos por contato tópico, ambos com 24h. Lambda-cialotrina causou aumento da apoptose em todas as populações. Em Pernambuco houve maior estresse oxidativo e alterações morfohistoquímicas no intestino médio e gônadas, com reflexo na gemetogênese. Ceará e Mato Grosso tiveram menor estresse, porém em Mato Grosso o índice de proliferação celular foi maior, no qual contribuiu para a sua menor suscetibilidade. Nas populações de Pernambuco e Ceará, beta-ciflutrina e os óleos promoveram danos nutricionais e morfohistoquímicos no intestino e gônadas, principalmente na DL₇₀ dos óleos. Esses resultados revelam que os bicudos de Mato Grosso apresentam mecanismos mais eficientes de respostas celulares, além da evidência que óleos essenciais têm efeitos bioquímicos e fisiológicos promissores, não apenas porque podem causar

mortalidade, mas porque afeta parâmetros indispensáveis a sobrevivência e estabelecimento de *A. grandis* dentro da cultura. Ressaltamos que esta pesquisa é pioneira no estudo dos efeitos de óleos essenciais em *A. grandis*, com ênfase nos aspectos nutricionais e morfohistoquímicos que norteiam essa interação. Assim, tais resultados abrem caminho para o desenvolvimento de substâncias que possuam características indispensáveis na produção agrícola, a saber, efetividade e segurança.

PALAVRAS-CHAVE: Inseticida sintético, óleos essenciais, intestino médio, apoptose, gametogênese, estresse oxidativo, nutrição, bicudo-do-algodoeiro.

COMPARED BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF POPULATIONS OF *Anthonomus grandis* BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSED TO PIRETROIDS AND
ESSENTIAL OILS

por

HILTON NOBRE DA COSTA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira UFRPE)

ABSTRACT

The research aimed to: (i) evaluate the effects of the pyrethroid lambda-cyhalothrin on oxidative stress, intestinal immunohistochemistry and morphology and histochemistry of the midgut and gonads in three populations of *Anthonomus grandis*; (ii) to investigate the influence of the pyrethroid beta-cyfluthrin and the LD₅₀ and LD₇₀ of the essential oils of *Juniperus virginiana* and *Melaleuca alternifolia* in the nutritional parameters, in the morphology of the midgut and gonads of two populations of the respective insect. Contamination by the pyrethroid was due to the ingestion of flower buds immersed in insecticidal solutions and oils by topical contact, both with 24h. Lambda-cyhalothrin caused an increase in apoptosis in all populations. In Pernambuco, there was greater oxidative stress and morpho-histochemical changes in the midgut and gonads, reflected in gemetogenesis. Ceará and Mato Grosso had less stress, however in Mato Grosso the rate of cell proliferation was higher, which contributed to their lower susceptibility. In the populations of Pernambuco and Ceará, beta-cyfluthrin and oils promoted nutritional and morphological and chemical damage in the intestine and gonads, mainly in the LD₇₀ of the oils. These results reveal that the boll weevils in Mato Grosso have more efficient mechanisms of cellular responses, in addition to the evidence that essential oils have promising biochemical and physiological effects,

not only because they can cause mortality, but because they affect parameters that are essential to the survival and establishment of *A. grandis* within the culture. We emphasize that this research is a pioneer in the study of the effects of essential oils in *A. grandis*, with emphasis on the nutritional and morpho-histochemical aspects that guide this interaction. Thus, these results open the way for the development of substances that have indispensable characteristics in agricultural production, namely, effectiveness and safety.

KEY WORDS: Synthetic insecticide, essential oils, midgut, gametogenesis, oxidative stress, nutrition.

BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA COMPARADA DE POPULAÇÕES DE *Anthonomus grandis*
BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSTAS A PIRETROIDES E ÓLEOS
ESSENCIAIS

por

HILTON NOBRE DA COSTA

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

RECIFE - PE

Janeiro – 2021

BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA COMPARADA DE POPULAÇÕES DE *Anthonomus grandis*
BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSTAS A PIRETROIDES E ÓLEOS
ESSENCIAIS

por

HILTON NOBRE DA COSTA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira UFRPE

Glaucilane dos Santos Cruz PNPd/UFRPE

Carolina Arruda Guedes PNPd/UFRPE

BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA COMPARADA DE POPULAÇÕES DE *Anthonomus grandis*
BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSTAS A PIRETROIDES E ÓLEOS
ESSENCIAIS

Por

HILTON NOBRE DA COSTA

Orientador: _____
Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Examinadores: _____
Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Guilherme Gomes Rolim – IMAnt

Carolina Arruda Guedes – UFRPE

Kamilla de Andrade Dutra – UFPE

DEDICATÓRIA

A minha esposa, Ana Paula S. S. Nobre, a minha filha, Lis S. Nobre, ao meu pai, Hildemario (*in memoriam*), a minha mãe, Nadjane Nobre, aos meus irmãos, Bruno Nobre e Breno de Santana, e aos meus sobrinhos, Melissa, Lily, Samuel e Nicolas, dedico.

AGRADECIMENTOS

Dou graças a Deus, a quem sirvo com a consciência limpa, como o serviram os meus antepassados (2 Timóteo 1:3), por ter me proporcionado a realização de mais um sonho e por me sustentar durante esse período, que nos momentos mais difíceis pude sentir o seu cuidado e provisão.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco que foi a minha segunda casa durante todo esse tempo desde a graduação e por ter profissionais tão qualificados que juntos deixaram o dia a dia melhor.

Ao Centro de Apoio a Pesquisa (Cenapesq) da UFRPE que me permitiram executar os experimentos em microscopia, em especial aos Professores André Lavorante e Carlos Guaraná, ao técnico Marcelo e as recepcionistas Terezinha e Eustáquia. Meu muito obrigado por todos esses anos.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado que me permitiu o sustento durante esses anos e a realização das pesquisas.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira, por não ter medido esforços para a conclusão do Doutorado, pelos ensinamentos, orientação, conselhos e amizade, bem como a todos os momentos alegres que vivemos juntos desde a graduação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Álvaro Aguiar C. Teixeira, pela disposição em ajudar, orientar, aconselhar, bem como pela amizade e a todos os momentos alegres que vivemos juntos.

A minha co-orientadora, Dra. Glaucilane dos Santos Cruz, por toda a ajuda na execução dos experimentos, pelos conselhos e amizade e por todos os momentos alegres no laboratório e fora dele que com certeza deixaram o curso melhor. Obrigado minha amiga.

A todos os amigos do Laboratório de Fisiologia de Insetos, Dra. Carolina Guedes, Dra. Kamilla Dutra, Dr. Andrezo Adenilton, Dra. Cristiane Thalita, Me. Valeska Braga, Me. Milena e Maria Clara por todo o carinho, amizade e momentos alegres dentro e fora do laboratório. Em especial a Carolina Guedes pela ajuda nos experimentos e a Maria Clara, que além disso, não mediu esforços para estar dia a dia, até nos fins de semana, para ajudar. Meus sinceros agradecimentos amigos.

Aos amigos do Laboratório de Estudos Morfológicos em Vertebrados e Invertebrados pela amizade e momentos alegres dentro e fora dele, em especial a Dra. Ismaela Melo pela ajuda na execução dos experimentos, disposição, conselhos e amizade. Muito obrigado amigos.

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, em especial aos Doutores Paulo Duarte, Antônio Almeida, Elisabete Albuquerque e Cleane Souza. Ao Me. Denner Potin, pela disposição em ajudar, analisar a estatística e coleta dos insetos em campo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia que contribuíram para minha formação como Doutor, em especial ao Prof. Dr. Jorge Torres, Prof. Dr. Paschoal Grossi, Prof. Dr. Herbert Siqueira, Profa. Dra. Christian Torres, Prof. Dr. José Vargas, Profa. Dra. Daniele Parizotto, Prof. Dr. Claudio Camara.

Agradeço aos Doutores Guilherme Gomes Rolim do Instituto Mato-Grossense do Algodão (IMAmt) e Fábio Aquino de Albuquerque da EMBRAPA Algodão pelo envio dos bicudos ao longo destes anos.

A minha esposa, Ana Paula Nobre, pela paciência em esperar pelos muitos dias em que estive ausente, por todo o carinho, amor, orações e palavras de incentivo.

Aos irmãos em Cristo que sempre oraram e torceram por mim, em especial ao Pastor Valter Rabelo e família e ao Presbítero Jairo Barbosa e família. Minha gratidão a vocês.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
Importância do algodão	1
Gênero <i>Anthonomus</i> e o bicudo-do-algodoeiro.....	2
Piretroides.....	3
Óleos essenciais.....	5
Requerimentos Nutricionais.....	6
Efeitos citotóxicos	9
LITERATURA CITADA.....	11
2 LAMBDA-CIALOTRINA PROMOVE DIFERENTES EFEITOS CITOTÓXICOS EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO.....	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO.....	32
AGRADECIMENTOS.....	35
LITERATURA CITADA.....	35

3	ALTERAÇÕES HISTOFISIOLOGICAS E NUTRICIONAIS EM POPULAÇÕES DE <i>Anthonomus grandis</i> SUBMETIDAS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Juniperus</i> <i>virginiana</i> E <i>Melaleuca alternifolia</i> EM COMPARAÇÃO A BETA-CIFLUTRINA	56
	RESUMO	57
	ABSTRACT	58
	INTRODUÇÃO	59
	MATERIAL E MÉTODOS	61
	RESULTADOS	66
	DISCUSSÃO	71
	AGRADECIMENTOS	75
	LITERATURA CITADA	75
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Importância do algodão

No Brasil, a cotonicultura é uma grande atividade agrícola que gera vários empregos diretos e indiretos e bastante rentabilidade ao país. Na safra 2018/2019, o Brasil assumiu o posto de segundo colocado em relação à exportação de pluma, ultrapassando a Índia e ficando atrás apenas dos Estados Unidos, sendo o quinto maior do mundo (Conab 2019, Abrapa 2020). No acumulado de janeiro a outubro, o Brasil exportou 1,42 milhão de toneladas em 2020, volume 31% superior ao acumulado do mesmo período do ano de 2019. A expectativa da Conab é que o Brasil exporte 1,92 milhão de toneladas em 2020, volume 18,9% superior ao recorde exportado em 2018, que foi de 1,61 milhão de toneladas. Apesar do bom desempenho das exportações, diante das produções recordes em 2019 e 2020 e do enfraquecimento da demanda interna e externa, causado pela pandemia da COVID-19, os estoques brasileiros deverão ficar próximos das 2,0 milhões de toneladas no final do ano de 2020, maior volume da história. Apesar do alto nível dos estoques, a maior parte já está negociada para entrega futura (Conab 2020). A produção da safra 2019/20 já atinge os 2.737,9 milhões de toneladas, volume maior que os 2.724,9 milhões estimados. Deste total, a região Centro-Oeste representa 77,4%, com o estado do Mato Grosso produzindo 73,4% de todo o algodão nacional (Conab 2020). Além disso, os números da produção em caroço em 2019 são recordes e totalizaram em dezembro 4.088,3 milhões de toneladas (Conab 2020).

A fibra é o principal produto do cultivo, considerada como a principal matéria prima para a indústria têxtil no mundo (Fortucci 2002). Além dela, o algodão também gera outros produtos como

o líter, o óleo bruto presente nas sementes, a torta e o caroço usados para alimentação animal (Beltrão 2004).

Gênero *Anthonomus* e o bicudo-do-algodoeiro

Os insetos do gênero *Anthonomus*, ordem Coleoptera e família Curculionidae, têm uma distribuição cosmopolita, com cerca de 500 espécies descritas (Smith-Pardo 2015). Muitas destas de importância agrícola, a saber: *Anthonomus flavus* Boheman, encontrados em plantas de *Malphigia* spp.; *Anthonomus melanostictus* Champion, em plantas da família Malvaceae; *Anthonomus pomorum* Linnaeus, encontrados em *Malus domestica* (maçã) e *Pyrus communis* (pêra européia); *Anthonomus rubi* Herbst, em flores e frutos de Rosaceae (Morango e Framboesa); *Anthonomus sisyphus* Clark, em várias plantas das famílias Leguminosae, Malphigiaceae e Rubiaceae; e *Anthonomus grandis* Boheman, em plantas da família Malvaceae (*Gossypium* spp, *Cienfuegosia* spp., *Thespesia* spp. e *Hampea* spp.) (Smith-Pardo 2015).

Anthonomus grandis, popularmente chamado de bicudo-do-algodoeiro, é a espécie que tem limitado a expansividade do cultivo de algodão no Brasil, pois alimenta-se de botões florais, flores e maçãs, interferindo diretamente na produção, podendo provocar prejuízos de 75% a 100% (Abrapa 2018). Além disso, a oviposição ocorre preferencialmente nos botões florais, entretanto pode ser feita nas flores e maçãs. A fêmea coloca os ovos isoladamente através de um orifício de oviposição, fechando-o posteriormente com uma secreção cerosa produzida por ela mesma (Praça 2007, Azambuja & Degrande 2015, MAPA 2020). Pelo fato das larvas se desenvolverem dentro destas estruturas vegetais, o contato com os inseticidas e inimigos naturais se torna limitado. Como consequência, o produtor muitas vezes é obrigado a utilizar inseticidas sintéticos com o intuito de controlar a praga, geralmente pulverizando produtos não seletivos e de amplo espectro (Fonseca *et al.* 2011, Godoy & Nakano 2011, Rolim *et al.* 2019, MAPA 2020). Para a maioria dos produtores, o controle químico com inseticidas sintéticos ainda tem sido considerado o mais promissor

(Azambuja & Degrande 2014, Santos 2015). Atualmente, existem no Brasil 29 ingredientes ativos registrados para pulverizar os campos de algodão contra *A. grandis* pertencentes às classes de inseticidas organofosforados, carbamatos e piretroides, com a maior quantidade dos produtos comerciais pertencentes ao grupo dos piretroides (AGROFIT 2020).

Piretroides

Os piretroides são derivados sintéticos das piretrinas, ésteres originalmente isolados das flores da espécie *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas (Santos *et al.* 2007). São classificados como inseticidas neurotóxicos que agem nos canais de sódio modulando-os, fazendo com que estes fiquem abertos por mais tempo e matando o inseto por hiperexcitabilidade do sistema nervoso (IRAC 2020).

Na região Centro-Oeste, especificamente no estado de Mato Grosso, os principais ingredientes ativos desta classe de inseticidas usados na lavoura algodoeira para controle do bicudo são beta-ciflutrina e zeta-cipermetrina, porém, recentemente os agricultores relataram falhas de controle (Oliveira-Marra *et al.* 2019). Miranda *et al.* (2017), ao usar populações de bicudo também do Centro-Oeste, porém do estado de Goiás, relataram que beta-ciflutrina e zeta-cipermetrina foram capazes de causar mortalidade de 60% a 80% em bicudos, porém lambda-cialotrina apresentou baixa eficiência (34%) levando a valores excessivos de CL₅₀ e CL₉₀.

Resultados semelhantes foram encontrados por Netto *et al.* (2017) com populações de Mato Grosso, onde a bifentrina, lambda-cialotrina e beta-ciflutrina causaram mortalidades abaixo de 80%. Eles ainda ressaltaram que esta classe de inseticidas tem apresentado menor toxicidade em comparação aos anos anteriores para o bicudo, devido à falta de rotação de produtos, que aliado ao baixo custo de aplicação, contribui para o uso excessivo e, conseqüentemente, para a seleção de indivíduos resistentes.

Diante desses relatos, é evidente que populações do bicudo da região Centro-Oeste possam ter desenvolvido mecanismos de defesa contra os piretroides, ainda mais quando há pressão de seleção por conta da aplicação frequente. O controle químico na respectiva região começa muitas vezes antes mesmo do bicudo ser encontrado na lavoura e as aplicações são realizadas sequencialmente com o mesmo inseticida a cada 3 ou 5 dias (Oliveira-Marra *et al.* 2019).

Análises de suscetibilidade e resistência dessas populações aos piretroides devem ser incentivadas. A exemplo dos métodos convencionais, como atividades de enzimas desintoxicantes (esterases, glutathione S-transferases e monooxigenases) e alterações do sítio-alvo de ligação (Davies *et al.* 2008, Huang *et al.* 2018, Sarabia *et al.* 2019, Huang *et al.* 2019), nos quais mostram-se promissores, porém, não de maneira absoluta, pois a quantificação da mortalidade e sobrevivência sempre devem estar associadas.

Mesmo não ocorrendo mortalidade (efeito agudo), o produto pode agir de forma secundária e assim suprimir a população. Para isso, outros métodos investigativos como parâmetros de níveis bioquímicos e respostas citotóxicas de órgãos alvo, como por exemplo intestino médio e gônadas, podem ser usados para auxiliar nessa finalidade. Esses dados devem ser levados em consideração pois permitem a permanência dos insetos no ambiente, já que participam de processos essenciais a sua sobrevivência. Estes processos envolvem principalmente a digestão e transformação de nutrientes essenciais a reprodução, como a gametogênese (Martin 1983, Spit *et al.* 2012, Zielinska *et al.* 2018). Entretanto, essas respostas podem variar dependendo da população testada e, nesse sentido, se faz necessária a realização de pesquisas que envolvam populações de bicudos não só da região supracitada, mas também de outras do Brasil, como as do Nordeste.

No entanto, sabe-se que a pulverização constante de produtos sintéticos, em detrimento de não apresentarem seletividade, pode acarretar em sérios problemas à saúde e ao meio ambiente, deixando resíduos nas plantas e no solo, contaminando ecossistemas aquáticos e eliminando insetos

benéficos, além de favorecer a seleção de populações resistentes (Metcalf 1989, Alyokhin *et al.* 2008, Stehle & Schulz 2015). Nessa perspectiva, outros métodos de controle podem ser utilizados, a exemplos dos óleos essenciais de plantas.

Óleos essenciais

Alternativamente, óleos essenciais têm ganhado destaque nas pesquisas envolvidas no controle de pragas de importância agrícola devido a sua propriedade toxicológica. Além disso, eles são, em geral, produtos de baixo risco e contaminação ambiental, de baixa toxicidade aos mamíferos e biodegradáveis (Madbouly *et al.* 2015, Preedy 2015).

Os componentes presentes nos óleos essenciais pertencem a dois grupos químicos distintos, os terpenos e os fenilpropanoides. Os terpenos são biossintetizados a partir das rotas metabólicas do metileritritol fosfato e da rota do ácido mevalônico, enquanto os fenilpropanoides a partir da rota do ácido chiquímico. Sendo atribuída aos terpenos grande parte da atividade inseticida dessas substâncias (Simões & Spitz 2004, Taiz & Zeiger 2006, Bernards 2010).

Segundo estimativas, cerca de 17.500 espécies de plantas aromáticas superiores produzem óleos essenciais, pertencendo as mais diversas famílias botânicas incluindo Myrtaceae, Lauraceae, Piperaceae, Rutaceae e Lamiaceae (Rodriguez *et al.* 1984, Jacobson 1989, Rajendran & Sriranjini 2008, Tripathi *et al.* 2009).

Dentre os diversos óleos já estudados, o de *Melaleuca alternifolia* Cheel vem se mostrando promissor, pois além de demonstrar atividade inseticida, está amplamente disponível e é indicado também como um agente antimicrobiano, anti-inflamatório e anticâncer (Hammer *et al.* 2006).

Estudos desenvolvidos por Benelli *et al.* (2013), mostraram que o óleo essencial de *M. alternifolia*, apresentou toxicidade por ingestão, fumigação e contato sobre adultos de *Ceratitis capitata* Wiedemann. Diversas pesquisas também comprovaram a atividade inseticida deste óleo

sobre pragas como *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Liao *et al.* 2016) e *Helicoverpa armigera* Hübner (Liao *et al.* 2017).

Outro óleo que merece destaque é o de cedro, *Juniperus virginiana* L., que possui aroma amadeirado fraco e ação relaxante, com diminuição da pressão arterial e das frequências cardíacas e respiratórias (Zhang & Yao 2018) e ação anti-inflamatória em humanos (Tumen *et al.* 2013). Além das propriedades acima citadas, este óleo tem demonstrado efeito inseticida com eficiência em insetos, como *Resseliella oculiperda* Rübsaamen (Tol *et al.* 2007), *Anopheles stephensi* Liston (Tahghighi *et al.* 2019) e formigas e cupins (Eller *et al.* 2010, Eller *et al.* 2014). Amer & Mehlhorn (2006) trataram larvas de terceiro ínstar de *Aedes aegypti* L. na concentração de 50 ppm do respectivo óleo e observaram uma mortalidade de 100%, em 12h após a instalação do experimento.

Vale salientar que além da mortalidade, os óleos essenciais podem ocasionar efeitos subletais na biologia, comportamento, reprodução, desenvolvimento e alimentação, além de causarem repelência e deterrência (Alves *et al.* 2013, Mitić *et al.* 2019, Ebrahimifar *et al.* 2020, Ginassi *et al.* 2020). Por exemplo, os óleos de *Eucalyptus staigeriana* F.Muell. ex Bailey, *Ocimum gratissimum* L. e *Foeniculum vulgare* Mill causaram redução do peso larval e pupal em *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Cruz *et al.* 2016). Já na fisiologia, pode promover efeitos adversos a níveis celulares, teciduais e nutricionais (Cruz *et al.* 2017, Dutra *et al.* 2019, Guedes *et al.* 2020).

Requerimentos nutricionais

Um dos mecanismos favoráveis à sobrevivência dos insetos é o seu estado nutricional, no qual, alimentando-se, adquire nutrientes essenciais para suprir as demandas energéticas associadas à manutenção geral, além de estimular o crescimento e a reprodução (Behmer 2008, Gullan & Crasnton 2012).

Nesse aspecto, os insetos só diferem de outros animais porque são capazes de obter seus nutrientes de uma ampla gama de diferentes fontes de alimentos que, por vários motivos, não estão

disponíveis para a maioria dos outros animais. Por exemplo, cupins se alimentam de madeira, baratas de material vegetal morto, os insetos sugadores das seivas do floema e xilema de planta (pulgões, cigarrinhas e cigarras) ou no caso de piolhos sugadores de sangue de vertebrado. Algumas formigas e besouros obtêm seus nutrientes cultivando fungos (Behmer 2008).

Apesar disso, a qualidade dos nutrientes necessários à grande maioria dos insetos é semelhante, visto que a composição química básica de seus tecidos e seus processos metabólicos são geralmente similares. Mesmo assim, existem grandes diferenças nas necessidades nutricionais, podendo ser o resultado de mudanças evolutivas associadas à alimentação em substratos com quantidades e qualidades nutricionais diferentes (Chapman 2013).

Um dos nutrientes importantes são as proteínas, que fornecem aminoácidos envolvidos em muitos processos como morfogênese, crescimento, produção de ovos e esclerotização cuticular, além de atuarem como neurotransmissores (Chen 1966, Dadd 1985, Kunkel & Nordin 1985, Klowden 2007). O corpo gorduroso é o principal local de síntese de aminoácidos nos insetos, apesar de ocorrer também em outros tecidos (Gullan & Cranston 2012). É nesse órgão também que ocorre a síntese da vitelogenina, a principal molécula necessária ao sucesso reprodutivo das fêmeas (Klowden 2007, Coelho *et al.* 2016, Salmela & Sundström 2017, Huo *et al.* 2018).

Carboidratos também são importantes, pois são as principais fontes energéticas da maioria dos insetos. Eles podem ser convertidos em gorduras e contribuir para a produção de aminoácidos. Participam também do desenvolvimento cuticular, das estruturas reprodutivas e do processo pré-vitelogênico (Arrese *et al.* 2010). O dissacarídeo trealose e o polissacarídeo glicogênio são importantes fontes de carboidratos nos insetos. Ambos podem ser facilmente convertidos em glicose quando há necessidade e, assim, mobilizada para a região de interesse (Klowden 2007, Gullan & Cranston 2012, Yamada *et al.* 2018).

Já os lipídeos são importantes reservas que fornecem energia para atividades que exigem grande esforço metabólico, como tolerância a temperaturas mais baixas, metamorfose, voo prolongado, produção de ovos e longevidade, além de atuarem na composição de membranas celulares (Canavoso *et al.* 2001, Bretas 2016). Eles são absorvidos tanto como ácidos graxos como diacilgliceróis no intestino anterior e nos cecos gástricos (Klowden 2007). Quase toda gordura nos insetos está estocada no corpo gorduroso em células chamadas trofócitos (Gullan & Cranston 2012) e mais de 90% do armazenado é triglicerídeo (Arrese & Soullages 2010).

Nessa perspectiva, os nutrientes são de fundamental importância para o desenvolvimento, à capacidade de defesa e, sobretudo, a reprodução dos insetos (Klowden 2007, Gullan & Cranston 2012, Chapman 2013). Assim, no contexto do manejo integrado de pragas (MIP), saber quais produtos afetam esses parâmetros são alternativas viáveis para o controle de pragas importantes, como *A. grandis* (Gallo *et al.* 2002).

Cunha *et al.* (2015), observaram que o bicudo-do-algodoeiro após tratamento com o inseticida pimetozina apresentou alterações nos padrões de açúcar, glicogênio e lipídeo. Óleos também tem essa capacidade, como é o caso de *Piper corcovadensis* Miq. que foi capaz de reduzir as taxas de proteínas, açúcares e glicogênio em *S. frugiperda* por contato tópico (Dutra *et al.* 2019). Os autores ainda destacam que devido a estas alterações, os padrões reprodutivos possivelmente sejam alterados. Nesta mesma lagarta, o óleo de *Piper hispidinervum* C.DC. promoveu diminuição de carboidratos e proteínas nos ovários e, conseqüentemente, redução do número de ovos e de larvas eclodidas (Alves *et al.* 2013). Além disso, o trans-anetole, o limoneno e a associação entre eles, reduziu carboidratos, lipídeos e proteínas que impactam no número de ovos, período de oviposição e longevidade dos adultos (Cruz *et al.* 2017).

Para Costa *et al.* (2004) e Milano *et al.* (2010), a diminuição das taxas de reprodução geralmente está associada a transtornos alimentares e deficiência nutricional. A quantidade e

qualidade dos nutrientes disponíveis para os ovários durante a diferenciação pode levar a alterações na vitelogênese, maturação dos ovos e produção de ovos (Engleman 1998).

Sendo assim, testes bioquímicos de nutrição são importantes parâmetros avaliativos dos efeitos letais e subletais dos compostos de óleos essenciais em populações de pragas, principalmente com bicudos, pois ainda são incipientes.

Efeitos citotóxicos

A nutrição dos insetos está diretamente relacionada à capacidade de digestão e absorção promovida pelo epitélio intestinal. Na região do intestino médio, está presente a membrana peritrófica que é considerada uma significativa barreira mecânica contra agentes estressores, como os inseticidas. Porém, se ultrapassada, o dano ao epitélio é iminente, podendo levar a complicações irreversíveis (Gullan & Cranston 2012). Ao longo do epitélio da parede intestinal predominam as células colunares (também chamadas de digestivas ou enterócitos) que atuam na absorção de nutrientes, na síntese de enzimas e membrana peritrófica e no transporte de íons e água (Klowden 2007, Gullan & Cranston 2012, Chapman 2013).

Dada à importância fisiológica, essa região torna-se um importante alvo na estratégia de supressão de pragas. Em *A. gadii*, os inseticidas pimezina e lufenuron já demonstraram causar danos histológicos e histoquímicos ao epitélio intestinal, com consequências nos testículos e ovários e impacto no processo de gametogênese (Cunha *et al.* 2015, Costa *et al.* 2017). Com base nisso, a homeostase intestinal está diretamente relacionada à manutenção nutricional e, consequentemente, ao bom funcionamento de processos vitais do inseto, como a reprodução.

A exposição dos insetos a algum tóxico desencadeia processos de defesa, como os celulares e humorais, que podem agir simultaneamente. Uma das respostas celulares observadas e estudadas é a apoptose, que mesmo ocorrendo naturalmente na fisiologia dos organismos, pode resultar dos danos ocasionados por agentes estressores (Levy *et al.* 2004, Klowden 2007, Chapman 2013, Huang

et al. 2013) isso foi observado no intestino médio, nas glândulas salivares e ovariolos de abelhas *Apis mellifera* L. após tratamento com organofosforados, piretroides e neonicotinoides (Gregorc & Ellis 2011).

Óleos essenciais também induzem o processo de morte celular. O óleo de nim promoveu efeitos necróticos como: alterações nas microvilosidades, ruptura da membrana plasmática, vacuolização do citoplasma, formação e ampliação de espaços intercelulares, dentre outros efeitos (Correia *et al.* 2009, Almehmadi 2011, Scudeler & Santos 2013, Scudeler *et al.* 2014). Em larvas de *S. frugiperda*, os compostos limoneno e trans-anetole e os óleos essenciais do gênero *Piper* foram capazes de causar apoptose no testículo e intestino, além de diminuição da proliferação celular (Cruz *et al.* 2017, Dutra *et al.* 2019).

Os danos nas células colunares estimulam o processo de regeneração tecidual do intestino, que leva a proliferação e diferenciação de células-tronco intestinais, também chamadas de regenerativas (Spies e Spence 1985, Chiang *et al.* 1986). O objetivo do organismo é tentar recuperar o tecido lesado e evitar que os processos digestivos entrem em colapso. Estas células proliferadas podem agrupar-se formando ninhos por todo o epitélio e permite que elas mantenham suas características de células-tronco com capacidade de proliferação e diferenciação (Illa-Bochaca & Montuenga 2006). A regeneração indica que o dano é transitório e reversível, do contrário, em situações graves pode não ser acompanhado pela reparação celular e causar a morte do organismo (Miller & Zachary 2017).

Diante disso, a investigação da ocorrência dos respectivos mecanismos torna-se uma importante ferramenta de suporte no estudo de suscetibilidade de populações de pragas-chave para assim desenvolver melhores táticas de controle. Para isso, o conhecimento de quais produtos sintéticos e naturais causadores de danos histológicos e, conseqüentemente, apoptóticos em células

intestinais é um indicativo de efeito promissor que poderá levar a complicações no potencial reprodutivo do inseto.

Sabe-se que a contaminação causada por algum agente tóxico pode levar ao aumento do estresse oxidativo no organismo do inseto, no qual caracteriza-se quando há um desequilíbrio entre a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Lalouette *et al.*, 2011). Entretanto, danos nas células digestivas pode aumentar o estresse oxidativo a partir do acúmulo de ERO, levando a perda das funções básicas dos constituintes celulares, como DNA, proteínas, carboidratos e lipídeo que, conseqüentemente, prejudica a absorção dos nutrientes ingeridos (Bi & Felton 1995, Velki *et al.* 2011).

Assim, o objetivo deste trabalho é elucidar as alterações provocadas pelos óleos essenciais de *J. virginiana* e *M. alternifolia* e dos piretroides beta-ciflutrina e lambda-cialotrina nas respostas celulares do intestino médio e gônadas, no estresse oxidativo e em parâmetros nutricionais de três populações brasileiras do bicudo-do-algodoeiro oriundas dos estados de Mato Grosso, Pernambuco e Ceará, a fim de comparar suas respostas bioquímicas e fisiológicas.

Literatura Citada

Abrapa. 2018. Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/>. Acesso em 20/03/2018.

Abrapa. 2020. Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/>. Acesso em 10/12/2020.

AGROFIT. 2020. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 09/12/2020.

Almehmadi, R.M. 2011. Larvicidal, histopathological and ultra-structure studies of *Matricharia chamomella* extracts against the rift valley fever mosquito *Culex quinquefasciatus* (Culicidae:Diptera). J. Entomol. 8:63-72.

Alves, T.J.S., G.S. Cruz, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, C.A.G. Câmara & F.M. Cunha. 2013. Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. Biotech. Histochem. 88: 1-11.

- Alyokhin, A., M. Baker, D. Mota-Sanchez, G. Dively & E. Grafius. 2008.** Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides. *Am. J. Potato Res.* 85: 395–413.
- Amer A. & H. Mehlhorn. 2006.** Larvicidal effects of various essential oils against. *Parasitol. Res.* 99: 466-472.
- Arrese, E.L. & J.L. Soulages. 2010.** Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annu. Rev. Entomol* 55: 207-225.
- Arrese, E.L., A.D. Howard, R.T. Patel, O.J. Rimoldi & J.L. Soulages. 2010.** Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 91-99.
- Azambuja, R. & P.E. Degrande. 2014.** Thirty years of cotton boll weevil in Brazil. *Arq. Inst. Biol* 1: 1-34.
- Azambuja, R. & P.E. Degrande. 2015.** Biologia e ecologia do bicudo-do-algodoeiro no Brasil, p.47-60. In Instituto Mato-Grossense do Algodão – Imamt, O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boh. 1843) nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle. Cuiabá, 254p. (Boletim de P&D).
- Behmer, S.T. 2008.** Nutrition in Insects. In: Capinera, J.L. (eds) *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_2277.
- Beltrão, N.E.M. 2004.** Pragas do algodoeiro, p. 123-134. In N.E.M. Beltrão & A.E. Araújo (eds.), *Algodão: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 265p.
- Benelli G., A. Canale, G. Flamini, P.L. Cioni, F. Demi, L. Ceccarini, M. Macchia & B. Contia. 2013.** Biototoxicity of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) essential oil against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and its parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). *Ind Crops Prod.* 50: 596-603.
- Bernards, M.A. 2010.** Plant natural products: a primer. *Can. J. Zool.* 88: 601-14.
- Bi, J.L. & G.W. Felton. 1995.** Foliar oxidative stress and insect herbivory: Primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J. Chem. Ecol.* 21: 1511-1530.
- Bretas, J.A.C. 2016.** Corpo gorduroso de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Tese de Doutorado, UFRRJ, Seropédica, 66p.
- Canavoso, L.E., Z.E. Jouni, K.J. Karnas, J.E. Pennington & M.A. Wells. 2001.** Fat Metabolism in Insects. *Annu. Rev. Nutr* 21: 23-46.

- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structures and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Chen, P.S. 1966.** Amino Acid and Protein Metabolism in Insect Development. *Adv. Insect Physiol* 3:53–132.
- Coelho, R.R., J.D.A.S. Júnior, A.A.P. Firmino, L.L.P. Macedo, F.C.A. Fonseca, W.R. Terra, G. Engler, J.A. Engler, M.C.M. Silva & M.F. Grossi-de-Sa. 2016.** Vitellogenin knockdown strongly affects cotton boll weevil egg viability but not the number of eggs laid by females. *Meta Gene* 9: 173-180.
- Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) 2019.** Perspec. agropec., Brasília, v.7, p. 1-100.
- Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) 2020.** Acomp. safra bras. Grãos, v.7 – safra 2019/20 – Quarto levantamento, Brasília, p.1-25.
- Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) 2020.** Histórico Mensal Algodão – Outubro/Novembro 2020, Brasília, p. 1-5.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2009.** Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. *Neotrop. Entomol.* 38: 83-91.
- Costa, E.L.N., R.F.P. Silva & L.M. Fiusa. 2004.** Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biol. Leopold.* 26: 173-185.
- Costa, H.N., Cunha, F.M., Cruz, G.S., D'assunção, C.G., Rolim, G.G., Barros, M. E.G., Breda, M.O., Teixeira, Á.A.C. & Wanderley-Teixeira, V. 2017.** Lufenuron impact upon *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) midgut and its reflection in gametogenesis. *Pestic Biochem Physiol.* 137: 71-80.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.S.C. Lopes, D.R.S. Barbosa, M.O. Breda, K.A. Dutra, C.A. Guedes, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Sublethal effects of essential oils from *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 109: 660-666.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D'assunção, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa & M.O. Breda. 2017.** Effect of transanethole, limonene and their combination in nutritional components and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Biol. Interact.* 263: 74-80.
- Cunha, F.M., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Pereira, B.F., Caetano, F.H., Torres, J.B., Gonçalves, G.G.A. & Santos, F.A.B. 2015.** Effects of Pymetrozine on biochemical parameters and the midgut ultrastructure of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *Animal Biol* doi.org/10.1163/15707563-00002476

- Dadd, R.H. 1985.** Nutrition: organisms. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. 4, ed. G.A.Kerkut & L.I. Gilbert, pp. 313–90. Oxford: Pergamon Press.
- Davies, T.G.E., A.O. O'Reilly, L.M. Field, B.A. Wallace & M.S. Williamson. 2008.** Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. *Pestic. Manag. Sci.*, 64: 126-1130.
- Dutra, K. A., V. Wanderley Teixeira, G. S. Cruz, C. T. S. Silva, C. G. D'Assunção, C. G. M. Ferreira, A. L. B. Monteiro, A. C. Agra Neto, C. J. C. Lapa Neto, A. A. C. Teixeira & D. M. A. F. Navarro. 2019.** Morphological and immunohistochemical study of the midgut and fat body of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: noctuidae) treated with essential oils of the genus *Piper*. *Biotec & Histochem*, 94: 498-513.
- Ebrahimifar, J., A. Jamshidnia, R. Sadeghi & A. Ebadollahi. 2020.** Repellency of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss essential oil on two major stored-product insect pests without effect on wheat germination. *Int. J. Trop. Insect Sci.*, doi.org/10.1007/s42690-020-00195-8.
- Eller, F.J., C.A., Clausen, F. Grenn & S.L.Taylor. 2010.** Critical fluid extraction of *Juniperus virginiana* L. and bioactivity of extracts against subterranean termites and wood-rot fungi. *Ind. Crop. Prod.*, 32: 481-85.
- Eller, F. J., R. K. Vander Meer, R. W. Behle, L. B. Flor-Weiler & D. E. Palmquist. 2014.** Bioactivity of Cedarwood Oil and Cedrol Against Arthropod Pests. *Environ. Entomol.*, 43: 762-766.
- Engleman, F. 1998.** In vitro germ plasm conservation. In: ISHS Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. Drew RAI, Ed. Horticultural Research & Development Corp., Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. p. 41-47.
- Fonseca, P.R.B., I.S. Lima Júnior, M.F. Soria, C. Kodama & P.E. Degrande. 2011.** Inseticidas neonicotinoides no controle do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae) e a falha de controle do endossulfan. *Arq. Inst. Biol* 78: 545-551.
- Fortucci, P. 2002.** The contributions of cotton to economy and food security in developing countries, FAO. In: Acessado em 10/12/2020.
- Godoy, M.S. & O. Nakano. 2011.** Efeitos de inseticidas sobre a reprodução e sobrevivência do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* boh. (Coleoptera: Curculionidae) em condições de laboratório. *Rev. Verde* 6: 12-22.
- Gregorc, A. & J.D. Ellis. 2011.** Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 99: 200-207.
- Guedes, C.A., V.W. Teixeira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro, G.S. Cruz, C.J.C.L. Neto, A.A. Correia, J.M. Sandes, F.A. Brayner, L.C. Alves & Á.A.C. Teixeira. 2020.** Evaluation of

Piper marginatum (Piperales: Piperaceae) Oil and Geraniol on the Embryonic Development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Comparison to Formulated Products.

- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2012.** Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Roca, 494p.
- Hammera, K.A., C.F. Carsona, T.V. Riley & J.B. Nielsen. 2006.** A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. F. Chem. Toxicol, 44: 616-625.
- Huang, N., S. Civciristov, C.J. Hawkins & R.J. Clem. 2013.** SfDronc, an initiator caspase involved in apoptosis in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. Insect Biochem. Molec. Biol. 43: 444-454.
- Huang, Y., Liao, M., Yang, Q., Xiao, J., Hu, Z., Zhou, L. & Cao, H. 2018.** Transcriptome profiling reveals differential gene expression of detoxification enzymes in *Sitophilus zeamais* responding to terpinen-4-ol fumigation. Pestic Biochem Physiol. 149: 44-53.
- Huang, Y. Liao, M., Yang, Q. Shi, S., Xiao, J. & Cao, H. 2019.** Molecular characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase and the involvement of CYP6MS1 in the susceptibility of *Sitophilus zeamais* to terpinen-4-ol. Pestic Biochem Physiol. doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.07.008.
- Huo, Y. Y. Yu1, L. Chen, Q. Li1, M. Zhang, Z. Song, X. Chen, R. Fang & L. Zhang. 2018.** Insect tissue-specific vitellogenin facilitates transmission of plant virus. Plos Pahog <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006909>.
- Illa-Bochaca, I. & L.M. Montuenga. 2006.** The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. J. Exp. Biol, 209: 2215-2223.
- Jacobson, M. 1989.** Botanical pesticides: past, present and future, p. 69-77. In J.T. Arnason, B.J.R. Philogène & P. Morand (eds.), Insecticide of plant origin. Washington, American Chemical Society, 213p.
- Klowden, M.J. 2007.** Physiological Systems in Insects. New York, Academic Press, 668p.
- 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.
- Lalouette, L., C.M. Williams, F. Hervant, B.J. Sinclair & D. Renault. 2011.** Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 158: 229–234.
- 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. Zhou, Y. Liu, X.W. Wu, R.M. Hua, G.R. Wang & H.Q. Cao. 2016.** Insecticidal Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil and RNA-Seq Analysis of *Sitophilus zeamais* Transcriptome in Response to Oil Fumigation. Plos One, doi.org/10.1371/journal.pone.0167748.
- Liao, M., J.J. Xiao, L. Zhou, X. Yao, F. Tang, R.M. Hua, X.W. Wu & H.Q. Cao. 2017.** Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on the *Helicoverpa armigera*. J. Appli. Entomol, doi.org/10.1111/jen.12397.
- Madbouly, S.A., C. Zhang & M.R. Kessler. 2015.** Bio-based plant oil polymers and composites. Elsevier Inc., Oxford, UK, 213p.
- Mapa (Ministério da Agricultura).** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso: 01/12/2020.
- Martin, M.M. 1983.** Cellulose digestion in insects. Comp. Biochem. Physiol, 75: 313-324.
- Metcalf, R. L. 1989.** Insect resistance to insecticides. Pest Manag. Sci, 26: 333-358.
- Milano, P., F.E. Berti, 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.
- Miller, M.A. & J.F. Zaachary. 2017.** Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death, p. 2-43 In J.F. Zachary & M.D. McGavin (60 eds.), Pathologic Basis of Veterinary Disease. Elsevier, p. 1249.
- Miranda, J.E., Tripode B.M.D., Lopes G.D. & S.B. Maia. 2017.** TOXICIDADE DE PIRETROIDES A POPULAÇÃO DE BICUDO DE ALGODOEIRO DE GOIÁS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 11., 2017, Maceió. Resumos... Inovação e rentabilidade na cotonicultura: resumos. Brasília, DF: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão - Abrapa, 2017.
- Mitić, Z.S., B. Jovanović, S. Č. Jovanović, Z.Z. Stojanović-Radić, T. Mihajilov-Krstev, N.M. Jovanović, B. M. Nikolić, P.D. Marin, B. K. Zlatković, & G.S. Stojanović. 2019.** Essential oils of *Pinus halepensis* and *P. heldreichii*: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. I. Crop. Product, 140: 111702.
- Netto, J.C., G.G. Rolim & L.S. Arruda. 2017.** Mortalidade do bicudo-do-algodoeiro após contato em resíduo seco de diferentes moléculas inseticidas utilizadas na cultura do algodoeiro – Safra 2016/2017. Mato Grosso, Instituto Mato-Grossense do Algodão (Imamt), 8p. (Circular Técnica 31).
- Oliveira-Marra, S.O.D., R.N.C. Guedes, C.S. Bastos, P.H.A. Marra, L.M. Vivan & A.M. Zanine. 2019.** Insecticide resistance and control failure likelihood among populations of the boll weevil (*Anthonomus grandis*) from Mato Grosso (Brazil). Acta Sci, doi: 10.4025/actasciagron.v41i1.42714.

- Praça, L. B. 2007.** *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae). Brasília, Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia, 23p.
- Preedy, V.R. 2015.** Essential oil in food preservation, flavour and safety. London, Academic Press, 862p.
- Rajendran S. & V. SriranjiniJ. 2008.** Plant products as fumigants for stored-product insect control. J. Stored Prod. Res. 44: 126-135.
- Rodriguez, E., P.L. Healey & I. Mehla. 1984.** Biology and chemistry of plant trichomes. NewYork: Plenum, 255p.
- Rolim, G.G., Arruda, L.S., Torres, J.B., Barros, E.M. & Fernandes, M.G. 2019.** Susceptibility of Cotton Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) to Spinosyns. J Econ Entomol. 112: 1688-1694.
- Salmela, H., & L. Sundström. 2017.** Vitellogenin in inflammation and immunity in social insects. Inflammation and Cell Signaling, Doi.org/10.14800/ics.1506.
- Santos, M.A.T., M.A. Areas & F.G.R. Reyes. 2007.** Piretroides - uma visão geral. Alimentos e Nutrição, 18: 339-349.
- Santos, W.J. 2015.** Medidas estratégicas de controle do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boh., 1843), p.79-94. In Instituto Mato-Grossense do Algodão – Imamt, O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boh., 1843) nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle. Cuiabá, 254p. (Boletim de P&D).
- Sarabia, L.E., López, M.F., Pineda-Mendonza, R.M., Obregón-Molina, G., Gonzalez-Escobedo, R., Albores-Medina, A. & Zúñiga, G. 2019.** Time-Course of CYP450 Genes Expression From *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae) During Early Hours of Drilling Bark and Settling Into the Host Tree. J Inset Sci. doi.org/10.1093/jisesa/iez046.
- Scudeler, E.L. & D.C. Santos. 2013.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navas, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). Micron 44: 125-132.
- Scudeler, E.L., C.R. Padovani. & D.C. Santos. 2014.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on the replacement of the midgut epithelium in the lacewing *Ceraeochrysa claveri* during larval-pupal metamorphosis. Acta Histochem. 116:771-780.
- Smith-Pardo, A. 2015.** Species of the beetle genus *Anthonomus* Germar, 1817 (Curculionidae: Curculioninae: Anthonomini) of quarantine importance intercepted at U.S. of entry. Bol mus entomol Francisco Luís Gallego. 7: 1-18.

- Simões, C.M.O. & V. Spitz.** 2004. Óleos voláteis, p. 467-495. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick (eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Editora da universidade/UFSC, 1104p.
- 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.
- Spit, J., L. Badisco, H. Verlinden, P. Van Wielendaele, S. Zels, S. Dillen & J.V. Broeck.** 2012. Peptidergic control of food intake and digestion in insects. *Can. J. Zool.* 90: 489-506.
- Stehle, S. & R. Schulz.** 2015. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *PNAS*, 112: 5750-5755.
- Tahghighi, A., N. Maleki-Ravasan, N.D. Djadid, H. Alipour, R. Ahmadvand, F. Karimian & S. Yousefinejad.** 2019. GC–MS analysis and anti–mosquito activities of *Juniperus virginiana* essential oil against *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 9: 168-175.
- Taiz, L. & E. Zeiger.** 2006. *Fisiologia vegetal*, 3.ed. Porto Alegre, Artmed, 722p.
- Tol, R.W.H.M., H.J. Swarts, A. Linden & J.H. Visser.** 2007. Repellence of the red bud borer *Resseliella oculiperda* from grafted apple trees by impregnation of rubber budding strips with essential oils. *Pest. Manag. Sci.* 63: 483-490.
- 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 Phytother.* 1: 052-064.
- Tumen, I., I. Süntar, F. J. Eller, H. Keleş & E.K. Akkol.** 2013. Topical Wound-Healing Effects and Phytochemical Composition of Heartwood Essential Oils of *Juniperus virginiana* L., *Juniperus occidentalis* Hook., and *Juniperus ashei* J. Buchholz. *J. Medic. Food*, doi.org/10.1089/jmf.2012.2472.
- Velki, M., D. Kodrík, J. Vecera, B.K. Hackenberger & R. Socha.** 2011. Oxidative stress elicited by insecticides: A role for the adipokinetic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172: 77-84.
- Yamada, T., O. Habara, H. Kubo & T. Nishimura.** 2018. Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in *Drosophila*. *Development*, doi:10.1242/dev.158865.
- Zhang, K. & L. Yao.** 2018. The anxiolytic effect of *Juniperus virginiana* L. essential oil and determination of its active constituents. *Physiol. Behavior*, 189: 50-58.
- Zielińska, E., B. Baraniak & M. Karaś.** 2018. Identification of antioxidant and anti-inflammatory peptides obtained by simulated gastrointestinal digestion of three edible insects species

(*Gryllodes sigillatus*, *Tenebrio molitor*, *Schistocerca gregaria*). Int. J. Food Sci. Technol, 53: 2542–2551.

CAPÍTULO 2

LAMBDA-CIALOTRINA PROMOVE DIFERENTES EFEITOS CITOTÓXICOS NO
INTESTINO E GÔNADAS EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS DO BICUDO-DO-
ALGODOEIRO

Hilton N. Costa¹, Glaucilane S. Cruz¹, Maria C. N. Ferreira², Valeska A. Á. Braga², Ismaela M. F. Melo², Guilherme G. Rolim³, Fabio A. Albuquerque⁴, Leucio D. Vieira⁵, Álvaro A. C. Teixeira² E
Valéria W. Teixeira²

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

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

³Departamento de Entomologia, Instituto Mato-Grossense do Algodão (IMAnt), Rondonópolis,
Brasil.

⁴Departamento de Pesquisa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA),
Barbalha, Brasil.

⁵Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

¹Costa, H.N., Cruz, G.S., Ferreira, M.C.N., Braga, V.A.Á, Melo, I.M.F., Rolim, G.G., Albuquerque, F.A., Filho, L.D.V., Teixeira, Á.A.C. & Teixeira, V.W. LAMBDA-CIALOTRINA PROMOVE DIFERENTES EFEITOS CITOTÓXICOS NO INTESTINO E GÔNADAS EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO. Pesticide Biochemistry and Physiology.

RESUMO - Populações de *Anthonomus grandis* da região Nordeste do Brasil mostraram-se suscetíveis ao tratamento com lambda-cialotrina (dados não publicados), porém, populações da região Centro-Oeste submetidas à piretroides revelaram baixa mortalidade. Assim, a investigação dos mecanismos celulares envolvidos na resposta a exposição a piretroides em diferentes populações de *A. grandis* é fundamental. Desse modo, avaliamos o efeito do lambda-cialotrina no estresse oxidativo e nas alterações celulares do intestino médio e gônadas de populações *A. grandis* de Mato Grosso, Pernambuco e Ceará. Botões florais foram imersos na solução inseticida (200 µL do ingrediente ativo + 100 mL de água destilada) e oferecidos aos insetos adultos por 24h. Todos os parâmetros foram avaliados 24h após a alimentação. Nas populações PE houve maior estresse oxidativo, porém em CE e MT esse índice foi menor. PE e CE apresentaram baixa proliferação celular e danos histológicos e histoquímicos nas gônadas. No entanto, em MT houve alto índice de proliferação celular no intestino médio. Em todas as populações houve aumento do índice apoptótico. Entendemos que as análises bioquímicas e fisiológicas são suficientes para explicar o fato que os bicudos de MT respondem de maneira mais eficiente a exposição ao inseticida a partir de regeneração de células intestinais danificadas, processo que evitou a depleção nutricional do organismo. Também deduzimos que essa população consegue equilibrar o mecanismo de reparação ao dano e realocação de reservas nutricionais. Além disso, constatamos que a capacidade de proliferação celular, que culmina em reparação tecidual, foi o principal motivo das diferentes respostas entre as populações.

PALAVRAS-CHAVE: Piretróide, bicudo-do-algodoeiro, estresse oxidativo, apoptose, proliferação celular, gônadas

LAMBDA-CYHALOTHRIN PROMOTES DIFFERENT CYTOTOXIC EFFECTS ON THE GUT AND GONADS IN BRAZILIAN POPULATIONS OF COTTON BOLL WEEVIL

ABSTRACT – *Anthonomus grandis* populations in the northeastern region of Brazil are susceptible to pymetrozine and lufenuron. However, populations in the Central-West submitted to pyrethroids showed low mortality. Thus, the investigation of the cellular mechanisms involved in susceptibility is necessary, since there is a risk of resistance. Therefore, we evaluated the effect of lambda-cyhalothrin on oxidative stress and on cellular changes in the midgut and gonads of populations of *A. grandis*, from Mato Grosso, Pernambuco, and Ceará. Flower buds were immersed in the insecticide solution and offered to adult insects for 24 hours. All parameters were evaluated 24h after feeding. The results showed less oxidative stress and greater cell proliferation in the midgut in the MT population, avoiding nutritional depletion. The populations of PE and CE suffered greater oxidative stress, low cell proliferation, and histological and histochemical damage to the gonads. In all populations there was an increase in the apoptotic index. We conclude that low cell proliferation in populations of PE and CE may be the factor for susceptibility. This work demonstrates that physiological analyzes such as oxidative stress, apoptosis, cell proliferation, and morphohistochemistry are sufficient to explain the fact that MT bollworms present better responses when exposed to lambda-cyhalothrin compared to PE and CE, being considered a tolerant population to treatment at the recommended dose. Therefore, this research provides evidence that the study of the susceptibility of pest populations and different responses to the same product can be explained from a physiological perspective through the investigation of different cellular responses as an alternative to conventional methods.

KEY WORDS: Pyrethroids, cotton boll weevil, oxidative stress, apoptosis, cell proliferation, gonads

Introdução

Inseticidas são conhecidos por promoverem efeitos adversos nos insetos, por exemplo, na fisiologia digestiva, afetando as células que revestem o epitélio da região do intestino médio. Como essa região atua na absorção de nutrientes, o impacto nela pode ter consequências nos processos reprodutivos. Além disso, a exposição pode afetar diretamente as gônadas, levando a complicações na gametogênese nos testículos e ovários. Portanto, a homeostase intestinal está diretamente relacionada à manutenção nutricional e, consequentemente, ao bom funcionamento de processos vitais do inseto, como a reprodução (Cunha *et al.* 2015, Costa *et al.* 2017).

Constantemente o epitélio intestinal é renovado, principalmente quando a região sofre algum dano. A renovação ocorre por meio da proliferação de células regenerativas, também chamadas de células-tronco intestinais (Park & Takeda 2008, Caccia *et al.* 2019). Muitos estudos relacionam a renovação epitelial, a partir da proliferação de células-tronco, durante a muda em insetos holometábolos, como resposta a infecção a patógenos ou exposição a xenobióticos (Buchon *et al.* 2009, Naszai *et al.* 2015, Taracena *et al.* 2018, Janeh *et al.* 2019). Muitas vezes esse mecanismo atua como resposta a apoptose, que pode ocorrer naturalmente ou ser induzida após algum estresse (Gregorc & Ellis 2011, Huang *et al.* 2013). Já a apoptose tem relação com o estresse oxidativo causado pelo desequilíbrio entre a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que leva a perda das funções básicas dos constituintes celulares, como DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos (Lalouette *et al.* 2011, Velki *et al.* 2011).

Investigar a ocorrência desses mecanismos nos insetos-praga de importantes culturas é fundamental para desenvolver melhores táticas de controle, a exemplo do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, Coleoptera: Curculionidae). Este besouro é a principal praga do cultivo de algodão em todas as regiões do Brasil e pode causar prejuízos de 75% a 100% na produtividade (Godoy & Nakano 2011, Abrapa 2020, MAPA 2020). A região Centro-Oeste é a

maior produtora de algodão do país e para manter a viabilidade do cultivo são necessárias aplicações de formulações convencionais para o controle deste besouro (Rolim *et al.* 2019). Pesquisas anteriores demonstraram que populações de *A. grandis* da região Nordeste são susceptíveis a piretroides (dados não publicados). No entanto, populações da região Centro-Oeste submetidas à piretroides revelaram baixa mortalidade (Oliveira-Marra *et al.* 2019). Diante disso, a investigação dos mecanismos subjacentes envolvidos na suscetibilidade a inseticidas em diferentes populações brasileiras de *A. grandis* se faz necessária, principalmente quando existe o risco de resistência.

Mecanismos de resistência também podem ser inferidos a partir de respostas celulares intestinais, como já documentados por intoxicação via patógenos (Loeb *et al.* 2001, Castagnola & Jurat-Fuentes 2016). Nos mosquitos *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* e *Anopheles gambiae*, foram relatadas a relação da capacidade de regeneração do intestino médio com a resistência a infecções bacterianas (Janeh *et al.* 2017, Janeh *et al.* 2019). Diante disso, é fundamental analisar as respostas celulares a exposição a piretroides de *A. grandis* oriundas de diferentes regiões do Brasil, para o melhor conhecimento e desenvolvimento de estratégias de manejo, visto serem ainda escassas.

Portanto, a fim de conhecer os mecanismos de respostas celulares de populações brasileiras de *A. grandis*, o presente estudo avaliou os efeitos da ingestão de lambda-cialotrina no estresse oxidativo, bem como na apoptose, proliferação celular e morfohistoquímica do intestino médio e gônadas.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia de Insetos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, no Centro de Apoio à Pesquisa (Cenapesq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil) e no Laboratório de Fisiologia

Renal do Departamento de Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil).

Criação e Obtenção das Populações *Anthonomus grandis*. Botões florais e cápsulas de algodão infestados com larvas e pupas de *A. grandis* foram coletados em campos comerciais e experimentais em três cidades, Rondonópolis (Mato Grosso/MT, centro-oeste do Brasil), Recife (Pernambuco/PE, nordeste do Brasil) e Barbalha, (Ceará/CE, nordeste do Brasil) (Fig. 1), e enviados ao Laboratório de Fisiologia de Insetos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil). Os grupos de insetos de cada estado foram então alojados separadamente em gaiolas plásticas de emergência ($42,5 \times 30,7 \times 30,5$ cm) armazenadas em laboratório mantido a 25 ± 1 °C, com umidade relativa de 65 ± 5 % e fotofase de 12 horas. Os insetos da população de Pernambuco também foram utilizados como o grupo controle.

Tratamento com Lambda-cialotrina. Os insetos foram expostos ao piretroide lambda-cialotrina na dose recomendada para o controle do *A. grandis* a uma concentração (200 µL do p.c. + 100 mL de água destilada) baseada na dose de rótulo (300 mL p.c./ha em 100 à 200 L de calda/ha, Karate Zeon 50® 50 g/L suspensão encapsulada, Syngenta Crop Protection Ltda, São Paulo / SP-Brasil). Botões florais de algodão foram imersos na solução inseticida e secos em temperatura ambiente por 1 hora. A água destilada foi usada para o controle. Após esse período, os botões tratados foram oferecidos como alimento, durante 24 h, para os insetos adultos (24 h de idade), individualmente colocados em recipientes plásticos (80 mL) forrados internamente com papel filtro umedecido e mantidos em câmara climatizada sob 12 h de fotoperíodo, $25 \pm 0,5$ °C e umidade relativa de 70%. Todas as avaliações foram realizadas após 24 h de exposição ao inseticida. O bioensaio foi conduzido em delineamento de blocos inteiramente casualizados com três blocos de 50 insetos para cada tratamento.

Estresse Oxidativo. Para o estresse oxidativo, foi avaliada a peroxidação lipídica realizada pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - thiobarbituric acid reactive substances), de acordo com Ohkawa *et al.* (1979). Cinco insetos adultos de cada tratamento foram homogeneizados com KCl 1,15 % + EDTA 3 mM em banho de gelo. Posteriormente, foi adicionado um meio de reação contendo 0,3 % de ácido tiobarbitúrico, 0,4 % de SDS e 7,5 % de ácido acético (pH 3,5), e subsequentemente a mistura foi aquecida a 95 °C por uma hora. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante teve a absorbância mensurada em comprimento de onda de 535 nm. Os dados obtidos foram corrigidos pela concentração de proteína do homogenato, mensurada de acordo com Lowry *et al.* (1951).

Coleta dos Órgãos e Inclusão em Histoiresina. Dez tubos digestivos, dez testículos e dez ovariolos após 24 h foram coletados. Os insetos foram imobilizados em baixa temperatura (4 °C), dissecados em microscópio estereoscópico, fixados em formol a 10 % por 24 h e armazenados em álcool 70 %. Os intestinos médios dos insetos foram seccionados e, juntamente com os testículos e ovariolos, desidratados em banhos crescentes de etanol (70–100 %), por 10 minutos cada. As amostras foram impregnadas em álcool + histoiresina (1:1) por 24 h e finalmente incluídas em histoiresina pura (Leica®).

Confecção e Coloração das Lâminas Histológicas e Histoquímicas. Cortes de espessura de 5 µm foram obtidos de um micrótomo Leica® RM 2035 e submetidos a técnicas de coloração com azul de toluidina para análise morfológica. Para a análise histoquímica, utilizou-se o ácido periódico-Schiff (P.A.S.) (detecção de carboidratos neutros) e Xylidine Ponceau (detecção de proteína total). Todas as lâminas foram examinadas com fotomicroscópio Leica®.

Quantificação de Pixels. Para a quantificação histoquímica de carboidratos neutros e proteína total a partir dos pixels, as imagens foram submetidas ao programa editor de imagens GIMP® 2.8 (GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX) para conversão das imagens digitais em tons de

cinza (preto e branco). Esta segmentação de cores permite a medição do número de pixels no tecido selecionado (Temitope 2013). Para cada tratamento, foram utilizadas três lâminas de insetos diferentes, onde foram avaliadas quatro seções, totalizando 12 seções.

Confecção das Lâminas Imunohistoquímicas. Para a análise imunohistoquímica (apoptose e proliferação celular), os intestinos médios foram incluídos em parafina e os cortes de 5 µm de espessura feitos em micrótomo Minot (LEICA RM 2035), colocados em banho-maria e coletados em lâminas silanizadas. As imagens foram capturadas e digitalizadas pelo software Leica LAS Image (Junqueira & Junqueira 1983, Solomon 2009).

Imunohistoquímica do Intestino Médio. Para detectar apoptose pela fragmentação do DNA, lâminas silanizadas contendo cortes de intestino médio, foram submetidas ao teste de TUNEL (Terminal Deoxinucleotidil Transferase Uracil Nick End Labeling) (Gravrieli *et al.* 1992) seguindo o protocolo do kit Apoptag Plus (Merck®). Os cortes foram inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em PBS por 5 minutos à temperatura ambiente. Após, a Proteinase K foi aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão equilíbrio por 60 minutos a 4° C. Depois, os cortes foram incubados em TdT a 37° C por 1 hora em câmara úmida. Foi aplicada a solução stop por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-digoxigenina. As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) (±20 minutos), sendo contracorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Após isso, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para serem montadas e observadas em microscópio de luz.

Para determinar a proliferação celular, os cortes foram despafarfinizados, hidratados e submetidos à recuperação antigênica com tampão citrato (pH=6) em banho-maria por 20 minutos, a 100 °C, e após descanso de 20 minutos em temperatura ambiente foi aplicado sobre o peróxido de hidrogênio a 3 % por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão Tris e com anticorpo PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) (Spring) na diluição 1:100, por 1 hora em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em tampão Tris e incubados com histofine por 30 minutos, submetidos ao cromógeno diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) e contracorados com hematoxilina.

O índice apoptótico e a proliferação celular foram determinados pelo percentual de células positivas a partir da contagem de, pelo menos, 500 núcleos/tratamento subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40x (Losa *et al.* 2000, Wu *et al.* 2013).

Quantificação de Células Regenerativas do Intestino Médio. A quantificação foi realizada por meio de dois cortes da linha média do intestino de três insetos por tratamento (controle e lambda-cialotrina 24 h), corados com azul de toluidina. A captura das imagens foi realizada por uma câmera de vídeo Sony® acoplada a um microscópio Olympus BX50. Em cada repetição, (lâmina com uma seção de corte) células regenerativas foram contabilizadas em todo o intestino médio.

Análise Estatística. Os dados que assumiram normalidade e homogeneidade tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade, enquanto os que não assumiram foram analisados em Kruskal Wallis ao nível 5% de probabilidade no programa SAS Institute.

Resultados

Estresse Oxidativo

Os bicudos tratados com lambda-cialotrina durante 24 horas apresentaram aumento de peroxidação lipídica em relação ao grupo controle (Fig. 2), sugerindo a ocorrência de estresse

oxidativo causado pelo inseticida. Os bicudos da população PE tiveram aumentos expressivos em relação aos demais ($F=16.73$; $P< 0.0001$). A população MT não diferiu dos insetos de CE.

Histologia e Histoquímica do Intestino Médio

Os adultos do controle, após 24 horas, apresentaram intestino médio revestido externamente por duas camadas de tecido muscular estriado, uma interna, disposta circularmente, e outra externa, longitudinalmente. O epitélio é simples, composto por dois tipos de células: (1) as células digestivas colunares, com núcleos esféricos centrais e uma borda em escova de microvilosidades em seu ápice e (2) células-tronco ou regenerativas com citoplasma basófilo, que ocorrem individualmente ou agrupadas em ninhos, que ficam em contato com a lâmina basal. Além disso, foi observada a presença de membrana peritrófica (MP) na luz intestinal, separando o bolo alimentar da camada de células epiteliais (Fig. 3A e B).

O intestino médio dos adultos tratados com lambda-cialotrina apresentou, após 24 horas, camadas de tecido muscular preservadas. No entanto, houve em todas as populações testadas aumento do número de células regenerativas, com formação de ninhos nos tratamentos de MT e CE, mas surgindo isoladamente no tratamento de PE. Na população MT, houve desorganização das células colunares, espaçamentos nos ninhos de células regenerativas, ejeção de núcleos e fragmentos celulares no lúmen, indicando processo de descamação epitelial (Fig. 3 C-D). No epitélio intestinal dos bicudos da população PE, foi possível identificar principalmente a formação de protusões citoplasmáticas e secreções (Fig. 3 E-F). Na população CE, observou-se também descamação epitelial, a formação de protusões citoplasmáticas, alterações nas células colunares e espaçamentos nos ninhos de células regenerativas (Fig. 3 G-H).

A análise histoquímica das células epiteliais para detecção de carboidratos neutros do grupo controle revelou maior reação positiva ao corante P.A.S. em comparação aos tratamentos após 24 horas. No controle, foi observada a presença e distribuição uniforme dos grânulos de glicogênio em

tudo o citoplasma, além da membrana peritrófica (Fig. 4 A). Nos grupos expostos a lambda-cialotrina, foi observado ausência da membrana peritrófica em todos os intestinos, e distribuição dos grânulos de glicogênio de modo intenso para a região apical da célula na população MT (Fig. 4 B), com predominância para o ápice celular em PE (Fig. 4 C). Na população do CE verificou-se distribuição de glicogênio por todo citoplasma e de forma mais intensa do que em PE (Fig. 4 D). Do mesmo modo, a quantificação de pixels revelou diferença significativa entre o controle e os tratamentos e até entre os tratamentos, com menor redução de glicogênio nos bicudos da população MT, mostrando que a quantidade de carboidratos neutros foi alterada pelo inseticida ($\chi^2=34.4005$; $P<0.0001$) (Fig. 4 E).

De maneira semelhante, as análises histoquímicas das células epiteliais para detecção de proteínas totais revelaram coloração positiva para Xylidine Ponceau no controle e tratamentos (Fig. 5 A-D). A quantificação dos pixels também mostrou diferença significativa, sendo que os maiores teores foram observados na população de PE, seguida da população de MT, mas sem diferença entre as populações controle e CE ($F=409.18$; $P<0.0003$) (Fig. 5A- E).

Imunohistoquímica do Intestino Médio

Foram detectados marcação positiva (núcleos em marrom) nas células colunares do epitélio dos bicudos tratados com o inseticida, indicando que foi induzida a morte celular por apoptose no epitélio do intestino médio (Fig. 6 A-D). A análise do índice apoptótico revelou que nos tratamentos todas as populações apresentaram mais de 80% dos núcleos positivos, enquanto no controle esse valor foi menor que 5% ($F= 208.98$; $P<0.0001$) (Fig. 6 E).

A expressão do PCNA também revelou marcação positiva (núcleos em marrom), indicando proliferação celular em todas as populações (Fig. 7 A-D). Porém, a análise do índice de PCNA mostrou maior porcentagem de núcleos positivos na população de MT (>70%), seguida de CE

(>40%), porém em PE os valores foram bem menores (<2%) que o controle (=17%) (F=89.02; P<0.0001) (Fig. 7 E).

Quantificação de Células Regenerativas do Intestino Médio

Foi observado que os insetos das três populações tratados com lambda-cialotrina apresentaram aumento substancial de células regenerativas por todo o epitélio do intestino médio em comparação ao controle (F= 28.93; P<0.0001) (Fig. 8).

Histologia e Histoquímica dos Testículos

O grupo controle apresentou testículos revestidos por tecido conjuntivo (cobertura peritoneal) em toda a extensão, com formação de vários folículos testiculares a partir de invaginações septadas (Fig. 9 A). Além disso, foi observada a presença de muitos espermatozoides e de alguns cistos (contendo células da linhagem espermática). Os testículos tratados com lambda-cialotrina revelaram cistos em maior proporção e poucos feixes de espermatozoides, quando comparados ao controle (Fig. 9 B-D).

As análises histoquímicas para detecção de carboidratos neutros mostraram que os testículos tratados tiveram maiores reações positivas ao P.A.S. quando comparados ao controle (Fig. 10 A-D). Corroborando com a quantificação dos pixels, no qual houve diferença significativa dos tratamentos com o controle, indicando que o tratamento com inseticida aumentou os níveis de carboidratos neutros nesse órgão (F= 112.60; P<0.0001) (Fig. 10 E). Do mesmo modo, a detecção de proteínas revelou maior reação positiva de Xylidine Ponceau nos tratamentos em relação ao controle (Fig. 11 A-D), como também quantificações maiores de pixels (χ^2 = 27.4345; P<0.0001) (Fig. 11 E).

Histologia e Histoquímica dos Ovaríolos

As análises histológicas revelaram que os ovaríolos do grupo controle são revestidos por uma bainha de tecido conjuntivo, além de apresentarem uma região de gema bem desenvolvida e

uma camada de células foliculares envolvendo cada oócito em formação, além de vesícula germinativa (Fig. 12 A). Os ovários do tratamento com lambda-cialotrina mostraram-se semelhantes morfológicamente ao controle, no entanto nos oócitos da população PE e CE não foi identificada a vesícula germinativa (Fig. 12 B-D).

Histoquimicamente, na detecção de carboidratos houve coloração positiva ao P.A.S. tanto no grupo controle quanto nos tratamentos com lambda-cialotrina (Fig. 13 A-D). No entanto, as análises dos pixels revelaram diferenças significativas, onde as reduções de carboidratos foram menores para MT quando comparados as outras populações ($\chi^2 = 40.2505$; $P < 0.0001$) (Fig. 13 E). De modo semelhante, houve reação positiva ao corante Xylidine Ponceau para as proteínas totais (Fig. 14 A-D), porém não ocorreram diferenças significativas do número médio de pixels ($F = 1.94$; $P = 0.1376$) (Fig. 14 E).

Discussão

As diferenças apresentadas entre as populações submetidas ao piretroide lambda-cialotrina, tem relação com a capacidade antioxidante. Devido a pressão de seleção, a partir das frequentes pulverizações de inseticidas na região (Oliveira-Marra *et al.* 2019, Rolim *et al.* 2019), os bicudos da população MT certamente desenvolveram um mecanismo antioxidante de defesa que é herdado pelas gerações seguintes, resultando na sua menor suscetibilidade.

Em insetos resistentes é comum observar que grupos enzimáticos atuem fisiologicamente eliminando e/ou neutralizando a molécula inseticida (Hema *et al.* 2011, Zimmer & Nauen 2011, Barros *et al.* 2013), resultando no menor estresse oxidativo. Segundo Oliveira-Marra *et al.* (2019), os bicudos da região Centro-Oeste não são resistentes aos piretroides, porém, é evidente nesta pesquisa que a população MT sofreu menor estresse.

O menor nível de estresse oxidativo permitiu a recuperação dos danos celulares intestinais de modo mais eficiente nessa população, pois apesar das alterações histológicas e indução de apoptose, a técnica imunohistoquímica revelou alta proliferação celular. Assim, houve a substituição de células danificadas, evidenciada também pelo aumento do número de células regenerativas, que agruparam-se formando ninhos por todo o epitélio. Consequentemente, a alta proliferação de células na população MT evitou que a absorção intestinal fosse reduzida e que o organismo sofresse uma depleção nutricional, podendo ser confirmado também pela redução menos intensa de carboidratos. O reflexo da eficiência de absorção de nutrientes é muito importante em insetos holometábolos, pois estes necessitam da aquisição nutricional adequada para manter o seu potencial reprodutivo (Behmer 2008, Cruz *et al.* 2017), essencial ao estabelecimento de uma praga no agroecossistema.

Nessa perspectiva, mesmo que em MT tenha ocorrido regeneração celular intestinal, verificou-se nos testículos a presença de cistos, entretanto, em proporções menores aos feixes de espermatozoides, propondo que não houve retardo na espermatogênese quando comparados as outras populações.

Em contrapartida, os bicudos de PE sofreram maior estresse oxidativo provavelmente por não possuírem um mecanismo antioxidante eficiente. Além disso, nessa população a baixa proliferação celular, vista também em CE, não permitiu a reparação celular necessária após o processo de apoptose, no qual promoveu complicações na absorção. Sendo assim, a não substituição das células lesadas nas populações PE e CE levou a problemas na absorção dos nutrientes ingeridos, que culminou em menores taxas de carboidratos no intestino. Além do mais, os danos histológicos e histoquímicos nas gônadas, principalmente as reduções de carboidratos nos ovários, comprovam que a absorção foi comprometida. Costa *et al.* (2017) relataram que em populações PE de *A. grandis* os danos no intestino médio causados pelo lufenuron refletiram em redução da espermatogênese e oogênese.

A maturação dos oócitos nos ovários abrange vários estágios, começando na região do germário, passando pelo enfileiramento dos folículos e terminando em oócitos com núcleos transformados em vesícula germinativa posicionada na região central (Ullmann 1973, Parthasarathy *et al.* 2010). Além disso, a deposição de vitelo para a oogênese está diretamente relacionada com a vesícula germinativa (Chapman 2013). Portanto, a não formação dessa vesícula na população PE e CE, indica a possibilidade de haver complicações na formação do ovo, uma vez que a secreção do córion poderá ser impedida.

Sabe-se que o aumento do estresse oxidativo é diretamente proporcional ao maior dano celular. Na lagarta *Helicoverpa armigera* Hübner os piretroides permetrina e fenvalarato também elevaram o estresse oxidativo (Akbar *et al.* 2012). Portanto, infere-se que o maior dano ocorreu nos bicudos da população PE e devido a baixa capacidade de proliferação celular o problema foi intensificado, no qual poderá ter sido de caráter irreversível. Já em CE, o estresse oxidativo não diferiu de MT, podendo ter relação com a proliferação celular relativamente alta (>40%) em relação ao grupo controle, porém, não suficiente para evitar déficit de absorção nutricional, como pode ser identificado com a menor quantidade de carboidratos nos ovários.

Embora nas três populações estudadas tenha sido verificada ausência da membrana peritrófica, que desempenha um importante papel de proteção, através do sequestro e/ou inativação de toxinas ingeridas (Hegedus *et al.* 2009), essa não foi preponderante para interferir nesses danos, pois a população de MT conseguiu reagir de maneira mais eficiente a tais danos. Assim, inferimos que a baixa capacidade de proliferação celular em PE e a ineficiência da proliferação em CE, pode ter sido o fator principal para a suscetibilidade dessas populações.

A redução de carboidratos em bicudos de PE e CE indica um acentuado gasto energético em resposta ao agente estressor e comprova as consequências de maiores danos oxidativos. De acordo com Arrese *et al.* (2010) e Rosas-Mejía *et al.* (2015), os carboidratos são as principais fontes

energéticas dos insetos, além de participarem da proteção contra inseticidas. Isso reforça a hipótese de que essas populações não conseguiram equilibrar o mecanismo de reparação celular e a realocação de reservas.

Este trabalho demonstra que as análises bioquímicas e fisiológicas são suficientes para explicar o fato que os bicudos de MT respondem de maneira mais eficiente a exposição ao inseticida, a partir da regeneração de células intestinais danificadas, processo que evitou a depleção nutricional do organismo. Também deduzimos que essa população consegue equilibrar o mecanismo de reparação ao dano e realocação de reservas nutricionais. Além disso, constatamos que a capacidade de proliferação celular, que culmina em reparação tecidual, foi o principal motivo das diferentes respostas entre as populações.

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor.

Literatura Citada

Abrapa. 2018. Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/>. Acesso em 20/03/2018.

Arrese, E.L., A.D. Howard, R.T. Patel, O.J. Rimoldi & J.L. Soulages. 2010. Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 91-99.

Barros, A.T.M., Schumaker, T.T.S., Koller, W.W., Klafke, G.M., Albuquerque, T.A. & Gonzalez, R. 2013. Mechanisms of pyrethroid resistance in *Haematobia irritans* (Muscidae) from Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22: 136-142.

Behmer, S.T. 2008. Nutrition in Insects. In: Capinera JL (eds) *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht, 262p.

- Buchon, N., N.A. Broderick, M. Poidevin, S. Pradervand & B. Lemaitre. 2009.** *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host Microbe* 5: 200-211.
- Caccia, S., M. Casartelli & G. Tettamanti. 2019.** The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell Tissue Res.* 377:505–525.
- Castagnola, A. & J.L. Jurat-Fuentes. 2016.** Intestinal regeneration as an insect resistance mechanism to entomopathogenic bacteria. *Curr. Opin. Insect. Sci* 15:104–110.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structures and function. Cambridge, Cambridge University Press, p. 929.
- Costa, H.N., Cunha, F.M., Cruz, G.S., D'assunção, C.G., Rolim, G.G., Barros, M. E.G., Breda, M.O., Teixeira, Á.A.C. & Wanderley-Teixeira, V. 2017.** Lufenuron impact upon *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) midgut and its reflection in gametogenesis. *Pestic Biochem Physiol.* 137: 71-80.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D'assunção, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa, M.O. Breda. 2017.** Effect of trans-anethole, limonene and your combination in nutritional componentes and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Biol. Interact.* 263: 74-80.
- Cunha, F.M., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Pereira, B.F., Caetano, F.H., Torres, J.B., Gonçalves, G.G.A. & Santos, F.A.B. 2015.** Effects of Pymetrozine on biochemical parameters and the midgut ultrastructure of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *Animal Biol.* doi.org/10.1163/15707563-00002476.
- Godoy, M.S. & O. Nakano. 2011.** Efeitos de inseticidas sobre a reprodução e sobrevivência do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* boh. (Coleoptera: Curculionidae) em condições de laboratório. *Rev. Verde* 6: 12-22.
- Gregorc, A. & J.D. Ellis. 2011.** Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 99: 200-207.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & S.A. Ben-Sasson. 1992.** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493–501.
- Hema, O., Some, H., Zagre, B., Konate, G., Traore, O. & Traore, K. 2011.** Caracterização bioquímica e molecular da resistência da *Helicoverpa armigera* hübner aos piretroides no burkina faso. Estratégias de proteção do algodoeiro. *Anais do Congresso Brasileiro de Algodão & Cotton Expo*, p.25-46.
- Hegedus, D., M. Erlandson, C. Gillott & U. Toprak. 2009.** New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.* 54:285-302.

- Huang, N., S. Covicristov, C.J. Hawkins & R.J. Clem. 2013.** SfDronc, an initiator caspase involved in apoptosis in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 43: 444-454.
- Janeh, M., D. Osman & Z. Kambris. 2017.** Damage-Induced Cell Regeneration in the Midgut of *Aedes albopictus* Mosquitoes. *Sci. Rep.* doi: 10.1038/srep44594.
- Janeh, M., D. Osman & Z. Kambris. 2019.** Comparative Analysis of Midgut Regeneration Capacity and Resistance to Oral Infection in Three Disease-Vector Mosquitoes. *Sci. Rep.* DOI:10.1038/s41598-019-50994-4.
- Junqueira, L. C. U.; Junqueira, L. M. M. S. 1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos Editora, 3º ed, 270p.
- Akbar, S.M.D., H.C. Sharma, S.K. Jayalakshmi & K. Sreeramulu. 2012.** Effect of pyrethroids, permethrin and fenvalerate, on the oxidative stress of *Helicoverpa armigera*. *World J. Sci. Technol.* 2: 01-05.
- Lalouette, L., C.M. Williams, F. Hervant, B.J. Sinclair & D. Renault. 2011.** Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 158: 229–234.
- Loeb, M.J., P.A.W. Martin, R.S. Hakim, S. Goto & M. Takeda. 2001.** Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sub lethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J Insect Physiol.* 47:599–606.
- Losa, M., Barzaghi, R.L., Mortini, P., Franzin, A., Mangili, F., Terreni, M.R., & , M. Giovanelli. 2000.** Determination of the proliferation and apoptotic index in adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors: comparison between micro- and macroadenomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 156:245–251.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MAPA (Ministério da Agricultura).** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso: 01/09/2020.
- Miranda, J.E. & S.M.M. Rodrigues. 2015.** História do bicudo no Brasil, p. 9-48. In Instituto Mato-Grossense do Algodão – Imamt, O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boh., 1843) nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle. Cuiabá, 254p. (Boletim de P&D).
- Naszai M., L.R. Carroll & J.B. Cordero. 2015.** Intestinal stem cell proliferation and epithelial homeostasis in the adult *Drosophila* midgut. *Insect Biochem Mol Biol.* 67:9-14.
- Ohkawa, H., N. Ohishi & K. Yagi. 1979.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.

- Oliveira-Marra, S.O.D., R.N.C. Guedes, C.S. Bastos, P.H.A. Marra, L.M. Vivan & A.M. Zanine. 2019.** Insecticide resistance and control failure likelihood among populations of the boll weevil (*Anthonomus grandis*) from Mato Grosso (Brazil). *Acta Sci. Agron.* doi: 10.4025/actasciagron.v41i1.42714.
- Park, M.S. & M. Takeda. 2008.** Starvation suppresses cell proliferation that rebounds after refeeding in the midgut of the American cockroach, *Periplaneta Americana*. *J. Insect Physiol.* 54: 386–392.
- Parthasarathy, R., Sheng, A., Palli, S.R. 2010.** Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Molec.* 40: 429-439.
- Rolim, G.G. L.S. Arruda, J.B. Torres, E.M. Barros & M.G. Fernandes. 2019.** Susceptibility of Cotton Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) to Spinosyns. *J. Ecom. Entomol.* 112: 1688–1694.
- Rosas-Mejía, M., A. Correa-Sandoval, C. S. Venegas-Barrera & J.V. Horta-Veja. 2015.** Preferences among five carbohydrates in *Pheidole bilimeki* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool. Mex.* 31: 291-297.
- Solomon, R.W. (2009).** Free and open source software for manipulation of digital images. *Americ. J. Roentgenology* 192, 330-334.
- Taracena, M.L., V. Bottino-Rojas, O.A.C. Talyuli, A.B. Walter-Nuno, J.H.M. Oliveira, Y.I. Angleró-Rodriguez, M.B. Wells, G. Dimopoulos, P.L. Oliveira & G.O. Paiva-Silva. 2018.** Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus. *Plos Negl. Trop. Dis.* doi: 10.1371/journal.pntd.0006498.
- Ullmann, S.L., 1973.** Oogenesis in *Tenebrio molitor*: Histological and autoradiographical observations on pupal and adult ovaries. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30,179-217.
- Velki, M., D. Kodrík, J. Vecera, B.K. Hackenberger & R. Socha. 2011.** Oxidative stress elicited by insecticides: A role for the adipokinetic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172: 77-84.
- Wu, X., Cheng, B., Cai, Z.D. & L.M. Lou. 2013.** Determination of the apoptotic index in osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. *Cancer Cell Int.* 13:1-4.
- Zimmer, C.T. & Nauen, R. 2011.** Cytochrome P450 mediated pyrethroid resistance in European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 100: 264-272.

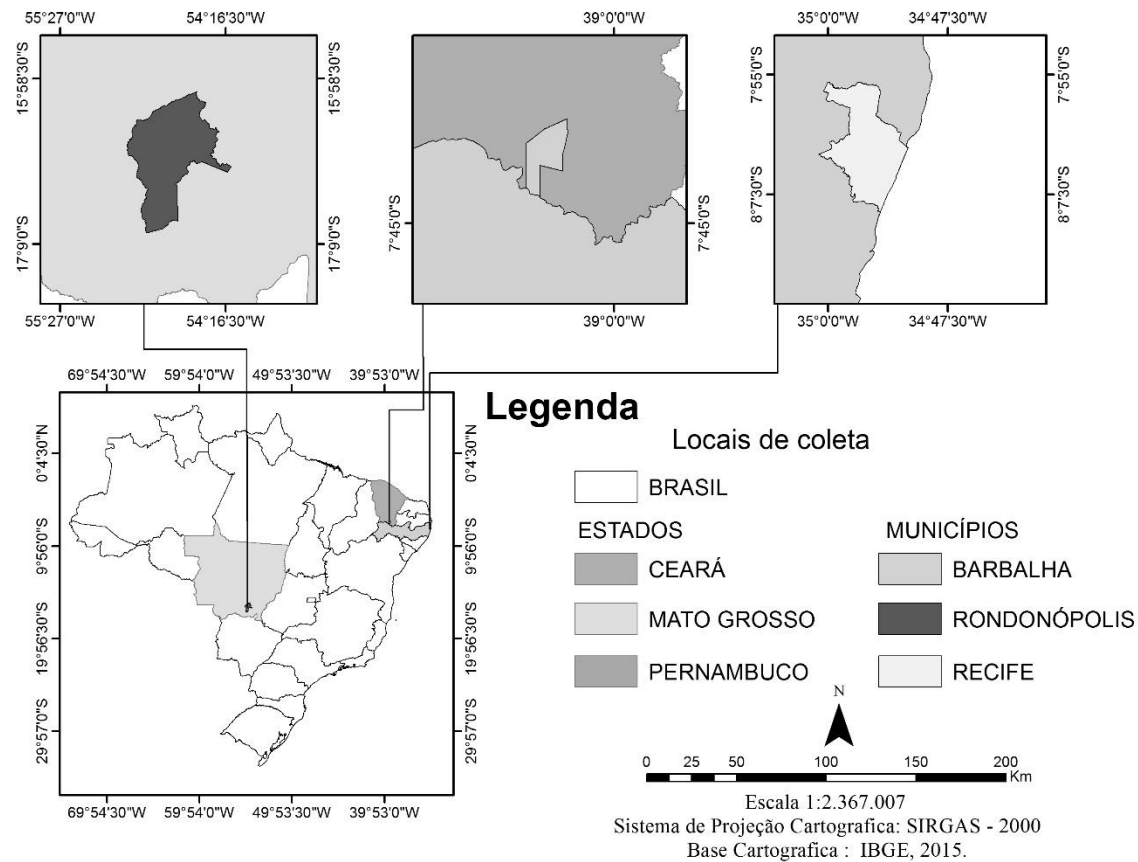


Figura 1. Mapa ilustrando os locais de coleta das populações de *Anthonomus grandis* em campos de algodão no Brasil.

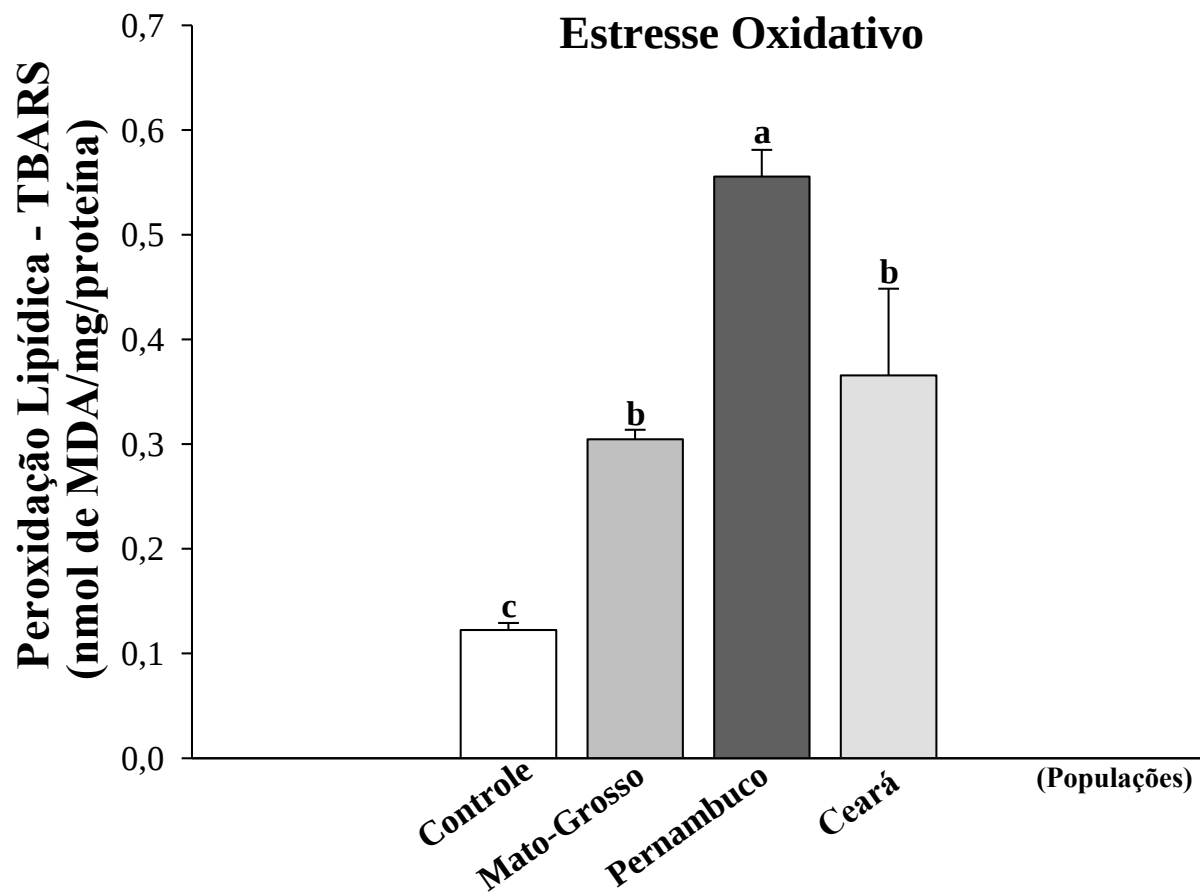


Figura 2. Estresse oxidativo a partir da mensuração do ácido tiobarbitúrico (TBARS) como indicativo de peroxidação lipídica (nmol de MDA/mg/proteína) em adultos de *Anthonomus grandis*. Controle e tratamento com lambda-cialotrina após 24 horas das populações Mato Grosso/MT, Pernambuco/PE e Ceará/CE. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

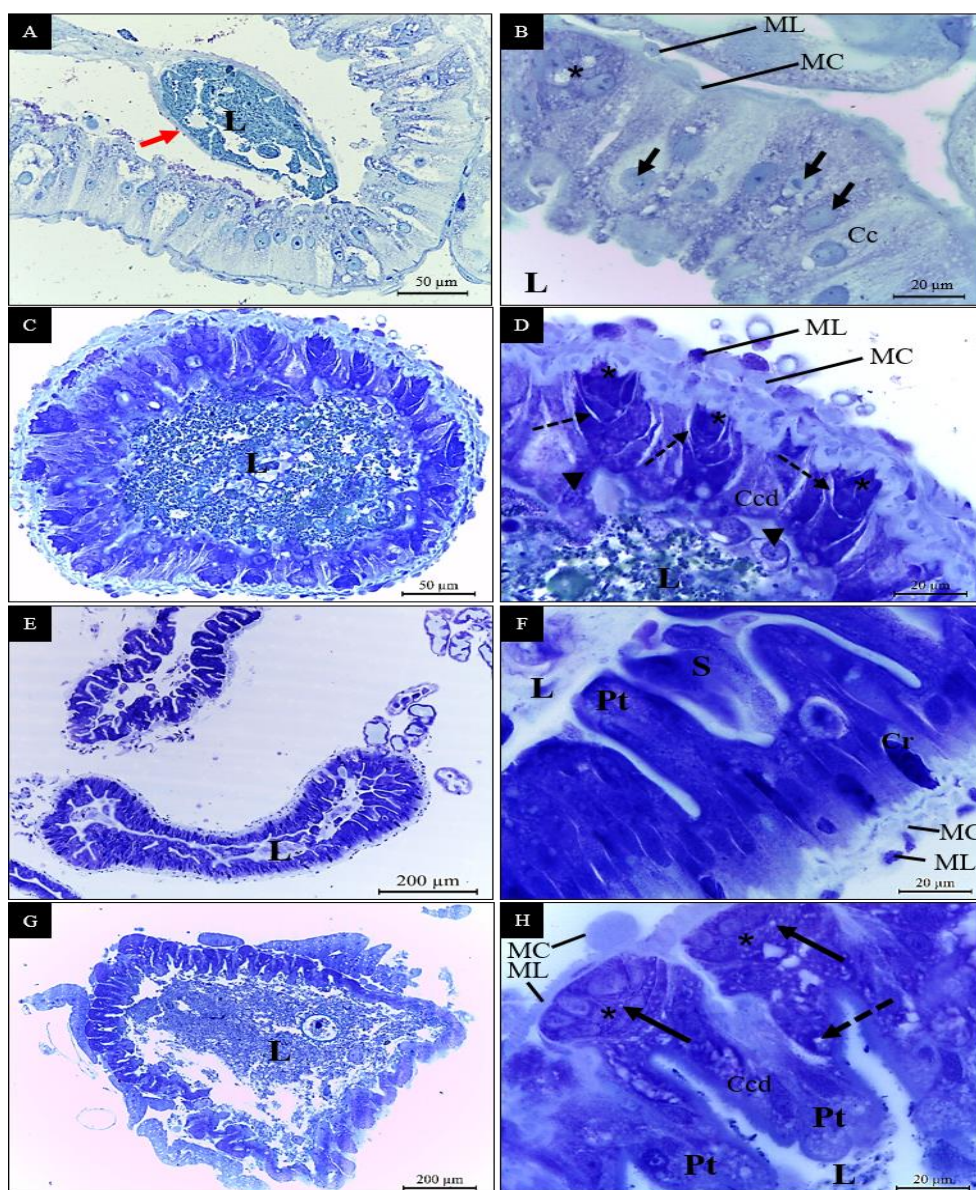


Figura 3. Seção transversal do intestino médio de adultos *Anthonomus grandis*. A e B - controle. C – H tratamento com lambda-cialotrina após 24 horas. Coloração Azul de Toluidina. A – visão geral do intestino médio com membrana peritrófica (seta vermelha) delimitando o alimento ingerido no lúmen (L). B – intestino médio destacado com células colunares (Cc) e núcleos (seta) na região mediana; ninhos de células regenerativas (asterisco); Músculos circulares (MC) e Músculos longitudinais (ML). C – visão geral do intestino da população Mato Grosso/MT com muito material na região do lúmen. D – Observar descamação do epitélio com alterações nas células colunares

(Ccd), núcleos ejetados no lúmen (ponta de seta), formação de ninhos de células regenerativas (asterisco) com espaçamentos (seta pontilhada). E – visão geral do intestino da população Pernambuco/PE. F – Protusões (Pt) das células colunares, secreção (S) e célula regenerativa (Cr). G – visão geral do intestino da população Ceará/CE. H – Identificar descamação, desorganização (Ccd) e protusões (Pt) das células colunares, bem como vacúolos citoplasmáticos (seta tracejada) e presença de vacúolos nos ninhos de células regenerativas (seta longa).

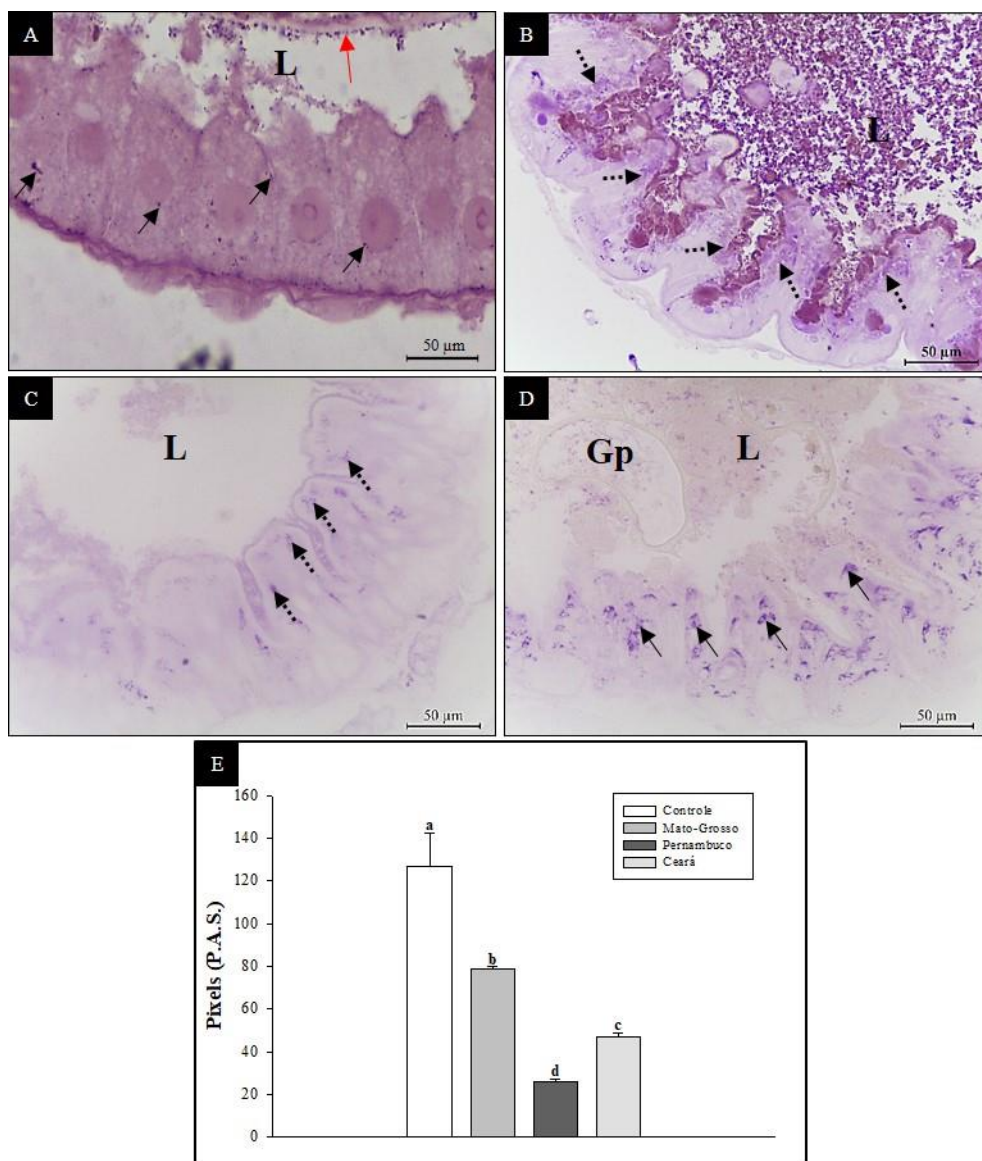


Figura 4. Histoquímica do intestino médio de adultos de *Anthonomus grandis* para carboidratos neutros. A – controle. B, C e D, populações de Mato Grosso/MT, Pernambuco/PE e Ceará/CE, respectivamente, após tratamento com lambda-cialotrina por 24 horas. Coloração ácido periódico-Schiff (P.A.S.). A – Presença e distribuição uniforme dos grânulos de glicogênio no citoplasma das células (setas) e membrana peritrófica (seta vermelha). B e C – Mudanças no padrão de distribuição dos grânulos de glicogênio para o ápice das células (setas pontilhadas) e ausência da membrana peritrófica. D – Distribuição uniforme dos grânulos de glicogênio e ausência da membrana

peritrófica. E – Número médio de pixels para carboidratos neutros. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade. L - lúmen; Setas - grânulos de glicogênio; Gp - grão de pólen.

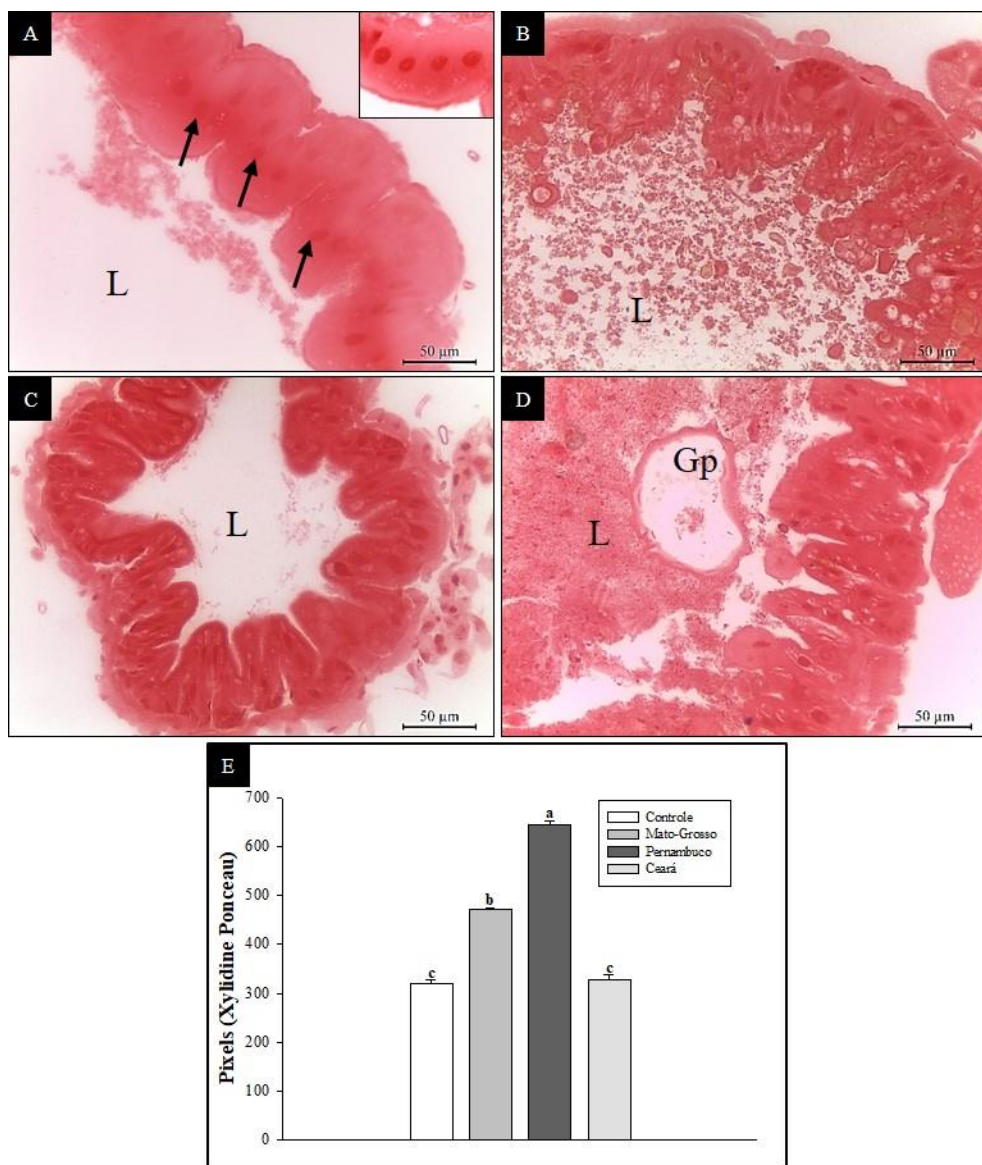


Figura 5. Histoquímica do intestino médio de adultos de *Anthonomus grandis* para proteínas totais. A – controle. B, C e D, populações de Mato Grosso/MT, Pernambuco/PE e Ceará/CE, respectivamente, após tratamento com lambda-cialotrina por 24 horas. Coloração Xylidine Ponceau. E – Número médio de pixels para proteínas totais. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. L - lúmen; Setas - núcleos; Gp - grão de pólen.

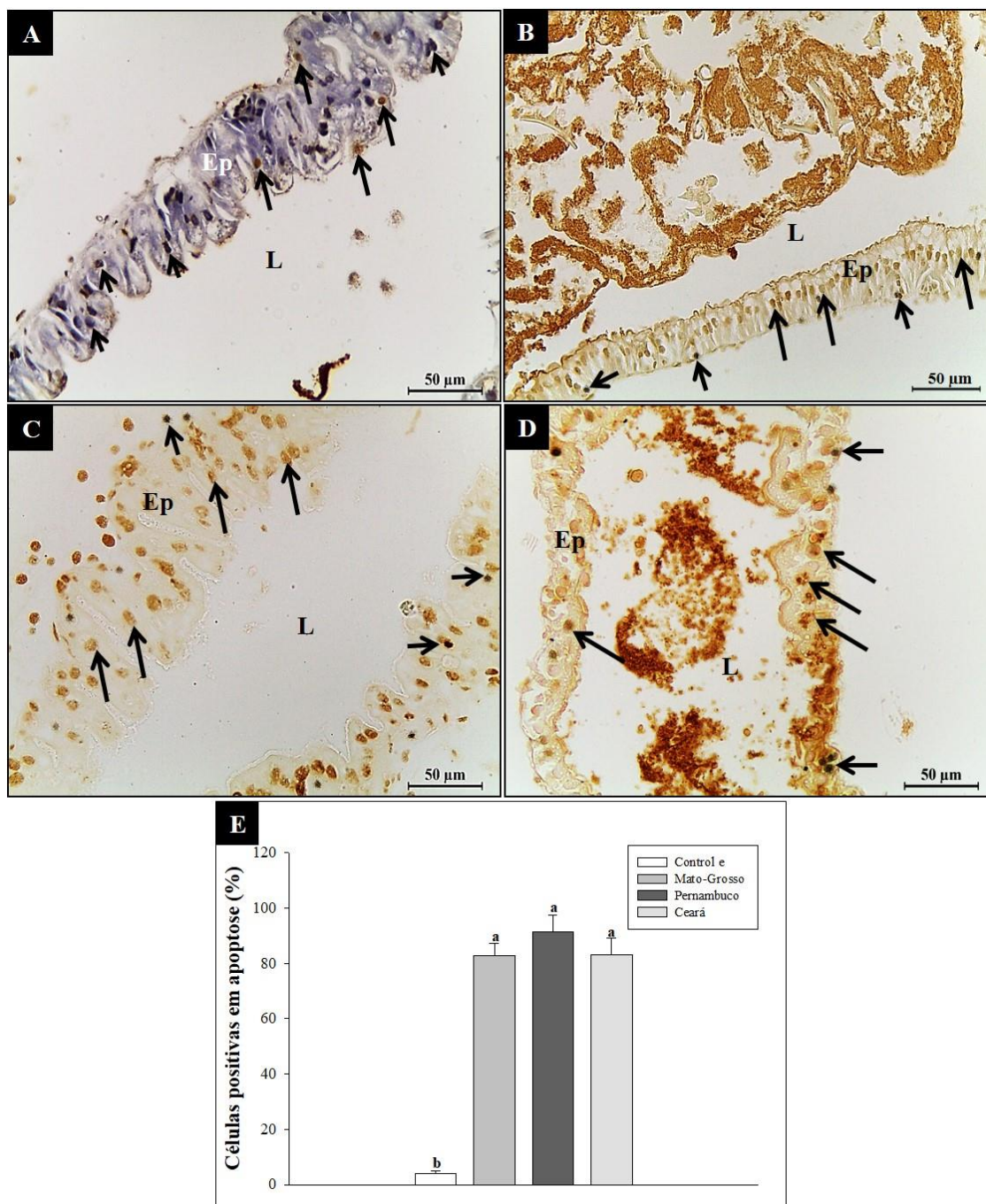


Figura 6. Ensaio TUNEL para detecção de apoptose do intestino médio de populações de *Anthonomus grandis*, A- Controle. B, C e D populações de Mato Grosso/MT, Pernambuco/PE e Ceará/CE, respectivamente, após tratamento com lambda-cialotrina por 24 horas. E - Índice apoptótico (média $\pm$ EP). Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste

de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Núcleo apoptótico (seta longa), núcleo normal (seta curta), epitélio (Ep), Lúmen (L).

.

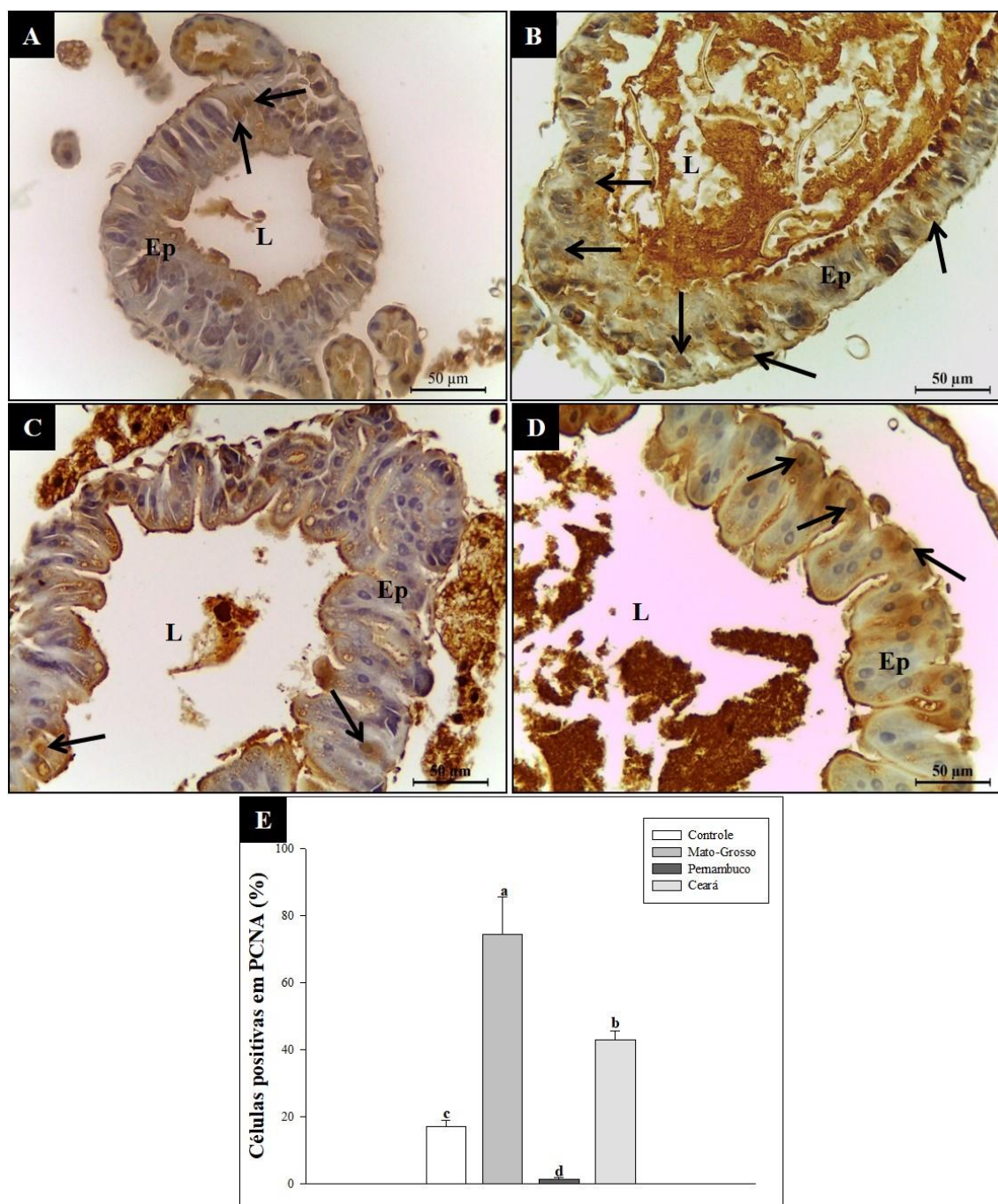


Figura 7. Expressão do marcador de proliferação celular PCNA no intestino médio de populações de *Anthonomus grandis*, A- Controle. B, C e D populações de Mato Grosso/MT, Pernambuco/PE e Ceará/CE, respectivamente, após tratamento com lambda-cialotrina por 24 horas. E – Proliferação (média $\pm$ EP). Células positivas (setas), epitélio (Ep), Lúmen (L). Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

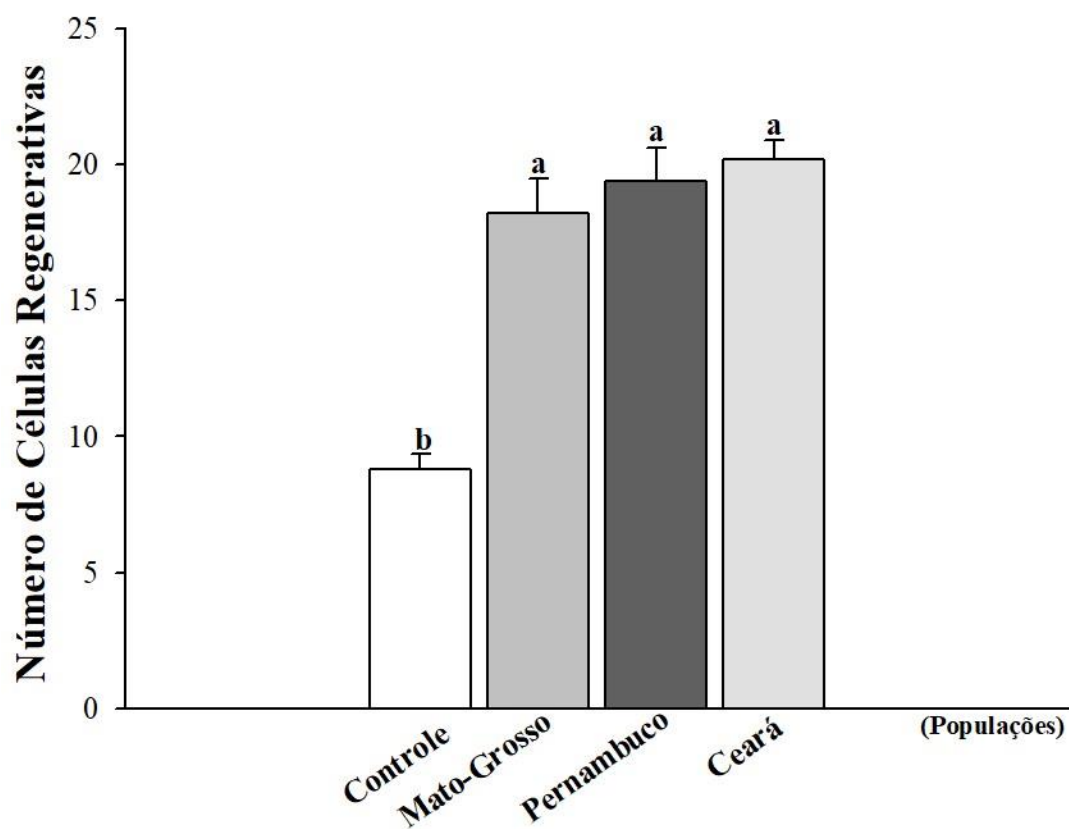


Figura 8. Número médio de células regenerativas no intestino médio de adultos de *Anthonomus grandis*, controle e tratamento com lambda-cialotrina após 24 horas das populações de Mato Grosso/MT, Pernambuco/PE e Ceará/CE. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

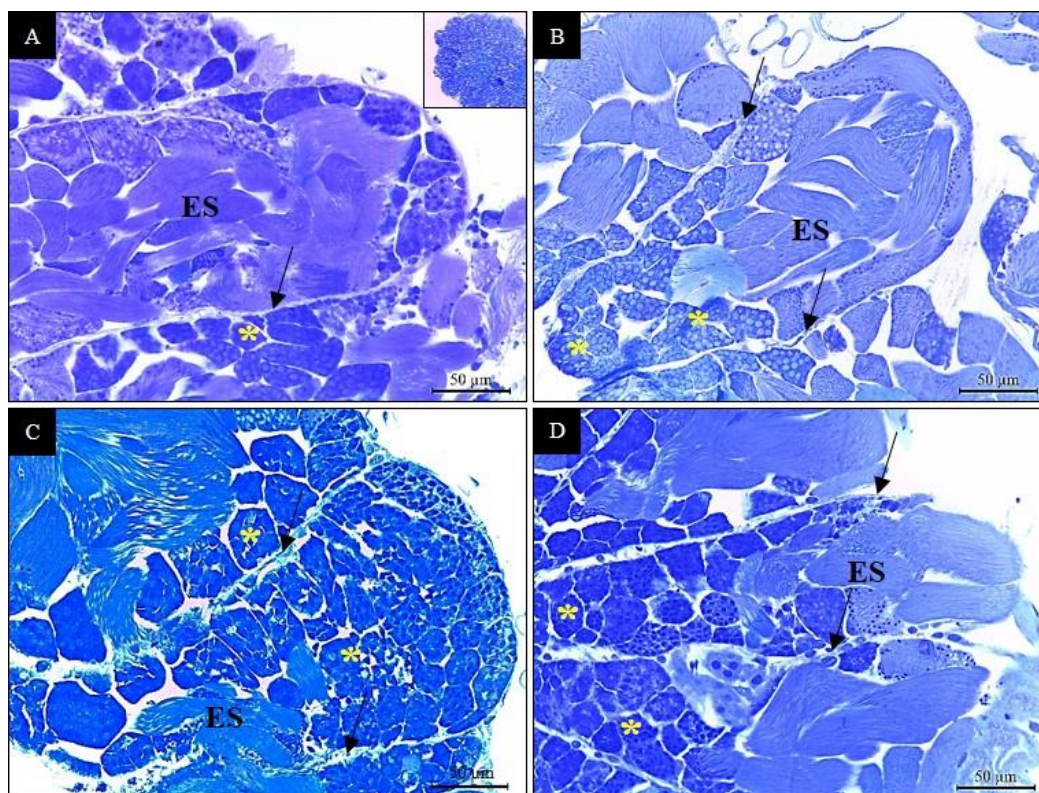


Figura 9. Testículos de adultos de *Anthonomus grandis*. A - controle. B, C e D, populações de Mato Grosso, Pernambuco e Ceará, respectivamente, após tratamento com Lambda-cialotrina por 24 horas. Coloração Azul de Toluidina. Es, espermatozoides; Seta, cobertura peritoneal; Asterisco, cistos.

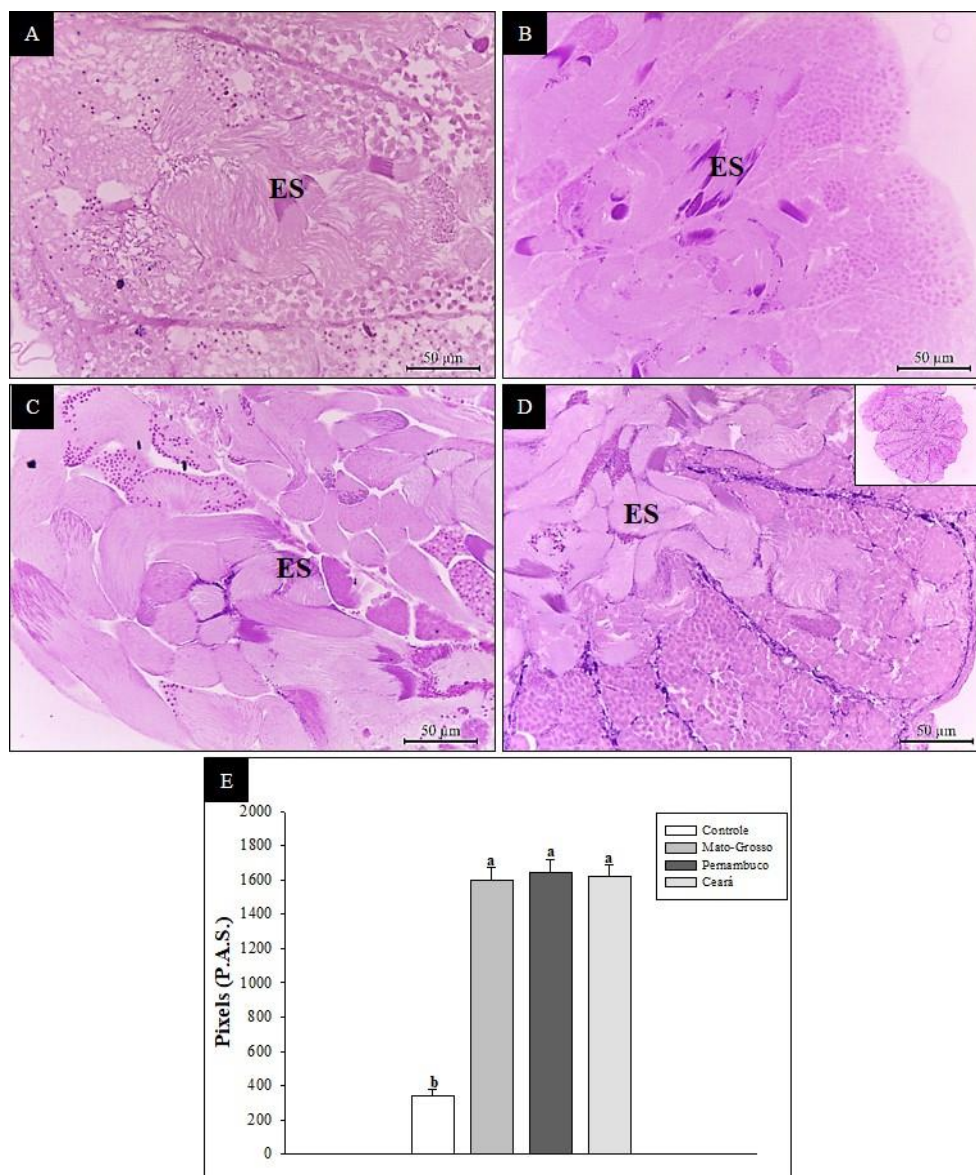


Figura 10. Histoquímica do testículo de adultos de *Anthonomus grandis* para quantificação de carboidratos neutros. A – controle. B, C e D, populações de Mato Grosso, Pernambuco e Ceará, respectivamente, após tratamento com Lambda-cialotrina por 24 horas. Coloração Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.). E - quantificação em pixels de carboidratos neutros. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

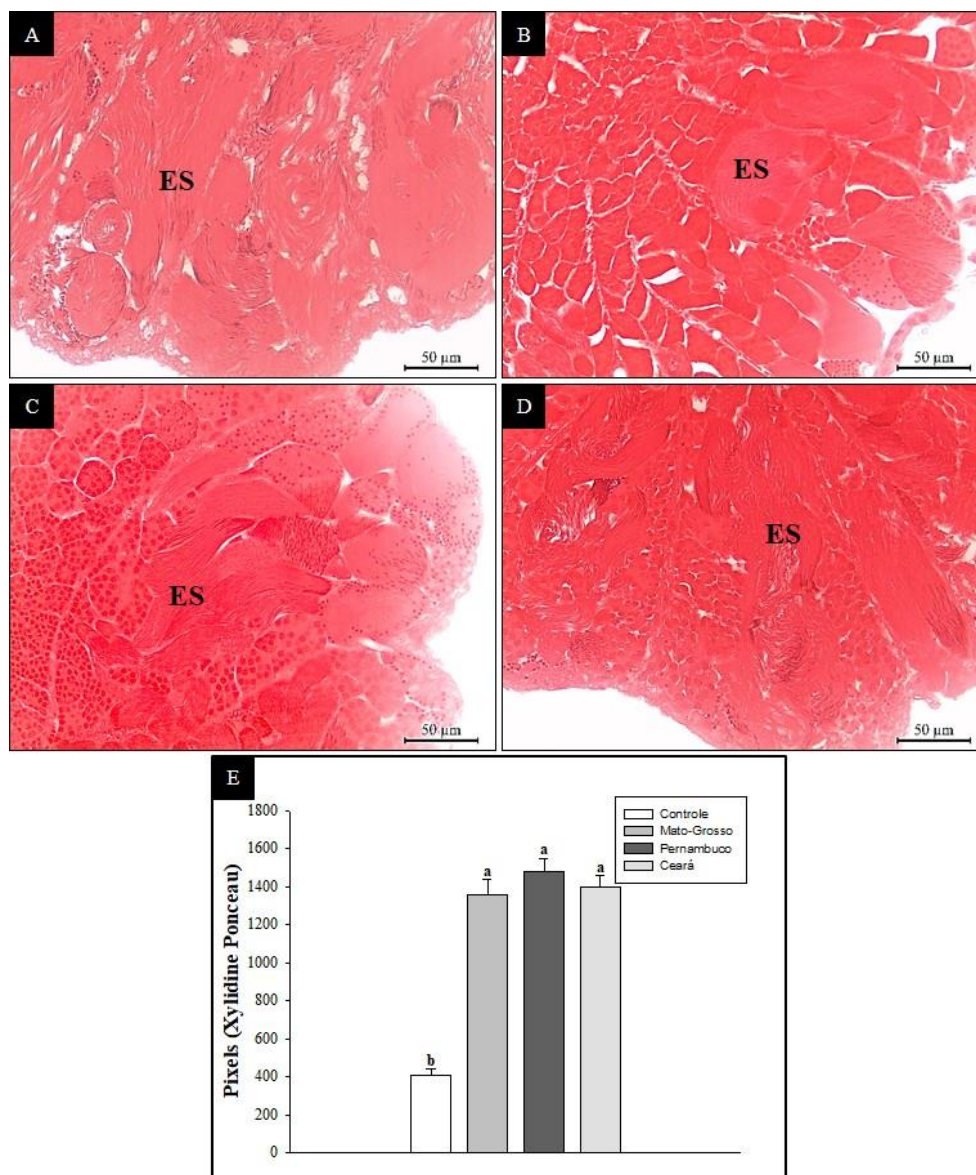


Figura 11. Histoquímica do testículo de adultos de *Anthonomus grandis* para quantificação de proteínas totais. A – controle. B, C e D, populações de Mato Grosso/MT, Pernambuco/PE e Ceará/CE, respectivamente, após tratamento com lambda-cialotrina por 24 horas. Coloração Xylidine Ponceau. E – Número médio de pixels para proteínas totais. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

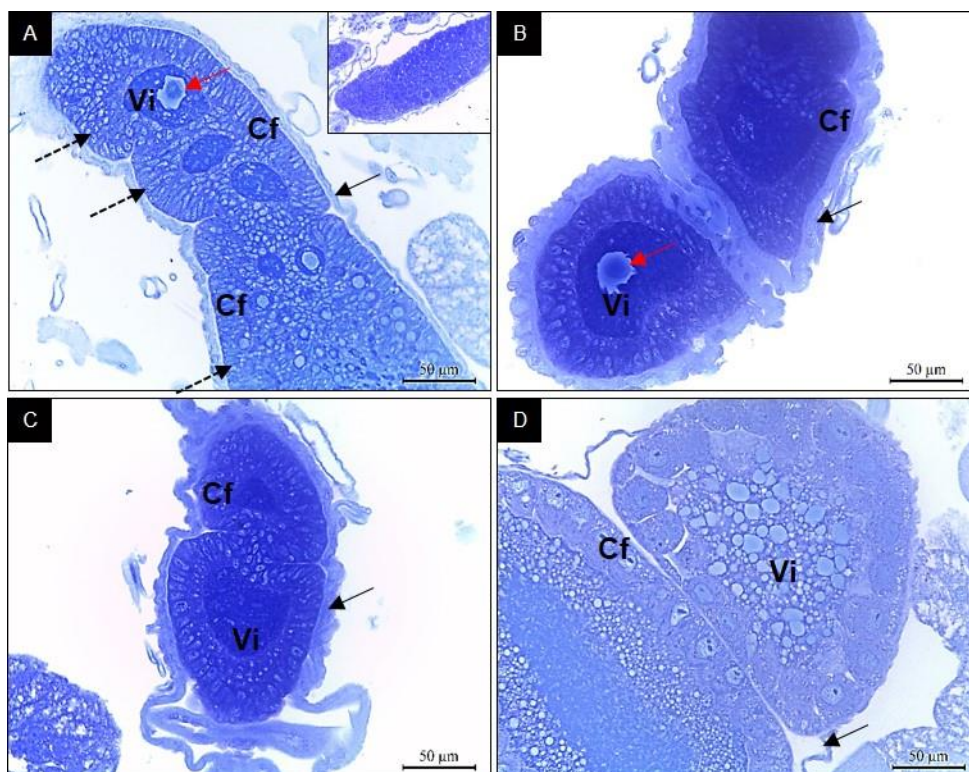


Figura 12. Ovariolos de adultos de *Anthonomus grandis*. A - controle. B, C e D, populações de Mato Grosso/MT, Pernambuco/PE e Ceará/CE, respectivamente, após tratamento com lambda-cialotrina por 24 horas. Coloração Azul de Toluidina. Vi, vitelo; Cf, células foliculares; Seta, bainha de tecido conjuntivo; Seta pontilhada, oócitos em formação; Seta vermelha, vesícula germinativa.

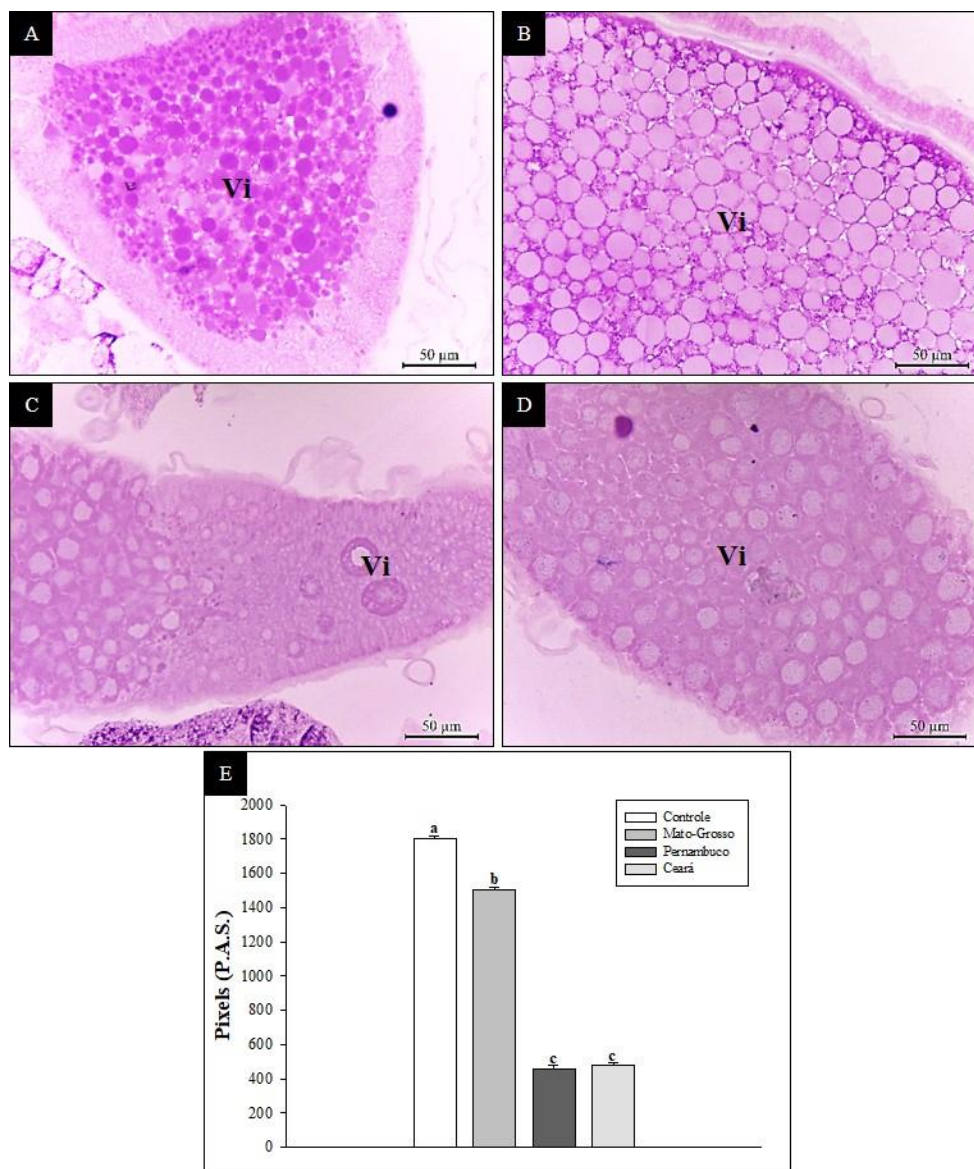


Figura 13. Histoquímica do ovaríolo de adultos de *Anthonomus grandis* para quantificação de carboidratos neutros. A – controle. B, C e D, populações de Mato Grosso/MT, Pernambuco/PE e Ceará/CE, respectivamente, após tratamento com lambda-cialotrina por 24 horas. Coloração ácido periódico-Schiff (P.A.S.). E – Número de médio de pixels para carboidratos neutros. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade. Vi, vitelo.

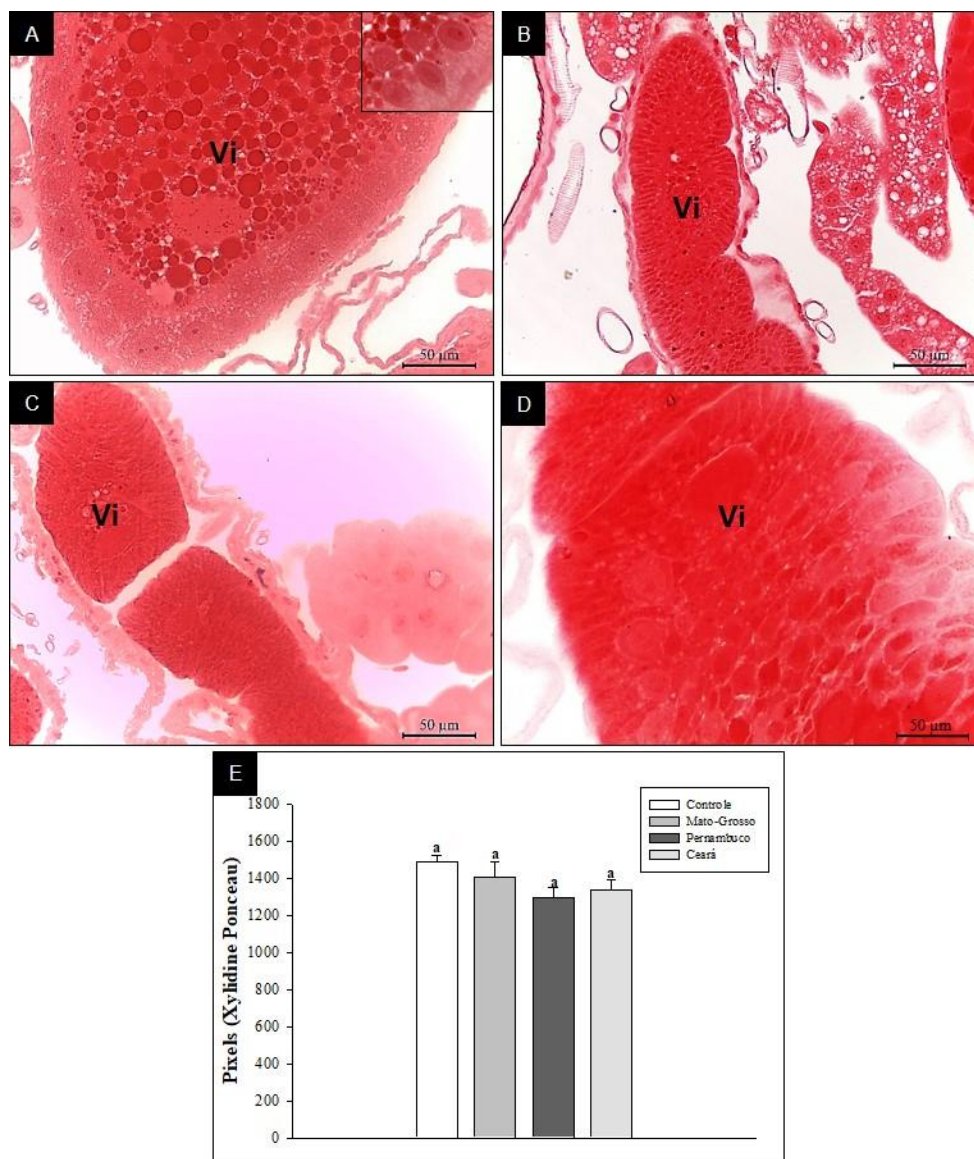


Figura 14. Histoquímica do ovário de adultos de *Anthonomus grandis* para quantificação de proteínas totais. A – controle com destaque das células foliculares. B, C e D, populações de Mato Grosso/MT, Pernambuco/PE e Ceará/CE, respectivamente, após tratamento com lambda-cialotrina por 24 horas. Coloração Xylidine Ponceau. E – Número médio de pixels para proteínas totais. Barras seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Vi, vitelo.

CAPÍTULO 3

ALTERAÇÕES HISTOFISIOLOGICAS E NUTRICIONAIS EM POPULAÇÕES DE *Anthonomus grandis* SUBMETIDAS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Juniperus virginiana* E *Melaleuca alternifolia* EM COMPARAÇÃO A BETA-CIFLUTRINA ¹

Hilton N. Costa¹, Glaucilane S. Cruz¹, Carolina A. Guedes¹, Maria C. N. Ferreira², Valeska A. Á.
Braga², Kamilla A. Dutra³, Denner M. Potin¹, Fabio A. Albuquerque⁴, Jorge B. Torres¹, Álvaro A.
C. Teixeira², Valéria Wanderley Teixeira²

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

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

³Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

⁴Departamento de Pesquisa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA),
Barbalha, Brasil.

¹Costa, H.N., G.S. Cruz, C.A. Guedes, M.C.N. Ferreira, V.A.Á. Braga, K.A. Dutra, D.M. Potin, F.A. Albuquerque, J.B. Torres Á.A.C. Teixeira & Valéria Wanderley Teixeira. Alterações histofisiológicas e nutricionais em populações de *Anthonomus grandis* submetidas aos óleos

essenciais de *Juniperus virginiana* e *Melaleuca alternifolia* em comparação a beta-ciflutrina. Acta Histochemica.

RESUMO - Óleos essenciais de plantas vêm ganhando destaque nas pesquisas com controle de pragas devido a sua propriedade inseticida e baixa contaminação ambiental. Os óleos de *Juniperus virginiana* e *Melaleuca alternifolia* são exemplos já comprovados de produtos com potencial inseticida. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi de investigar se os óleos de *J. virginiana* e *M. alternifolia* promovem alterações morfológicas e histoquímicas no intestino médio e nutricionais, e se isso reflete na gametogênese em comparação ao piretróide beta-ciflutrina, em adultos de *Anthonomus grandis* oriundos dos estados de Pernambuco e Ceará. A DL₅₀ e DL₇₀ dos óleos foi estabelecida em testes preliminares e testadas topicamente. Para beta-ciflutrina foi usada a dose de rótulo para o bicudo e testada via ingestão de botões florais. Todas as avaliações foram feitas após 24 h. Em todos os tratamentos foi observado nas duas populações de insetos alterações morfológicas no intestino (por exemplo, desorganização e vacuolização do epitélio, protusões e aumento no número de células regenerativas) e nas gônadas (vacuolização da cobertura peritoneal e das células foliculares). Os níveis de proteínas, lipídeos, glicogênio e açúcar sofreram diminuições, no entanto, apenas na população Ceará o açúcar não reduziu. A quantificação dos pixels para carboidratos e proteínas tanto no intestino quanto nas gônadas mostrou redução. Dessa forma, assim como beta-ciflutrina, os óleos essenciais de *J. virginiana* e *M. alternifolia* são capazes de causar alterações morfológicas e histoquímicas no intestino médio com reflexos na nutrição e gametogênese de *A. grandis* de Pernambuco e Ceará.

PALAVRAS-CHAVE: Bicudo-do-algodoeiro, óleos essenciais, bioquímica, Manejo Integrado de Pragas, reprodução

ABSTRACT - Essential oils from plants have been gaining prominence in research on pest control due to their insecticidal property and low environmental contamination. The oils of *Juniperus virginiana* and *Melaleuca alternifolia* are proven examples of products with potential insecticide. Thus, the objective of this work was to investigate whether the oils of *J. virginiana* and *M. alternifolia* promote morphological and histochemical changes in the midgut and nutritional, and if this reflects on gametogenesis in comparison to the pyrethroid beta-cyfluthrin, in adults of *Anthonomus grandis* from the states of Pernambuco and Ceará. The LD₅₀ and LD₇₀ of the oils were established in preliminary tests and tested topically. For beta-cyfluthrin, the label dose for the boll weevil was used and tested via ingestion of flower buds. All assessments were made after 24 h. In all treatments, morphological changes were observed in the two insect populations in the intestine (for example, disorganization and vacuolization of the epithelium, protusions and an increase in the number of regenerative cells) and in the gonads (vacuolization of the peritoneal cover and follicular cells). The levels of proteins, lipids, glycogen and sugar decreased, however, only in the Ceará population, sugar did not decrease. The quantification of pixels for carbohydrates and proteins in both the intestine and gonads showed a reduction. Thus, as well as beta-cyfluthrin, the essential oils of *J. virginiana* and *M. alternifolia* are capable of causing morphological and histochemical changes in the midgut with reflexes on the nutrition and gametogenesis of *A. grandis* from Pernambuco and Ceará.

KEY WORDS: Cotton boll weevil, essentials oils, biochemistry, Integrated Pest Management, reproduction.

Introdução

O intestino médio dos insetos é uma das principais vias de contato na avaliação dos efeitos de agentes estressores, tornando-se um órgão-alvo importante no estudo de controle de pragas (Catae *et al.* 2014). A membrana peritrófica presente nela é uma importante barreira física, porém, se ultrapassada, o dano às células do epitélio será iminente (Costa *et al.* 2017). Após a digestão, a absorção pelas células do intestino médio permite que os nutrientes caiam na hemolinfa e dela sejam transportados para todos os tecidos e órgãos (Gullan & Cranston 2012).

As gônadas, por exemplo, são órgãos que necessitam de nutrientes para o processo de gametogênese, na qual em insetos é diretamente proporcional a qualidade e quantidade dessas moléculas. No entanto, havendo dano celular intestinal, os níveis nutricionais do organismo como um todo sofrerão alterações, afetando esse processo de formação de gametas, que pode acarretar em efeitos negativos na história de vida desses organismos (Arrese *et al.* 2010, Rosas-Mejía *et al.* 2015, Bretas 2016, Cruz *et al.* 2017, Costa *et al.* 2017, Silva *et al.* 2019).

No contexto nutricional, carboidratos, lipídeos e proteínas participam de processos fundamentais a sobrevivência e estabelecimento de um inseto dentro da cultura. Portanto, investigar os inseticidas que têm potencial de causar tais efeitos na fisiologia de insetos-praga é imprescindível. De maneira alternativa aos produtos formulados, o uso de biopesticidas, como os óleos essenciais de plantas, vem ganhando destaque nas pesquisas devido a sua propriedade toxicológica e baixa contaminação ambiental e toxicidade aos mamíferos (Madbouly *et al.* 2015, Preedy 2015).

Entre os diversos óleos já estudados, o de *Melaleuca alternifolia* Cheel e o de *Juniperus virginiana* L. vem se mostrando promissores por demonstrarem atividade inseticida para diversos insetos praga (Amer & Mehlhorn 2006, Tol *et al.* 2007, Eller *et al.* 2010, Benelli *et al.* 2013, Eller *et al.* 2014, Liao *et al.* 2016, Liao *et al.* 2017, Tahghighi *et al.* 2019). Além da mortalidade, os óleos essenciais, assim como os inseticidas, podem atuar na fisiologia desses organismos, promovendo

efeitos adversos a níveis celulares, teciduais e nutricionais (Alves *et al.* 2013, Cruz *et al.* 2017, Dutra *et al.* 2019, Guedes *et al.* 2020).

Insetos que se desenvolvem endofiticamente são de difícil controle devido a pouca exposição aos inseticidas comumente utilizados, a exemplo do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman), que mesmo após tratamento com piretroides se mantém em níveis populacionais altos por se desenvolverem em botões e/ou maçãs (Oliveira-Marra *et al.* 2019, Rolim *et al.* 2019). Assim, se utilizar de produtos, a exemplo de óleos essenciais, cuja ação não se restringe apenas a mortalidade, mas a efeitos tardios na biologia e reprodução é de fundamental importância e pode garantir, junto a outros métodos, o sucesso da cultura.

Nas décadas de 1960/70 o nordeste brasileiro foi uma das principais regiões produtoras de algodão devido ao clima e condições favoráveis, chegando a representar 40% da produção nacional, contudo, essa produtividade entrou em declínio após o surgimento do *A. grandis* (Beltrão 2003). Hoje observa-se um incremento nessa produção que atualmente se concentra em pequena escala no sertão dos estados de Pernambuco, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte (Beltrão 2003, Coêlho 2018), com exceção da Bahia que é o segundo maior produtor nacional (Abrapa 2020). Com isso, desenvolver métodos de controle mais efetivos e seguros é prioritário para a continuidade do sucesso da cotonicultura.

Sendo assim, o objetivo desta pesquisa é investigar se os óleos essenciais de *M. alterfolia* e *J. virginiana* promovem alterações morfológicas e histoquímicas no intestino médio, interferindo nos níveis de moléculas nutricionais e se isso vai refletir nos testículos e ovários em comparação ao piretróide beta-ciflutrina, em adultos de *A. grandis*, oriundos de campos de algodão dos estados de Pernambuco e Ceará.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia de Insetos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e no Centro de Apoio à Pesquisa (Cenapesq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil).

Criação e Obtenção das Populações de *Anthonomus grandis*. Botões florais e cápsulas de algodão, infestados com larvas e pupas de *A. grandis* foram coletados em campos comerciais e experimentais em duas cidades, Recife (Pernambuco/PE, nordeste do Brasil) e Barbalha, (Ceará/CE, nordeste do Brasil), e enviados ao Laboratório de Fisiologia de Insetos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil). Os grupos de insetos de cada estado foram então alojados separadamente em gaiolas plásticas de emergência ($42,5 \times 30,7 \times 30,5$ cm) armazenadas em laboratório mantido a 25 ± 1 °C, com umidade relativa de $65 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas.

Obtenção dos Óleos Essenciais e Inseticida Sintético. Os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Juniperus virginiana* foram obtidos da Empresa Ferquima Ind. e Com. Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). *M. alternifolia* foi extraída a partir de folhas e *J. virginiana* da madeira. O método de extração utilizado foi de arraste a vapor para todos os óleos. 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 <1461 <http://www.ferquima.com.br>>. O inseticida piretroide beta-ciflutrina (Bulldock 125 SC) foi obtido de casas comerciais do centro do Recife.

Análises Cromatográficas em Fase Gasosa. Os óleos essenciais de *M. alternifolia* e *J. virginiana* foram analisados qualitativamente por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas CG/EM em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series CG/EM 1 (Agilent Technologies, Palo

Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0.25 mm d.i., 0,25 μ m espessura da película). 1 μ L da solução (2000 μ g/mL) de cada óleo essencial preparada em hexano foi injetada em split 1:50, assim como uma solução hexânica da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C8-C30 (Sigma-Aldrich® 1484). A temperatura do cromatógrafo gasoso foi ajustada em 60 °C por 3 min, sendo então elevada em 2,5 °C min⁻¹ até alcançar 240 °C e mantida nesta temperatura por 10 min. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface da espectrometria de massas foi definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5 scan-s de m/z 20-350 (Santos *et al.* 2014, Silva *et al.* 2016). Os constituintes dos óleos essenciais foram quantificados através da Cromatografia Gasosa (CG) em um sistema Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Trace CG Ultra gás equipado com um detector de ionização por chama (DIC), com uma coluna HB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de espessura da película). A temperatura do forno foi mantida a 40 °C durante 2 min e depois aumentada a 4 °C min⁻¹ para 230 °C. O injetor e o detector foram mantidos a 250 °C. Para realizar a quantificação, 1 μ L da solução (2000 μ g/mL) de cada óleo essencial preparada em hexano foi injetada em splitless. A composição de cada componente foi expressa na forma de percentagens da área total do pico conforme registrado por GC-FID.

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

espectros de massa com aqueles disponíveis na biblioteca do GC/EM: MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition e com os descritos por Adams (2009).

Bioensaio com o Inseticida Sintético e de Toxicidade dos Óleos Essenciais. Para a utilização do inseticida sintético beta-ciflutrina foi testada uma dose específica (12.500 µL do p.c. + 100 mL de água destilada) baseada na dose de rótulo recomendada para o *A. grandis* (80-100mL do produto comercial em 100-300L de água/ha). A exposição ao inseticida seguiu os métodos usados por Costa *et al.* (2017) com algumas adaptações, onde botões florais de algodão foram imersos na solução inseticida por 30 segundos e deixados em temperatura ambiente para secagem por 1 hora. Em seguida, foram oferecidos aos insetos de maneira individualizada em recipientes de 80 mL forrados com papel filtro, perfazendo um total de 30 insetos para cada população. Para garantir a ingestão, os insetos foram deixados 24 horas sem alimentação antes da instalação dos experimentos. As avaliações ocorreram com 24 horas após a instalação do experimento. O grupo controle de cada população constou apenas de água destilada.

Para uso dos óleos essenciais, testes preliminares, através do contato tópico, foram realizados visando definir as doses de *M. alternifolia* e *J. virginiana* capazes de promover mortalidades em torno de 5 e 95% nas populações de *A. grandis*. Para cada dose foram avaliados 30 adultos, sendo em média 5 doses, totalizando 150 adultos/óleo. Foi aplicado 1,0 µL da solução do óleo essencial mais acetona (solvente), na região protorácica do inseto, utilizando uma seringa Hamilton TM (50 µL). O teste controle foi realizado apenas com acetona. A mortalidade foi obtida 48h após a instalação do experimento, os resultados submetidos a análise de probit pelo programa SAS (SAS 2001) e as razões de Toxicidade (RT) obtidas através do quociente entre a dose letal do óleo de maior toxicidade e dose letal dos demais óleos, individualmente. Após a obtenção da curva, foram selecionadas as doses letais (DL₅₀ e DL₇₀). Para a realização dos experimentos subsequentes os

insetos foram separados em grupo de 5 e colocados em placa de Petri (8 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura), submetidos às DL₅₀ e DL₇₀, alimentados com botões florais e avaliados com 24 horas após a instalação do experimento.

Coleta dos Órgãos e Inclusão em Histoiresina. Dez tubos digestivos, dez testículos e dez ovariolos, após 24h de exposição aos produtos testados, foram coletados. Os insetos foram imobilizados em baixa temperatura (4° C), dissecados em microscópio estereoscópico, fixados em formol a 10% por 24h e armazenados em álcool 70%. Os intestinos médio dos insetos foram seccionados e, juntamente com os testículos e ovariolos, desidratados em banhos crescentes de etanol (70–100%), por 10 minutos cada. As amostras foram impregnadas em álcool + histoiresina (1:1) por 24h e finalmente incluídas em histoiresina pura (Leica®).

Confecção e Coloração das Lâminas Histológicas e Histoquímicas. Cortes de espessura de 5 µm foram obtidos de um micrótomo Leica® RM 2035 e submetidos a técnicas de coloração com azul de toluidina para análise morfológica. Para a análise histoquímica, utilizou-se o ácido periódico-Schiff (P.A.S.) (detecção de carboidratos neutros) e Xylidine Ponceau (detecção de proteína total). Todas as lâminas foram examinadas com fotomicroscópio Leica®. As imagens foram capturadas e digitalizadas pelo software Leica LAS Image (Solomon 2009, Junqueira & Junqueira 1983).

Quantificação de Pixels. Para a quantificação histoquímica de carboidratos neutros e proteínas totais a partir dos pixels, as imagens capturadas foram submetidas ao programa editor de imagens GIMP® 2.8 (GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX) para conversão das imagens digitais em tons de cinza (preto e branco). Esta segmentação de cores permite a medição do número de pixels no tecido selecionado (Temitope 2013). Para cada tratamento, foram utilizadas três lâminas de insetos diferentes, onde foram avaliadas quatro seções, totalizando 12 seções.

Ensaio Bioquímico. Para extração e quantificação das proteínas solúveis totais, lipídeo, açúcar total e glicogênio, adultos com 24h após a aplicação dos produtos (óleos essenciais e inseticida sintético) foram utilizados e cada amostra constou de dois insetos adultos para cada tratamento, sendo obtidas 10 repetições, totalizando 20 insetos/tratamento. O preparo das amostras (controle e tratamento) se deu com os adultos imobilizados a uma temperatura de 4 °C e macerados em 500 µL do tampão fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,1 M). O macerado foi retirado com um pipetador automático (inseto adulto + tampão) e armazenado em um microtúbulo devidamente etiquetado. Todo procedimento foi efetuado em baixa temperatura para evitar a oxidação das amostras. Após esta etapa ocorreu o preparo das amostras e para isso cada grupo de amostras foi centrifugada por 3 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação foi separado 100 µL de cada amostra para análise das proteínas solúveis totais e 200 µL para as análises de lipídeo, açúcar total e glicogênio.

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

Extração e Quantificação de Lipídio, Açúcar Total e Glicogênio. O conteúdo de lipídio, açúcar total e glicogênio foram avaliados utilizando o método de Van Handel (1985a, b), onde 200 µL do macerado homogeneizado foi acrescido 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 transferido para um microtúbulo onde foi acrescentado 600 µL de água destilada e centrifugado a 3000 rpm durante 3 min. O precipitado foi utilizado para a análise de lipídeo 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, foi feita a leitura 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.

Análise Estatística. Os dados que assumiram normalidade e homogeneidade foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, enquanto os assumiram foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade (SAS 2002).

Resultados

Análises Cromatográficas em Fase Gasosa e identificação química dos óleos essenciais.

A análise da composição química dos óleos essenciais de *M. alternifolia* e *J. virginiana* permitiu identificar a presença de 68 compostos, quantificando um total de 98,06% e 98,69% dos óleos, respectivamente (Tabela 1). O óleo de *J. virginiana* é exclusivamente rico em sesquiterpenos, desses 69,76% não oxigenados e 28,3% oxigenados. Tem como componentes majoritários o (Z)-thujopsene (31,94%), cedrol (25,61%) e α -cedrene (18,49%). Em contrapartida o óleo de *M. alternifolia* é predominantemente rico em monoterpenos, desses 53,72% são oxigenados e 38,98% não oxigenados, enquanto que a classe dos sesquiterpenos fica restrita a 5,99% do óleo essencial. Sendo seus componentes majoritários o terpinen-4-ol (47,24%), γ -terpinene (18,60%) e α -terpinene (8,77%) exclusivamente monoterpênicos.

Bioensaio com o Inseticida Sintético e de Toxicidade dos Óleos Essenciais.

A concentração utilizada para beta-ciflutrina foi estabelecida com base na dose de rotulagem. Para o óleo de *J. virginiana* foram obtidos na população PE as seguintes doses DL₅₀ 0,280 (0,139-0,543) mg/g e a DL₇₀ 0,597 (0,343-2,322) ($\chi^2 = 10,79$). Para o óleo de *M. alternifolia* foram obtidos as DL₅₀ 0,169 (0,096-0,274) mg/g e a DL₇₀ 0,303 (0,196-0,697) ($\chi^2 = 13,29$) (Tabela 2). Na DL₅₀ o óleo de *M. alternifolia* apresentou uma razão de toxicidade 1,65 vezes e na DL₇₀ 1,96 vezes maior do que o de *J. virginiana*.

Para a população CE, as doses de *J. virginiana* foram DL₅₀ 0,311 (0,228-0,419) mg/g e a DL₇₀ 0,488 (0,368-0,783) ($\chi^2 = 21,18$). Para o óleo de *M. alternifolia* foram obtidas as doses DL₅₀ 0,208 (0,128-0,317) mg/g a DL₇₀ 0,406 (0,272-0,855) ($\chi^2 = 16,39$) (Tabela 3). A razão de toxicidade na DL₅₀ de *M. alternifolia* foi de 1,49 vezes e na DL₇₀ 1,20 vezes maior do que o de *J. virginiana*.

Histologia do Intestino Médio, Testículo e Ovariolo.

O intestino médio dos grupos controles (populações de PE e CE) apresentaram-se revestidos externamente por camadas de tecido muscular circular e longitudinal e internamente por um epitélio de células colunares com núcleos esféricos centrais e uma borda em escova em seu ápice. Além disso, identificou-se células regenerativas que ocorrem individualmente ou agrupadas em ninhos que ficam em contato com a lâmina basal. Na região do lúmen, observou-se a presença da membrana peritrófica separando o bolo alimentar do epitélio (Fig. 1A e B).

O intestino médio dos bicudos das populações PE e CE tratados com o piretroide beta-ciflutrina e os óleos essenciais nas DL₅₀ de *J. virginiana* e *M. alternifolia* apresentaram alterações morfológicas significativas. Em todos os tratamentos o epitélio das duas populações mostrou-se desorganizado, com protusões das células colunares, presença de numerosos vacúolos e de células regenerativas formando ninhos, além da ausência da matriz peritrófica (Fig. 1C-L). A dose de beta-ciflutrina e a DL₇₀ de *M. alternifolia* promoveram espessamento da camada muscular nas duas

populações (Fig. 1C e D, 1K e L), enquanto que na DL₇₀ de *J. virginiana* foi observada camada muscular mais delgada com desprendimento das células colunares em CE (Fig. 1H). Também foi evidenciado que a DL₅₀ e ₇₀ de *M. alternifolia* causou a ejeção de núcleos para a região do lúmen na população CE (Fig. 1J e L).

Os adultos dos controles apresentaram testículos revestidos por tecido conjuntivo (ou cobertura peritoneal) em toda sua extensão, com septos formando vários folículos testiculares (Fig. 2A e B). Também foram encontrados vários espermatozóides e alguns cistos. Nos tratamentos com beta-ciflutrina e os óleos observou-se poucos espermatozoides (Fig. 2 C-L). Em PE, os folículos apresentaram numerosos cistos, e especificamente na DL₇₀ de *M. alternifolia* ocorreu vacuolização folicular intensa (Fig. 2 K). Já em CE, na DL₅₀ e ₇₀ de *J. virginiana* ocorreu espessamento da cobertura peritoneal (Fig. 2F e H) e na DL₇₀ de *M. alternifolia* vacuolização (Fig. 2L).

Os grupos controles revelaram os ovários revestidos por uma bainha de tecido conjuntivo, uma região de gema bem desenvolvida e uma camada de células foliculares envolvendo cada oócito (Fig. 3A e B). Os ovários dos grupos submetidos a beta-ciflutrina e os óleos mostraram-se semelhantes morfológicamente ao controle, porém com algumas alterações (Fig. 3C-L). Em PE, o tratamento com beta-ciflutrina e DL₅₀ de *M. alternifolia* reduziu a região de vitelo (Fig. 3C e I), já na DL₇₀ não foi observado essa região (Fig. 3K). Na população CE, beta-ciflutrina também reduziu a quantidade de vitelo (Fig. 3D), bem como a DL₇₀ de *J. virginiana* (Fig. 3H) e a DL₅₀ de *M. alternifolia* (Fig. 3J).

Histoquímica para Carboidratos Neutros do Intestino Médio, Testículo e Ovariolo.

A histoquímica das células epiteliais do intestino médio dos grupos controles revelou maior reação positiva ao corante P.A.S. em comparação aos tratamentos (Fig. 4A-L). Os tratamentos com inseticida e óleos alteraram o padrão de distribuição dos grânulos de glicogênio para o ápice celular,

além disso a quantificação de pixels revelou redução de carboidratos, principalmente na DL₇₀ do óleo de *J. virginiana* em Pernambuco (F=112.69; P<0.0001). Já na população do Ceará essa mesma redução ocorreu nos dois óleos na DL₇₀ ($\chi^2=65.5198$; P<0.0001) (Fig. 4M e N).

Os testículos dos controles e dos grupos tratados reagiram positivamente ao P.A.S., porém sendo maiores nos controles (Fig. 5A-L). Em PE, a quantificação dos pixels mostrou que os tratamentos diminuíram os carboidratos, especialmente na DL₇₀ de *J. virginiana* e na DL₅₀ e ₇₀ de *M. alternifolia* ($\chi^2=59.9382$; P<0.0001), enquanto que em CE a redução ocorreu significativamente nas duas doses de ambos os óleos ($\chi^2=39.8299$; P<0.0001) (Fig. 5M e N).

Nos ovários, houve detecção de carboidratos com coloração positiva ao P.A.S. tanto nos grupos controles quanto nos tratamentos (Fig. 6A-L). A quantificação dos pixels revelou diferenças significativas, mostrando diminuições em todos os tratamentos, com destaque para a DL₇₀ de *M. alternifolia* tanto em PE ($\chi^2=67.9821$; P<0.0001) quanto em CE ($\chi^2=62.1290$; P<0.0001) (Fig. 6M e N).

Histoquímica para Proteínas Totais do Intestino Médio, Testículo e Ovaríolo.

Todos os grupos mostraram intestinos com reação positiva ao corante Xylidine Ponceau, com destaque para os controles (Fig. 7A-L). A quantificação dos pixels revelou significativa redução, principalmente na DL₇₀ de *J. virginiana* em PE (P<0.0001; $X^2=64.2180$) e CE (P<0.0001; $X^2=66.7645$) (Fig. 7M e N).

Os testículos também reagiram positivamente (Fig. 8A-L), entretanto, em PE a quantificação dos pixels não revelou diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, com exceção da DL₇₀ de *M. alternifolia* ($\chi^2=35.2542$; P<0.0001) (Fig. 8 M). Já em CE, todos os tratamentos mostraram redução dos pixels, especialmente na DL₇₀ de *M. alternifolia* ($\chi^2=50.2009$; P<0.0001) (Fig. 8N).

Ovariolos também tiveram reação ao corante (Fig. 9A-L) e a quantificação de pixels mostrou diferenças significativas com reduções em todos os tratamentos. A principal redução ocorreu no tratamento com *M. alternifolia*, principalmente na DL₅₀ e 70 em PE ($\chi^2=59.9581$; $P<0.0001$) e na DL₇₀ em CE ($\chi^2=67.1396$; $P<0.0001$) (Fig. 9M e N).

Ensaio Bioquímicos.

Nos bichos da população PE, os valores nutricionais em $\mu\text{g/mL}$ reduziram no tratamento com a DL₅₀ e 70 de *J. virgiana* e *M. alternifolia* e a dose de rótulo de beta-ciflutrina sendo, respectivamente: proteínas (8.72 ± 0.09 ; 8.13 ± 0.09 ; 8.81 ± 0.08 ; 8.15 ± 0.10 ; 8.05 ± 0.09) ($F=661.87$; $P<0.0001$); lipídeo (7.50 ± 0.08 ; 5.83 ± 0.11 ; 7.50 ± 0.08 ; 6.72 ± 0.08 ; 3.09 ± 0.05) ($F=835.65$; $P<0.0001$); glicogênio (178.75 ± 6.9 ; 183.90 ± 11.57 ; 7.50 ± 0.08 ; 6.72 ± 0.08 ; 118.12 ± 2.66) ($\chi^2=22.2295$; $P=0.0005$); açúcar (205.12 ± 6.01 ; 173.87 ± 11.66 ; 205.12 ± 6.01 ; 164.37 ± 6.74 ; 261.42 ± 1.13) ($\chi^2=22.4358$; $P=0.0004$); em comparação ao grupo controle (13.74 ± 0.03 ; 9.82 ± 0.06 ; 304.50 ± 12.84 ; 430.62 ± 18.79) (Fig. 10 A-D).

Resultados semelhantes foram observados na população CE para as proteínas (9.26 ± 0.10 ; 8.74 ± 0.09 ; 9.30 ± 0.09 ; 8.72 ± 0.09 ; $9.25 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$) ($F=598.31$; $P<0.0001$), os lipídeos (74.87 ± 1.29 ; 73.64 ± 1.43 ; 64.97 ± 1.73 ; 64.65 ± 1.89 ; $25.36 \pm 0.85 \mu\text{g/mL}$) ($\chi^2=26.6465$; $P<0.0001$) e o glicogênio (302.00 ± 25.97 ; 286.62 ± 11.26 ; 395.55 ± 29.87 ; 282.75 ± 10.50 ; $460.37 \pm 8.91 \mu\text{g/mL}$) ($\chi^2=23.2387$; $P<0.0003$) quando comparados ao controle (14.1 ± 0.01 ; 97.63 ± 0.89 ; $643.12 \pm 11.71 \mu\text{g/mL}$). Porém, os níveis de açúcar (31.72 ± 1.05 ; 35.49 ± 1.08 ; 34.52 ± 0.69 ; 32.75 ± 1.54 ; $32.25 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$) não diferiram ($F=1.58$; $P=0.2047$) do controle ($34.55 \pm 1.79 \mu\text{g/mL}$) (Fig. 11 A-D).

Na maior parte dos casos, os tratamentos com as DL₇₀ dos óleos e a dose de rótulo de beta-ciflutrina causaram as maiores reduções dos nutrientes nas duas populações.

Discussão

Os compostos identificados nesse trabalho pertencem as classes dos mono e sesquiterpenos, esses terpenos são os mais abundantes em se tratando de composição química de óleos essenciais (Modzelewska *et al.* 2005, Bakkali *et al.* 2008, Zuzarte & Salgueiro 2015). Além disso, grande parte da atividade inseticida dos óleos é atribuída a este grupo (Simões & Spitz 2004, Taiz & Zeiger 2006, Bernards 2010).

A composição química, bem como a quantidade dos compostos presentes nos óleos essenciais são intimamente influenciadas pelas condições edafoclimáticas, espécie da planta, localização geográfica, assim como fatores genéticos de melhoramento (Gobbo-Neto & Lopes 2007, Bakkali *et al.* 2008, Si *et al.* 2012). Sabendo que os óleos de *J. virginiana* e *M. alternifolia* são amplamente estudados e de composição química conhecida, estas variações são evidentemente observadas como podemos ver no trabalho de Castelo *et al.* (2013) que citam os mesmos componentes majoritários, porém em quantidades diferentes, α -terpinen-4-ol (36,6%), γ -terpineno (18,2%) e α -terpineno (7,1%). Enquanto que Zhang & Yao (2018) constataram para *J. virginiana* α -cedrene (28,11%), cedrol (24,58%), (-)-thujopsene (17,71%) β -cedrene (7,81%) como majoritários, também encontrados no nosso trabalho em quantidades diferentes.

Os óleos essenciais podem agir por contato, ingestão e fumigação (Ko *et al.* 2009, Benelli *et al.* 2013, Dutra *et al.* 2016). Porém, o modo de ação é um fator importante a ser considerado, pois características como lipofilidade, variações no tamanho e forma da molécula, bem como o grupo funcional, podem influenciar na capacidade inseticida de um óleo (Rice & Coats 1994, Pavela 2011, Castilhos *et al.* 2017).

Os componentes dos óleos essenciais podem ter ação de sinergismo. Por exemplo, Hummelbrunner & Isman (2001) relataram que misturas de diferentes monoterpenos produziram um efeito sinérgico na mortalidade e desenvolveram uma mistura de monoterpenos patenteada

contendo 0,9% de ingrediente ativo para controlar pragas desfolhadoras. Sinzogan *et al.* (2006), descobriram que os danos ao algodão causados pela lagarta *Helicoverpa armigera* pode ser minimizado pela combinação de extratos de três plantas (*Azadirachta indica*, *Khaya senegalensis* e *Hyptis suaveolens*) as misturas de inseticidas convencionais. Sendo assim, a criação de combinações sinérgicas, cujo objetivo é reduzir as doses de pesticidas potencialmente poluentes, bem como diminuir o risco de desenvolvimento de resistência (Tripathi *et al.* 2009), é vantajoso em relação ao uso do produto sintético isolado, ainda mais com a utilização de óleos essenciais.

Os vários constituintes dos óleos podem atuar de forma distinta nos diferentes sistemas dos insetos, como mortalidade, redução no peso e período larval e pupal, do número e viabilidade dos ovos, assim como, na morfologia e histoquímicas das gônadas (Alves *et al.* 2013, Cruz *et al.* 2015, Cruz *et al.* 2016). Por exemplo, o composto limoneno encontrado no óleo de *M. alternifolia* nesta pesquisa, já foi relatado por Cruz *et al.* (2017) como capaz de reduzir nutrientes como lipídeos, proteínas, açúcares e glicogênio em *S. frugiperda*.

Nesta pesquisa, assim como o inseticida sintético, todas as doses dos óleos de *J. virginiana* e *M. alternifolia* causaram alterações morfo-histoquímicas no intestino médio de adultos de *A. grandis*. Isso mostra a capacidade que esses óleos têm de servirem como aliados aos inseticidas sintéticos comumente usados no manejo desta praga ou como alternativa para combinações sinérgicas.

Os danos nas células digestivas, como protusões, vacuolização, lise celular com núcleos ejetados para a região do lúmen são alguns dos exemplos que indicam o comprometimento na função do órgão. Além do mais, em todos os tratamentos a membrana peritrófica não foi observada, certamente por conta dos danos celulares, visto que é secretada justamente por essas células (Hegedus *et al.* 2009). O espessamento da camada muscular do intestino promovido pela DL₇₀ de *M. alternifolia* e a dose rótulo de beta-ciflutrina provavelmente comprometeu a contração peristáltica e resultou ainda mais em problemas digestórios.

Para tentar se recuperar do dano, o epitélio aumenta o número de células regenerativas para substituição e reparação tecidual (Spies & Spencer 1985). Neste estudo, isso foi verificada pela presença de vários ninhos de células regenerativas ao longo do epitélio, principalmente nos grupos tratados com a DL₇₀ dos óleos e a dose de beta-ciflutrina. Apesar disso, a presença de vacúolos nesses ninhos indica o dano permanente e provavelmente a não reparação celular. Esses resultados corroboram com os de Costa *et al.* (2017), que também relataram aumento de ninhos de células regenerativas, desorganização das células colunares e presença de vacúolos em populações PE de *A. grandis* expostas ao lufenurom.

Outros bioinseticidas e piretroides também já foram comprovados ter efeitos no intestino médio. Por exemplo, Correia *et al.* (2009) quando submeteram larvas de *S. frugiperda* ao nim após 96h na concentração de 1,0% e após 144h a 0,5 %, relataram a degeneração do epitélio do intestino médio. Gutiérrez *et al.* (2016), relataram que a CL₅₀ de deltametrina após 24h promoveu retração da camada muscular, vacuolização do citoplasma, desorganização do núcleo e da borda estriada em *Callibaetis radiatus*.

As alterações histológicas observadas na presente pesquisa certamente influenciaram a histoquímica, reduzindo os níveis de carboidratos e proteínas no intestino. Além disso, houve mudança de grânulos de glicogênio para o ápice da célula em todos os tratamentos, sugerindo realocação de reservas para tentar se recuperar do dano e manter a funcionalidade do órgão.

Dificuldades na absorção e metabolização dos nutrientes pode levar a realocação de nutrientes entre processos fisiológicos. Por este motivo, foi observado que os tratamentos com os óleos essenciais de *J. virginiana* e *M. alternifolia* reduziram as taxas de proteínas, lipídeos, glicogênio e açúcares, assim como beta-ciflutrina. No entanto, apenas na população CE não foi visto redução de açúcar e isso mostra a capacidade dessa população de manter esse nutriente e, de consequentemente, o fornecimento de energia sob estresse. Teoricamente, isso pode ser explicado pela redução de

glicogênio que, entrando na via glicolítica, liberou glicoses na hemolinfa. Cunha *et al.* (2015), quando trataram bicudos da população PE com pimetozina observaram alterações ultraestruturais e morfológicas no intestino médio e, conseqüentemente, redução dos níveis de glicogênio e lipídeos após 48h.

As proteínas, lipídeos, carboidratos e glicogênio são fundamentais para um bom desempenho reprodutivo nos insetos. Por exemplo, as proteínas estão diretamente envolvidas na síntese de hormônio e enzimas, que são importantes para o processo de vitelogênese (Arrese *et al.* 2010, Guizzo *et al.* 2012, Lima-Mendonça *et al.* 2014, Rosas-Mejía *et al.* 2015). A redução de proteínas e carboidratos nos ovários e testículos provavelmente tem relação com as reduções dos níveis nutricionais que, por sua vez, está diretamente ligada ao dano no intestino médio.

Essas reduções podem ter ligação com os danos histológicos, como por exemplo, a vacuolização da cobertura peritoneal e das células foliculares, que provavelmente levou a baixa absorção de nutrientes da hemolinfa. Embora a indução de apoptose não ter sido analisada, é possível que esses danos tenham levado a esse processo, ainda mais porque o composto limoneno encontrado em *M. alternifolia* neste estudo, também foi capaz de causar apoptose testicular e, conseqüentemente, redução populacional em *S. frugiperda* (Cruz *et al.* 2017). Portanto, a diminuição tanto de espermatozoides quanto de vitelo provavelmente culminará em baixa taxa reprodutiva, podendo impactar no número de indivíduos da geração F1.

Sendo assim, os resultados desta pesquisa evidenciam que, assim como o piretroide beta-ciflutrina, os óleos essenciais de *J. virginiana* e *M. alternifolia* são capazes de causar alterações morfo-histoquímicas no intestino médio e morfológicas nas gônadas. Além disso, devido às complicações na absorção os níveis de moléculas nutricionais reduzem e também afetam a histoquímica das gônadas, refletindo na diminuição da gametogênese em adultos de *A. grandis* de PE e CE.

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor.

Literatura Citada

- Abrapa. 2020.** Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/>. Acesso em 10/12/2020.
- Adams, R.P. 2009.** Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois, 804p.
- Alves, T.J.S., G.S. Cruz, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, C.A.G. Câmara & F.M. Cunha. 2013.** Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. Biotech. Histochem. 88: 1-11.
- Amer A. & H. Mehlhorn. 2006.** Larvicidal effects of various essential oils against. Parasitol. Res. 99: 466-472.
- Arrese, E.L., A.D. Howard, R.T. Patel, O.J. Rimoldi & J.L. Soulages. 2010.** Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. Insect Biochem. Mol. Biol. 40: 91-99.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck & M. Idaomar. 2008.** Biological effects of essential oils – A review. Food Chem. Toxicol. 46: 446-475.
- Beltrão, N.E. 2003.** Breve história do algodão no Nordeste do Brasil. Campina Grande, Embrapa, 17 p. (Documentos 177).
- Benelli G., A. Canale, G. Flamini, P.L. Cioni, F. Demi, L. Ceccarini, M. Macchia & B. Contia. 2013.** Biototoxicity of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) essential oil against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and its parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). Ind Crops Prod. 50: 596-603.
- Bernards, M.A. 2010.** Plant natural products: a primer. Can. J. Zool. 88: 601-14.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of dye-binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Bretas, J.A.C. 2016.** Corpo gorduroso de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Tese de Doutorado, UFRJ, Seropédica, 66p.

- Castelo, A.V.M., S.R. Afonso, R.R. Melo, C.H.S.D. Menezzi, J. Camillo & R.F. Vieira. 2013.** Rendimento e composição química do óleo essencial de *Maleleuca alternifolia* Chell, na região do Distrito Federal. Rev. Bras. Ciênc. Agr. 8: 143-147.
- Castilhos, R.V., A.D. Grützmacher & J.R. Coats. 2017.** Acute toxicity and sublethal effects of terpenoids and essential oils on the predator *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). Neotrop. Entomol. 47: 311-317
- 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.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2009.** Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. Neotrop. Entomol. 38: 83-91.
- Costa, H.N., Cunha, F.M., Cruz, G.S., D'assunção, C.G., Rolim, G.G., Barros, M. E.G., Breda, M.O., Teixeira, Á.A.C. & Wanderley-Teixeira, V. 2017.** Lufenuron impact upon *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) midgut and its reflection in gametogenesis. Pestic Biochem Physiol. 137: 71-80.
- 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, J.V. Oliveira, C.G. D'assunção, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa & M.O. Breda. 2017.** Effect of transanethole, limonene and your combination in nutritional componentes and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Chem. Biol. Interact. 263: 74-80.
- Cunha, F.M., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Pereira, B.F., Caetano, F.H., Torres, J.B., Gonçalves, G.G.A. & Santos, F.A.B. 2015.** Effects of Pymetrozine on biochemical parameters and the midgut ultrastructure of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). Animal Biol doi.org/10.1163/15707563-00002476.
- Dutra, K.A., J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro, D.R.S. Barbosa & J.P. Oliveira. 2016.** Control of *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in *Vigna*

unguiculata (L.) Walp. with essential oils from four Citrus spp. plants. J. Stored Prod. Res. 68: 25-32.

- Dutra, K. A., V. Wanderley Teixeira, G. S. Cruz, C. T. S. Silva, C. G. D'Assunção, C. G. M. Ferreira, A. L. B. Monteiro, A. C. Agra Neto, C. J. C. Lapa Neto, A. A. C. Teixeira & D. M. A. F. Navarro. 2019.** Morphological and immunohistochemical study of the midgut and fat body of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: noctuidae) treated with essential oils of the genus *Piper*. Biotec & Histochem, 94: 498-513.
- Eller, F.J., C.A.Clausen, F. Grenn & S.L.Taylor. 2010.** Critical fluid extraction of *Juniperus virginiana* L. and bioactivity of extracts against subterranean termites and wood-rot fungi. Ind. Crop. Prod, 32: 481-85.
- Eller, F. J., R. K. Vander Meer, R. W. Behle, L. B. Flor-Weiler & D. E. Palmquist. 2014.** Bioactivity of Cedarwood Oil and Cedrol Against Arthropod Pests. Environ. Entomol, 43: 762-766.
- Gobbo-Neto, L. & N.P. Lopes. 2007.** Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova. 30: 374-381.
- Guedes, C.A., V.W. Teixeira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro, G.S. Cruz, C.J.C.L. Neto, A.A. Correia, J.M. Sandes, F.A. Brayner, L.C. Alves & Á.A.C. Teixeira. 2020.** Evaluation of *Piper marginatum* (Piperales: Piperaceae) Oil and Geraniol on the Embryonic Development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Comparison to Formulated Products.
- Guizzo, M.G., L. Abreu, A. Masuda, C. Logullo & I.S.V. Junior. 2012.** Metabolism of biomolecules in the embryogenesis of the tick *Rhipicephalus microplus* (Boophilus). Acta Sci. Vet. 40: 1010- 1022.
- Gutiérrez, Y., H.P. Santos, J. E. Serrão & E.E. Oliveira. 2016.** Deltamethrin-Mediated Toxicity and Cytomorphological Changes in the Midgut and Nervous System of the Mayfly *Callibaetis radiates*. Plos One <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152383>.
- Hegedus, D., M. Erlandson, C. Gillott & U. Toprak. 2009.** New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. Annu. Rev. Entomol. 54:285-302.
- Hummelbrunner, L.A. & M.B. Isman. 2001.** Acute sublethal, antifeedant and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). J. Agric. Food Chem. 49: 715-720.
- Ko, K., W. Juntarajumnong & A. Chandrapatya. 2009.** Repellency, fumigant and contact toxicities of *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 43: 56-63.
- Liao, M., J.J. Xiao, L. Zhou, Y. Liu, X.W. Wu, R.M. Hua, G.R. Wang & H.Q. Cao. 2016.** Insecticidal Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil and RNA-Seq Analysis of *Sitophilus zeamais* Transcriptome in Response to Oil Fumigation. Plos One, doi.org/10.1371/journal.pone.0167748.

- Liao, M., J.J. Xiao, L. Zhou, X. Yao, F. Tang, R.M. Hua, X.W. Wu & H.Q. Cao. 2017.** Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on the *Helicoverpa armigera*. J. Appli. Entomol, doi.org/10.1111/jen.12397.
- Lima-Mendonça, A., A.L. Mendonça, A.E.G. Sant'Ana & R.R. Nascimento. 2014.** Semioquímicos de moscas das frutas do gênero *Anastrepha*. Quim. Nova 37: 293-301.
- Madbouly, S.A., C. Zhang & M.R. Kessler. 2015.** Bio-based plant oil polymers and composites. Elsevier Inc., Oxford, UK, 213p.
- Modzelewska, A., S. Sur, S.K. Kumar & S.R. Khan. 2005.** Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents 5: 477-499.
- Oliveira-Marra, S.O.D., R.N.C. Guedes, C.S. Bastos, P.H.A. Marra, L.M. Vivan & A.M. Zanine. 2019.** Insecticide resistance and control failure likelihood among populations of the boll weevil (*Anthonomus grandis*) from Mato Grosso (Brazil). Acta Sci, doi: 10.4025/actasciagron.v41i1.42714.
- Pavela, R., 2005.** Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. Fitoterapia 76: 691-696.
- Rice, P.J. & J.R. Coats. 1994.** Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and the southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 87: 1172-1179.
- Rolim, G.G., Arruda, L.S., Torres, J.B., Barros, E.M. & Fernandes, M.G. 2019.** Susceptibility of Cotton Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) to Spinosyns. J Econ Entomol. 112: 1688-1694.
- Rosas-Mejía, M., A. Correa-Sandoval, C. S. Venegas-Barrera & J.V. Horta-Veja. 2015.** Preferences among five carbohydrates in *Pheidole bilimeki* (Hymenoptera: Formicidae). Acta Zool. Mex, 31: 291-297.
- SAS Institute. 2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Si, L., Y. Chen, X. Han, Z. Zhan, S. Tian, Q. Cui & Y. Wang. 2012.** Chemical composition of essential oils of *Litsea cubeba* harvested from its distribution areas in China. Molecules 17: 7057-7066.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, G.S. Cruz, F.M. Cunha & A.A.C. Teixeira. 2019.** Immune and nutritional responses of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) nymphs sprayed with azadirachtin. Austral Entomol, doi: 10.1111/aen.12432.

- Simões, C.M.O. & V. Spitz.** 2004. Óleos voláteis, p. 467-495. In C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick (eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Editora da universidade/UFSC, 1104p.
- Sinzogan, A.A.C., D.K. Kossou, P. Atachi & A. Van Huis.** 2006. Participatory evaluation of synthetic and botanical pesticide mixtures for cotton bollworm control. *Intl. J. Trop. Insect Sci.* 26: 246-255.
- 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.
- Tahghighi, A., N. Maleki-Ravasan, N.D. Djadid, H. Alipour, R. Ahmadvand, F. Karimian & S. Yousefinejad.** 2019. GC–MS analysis and anti–mosquito activities of *Juniperus virginiana* essential oil against *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 9: 168-175.
- Taiz, L. & E. Zeiger.** 2006. *Fisiologia vegetal*, 3.ed. Porto Alegre, Artmed, 722p.
- 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 Phytother.* 1: 052-064.
- Tol, R.W.H.M., H.J. Swarts, A. Linden & J.H. Visser.** 2007. Repellence of the red bud borer *Resseliella oculiperda* from grafted apple trees by impregnation of rubber budding strips with essential oils. *Pest. Manag. Sci.* 63: 483-490.
- Van Den Dool, H. & P.D.J.A. Kratz.** 1963. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11: 463-471.
- Van Handel, E.** 1985a. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1:299–301.
- Van Handel, E.** 1985b. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 302–304.
- Zhang, K. & L. Yao.** 2018. The anxiolytic effect of *Juniperus virginiana* L. essential oil and determination of its active constituents. *Physiol. Behavior*, 189: 50-58.
- Zuzarte, M., & L. Salgueiro.** 2015. Essential oils chemistry, p. 19-61. In D.P. Sousa (ed.), *Bioactive essential oils and câncer*. Cham, Springer, 292p.

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de *Juniperus virginiana* e *Melaleuca alternifolia*.

Nº	Compound ¹	I.R. ²	<i>J. virginiana</i>		<i>M. alternifolia</i>	
			I.R. ³	%	I.R. ³	%
1	α -Thujene	924	-	-	924	0.51
2	α -Pinene	932	-	-	930	1.93
3	Sabinene	969	-	-	971	0.24
4	β -Pinene	974	-	-	973	0.45
5	Myrcene	988	-	-	990	0.36
6	α -Phellandrene	1002	-	-	1003	0.30
7	α-Terpinene	1014	-	-	1014	8.77
8	p-Cymene	1020	-	-	1022	3.40
9	Limonene	1024	-	-	1026	1.45
10	1,8-Cineole	1026	-	-	1028	1.75
11	γ-Terpinene	1054	-	-	1057	18.60
12	Terpinolene	1086	-	-	1087	2.97
13	(Z)-p-Menth-2-en-1-ol	1118	-	-	1120	0.18
14	(E)-p-Menth-2-en-1-ol	1136	-	-	1138	0.19
15	Terpinen-4-ol	1174	-	-	1177	47.24
16	α-Terpineol	1186	-	-	1189	4.18
17	γ -Terpineol	1199	-	-	1196	0.18
18	2-epi- α -Funebrene	1380	1379	0.13	-	-
19	α -Duprezianene	1387	1384	0.34	-	-
20	β -Elemene	1390	1392	0.25	-	-
21	α -Chamipinene	1396	1397	0.07	-	-
22	α -Funebrene	1402	1401	0.11	-	-
23	Sesquithujene	1405	1406	0.11	-	-
24	α -Gurjunene	1409	-	-	1410	0.30
25	α-Cedrene	1410	1413	18.49	-	-
26	(E)-Caryophyllene	1417	-	-	1420	0.18
27	β-Cedrene	1419	1421	4.31	-	-
28	(Z)-Thujopsene	1429	1432	31.94	-	-
29	Isobazzanene	1436	1437	0.12	-	-
30	Aromadendrene	1439	-	-	1439	1.23
31	Myltayl-4(12)-ene	1445	-	-	1444	0.10
32	α -Himachalene	1449	1450	0.55	-	-
33	α -Humulene	1452	1454	0.09	-	-
34	allo-Aromadendrene	1458	-	-	1462	0.45
35	α -Acoradiene	1464	1465	0.61	-	-
36	β -Acoradiene	1469	1468	0.45	-	-
37	α -Neocallitropsene	1474	1472	0.20	-	-
38	E-Cadina-1(6),4-diene	1475	-	-	1474	0.24
39	β -Chamigrene	1476	1478	1.48	-	-
40	α -Curcumene	1479	1484	0.28	-	-
41	β -Selinene	1489	1487	0.44	1487	0.08

42	(Z)- β -Guaiene	1492	-	-	1489	0.16
43	Viridiflorene	1496	-	-	1496	1.86
44	β -Alaskene	1498	1496	0.69	-	-
45	α -Muurolene	1500	-	-	1501	0.12
46	β -Himachalene	1500	1501	2.95	-	-
47	α -Chamigrene	1503	1504	0.93	-	-
48	Cuparene	1504	1506	2.15	-	-
49	α -Alaskene	1512	1514	1.31	-	-
51	δ -Cadinene	1522	1524	1.04	1525	0.99
52	(E)-Cadina-1,4-diene	1533	-	-	1534	0.11
53	γ -Cuprenene	1533	1533	0.48	-	-
54	δ -Cuprenene	1542	1544	0.24	-	-
55	Allocedrol	1589	1591	0.23	-	-
56	Globulol	1590	-	-	1586	0.17
57	(Z)-dihydro-Mayurone	1595	1596	0.07	-	-
58	Cedrol	1600	1603	25.61	-	-
59	Epi-cedrol	1618	1615	0.30	-	-
60	α -Acorenol	1632	1632	0.58	-	-
61	β -Acorenol	1636	1636	0.37	-	-
62	Himachalol	1652	1649	0.11	-	-
63	3-Thujopsanone	1653	1652	0.43	-	-
64	7-epi- α -Eudesmol	1662	1660	0.07	-	-
65	8-Cedren-13-ol	1688	1692	0.09	-	-
66	Mayurone	1703	1708	0.11	-	-
67	(Z)-Thujopsenal	1708	1706	0.16	-	-
68	Cedryl acetate	1767	1766	0.17	-	-
Monoterpenos					-	38.98
Monoterpenos					-	53.72
Oxigenados						
Sesquiterpenos					69.76	5.82
Sesquiterpenos					28.3	0.17
Oxigenados						
Total					98.06	98.69

¹ Constituintes listados em ordem de eluição na coluna apolar DB-5;

² Índices de retenção de Kratz da literatura (Adams, 2009);

³ Índices de retenção de Kratz calculados através dos tempos de retenção em relação aos da série de n-alcanos (C8-C30).

Tabela 2. Toxicidade dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Juniperus virginiana* em adultos de *Anthonomus grandis* da população de Pernambuco (PE) por contato tópico.

Tratamentos	N ¹	GL ²	Inclinação da reta (±EP) ³	DL ₅₀ ⁴ (IC95%) ⁵ (mg/g)	RT ₅₀ ⁶	DL ₇₀ ⁴ (IC95%) ⁵ (mg/g)	RT ₇₀ ⁶	χ ² ⁷
<i>J. virginiana</i>	150	3	1,5±0,48	0,280 (0,139-0,543)	-	0,597 (0,343-2,322)	-	10,79
<i>M. alternifolia</i>	150	3	2,0±0,56	0,169 (0,096-0,274)	1,65	0,303 (0,196-0,697)	1,96	13,29

¹N= número de insetos usados no teste;

²GL= grau de liberdade;

³EP= erro padrão da média;

⁴DL= Dose letal (mg/g de inseto);

⁵IC = intervalo de confiança;

⁶RT = razão de toxicidade;

⁷χ²= Quiquadrado.

Tabela 3. Toxicidade dos óleos essenciais de *Juniperus virginiana* e *Melaleuca alternifolia* em adultos de *Anthonomus grandis* da população de Ceará (CE) por contato tópico.

Tratamentos	N ¹	GL ²	Inclinação da reta (±EP) ³	DL ₅₀ ⁴ (IC95%) ⁵ (mg/g)	RT ₅₀ ⁶	DL ₇₀ ⁴ (IC95%) ⁵ (mg/g)	RT ₇₀ ⁶	χ ² ⁷
<i>J. virginiana</i>	150	3	1,3±0,33	0,311 (0,228-0,419)	-	0,488 (0,368-0,783)	-	21,18
<i>M. alternifolia</i>	150	3	1,2±0,32	0,208 (0,128-0,317)	1,49	0,406 (0,272-0,855)	1,20	16,39

¹N= número de insetos usados no teste;

²GL= grau de liberdade;

³EP= erro padrão da média;

⁴DL= Dose letal (mg/g de inseto);

⁵IC = intervalo de confiança;

⁶RT = razão de toxicidade;

⁷χ²= Quiquadrado.

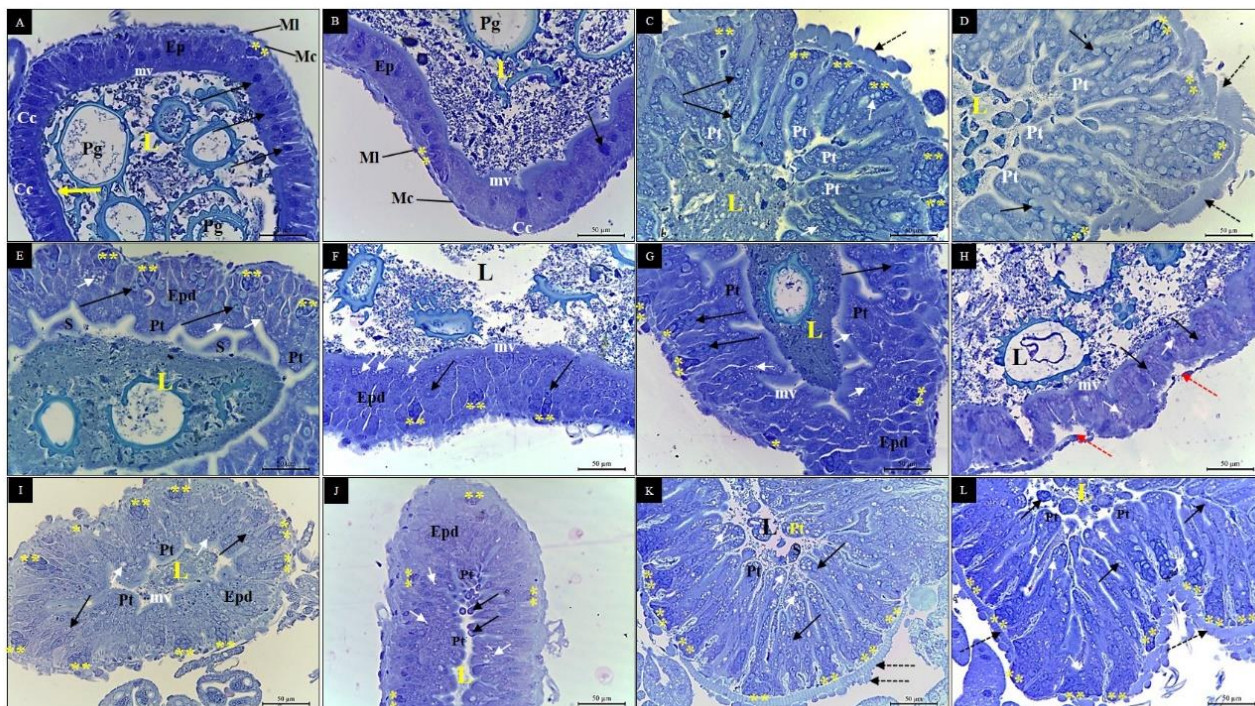


Figura 1. Seção transversal do intestino médio de adultos de *Anthonomus grandis*. Coloração Azul de Toluidina. A, C, E, G, I e K população de Pernambuco (PE). B, D, F, H, J e L população de Ceará (CE). A-B – controle com membrana peritrófica (seta amarela) no lúmen (L) com grãos de pólen (Pg), com células colunares (Cc) com núcleos centrais (seta) e borda em escova de microvilosidades no ápice (mv) e ninhos de células regenerativas (**) na base do epitélio (Ep), além de músculos circulares (Mc) e músculos longitudinais (MI) revestindo externamente. C e D – tratamento com beta-ciflutrina, observar protusões (Pt) das células colunares, numerosos vacúolos (seta branca), presença de ninhos de células regenerativas (**) e camada muscular espessa (seta tracejada). E-F – DL₅₀ e G-H – DL₇₀ do óleo essencial de *Juniperus virginiana*, evidenciar protusões (Pt) das células colunares, numerosos vacúolos (seta branca), desorganização do epitélio (Epd), numerosos ninhos de células regenerativas (**) e camada muscular delgada (seta tracejada vermelha). I-J – DL₅₀ e K-L – DL₇₀ do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, identificar protusões (Pt) das células colunares, numerosos vacúolos (seta branca), desorganização do epitélio

(Epd), presença de ninhos de células regenerativas (**), camada muscular espessa (seta tracejada) e ejeção de núcleos para o lúmen (L).

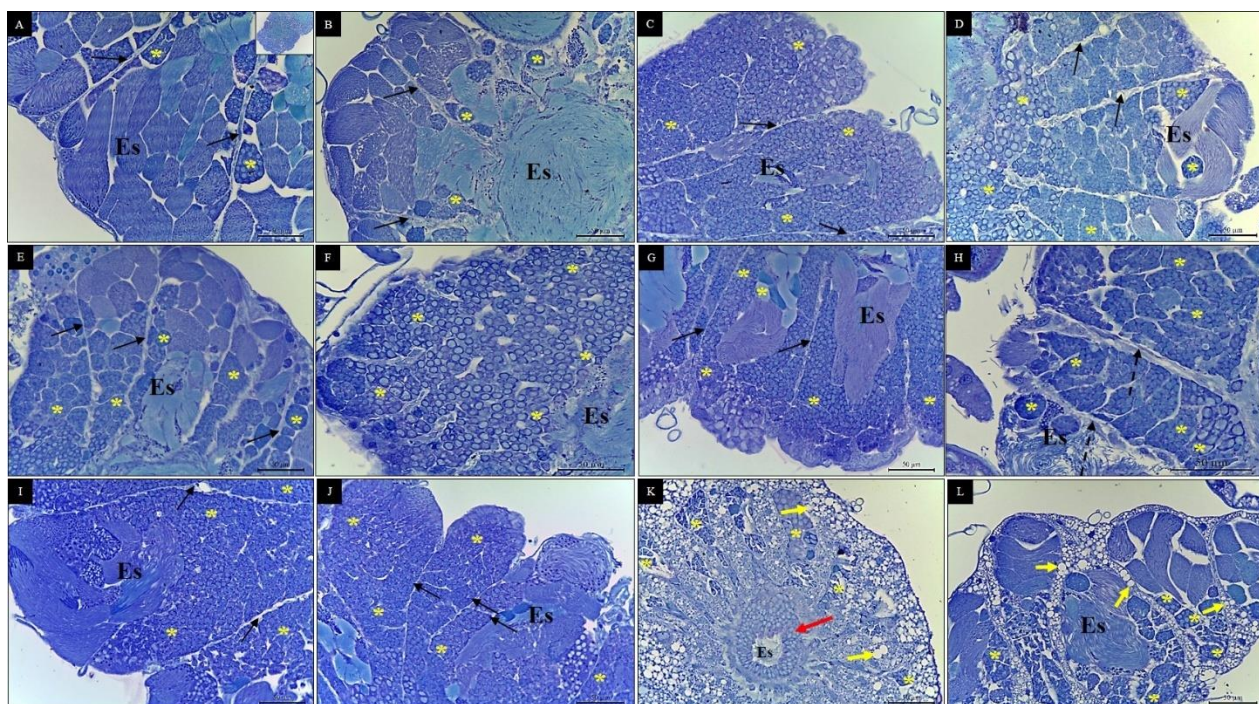


Figura 2. Testículo de adultos de *Anthonomus grandis*. Coloração Azul de Toluidina. A, C, E, G, I e K população de Pernambuco (PE). B, D, F, H, J e L população de Ceará (CE). A-B – controle, visualizar folículos testiculares separados pelos septos peritoneais (seta) com grande quantidade de espermatozoides (Es) e de cistos (Asterisco). C-D – tratamento com beta-ciflutrina, observar poucos feixes de espermatozoides (Es) e maior quantidade de cistos. E-F – DL₅₀ e G-H – DL₇₀ do óleo essencial de *Juniperus virginiana*, analisar poucos feixes de espermatozoides (Es) e maior quantidade de cistos e espessamento do septo peritoneal (seta tracejada). I-J – DL₅₀ e K-L DL₇₀ do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, identificar poucos feixes de espermatozoides (Es), aumento de cistos, espessamento do canal deferente (seta vermelha) e vacuolização no folículo e nos septos peritoneais (seta amarela).

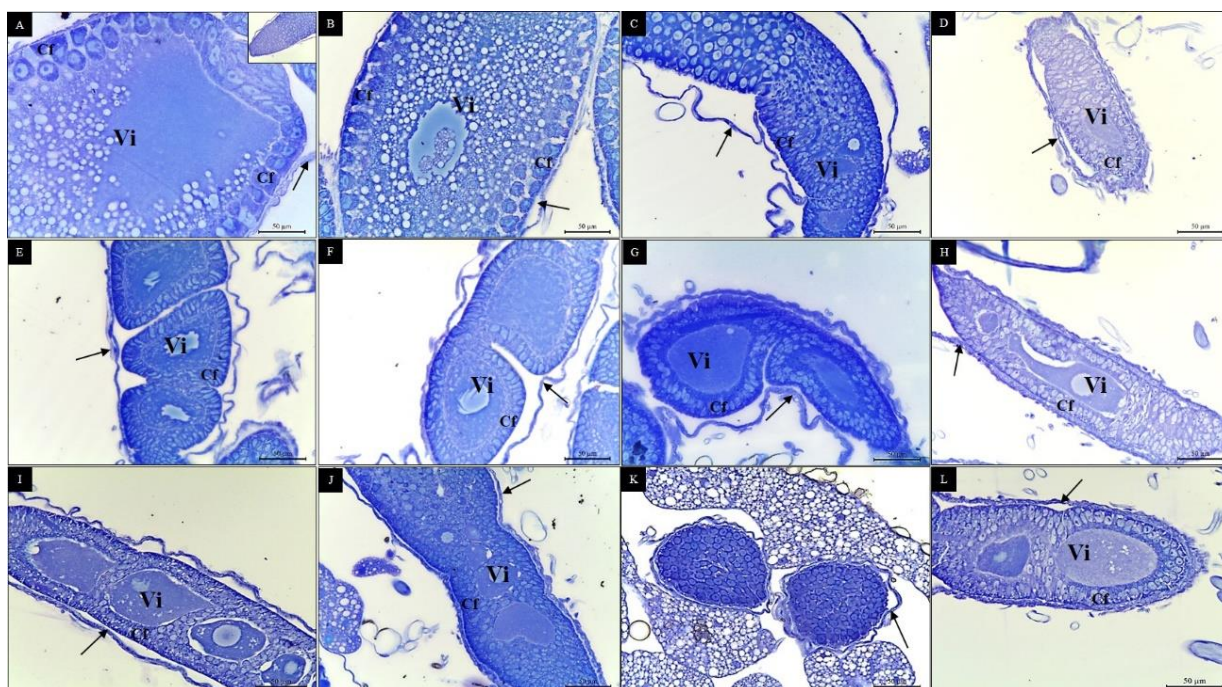


Figura 3. Ovariolo de adultos de *Anthonomus grandis*. Coloração Azul de Toluidina. A, C, E, G, I e K população de Pernambuco (PE). B, D, F, H, J e L população de Ceará (CE). A-B – controle, observar oócito com região de gema bem desenvolvida e com grande quantidade de vitelo (Vi). C-D – tratamento com beta-ciflutrina, identificar oócito com pouco vitelo (Vi). E-F – DL₅₀ e G-H – DL₇₀ do óleo essencial de *Juniperus virginiana*, analisar oócitos com pouco vitelo (Vi). I-J – DL₅₀ e K-L DL₇₀ do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, visualizar oócitos com pouco vitelo (Vi). Seta, bainha de tecido conjuntivo; Cf, células foliculares.

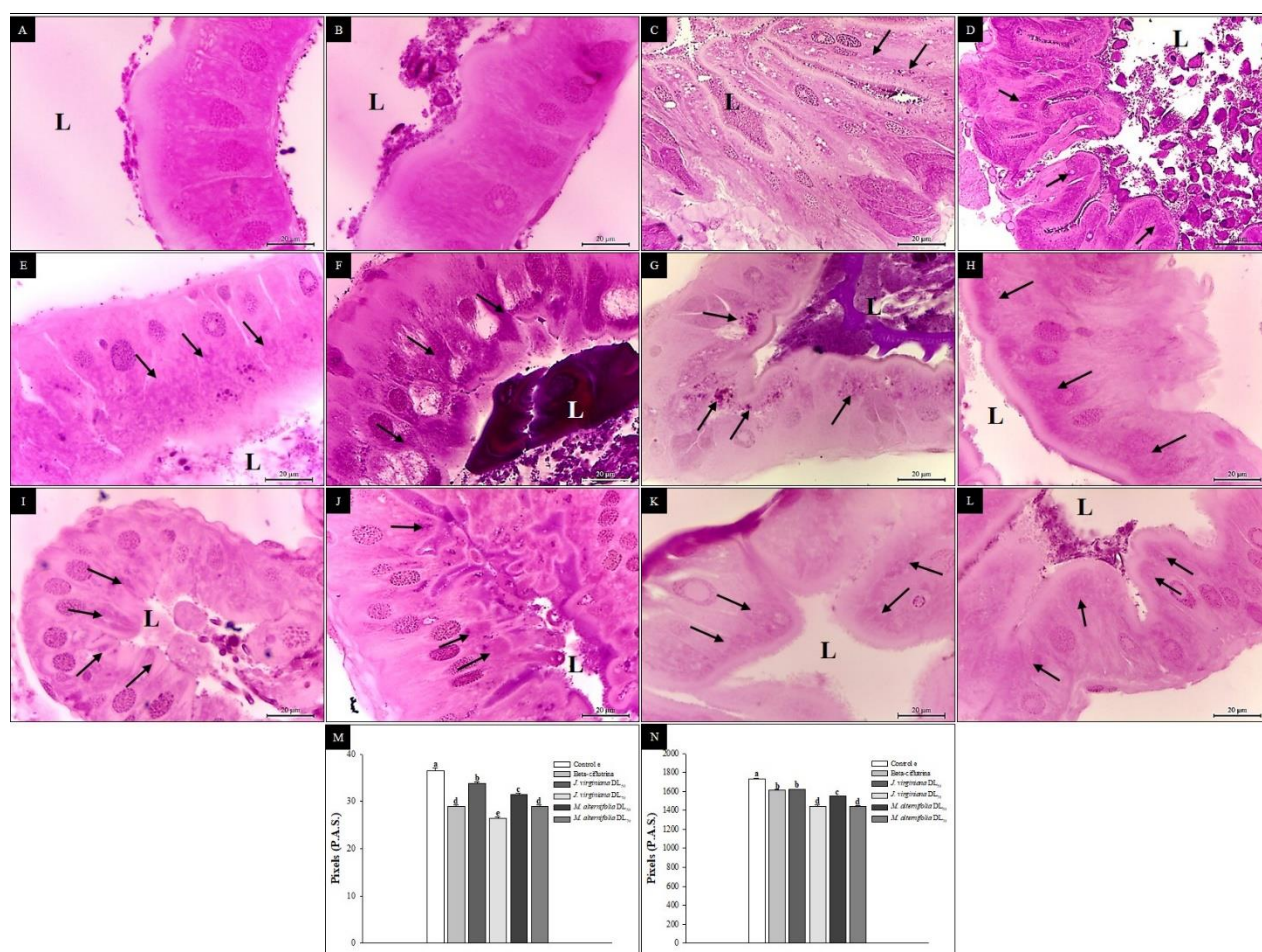


Figura 4. Histoquímica do intestino médio de adultos de *Anthonomus grandis* para carboidratos neutros. Coloração Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.). A, C, E, G, I, K e M população de Pernambuco (PE). B, D, F, H, J, L e N população de Ceará (CE). A-B – controle com distribuição normal dos grânulos de glicogênio. C-D – tratamento com beta-ciflutrina, E-F – DL₅₀ e G-H – DL₇₀ do óleo essencial de *Juniperus virginiana*, I-J – DL₅₀ e K-L DL₇₀ do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, evidenciar mudança do padrão de distribuição dos grânulos de glicogênio para o ápice celular (seta). L, lúmen. M-N – quantidade média de pixels (média $\pm$ erro). Barras seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

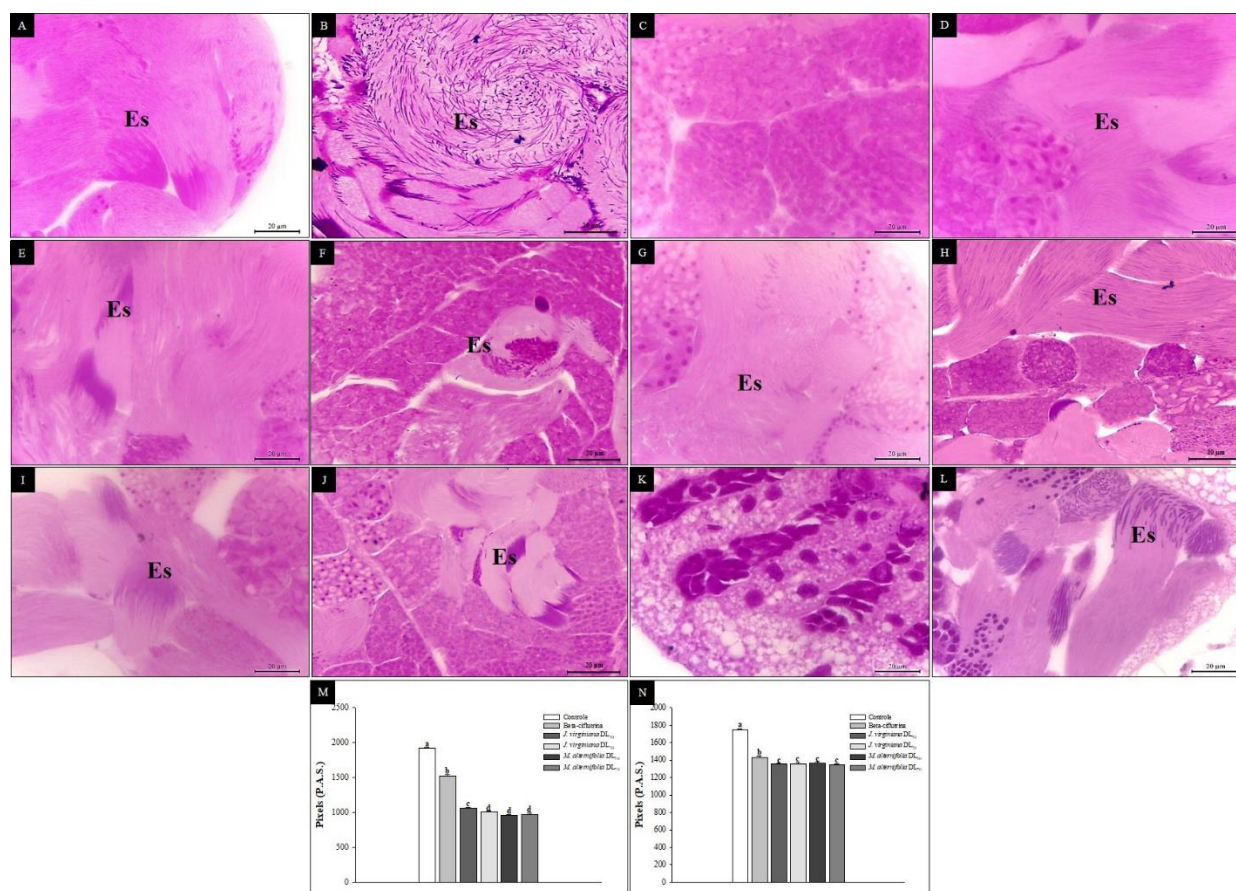


Figura 5. Histoquímica do testículo de adultos de *Anthonomus grandis* para carboidratos neutros. Coloração Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.). A, C, E, G, I, K e M população de Pernambuco (PE). B, D, F, H, J, L e N população de Ceará (CE). A-B – controle. C-D – tratamento com beta-ciflutrina. E-F – DL₅₀ e G-H – DL₇₀ do óleo essencial de *Juniperus virginiana*. I-J – DL₅₀ e K-L DL₇₀ do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Es, espermatozoides. M-N – quantidade média de pixels (média $\pm$ erro). Barras seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

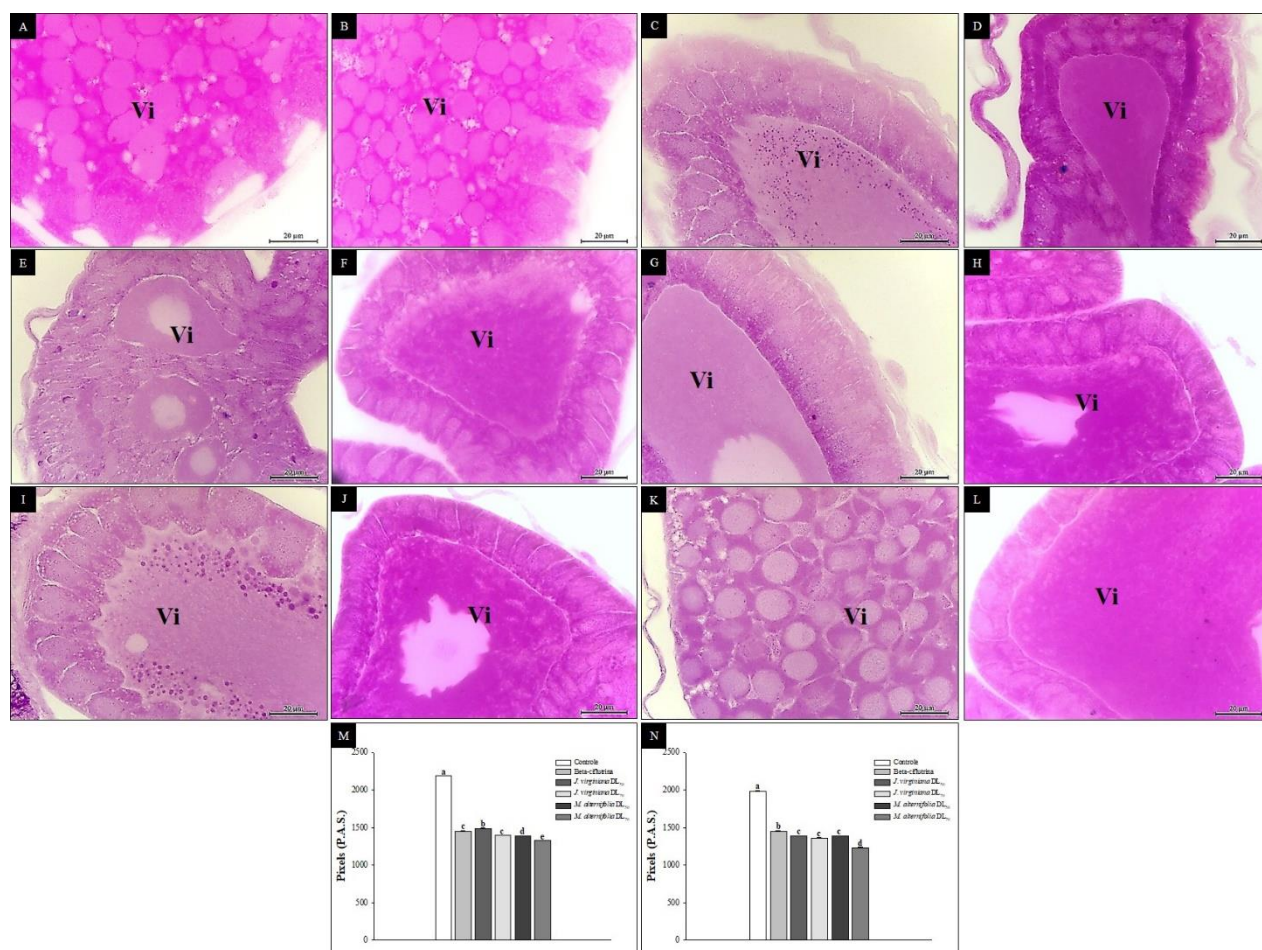


Figura 6. Histoquímica do ovaríolo de adultos de *Anthonomus grandis* para carboidratos neutros. Coloração Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.). A, C, E, G, I, K, e M população de Pernambuco (PE). B, D, F, H, J, L e N população de Ceará (CE). A-B – controle. C-D – tratamento com beta-ciflutrina. E-F – DL₅₀ e G-H – DL₇₀ do óleo essencial de *Juniperus virginiana*. I-J – DL₅₀ e K-L DL₇₀ do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Vi, vitelo. M-N – quantidade média de pixels (média $\pm$ erro). Barras seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

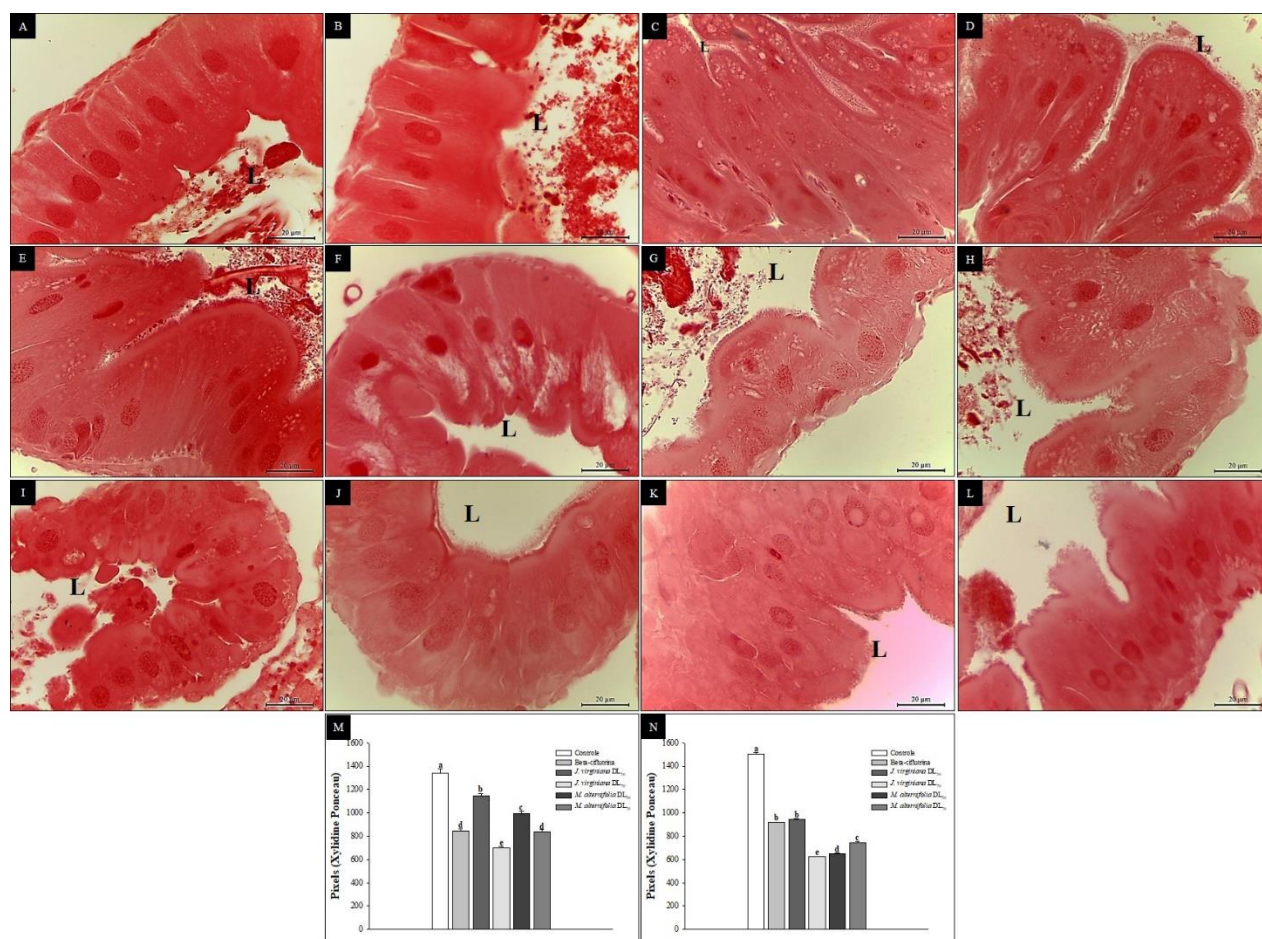


Figura 7. Histoquímica do intestino médio de adultos de *Anthonomus grandis* para proteínas totais. Coloração Xylidine Ponceau. A, C, E, G, I, K e M população de Pernambuco (PE). B, D, F, H, J, L e N população de Ceará (CE). A-B – controle. C-D – tratamento com beta-ciflutrina. E-F – DL₅₀ e G-H – DL₇₀ do óleo essencial de *Juniperus virginiana*. I-J – DL₅₀ e K-L DL₇₀ do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. L, lúmen. M-N – quantidade média de pixels (média ± erro). Barras seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

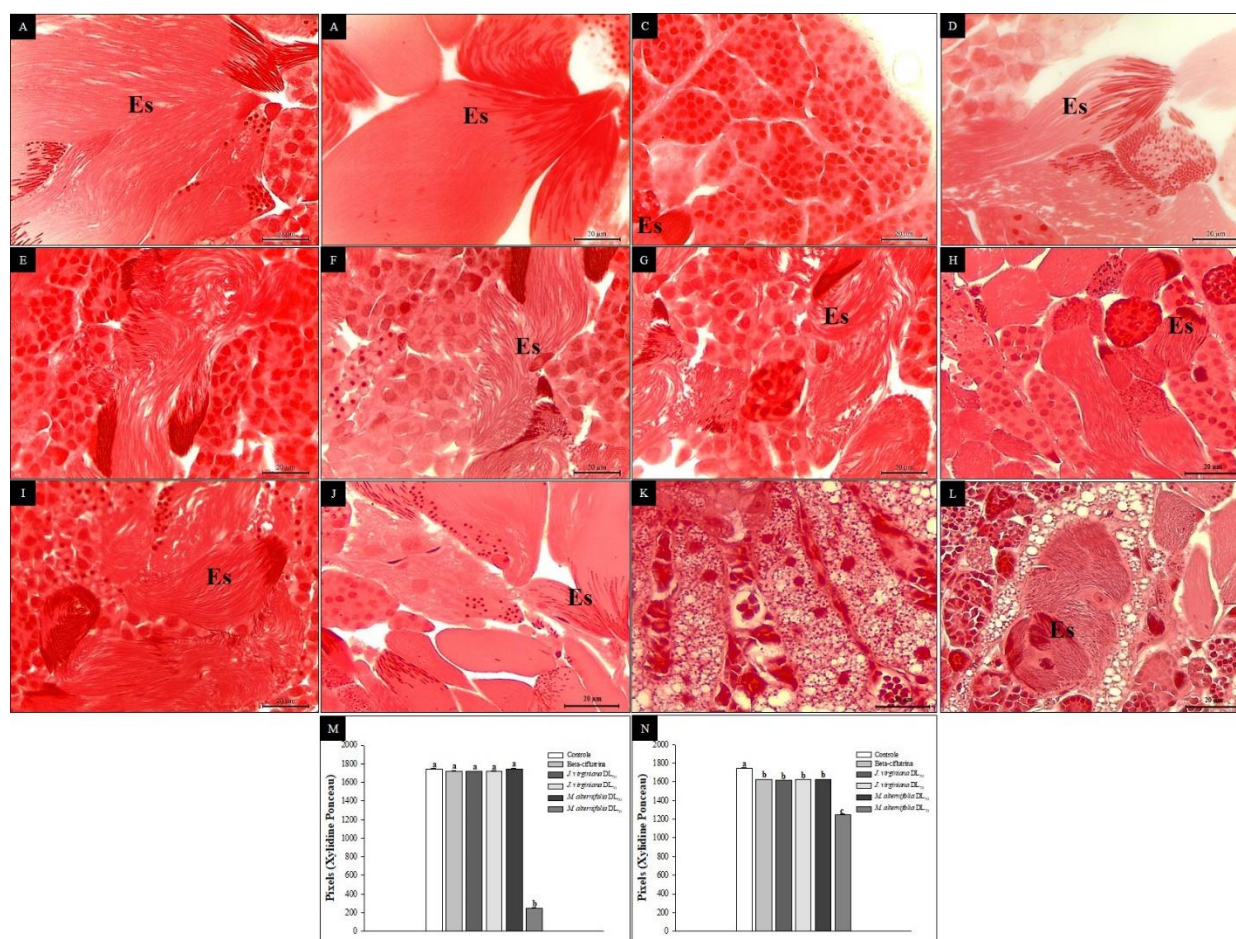


Figura 8. Histoquímica do testículo de adultos de *Anthonomus grandis* para proteínas totais. Coloração Xylidine Ponceau. A, C, E, G, I, K e M população de Pernambuco (PE). B, D, F, H, J, L e N população de Ceará (CE). A-B – controle. C-D – tratamento com beta-ciflutrina. E-F – DL₅₀ e G-H – DL₇₀ do óleo essencial de *Juniperus virginiana*. I-J – DL₅₀ e K-L DL₇₀ do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Es, espermatozoides. M-N – quantidade média de pixels (média $\pm$ erro). Barras seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

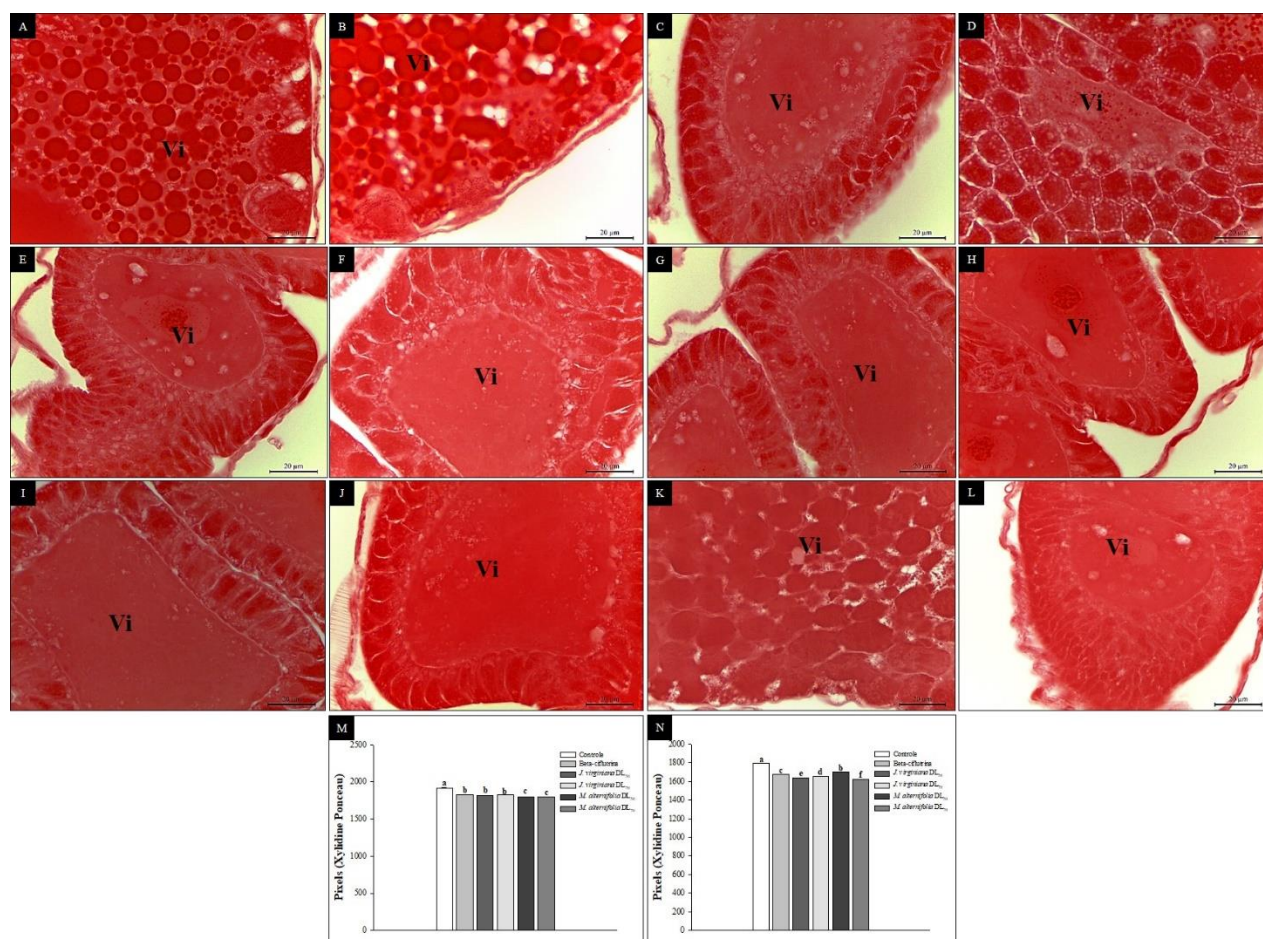


Figura 9. Histoquímica do ovário de adultos de *Anthonomus grandis* para proteínas totais. Coloração Xylidine Ponceau. A, C, E, G, I, K e M população de Pernambuco (PE). B, D, F, H, J, L e N população de Ceará (CE). A-B – controle. C-D – tratamento com beta-ciflutrina. E-F – DL₅₀ e G-H – DL₇₀ do óleo essencial de *Juniperus virginiana*. I-J – DL₅₀ e K-L DL₇₀ do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Vi, vitelo. M-N – quantidade média de pixels (média $\pm$ erro). Barras seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

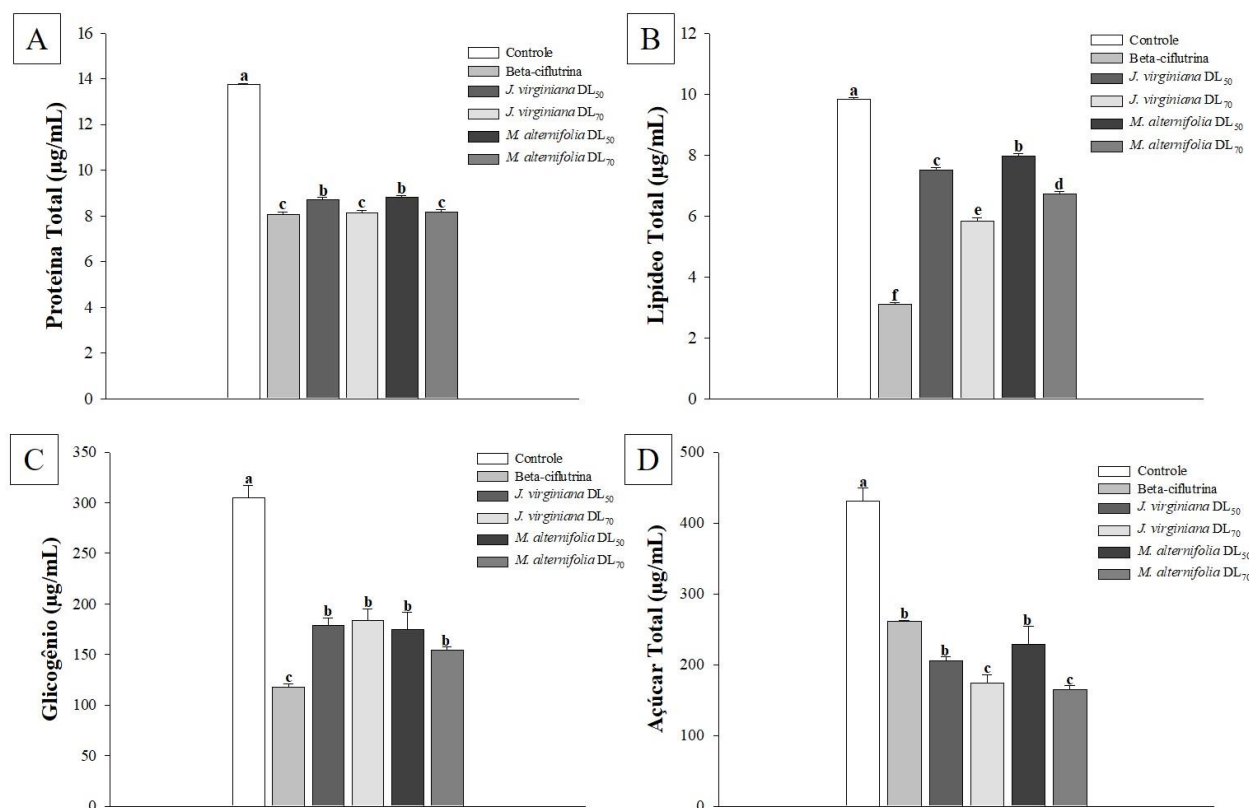


Figura 10. Análise bioquímica (µg/mL) de adultos de *Anthonomus grandis* submetidos aos óleos essenciais de *Juniperus virginiana* (DL₅₀ 0,280 mg/g e DL₇₀ 0,597 mg/g) e *Melaleuca alternifolia* (DL₅₀ 0,169 mg/g e DL₇₀ 0,303 mg/g) e ao piretroide beta-ciflutrina (Bulldock 125 SC, 125 g/L – Bayer) após 24 horas. População de Pernambuco (PE). A, proteína total. B, lipídeo total. C, glicogênio. D, açúcar total. Barras seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey e Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.001$).

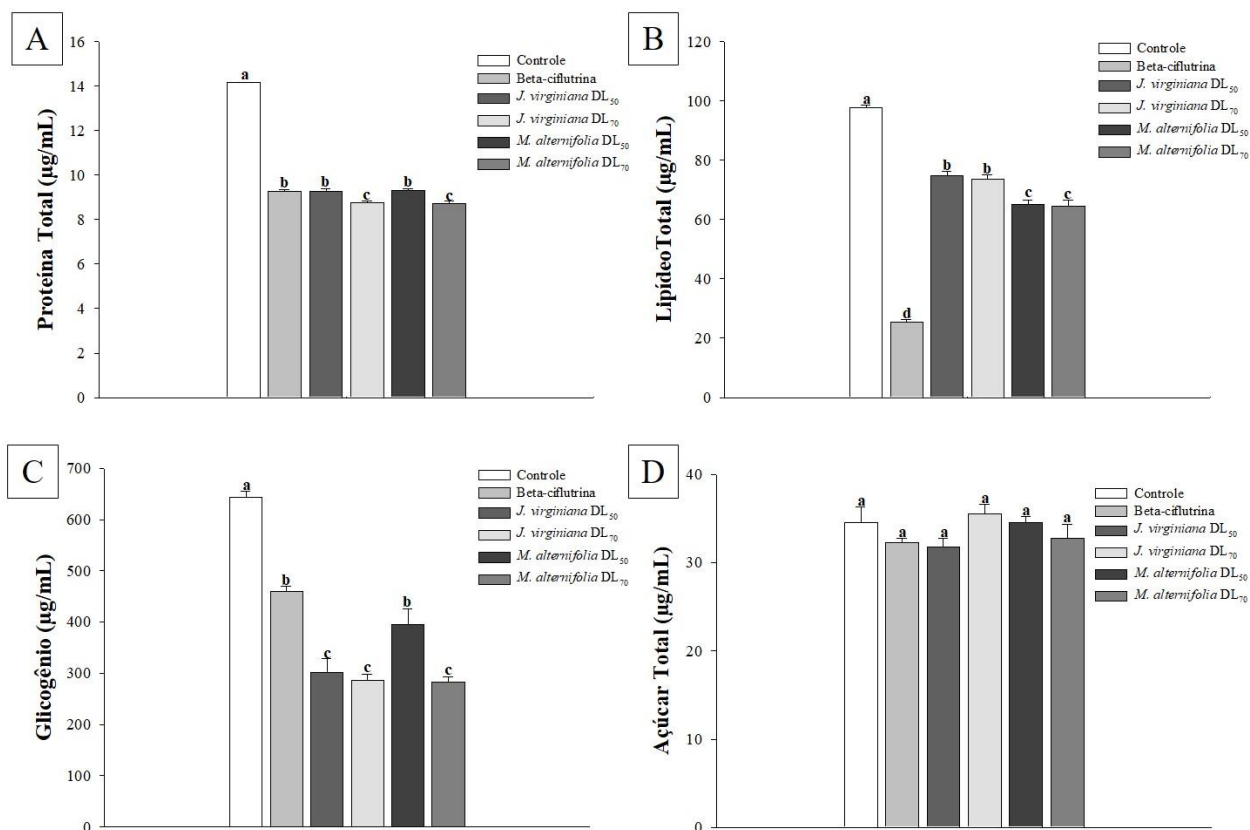


Figura 11. Análise bioquímica (µg/mL) de adultos de *Anthonomus grandis* submetidos aos óleos essenciais de *Juniperus virginiana* (DL₅₀ 0,311 mg/g e DL₇₀ 0,488 mg/g) e *Melaleuca alternifolia* (DL₅₀ 0,208 mg/g e DL₇₀ 0,406 mg/g) e ao piretroide beta-ciflutrina (Bulldock 125 SC, 125 g/L – Bayer) após 24 horas. População de Ceará (CE). A, proteína total. B, lipídeo total. C, glicogênio. D, açúcar total. Barras seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey e Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.001$).

CAPÍTULO 4

Considerações finais

Os bicudos oriundos de campos de algodão do estado de Mato Grosso da região Centro-Oeste do Brasil possivelmente, em virtude da alta pressão de seleção, desenvolveram um mecanismo antioxidante que é herdado entre as gerações. Esse mecanismo, observado principalmente na sua capacidade proliferativa celular intestinal, possibilita a recuperação dos danos subletais, que por sua vez pode evitar a morte do inseto. Além do mais, isso pode ocorrer sem necessariamente afetar o equilíbrio fisiológico do organismo, pois a realocação de moléculas nutricionais sendo garantida, permite, desse modo, que processos essenciais, como a taxa reprodutiva, não seja afetada ou que tenha impactos menores.

O estudo dos mecanismos de respostas celulares de insetos pragas, em virtude da exposição a inseticidas, é viabilizado pelos ensaios bioquímicos e fisiológicos, destacadamente as dosagens de moléculas nutricionais e os efeitos morfo-histoquímicos e imunohistoquímicos de órgãos-alvo, que propiciam auxílio nas avaliações de diferentes populações.

Populações de *Anthonomus grandis* da região Nordeste, especificamente dos estados de Pernambuco e Ceará, eventualmente porque não tem alta proliferação celular intestinal, mostram-se mais suscetíveis a piretroides do que as populações de Mato Grosso. Além disso, os danos causados pelos óleos essenciais de *Juniperus virginiana* e *Melaleuca alternifolia*, inéditos para esta espécie de inseto, mostram que esses produtos são uma alternativa promissora para o controle de pragas. Comprovadamente porque além de apresentarem várias bioatividades em parâmetros

indispensáveis à sobrevivência desses organismos, como o desenvolvimento e a reprodução, podem atuar em combinações de sinergismo juntos ou não a produtos sintéticos. Entretanto, é importante que mais estudos sejam feitos com óleos e seus compostos a nível de campo, bem como, em relação a formulações, afim de otimizar o uso destes produtos nessas condições.