

EFEITOS SUBLETAIS DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS COM *Bacillus thuringiensis*
VAR. *aizawai* SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

GLAUCILANE DOS SANTOS CRUZ

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira)

RESUMO

Anualmente demanda-se um alto investimento no controle da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), sendo esta a principal praga da cultura do milho. Para conter esta demanda métodos alternativos tem sido desenvolvidos, incluindo a utilização de inseticidas botânicos, conhecidos como óleos essenciais, e agentes entomopatogênicos, como a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner. Estas alternativas adéquam-se aos propósitos do Manejo Integrado de Pragas, por serem seletivos, de baixa toxicidade a mamíferos e apresentarem eficiência contra várias espécies de pragas. Assim, testou-se a hipótese de que a associação dos óleos de pimenta longa e cravo da Índia nas concentrações 30 e 50 mg/L DMSO com Xentari[®] WG (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* - Bta) (1000 mg/L) produzem um controle eficiente de *S. frugiperda*, afetando parâmetros biológicos, imunológicos e reprodutivos, e se as concentrações destes óleos afetam a espermatogênese, a histoquímica dos ovários, bem como seu impacto na fertilidade. Os resultados demonstraram que o óleo de pimenta longa na concentração 50 mg/L associado ao Bta ocasionou menor sobrevivência larval, já o cravo da Índia não mostrou-se eficiente quando associado ao Bta formulado. Porém, ambos os óleos associados ou não ao Bta interferiram na biologia e na imunidade humoral de *S. frugiperda*. Todos os

tratamentos afetaram a viabilidade dos ovos exceto a testemunha e o cravo da Índia nas duas concentrações sem Bta. A análise histológica mostrou que os óleos de pimenta longa e cravo da Índia nas concentrações 30 e 50 mg/L afetaram a espermatogênese e histoquímica dos ovários de *S. frugiperda*, refletindo na sua reprodução. No entanto, os efeitos do óleo de pimenta longa, associado ou não ao Bta, foram mais expressivos, demonstrando ser uma ferramenta promissora no controle desta praga, adequando-se ao MIP, controlando a sobrevivência da prole e seu sucesso na cultura.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta do cartucho, pimenta longa, cravo da Índia, *Bacillus thuringiensis*, morfologia, desenvolvimento, imunologia.

EFEITOS SUBLETAIS DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS COM *Bacillus thuringiensis*
VAR. *aizawai* SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

by

GLAUCILANE DOS SANTOS CRUZ

(Under the direction of Professor Valéria Wanderley Teixeira)

ABSTRACT

A large investment is annually demanded to control the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), which is the major insect pest of corn. To contain this demand alternative methods have been developed, including the use of botanical insecticides, known as essential oils, and entomopathogenic agents such as the bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner. These alternatives are adequate to Integrated Pest Management purposes, by being selective, low toxic to mammals and present efficiency against various pest species. Thus, we tested the hypothesis that association of long pepper and cloves oils at the concentrations of 30 and 50 mg/L DMSO with Xentari[®] WG (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* - Bta) (1000 mg/L) produces an efficient control of *S. frugiperda*, affecting biological, immunological and reproductive parameters, and if those concentrations of these oils affect spermatogenesis, the histochemistry of the ovarioles, as well as its impact on fertility. The results demonstrated that long pepper essential oil at a concentration of 50 mg/L associated with Bta has promoted lower larval survival, and clove does not proved efficient when combined with the Bta formulated. However, both oils, associated or not to Bta, interfered on the biology and humoral immunity of *S. frugiperda*. All treatments showed ovicidal effect except clove oil at the two concentrations without Bta. Histological analysis showed that clove and long pepper oils at the

concentrations of 30 and 50 mg/L have affected spermatogenesis and the histochemistry of the ovarioles of *S. frugiperda*, reflecting on their reproduction. However, the effects of long pepper oil associated or not to Bta were more expressive, proving to be a promising tool to control this pest, adapting to MIP, controlling the survival of offspring and its success in the culture.

KEY WORDS: Fall armyworm, long-pepper, clove, *Bacillus thuringiensis*, morphology, development, immunology.

EFEITOS SUBLETAIS DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS COM *Bacillus thuringiensis*
VAR. *aizawai* SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

GLAUCILANE DOS SANTOS CRUZ

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

RECIFE - PE

Fevereiro - 2012

EFEITOS SUBLETAIS DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS COM *Bacillus thuringiensis*
VAR. *aizawai* SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

GLAUCILANE DOS SANTOS CRUZ

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

José Vargas de Oliveira - UFRPE

EFEITOS SUBLETAIS DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS COM *Bacillus thuringiensis*
VAR. *aizawai* SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

GLAUCILANE DOS SANTOS CRUZ

Orientador: _____
Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Examinadores: _____
Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

José Vargas de Oliveira – UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira - UFRPE

Aos meus pais, Antonia (*in memorian*) e Jair, por todo amor e carinho que me nutriram na minha caminhada. Ao meu marido Eduardo e ao meu filho Vinícius por me proporcionarem a oportunidade de formar uma família.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, pois antes do meu nascimento, quando eu ainda estava na barriga da minha mãe, Tu já me conhecias, me escolheste e me separastes (Jeremias 1:5), todos os meus caminhos estão diante de Ti (Salmos 119:118), ainda a palavra não me chegou aos lábios, mais Tu já as conheces (Salmos 139:4), Tu sonda-me e conheces o meu coração(Salmos 139:23) por isso a minha alma te louva.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós- Graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA), pela oportunidade de execução deste curso.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela continuação da mesma.

Aos meus pais Antonia Pádua dos Santos (*in memorian*) e Jair Faria Cruz, por me amar, educar, repreender, compreender, escutar, disciplinar, acolher, em fim, por regar minha vida com seus ensinamentos, hoje alicerçados na palavra de Deus. Obrigado por acreditarem em mim.

Ao meu marido Eduardo Albuquerque por me apoiar nos momentos mais difíceis, onde pude contar com seu ombro amigo, e nos momentos mais felizes pude contar com seu sorriso. Pois melhor é serem dois do que um, porque se um cair o seu companheiro o levanta, mais se estiver só, quem o levantará? Se dormirem juntos os dois se esquentarão, mais se estiver só quem o esquentará?. E se alguém prevalecer contra um, os dois lhe resistirão, pois o cordão de três dobras não se quebra com facilidade (Eclesiastes 4: 9-12).

Ao meu filho Vinícius Albuquerque por seu amor puro e sincero. Através da permissão de Deus foste gerado em meu ventre e com teu nascimento pude entender o que é ser mãe. Quando

olho para ti, filho amado entendo que Deus me ama muito, pois colocou em minha vida este lindo anjo chamado Vinícius. Teu amor me faz um ser humano melhor.

Aos meus irmãos Isabele e André por todo apoio, compreensão e amor dedicado a mim. A Avani (minha mãe adotiva) por cuidar do meu filho com tão primoroso amor e zelo, por todos os conselhos e cuidados para comigo e com minha família. E a Rose (esposa do meu pai), por me acolher em seu coração, abrir seus braços e seu lar para mim, por me amar e interceder pela minha vida.

A minha família cristã, no qual juntos constituímos o corpo de Cristo, vontade perfeita do Pai para nossas vidas. Aos meus Pastores Quintino Orengo e Tereza Catão por acreditar em mim, ensinar a palavra de Deus e por alicerçarem minha vida com suas orações e testemunho.

À minha Orientadora Valéria Wanderley Teixeira pelo exemplo de mãe, mulher, professora e pesquisadora. Por me orientar não apenas nas questões experimentais mais na vida. Seu amor e dedicação me ajudam a ser uma pesquisadora e um ser humano melhor. Te amo em Cristo Jesus.

Ao professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira pela dedicação, orientação, disponibilidade e tranqüilidade em todos os momentos.

Ao professor José Vargas de Oliveira pela orientação, acolhimento e pelos momentos de descontração.

Ao professor Claudio Augusto Gomes da Câmara do Departamento de Química/UFRPE pela extração do óleo de cravo da Índia.

Aos professores Jorge Braz Torres, Herbert Álvaro Abreu de Siqueira e a aluna Eliana Passos pelo auxílio na estatística.

As amizades conquistadas durante o curso que estiveram sempre ao meu lado. Em especial agradeço a Carolina Arruda, Alicely Correia, Lilian Ribeiro, Andresa Cristina, Alberto Belo, Mariana Breda, Tadeu Martins, Eliana Passos, Karjoene Cassimiro, Liliane Marques, Mateus

Campos, Jennifer Guimarães, Cinthia Matias, Carla Assis, entre outros, pelo companheirismo. Pessoas como vocês dão cor e sabor a minha vida. Quem encontra um amigo fiel terá encontrado um tesouro (Eclesiastes 4: 14). Eu encontrei vocês.

Aos colegas do Laboratório de Histologia e do Laboratório de Entomologia Agrícola pelos momentos de descontração e convivência que tornaram melhor e mais leve esta caminhada.

Aos demais professores do PPGEA, por me auxiliarem em mais uma etapa da minha caminhada acadêmica.

E a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para meu crescimento profissional e pessoal. Que Deus possa derramar bênçãos sem medidas sobre suas vidas.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	8
2 BIOATIVIDADE DOS ÓLEOS DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervum</i> JACQ.) E CRAVO DA ÍNDIA (<i>Syzygium aromaticum</i> L.) ASSOCIADOS OU NÃO A Bta FORMULADO NA BIOLOGIA E IMUNOLOGIA DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS.....	22
DISCUSSÃO.....	24
AGRADECIMENTOS.....	28
LITERATURA CITADA.....	28
3 EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE A ESPERMATOGÊNESE E HISTOQUÍMICA DOS OVARIÓLOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E SEU REFLEXO NA FERTILIDADE.....	44
RESUMO	45

ABSTRACT	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	48
RESULTADOS.....	50
DISCUSSÃO.....	52
AGRADECIMENTOS	56
LITERATURA CITADA.....	56

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais consumidos mundialmente que, juntamente com a soja contribui com aproximadamente 80% da produção de grãos, sendo considerada uma cultura de importância econômica e social (Duarte *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2006). O Brasil ocupa o 3º lugar no “ranking” mundial da produção de milho, seguido pelo México, França, Argentina e Índia, perdendo apenas para os Estados Unidos e China (Oda & Soares 2010).

O cultivo do milho no Brasil é realizado em duas épocas: a primeira ocorre no fim de agosto na região Sul, outubro e novembro nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, e no início do ano na região Nordeste. A segunda época ou “safrinha” refere-se ao milho de sequeiro, cultivado entre fevereiro e março, geralmente depois da colheita da soja precoce. Mesmo em condições de clima desfavoráveis, o plantio do milho “safrinha” tem-se conduzido dentro dos sistemas de produção, sendo gradualmente adaptado, produzindo melhores rendimentos das lavouras desta época (Duarte *et al.* 2006; Lima *et al.* 2006).

Condições climáticas, tais como, temperatura, radiação solar, disponibilidade de água, são fatores limitantes para o desenvolvimento desta cultura, e outro fator que contribui para a diminuição na produção é o ataque de pragas agrícolas. Dentre os insetos que atacam a cultura do milho citam-se: a lagarta rosca, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), lagarta da espiga, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* (Mots.) (Coleoptera: Curculionidae) e lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Duarte *et al.* 2006).

A *S. frugiperda* destaca-se como praga-chave do milho e apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a região central dos Estados Unidos até a Argentina e em algumas ilhas da Índia (Schmidt 2002). No Brasil, ocorre durante todo o ano, causando danos nas fases de desenvolvimento vegetativo até a fase reprodutiva da cultura, apresentando preferência pelo cartucho de plantas jovens. As perdas podem variar com a cultivar, local de semeadura e práticas agronômicas (Matos Neto *et al.* 2004; Silva *et al.* 2008).

As lagartas podem atacar a cultura do milho durante todo o estágio de crescimento, ocasionando redução na produtividade superior a 30%. Nos primeiros ínstaes alimentam-se dos tecidos verdes, começando pelas áreas mais suculentas, deixando apenas a epiderme membranosa, provocando o sintoma da folha raspada. Em seguida realizam orifícios nas folhas, ocasionando um aumento na transpiração foliar e diminuição da fotossíntese. Atacam também a base da espiga ou diretamente os grãos leitosos, onde permanecem até o empupamento. As lagartas podem penetrar também no colmo, através do cartucho, e realizar galerias descendentes, ocasionando o sintoma conhecido como coração morto (Cruz *et al.* 1995, Nakano *et al.* 2002). As plantas atacadas por esta praga podem ser facilmente identificadas devido à grande quantidade de fezes no local (Oliveira *et al.* 2006).

Devido ao seu hábito alimentar diversificado, provoca, também, injúrias em algumas culturas, tais como; alfafa (*Medicago sativa* L.), soja (*Glycine max* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), batata doce (*Ipomoea batatas* L.), repolho (*Brassica oleracea* V.), espinafre (*Spinacia oleracea* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), abóbora (*Cucurbita pepo* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), capim papuã (*Brachiaria plantaginea*), capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), grama-seda (*Cynodon dactylon* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) aveia (*Avena sativa* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.); ao todo, mais de 80 espécies de plantas distribuídas em mais de 20 famílias

botânicas (Cruz 1995, Castro *et al.* 2006, Correia 2008, Lima *et al.* 2009, Sá *et al.* 2009, Barros *et al.* 2010).

Estudos realizados por Giolo *et al.* (2002) sobre a biologia de *S. frugiperda* coletadas na cultura do milho em Santa Rosa e Pelotas, RS, mantidas em laboratório, à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, UR $70\pm 15\%$ e fotofase de 14 h, alimentadas inicialmente com o hospedeiro e em seguida com dieta artificial, demonstraram que o desenvolvimento embrionário perdurou por dois ou três dias, a duração da fase larval foi de 14,10 e 16,45 dias, a duração da fase pupal de 10,65 e 12,72 dias com ciclo total de 31,94 e 31,56 dias, respectivamente.

Os inseticidas sintéticos Carbaryl 75P, Carbaryl 480SC, Cypermethrin 200CE, Cyfluthrin, Esfenvalerate 250CE, Fenvalerate 200CE, Fenitrothion 500CE, Parathion 500CE, Malathion metil 600CE, Lambdacyalothrin 50CE, Permethrin 384CE e Thichlorfon 500CE são utilizados como tática preferencial no controle desta praga. Em razão de diversos fatores, como: persistência e toxicidade no meio ambiente, alto custo de produção das culturas e seleção de populações resistentes, tem se verificado uma crescente procura por medidas de controle alternativas que promovam controle efetivo da praga e que ocasionem menor impacto ao meio ambiente (Sarmiento *et al.* 2002, Lima *et al.* 2008, Lima *et al.* 2009).

Essas medidas incluem o uso de inseticidas biológicos, como agentes entomopatogênicos, por serem geralmente seletivos, de baixa toxicidade ao homem e animais, apresentarem eficiência contra várias espécies de pragas e por se adequarem aos propósitos do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Torres *et al.* 2001). Além disso, vem crescendo o interesse na utilização de compostos alternativos, derivados de plantas, conhecidos como óleos essenciais, que já fazem parte de formulações comerciais de inseticidas, capazes de matar e repelir insetos (Isman 2000).

Os produtos de origem botânica oferecem larga variedade de moléculas com grande diversidade nas suas estruturas e atividade biológica (Reigosa & Pedrol 2002). Também pode ser

considerada outra razão para o interesse crescente em fitotoxinas, a ampla gama de novos sítios de ação nos organismos-alvo. Nesse caso, mesmo que estas não estejam disponíveis para comercialização, podem indicar caminhos para a síntese de novos produtos (Duke *et al.* 2000).

Os óleos essenciais desempenham um importante papel na proteção das plantas, como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas. Eles podem, também, funcionar como atrativos, favorecendo animais que promovem a dispersão do pólen e sementes ou repelindo insetos indesejáveis. São oriundos de plantas aromáticas geralmente encontradas em países de clima tropical e temperado, podendo ser sintetizados a partir de brotos, folhas, flores, caules, galhos, sementes, frutos, raízes e cascas. Estas substâncias são armazenadas em células secretoras e canais da planta podendo ser extraídas por vários métodos, sendo o mais comum a hidrodestilação. Diferem quanto ao número de moléculas, variedades e tipo de extração (Angioni *et al.* 2006, Bakkali *et al.* 2006).

Alguns óleos têm mostrado efeito repelente e deterrente em insetos como, por exemplo, os obtidos das plantas das famílias Piperaceae e Myrtaceae, destacando-se as espécies pimenta longa (*Piper hispidinervum* J.) e o cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* L.) (Miranda 2002, Miranda *et al.* 2002, Estrela *et al.* 2005, Navickiene *et al.* 2006, Lima *et al.* 2009).

A pimenta longa é um arbusto comumente encontrado na Amazônia, é largamente utilizada pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas, por apresentar como principal constituinte o safrol (92%), seguidos do dilapiol e sarisan, concentrados principalmente nas folhas e ramos secundários (Miranda 2002; Zacaroni *et al.* 2009). É utilizada como matéria-prima para a produção de substâncias antiinflamatórias e fixadoras, despertando também o interesse da agricultura, devido às suas propriedades antimicrobianas e inseticidas (Bergo *et al.* 2005; Silva & Bastos 2007). Estudos realizados por Lima *et al.* (2009) em lagartas de *S. frugiperda*, tratadas com esse óleo, através do contato tópico e ingestão, demonstraram uma redução na atividade

alimentar, mortalidade, agitação e hiperatividade. Os autores sugeriram ainda a existência de uma atividade neurotóxica.

O cravo da Índia é uma árvore oriunda das ilhas Molucas, na Indonésia, que ocupa o primeiro lugar na produção, seguidos por Zanzibar e Madagascar (Mazzafera 2003). Os botões secos das flores são utilizados como especiaria desde a antiguidade, e vem sendo empregados na fabricação de medicamentos, cosméticos e na agricultura, por apresentarem em sua constituição química o eugenol, com aproximadamente 95% nas folhas, 70 a 85% nos botões florais, seguidos do acetato de eugenol com 10- 15%, e β -cariofileno com 5 a 12% (Raina *et al.* 2001). Esta constituição confere ao cravo da Índia propriedades inseticidas (El-Hag *et al.* 1999), bactericida (Dorman & Deans 2000, Nascimento *et al.* 2000) e fungicida (Delespaul *et al.* 2000).

Por outro lado, inseticidas biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*), devido a sua eficiência, baixa toxicidade para o homem e animais e também para diversos inimigos naturais de pragas, são de grande importância para serem avaliados, em programas de manejo integrado de pragas, inclusive de *S. frugiperda*, em cultivos de milho tradicional e orgânico (Martinez & Van Emden 2001, Siegel 2001, Martinez 2002).

Trata-se de uma bactéria encontrada no solo, produtora de cristais protéicos cry, também chamados de delta-endotoxinas. Estas proteínas atuam no mesêntero de insetos, associando-se a receptores específicos das microvilosidades intestinais, causando lise osmótica através da esporulação. Possuem alta toxicidade e especificidade, restringindo sua ação apenas aos organismos-alvo (Herrero *et al.* 2001, Siegel 2001). O produto foi lançado pela França em 1938, sendo atualmente responsável por cerca de 90% do faturamento de bioinseticidas (Siegel 2001, Polanczyk & Alves 2003, Ma *et al.* 2008). Segundo Bobrowski (2003), uma das principais vantagens que justificam a utilização deste bioinseticida, é a redução das perdas causadas pela

lagarta-do-cartucho, no uso de inseticidas químicos e a sua seletividade nos inimigos naturais e outros vertebrados.

Dentro desse contexto, a adoção de alternativas aos métodos tradicionais no controle *S. frugiperda* como, por exemplo, a utilização de óleos essenciais e de *B. thuringiensis* são perfeitamente justificáveis dentro de uma estratégia de MIP. Porém, vários estudos têm mostrado o efeito inibitório de óleos essenciais sobre microorganismos (Salgado *et al.* 2003, Mendonça 2004).

A habilidade de reconhecer a presença de um organismo ou de uma substância estranha é fundamental para o sistema imunológico de qualquer ser vivo (Negreiro *et al.* 2004). Sendo assim os insetos desenvolveram um eficiente sistema de defesa contra elementos estranhos, constituído por duas linhas (Chapman 1998). A primeira é formada por barreiras estruturais passivas, compostas pelo exoesqueleto, sistemas respiratório e digestivo. Nesta linha a cutícula funciona como a principal barreira sendo rompida apenas por alguns fungos e nematóides. Entre a cutícula e a hemocele estes microorganismos deparam-se com vários agentes antimicrobianos cuja ação é inibir seu crescimento e penetração. A segunda linha é formada pelos mecanismos celulares e humorais (Lavine & Strand 2002, Silva 2002, Schmid-Hempel 2005).

As reações celulares são realizadas na hemolinfa pelos hemócitos, através dos processos de fagocitose, encapsulamento, nodulação e citotoxicidade (Meyer- Fernandes *et al.* 2000, Schmidt *et al.* 2001). Estes agem em associação com as defesas humorais, onde se incluem a produção de peptídeos antimicrobianos (Lowenberger 2001), reações intermediárias de oxigênio e nitrogênio (Bogdan *et al.* 2000, Vass & Nappi 2001), complexos enzimáticos que regulam a coagulação e a melanização. Contudo o sucesso destas defesas depende do número e tipo de hemócitos envolvidos nestes processos.

Outra forma de sobrevivência dos insetos e a capacidade de produzir descendentes. Esta capacidade é modulada por diversos fatores, dos quais, incluem-se temperatura, alimentação, feromônios, ingestão de substâncias nocivas, entre outros. Alguns óleos essenciais apresentam propriedades químicas que afetam diretamente a reprodução de insetos praga (Paranhos *et al.* 2005, Birah *et al.* 2010).

Estudos realizados por Silva *et al.* (2009) sobre os efeitos de diversos óleos na reprodução de *Euborellia annulipes* (Lucas) (Dermaptera: Anisolabididae) demonstraram que o óleo essencial de erva doce (*Fuenicunlum vulgare* Mill.) e de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) apresentaram uma ação inibidora de oviposição, interferindo no funcionamento do sistema reprodutor deste inseto. O percentual de ovos/postura foi de 9,50% e 18,30%, respectivamente, em relação à testemunha que obteve 44%. Birah *et al.* (2010) observaram que extratos de cravo da Índia proporcionaram em mariposas do gênero *Spodoptera* uma ação inseticida, reduzindo crescimento, desenvolvimento, fecundidade e fertilidade desse inseto. Efeitos ocasionados na reprodução pela utilização de óleos essenciais também foram observados por Castro *et al.* (2006), ao testarem o óleo essencial de mil folhas (*Achillea millefolium* L.) nas concentrações de 0, 1, 2, 5 e 10 ppm em *S. frugiperda*, observaram que na concentração de 2 ppm não ocorreu oviposição, evidenciando que o mesmo afetou diretamente a reprodução deste inseto.

O aparelho reprodutor masculino dos insetos é constituído, geralmente, por um par de testículos, por onde saem os vasos deferentes, desembocando na vesícula seminal, reunindo-se no ducto ejaculador (Chapman 1998). Dentro de cada testículo encontram-se os folículos testiculares, os quais são formados por quatro regiões distintas: o germário, constituído por células germinativas primordiais; zona de crescimento, localizada após o germário com numerosos cistos de espermatogônias; zona de divisão e redução, constituída por espermátocitos primários e

secundários e a zona de transformação onde se encontram espermátides em diferentes estágios de desenvolvimento e espermatozóides agrupados em feixes (Vargas 2007).

O aparelho reprodutor feminino consiste em um par de ovários, formado por ovariolos ligados pelo pedicelo aos ovidutos laterais, e este ao oviduto comum, que se abre na câmara genital denominada vagina, sendo ligada ao exterior pela vulva (Chapman 1998). Nos ovariolos ocorre o processo de oogênese, produção do óvulo maduro, apto para a fecundação (Buning 1994).

Embora os estudos com os óleos essenciais de pimenta longa e cravo da Índia tenham demonstrado diversas atividades sobre insetos, como mortalidade, deterrência, neurotoxicidade, entre outros, não há relatos sobre a atividade destes óleos associados a formulações de *Bt* sobre os parâmetros biológicos e imunológicos de *S. frugiperda*. Outro aspecto a ser analisado é a escassez de pesquisas com óleos essenciais sobre a espermatogênese e oogênese em insetos. Assim, a presente pesquisa testou as seguintes hipóteses: 1. Óleo de pimenta longa e cravo da Índia interferem na atividade do inseticida biológico Xentari[®] WG (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai*); 2. Óleos de pimenta longa e cravo da Índia associados ao Xentari[®] agem sinergicamente interferindo na sobrevivência diária, peso das lagartas de *S. frugiperda*, duração do período larval, peso pupal, duração do período pupal, razão sexual, fecundidade, fertilidade e aspectos imunológicos (produção de óxido nítrico e fenoloxidase), e 3. Óleos de pimenta longa e cravo da Índia afetam a histofisiologia reprodutiva de *S. frugiperda* interferindo na espermatogênese e na constituição do vitelo.

Literatura Citada

- Angioni, A., A. Barra, V. Coroneo, S. Dessi & P. Cabras. 2006.** Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food. Chem.* 54: 4364-4370.
- Bakkali F., S. Averbeck, D. Averbeck, A. Zhiri, D. Baudoux & M. Idaomar. 2006.** Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Scienc. Direct* 606: 27-38.
- Barros, E.M., J.B. Torres, J.R. Ruberson & M.D. Oliveira. 2010.** Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. *Entomol. Exp. Appl.* 137: 237-245.
- Bergo, C.L., H.A. Mendonça & M.R. Silva. 2005.** Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo essencial. *Acta Amaz.* 35: 111-117.
- Birah, A., T.V.R.S. Sharma, S. Singh & R.C. Srivastava. 2010.** Effect of aqueous leaf extract of cloves (*Syzygium aromaticum*) on growth and development of tobacco caterpillar (*Spodoptera litura*). *Indian J. Agr. Sci.* 80: 534-537.
- Bobrowski, V.L., L.M. Fiuza, G. Pasquali & M.H.B. Zanettini. 2003.** Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciênc. Rural* 33: 843-850.
- Bogdan, C., M. Rollinghoff & A. Diefenbach. 2000.** Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 64-76.
- Buning, J. 1994.** The insect ovary. Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. Chapman & Hall, Weinheim, 400p.
- Castro, D.P., M.G. Cardoso, J.C. Moraes, N.M. Santos & D.P. Baliza. 2006.** Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8: 27-32.
- Chapman, R.F. 1998.** The Insects: structure and function, 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press, 788p.
- Correia, A.A. 2008.** Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) tratadas com Nim (*Azadirachta indica* A). Dissertação de Mestrado, UFRPE, Recife, 45 p.
- Cruz, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete lagoas, Embrapa, 45p. (Circular Técnico 21).
- Cruz, I., J.M. Waquil, P.A. Viana, F.H. Valicente. 1995.** Pragas: diagnóstico e controle. *Arq. Agron.* 2: 10-14.

- Delepaul, Q., V.G. Billerbeck, C.G. Roques, G. Michel, C. Marquier-Vinuales & J.M. Bessiere. 2000.** The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *J. Essent. Oil Res.* 12: 256-266.
- Dorman, H.J.D. & S.G. Deans. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.
- Duarte, J.O., J.C. Cruz, J.C. Garcia & M.J. Cardoso. 2006.** Embrapa Sistemas de Produção. Disponível em: www.embrapa.br. Acessado em: 23/11/2009.
- Duke, S.O., F.E. Dayan & A.M. Rimando. 2000.** Natural products and herbicide discovery, p. 105-133. In A.H. Cobb & R.C. Kirkwood Cobss (eds.), *Herbicides and their mechanisms of action*. Sheffield, Sheffield Academic Press, 133p.
- El-hag, E.A., A.H. El-nadi & A.A. Zaitoon. 1999.** Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). *Phyto. Res.* 13: 388-392.
- Estrela, J.L.V., R.N.C. Guedes, C.R.A. Maltha, L.C. Magalhães & M. Fazolin. 2005.** Toxicidade de amidas análogas à piperina para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Magistra* 17: 69-75.
- Giolo, F.P., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia & G.R. Busato. 2002.** Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. *Rev. Bras. Agrocienc.* 8: 219-224.
- Herrero, S., B. Oppert & J. Ferré. 2001.** Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1085-1089.
- Isman, M. B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603-608.
- Lavine, M. D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.
- Lima, F.W.N., O.S. Ohashi, F.R.S. Souza & F.S. Gomes. 2006.** Avaliação de acessos de milho para resistência a *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. *Acta Amaz.* 36: 147-150.
- Lima, R.K., M. G. Cardoso, J.C. Moraes, S.S. Vieira, B.A. Melo & C.C. Filgueiras. 2008.** Composition of the essential oils from the japanese star *Illicium verum* L. and Lemon grass *Cymbopogon citrates* (DC. Stapaf: evaluation of their repellent effects on *Brevicornye brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). *Bioassay* 3: 8-13.
- Lima, M.P., J.V. Oliveira & E.J. Marques. 2009.** Manejo da lagarta-do-cartucho em milho com formulações de nim e *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*. *Ciê. Rural* 39: 1227-1230.
- Lowenberger, C.A. 2001.** The innate immune response of *Aedes aegypti*. *Biochem. Mol. Biol.* 31: 219-229.

- Ma, X., X. Liu, X. Ning, B. Zhang, F. Han, X. Guan, Y. Tan & Q. Zhang. 2008.** Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic. *J. Invertebr. Pathol.* 99: 123-128.
- Martinez, S.S. 2002.** O nim – *Azadirachta indica*: Natureza, usos múltiplos, produção. Londrina, Instituto Agronômico do Paraná, 142p.
- Martinez, S.S. & H.F. Van Emden. 2001.** Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotrop. Entomol.* 30: 113-125.
- Matos Neto, F.C., I. Cruz, J.C. Zanuncio, C.H.O. Silva & M.C. Picanço. 2004.** Parasitism by *Campoletis flavicineta* on *Spodoptera frugiperda* in corn. *Pesqu. Agropecu. Bras.* 39: 1077-1081.
- Mazzafera, P. 2003.** Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-india e eugenol. *Rev. B. Bot.* 26:231-238.
- Mendonça, A.T. 2004.** Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa. Tese de Doutorado, UFLA, Lavras, 72p.
- Meyer-Fernades, J.R., H. Lanz-Mendonza & K.C. Gondim. 2000.** Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in hemocytes of larval *Manduca sexta*. *Arch. Biochem. Biophys.* 328: 152-159.
- Miranda, E.M. 2002.** Caracterização e avaliação produtiva de uma população nativa de Pimenta Longa (*Piper hispidinervum*) no Seringal Cachoeira, AC. Brasil. *Acta Amaz.* 32: 9-20.
- Miranda, J.E., J.E.M. Oliveira, K.C.G. Rocha, S.A. Bortoli, H.M.D. Navickiene, M.J. Kato & M. Furlan. 2002.** Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Bras. Ol. Fibras* 6: 557-563.
- Nakano, O., N.S. Silveira, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., Sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Entomol. Agríc.* 10: 920-925.
- Nascimento, G.G.F., J. Locatelli, P.C. Freitas & G.L. Silva. 2000.** Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bactéria. *J. Microbiol.* 31: 247-256.
- Navickiene, H.M.D., A.A. Morandim, M.O.M. Marques, M.C.M. Young & M.J. Kato. 2006.** Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*. *Quim. Nova* 29: 467-470.
- Negreiro, M.C.C., F.G. Andrade & A.M.F. Falleiros. 2004.** Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. *Cienc. Agr.* 25: 293-308.

- Oda, L.M. & B.E.C. Soares. 2010.** Biotecnologia no Brasil. Aceitabilidade pública e desenvolvimento econômico. *Parc. Estrateg.* 10: 162-173.
- Oliveira, M.S.S., A.R. Roel, E.J. Arruda & A.S. Marques. 2006.** Efficiency of extracts of plantas in controlo fall armyworm in corn *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec.* 31: 326-331.
- Paranhos, B.A.J., C.C. Custódio, N.B.M. Neto & A.S. Rodrigues. 2005.** Extrato de neem e cravo da Índia no controle de *Zabrotes Subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) em sementes de feijão armazenado. *Colloq. Agrariae* 1: 1-7.
- Polanczyk, R. & S. Alves. 2003.** *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. *Agrociência* 7: 1-10.
- Raina, V.K., S.K. Srivastava, K.K. Aggarwa, K.V. Syamasunda & S. Kumar. 2001.** Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. *J. Flav. Frag.* 16: 334-336.
- Reigosa, M. & N. Pedrol. 2002.** Allelopathy from molecules to ecosystems. Plymouth, Science Publishers, 316p.
- Sá, V.G.M., B.V.C Fonseca, K.G.B Boregas & J.M. Waquil. 2009.** Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. *Neotrop. Entomol.* 38: 108-115.
- Salgado, A.P.S.P., M.G. Cardoso, P.E. Souza, J.A. Souza, C.M.P. Abreu & J.E.B.P Pinto. 2003.** Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolares sorokiniana*. *Ciênc. Agrotecnol.* 27: 249-254.
- Sarmaneto, R.A., R.W.S. Aguiar, R.A.S.S. Aguiar, S.M.J. Viera, H.G. Oliveira & A.M. Holtz. 2002.** Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), em milho no Brasil. *Biosci. J.* 18:41-48.
- Schmidt, F.B. 2002.** Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron na cultura do milho. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP, São Paulo, 63p.
- Schmid-Hempel, P. 2005.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 529-551.
- Schmidt, O., U. Theopold & M.R. Strand. 2001.** Innate immunity and evasion by insect parasitoids. *Bioassay* 23: 344-351.
- Siegel, J.P. 2001.** The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. *J. Invert. Pathol.* 77: 13-21.

- Silva, C.C.A. 2002.** Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotechnol. Cienc. Desenv.* 24: 68-72.
- Silva, A.B., E.B. Beserra & J.P. Dantas. 2008.** Utilização de *Metarhizium anisopliae* e extratos vegetais para o controle de *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* (Lepdoptera: Noctuidae) em milho. *Eng. Ambient.* 5: 77-85.
- Silva, D.M. & C.N. Bastos. 2007.** Antifungal activity of essential oils of Piper species against *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora capsici*. *Fitopatol. Bras.* 32: 143-145.
- Silva, A.B., J.L. Batista & C.H. Brito. 2009.** Influência de produtos de origem vegetal na oviposição e no desenvolvimento embrionário de *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae). *Eng. Ambien.* 6: 54-65.
- Torres, M., F.R.M. Espinosa & J.L. Argón. 2001.** Ultrasonic wedges for elastic wave bending and splitting without requiring a full band gap. *Phys. Rev. Lett.* 86: 4282-4285.
- Vargas, P.S.R. 2007.** Modificações do aparelho reprodutor de *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) após exposição a deltametrina. Dissertação de Mestrado, UFV, Viçosa, 63p.
- Vass, E. & A.J. Nappi. 2001.** Fruit fly immunity. *Bioassay* 51: 529-535.
- Zacaroni, L.M., M.G. Cardoso, P.E. Souza, F.A. Pimentel, L.G.L. Guimarães & A.P.S.P. Salgado. 2009.** Potencial fungitóxico de óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Amaz.* 39: 183-188.

CAPÍTULO 2

BIOATIVIDADE DOS ÓLEOS DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervum* JACQ.) E
CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum* L.), ASSOCIADOS OU NÃO AO Bta
FORMULADO, NA BIOLOGIA E IMUNOLOGIA DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

GLAUCILANE S. CRUZ¹, JOSE V. OLIVEIRA¹, VALERIA WANDERLEY-TEIXEIRA², ÁLVARO A.C.
TEIXEIRA², ALICELY A. CORREIA¹, THIAGO J.S. ALVES¹, FRANKLIN M. CUNHA¹

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

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

¹Cruz, G.S., J.V. Oliveira, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, A.A. Correia, T.J.S. Alves & F.M. Cunha. Bioatividade dos óleos de pimenta longa (*Piper hispidinervum* Jacq.) e cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* L.), associados ou não ao Bta formulado na biologia e imunologia de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). A ser submetido ao Journal of Essential Oil Research.

RESUMO- A utilização de óleos essenciais e inseticidas biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) constitui uma importante alternativa no controle de insetos-praga, em programas de manejo integrado, devido à eficiência, baixa toxicidade para mamíferos, seletividade a inimigos naturais e ausência de efeitos indesejáveis ao meio ambiente. Devido à importância de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como praga-chave do milho e em diversas culturas, o presente trabalho objetivou testar as seguintes hipóteses: 1. Avaliar se a associação dos óleos de pimenta longa e cravo da Índia nas concentrações 30 e 50 mg/L DMSO com Xentari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* - Bta) (1000 mg/L) produz um controle mais eficiente de *S. frugiperda*, afetando parâmetros biológicos e reprodutivos; 2. E se associação desses óleos com Bta promove alterações dos níveis de fenoxidase e óxido nítrico (NO) na hemolinfa de *S. frugiperda*. Os resultados demonstraram que o óleo essencial de pimenta longa na concentração de 50 mg/L, associado ao Bta, promoveu menor sobrevivência larval, e que cravo da Índia não foi eficiente, em associado ao Bta. Porém, ambos os óleos associados ou não a este inseticida interferiram na biologia e na imunidade humoral de *S. frugiperda*. Todos os tratamentos afetaram a viabilidade dos ovos exceto a testemunha e o cravo da Índia nas duas concentrações sem Bta. Portanto, a associação desses óleos com o inseticida Bta mostrou-se promissora no manejo integrado deste inseto.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta do cartucho, imunidade humoral, desenvolvimento, óleos essenciais, *Bacillus thuringiensis*

BIOACTIVITY OF LONG PEPPER (*Piper hispidinervum* JACQ.) AND CLOVE
(*Syzygium aromaticum* L.) OILS, ASSOCIATED OR NOT TO FORMULATED Bta ON THE
BIOLOGY AND IMMUNOLOGY OF *Spodoptera frugiperda* (JE SMITH) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)

ABSTRACT- The utilization of essential oils and biological insecticides based on *Bacillus thuringiensis* (Berliner) represents an important alternative to control insect pests in integrated pest management programs, represents an important alternative to control insect pests in integrated pest management due to its efficacy, low toxicity to mammals, selectivity to natural enemies and the absence of environmental side effects. Given the importance of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) as a key pest of corn, as well as a host of several crops, this study aimed to test the following hypotheses: Evaluate if the association between long pepper and clove oils at the concentrations of 30 e 50 mg/L DMSO with Xentari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* - Bta) (1000 mg/L) produces a more efficient control of *S. frugiperda*, affecting biological and reproductive parameters; 2. And if the association of these oils with Bta promotes changes in the levels of phenoloxidase and nitric oxide (NO) in *S. frugiperda* hemolymph. The results demonstrated that long pepper essential oil at a concentration of 50 mg/L associated to Bta promotes reduced larval survival, and that clove oil was not effective when associated to Bta. However, both oils associated or not to the insecticide affect the biology and humoral immunity of *S. frugiperda*. All treatments effect the eggs viability, except for the control and cloves from india in two concentrations without Bta. Therefore, the association of these oils with Bta insecticide seems to be promising in the integrated management of this insect.

KEYWORDS: Fall armyworm, humoral immunity, development, essential oils, *Bacillus thuringiensis*

Introdução

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das pragas mais polífagas de culturas no Brasil, destacando-se como a mais destrutiva na cultura de milho, por ocasionar perdas na produção de até 34% (Silva *et al.* 1997, Wiseman 1999, Dequech *et al.* 2007). Segundo Ferreira *et al.* (2010), no ano de 2009, os gastos para o controle de *S. frugiperda* no Brasil superaram 758 milhões de reais na primeira safra e 444 milhões na segunda, chegando a um valor total de 1,2 bilhão/ano.

O aumento do custo de produção, o conhecimento sobre os efeitos indesejáveis dos inseticidas químicos, associados à preocupação dos consumidores com a qualidade dos alimentos, tem ocasionado o interesse dos estudos sobre técnicas alternativas de controle, como a utilização de inseticidas de origem botânica (Isman 2000, Tavares 2002) e biológicos (Arango *et al.* 2002, Uribe *et al.* 2003)

Óleos obtidos de plantas das famílias Piperaceae e Myrtaceae com ênfase nas espécies pimenta longa (*Piper hispidinervum* Jacq.) e o cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* L.), respectivamente, tem demonstrado efeitos repelente e deterrente em diversos insetos (Miranda 2002, Miranda *et al.* 2002, Estrela *et al.* 2005, Navickiene *et al.* 2006, Lima *et al.* 2009).

A utilização de inseticidas biológicos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) constitui outro método alternativo aos inseticidas sintéticos. Seu modo de ação ocorre em receptores específicos no intestino médio dos insetos através da ação das delta-endotoxinas ou dos cristais protéicos com características inseticidas, onde as bactérias sofrem esporulação, ocasionando lise osmótica e conseqüentemente a morte do inseto (Bravo *et al.* 1998, Tremiliosi *et al.* 2008).

A associação de métodos de controle que objetivem potencializar o controle de inseto-praga é uma das estratégias do Manejo Integrado de Pragas, assim a associação de óleos

essenciais e *B. thuringiensis* pode constituir uma interessante estratégia de controle. No entanto, além da propriedade inseticida, óleos essenciais podem apresentar propriedades antimicrobiana, bactericida e fungicida (Nascimento *et al.* 2000, Delespaul *et al.* 2000, Silva & Bastos 2007). Portanto, em resposta a exposição da associação de óleos essenciais e formulações de Bt, pode haver alterações biológicas e imunológicas que podem ser determinantes ou não para a sobrevivência do inseto.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou testar as seguintes hipóteses: 1. Avaliar se a associação de óleos essenciais (pimenta longa e cravo da Índia) com Bt formulado produz um controle mais eficiente de *S. frugiperda*, afetando a atividade alimentar, alterando os estágios de desenvolvimento, promovendo deformidades em pupas e adultos, e inibindo a oviposição, entre outras. 2. E se associação desses óleos essenciais com Bt formulado promove alterações dos níveis de fenoloxidase e óxido nítrico (NO) na hemolinfa de *S. frugiperda*. Uma vez que essas substâncias participam na defesa do inseto promovendo melanização em resposta à presença de bactérias (Silva *et al.* 2002, Negreiro *et al.* 2004) e pela liberação de compostos reativos de nitrogênio e oxigênio. Nos insetos, esta reação, ocorre pela ação de hemócitos em resposta à presença de organismos estranhos, tais como patógenos (Nappi *et al.* 2000, Foley & O Farel 2003, Faraldo *et al.* 2005).

Material e Métodos

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

Obtenção e Criação dos Insetos. Lagartas de *S. frugiperda* foram obtidas da criação estoque do Laboratório de Entomologia Agrícola, mantidas à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa

de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12h, sendo alimentadas com folhas de milho do híbrido duplo AG 1051. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, com duas plantas/vaso de 5L, contendo solo + húmus de minhoca na proporção 2:1 + 12,13 g de N-P-K (formulação 4-14-8).

Obtenção dos Óleos Essenciais. O cravo da Índia foi adquirido em casas comerciais de especiarias na cidade do Recife, PE, e no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos do Departamento de Química da UFRPE foi submetido à hidrodestilação por 2 h. O óleo essencial foi extraído por meio de um aparelho tipo Clevenger modificado, posteriormente separado da água, seco com Na_2SO_4 anidro e armazenado à baixa temperatura em recipiente escuro hermeticamente fechado. O rendimento do óleo foi calculado com base no peso do material fresco. O óleo de pimenta longa, extraído das folhas, por sua vez, foi obtido da Embrapa – Acre. As emulsões dos óleos foram preparadas no laboratório de Entomologia Agrícola da UFRPE.

Teste de Fitotoxicidade. Com o objetivo de testar a fitotoxicidade dos óleos de cravo da Índia e pimenta longa, realizou-se um ensaio preliminar, utilizando-se as concentrações de 1000; 500; 250; 125; 60; 50; 30 mg/L em água destilada. Para cada concentração foram utilizados dez pedaços de folha de milho com aproximadamente 8,0 x 4,5 cm, cada pedaço constituindo uma repetição. As folhas foram imersas nas emulsões durante dez segundos e colocadas para secar sobre papel toalha. Em seguida, foram avaliados os níveis de fitotoxicidade em cada pedaço de folha, considerando-se o tamanho das áreas queimadas, sendo classificadas como leve, moderada e intensa (Fig 1). Para os testes de bioatividade dos óleos sobre os parâmetros biológicos e imunológicos, foram utilizadas concentrações que apresentaram leve fitotoxicidade.

Instalação dos Bioensaios. Pedaços de folhas de milho do híbrido duplo AG 1051, com aproximadamente 8,0 x 4,5 cm, foram imersas nas seguintes concentrações dos tratamentos: óleo de pimenta longa e de cravo da Índia (30 e 50 mg/L), Xentari[®] WG (*B. thuringiensis* subsp.

aizawai - Bta) (100 mg/L), óleo de pimenta longa + Bta (30 e 50 mg/L e 1000 mg/L, respectivamente), óleo de cravo da Índia + Bta (30 e 50 mg/L e 1000 mg/L, respectivamente). Para a testemunha, as folhas foram imersas apenas em DMSO e água destilada. Após imersão durante 10 segundos, cada pedaço de folha foi submetida à secagem e oferecida às larvas de *S. frugiperda* com 10 dias de idade, com peso médio de aproximadamente 78,15 mg (3^o instar), durante 48 horas. Em seguida, as larvas foram alimentadas com folhas não tratadas, substituídas diariamente, até a fase de pupa. As larvas foram pesadas no 5^o dia após a instalação do experimento e as pupas 24 horas após a formação, as quais foram mantidas em tubos de vidro até a emergência de adultos. Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: sobrevivência diária das larvas, peso e período larval, peso e período pupal, razão sexual e longevidade. Cada tratamento constou de 50 larvas individualizadas em tubos de fundo chato (25 x 85 mm), vedados com plástico filme. Utilizaram-se cinco repetições, com dez larvas cada, além da testemunha. Para avaliação do número de ovos e larvas eclodidas utilizou-se dois casais por gaiola com cinco repetições por tratamento. Os casais foram acondicionados em gaiola de PVC com dimensões de 10 cm x 15 cm (diâmetro e altura), revestido internamente com papel contínuo, como substrato para oviposição. As mariposas foram alimentadas com solução de mel a 10%, e mantidas em câmara climatizada. Todo o experimento foram realizados nas seguintes condições: temperatura de $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, $67 \pm 0,7\%$ de UR e fotofase de 12 h. As posturas foram coletadas diariamente e acondicionadas em placas de Petri com dimensões de 10 cm de diâmetro e posteriormente mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, contou-se o número total de ovos e o número de larvas eclodidas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD a 0,05% de significância usando o programa SAS (SAS Institute, 2001).

Dosagem de Óxido Nítrico. A produção de óxido nítrico na hemolinfa das larvas submetidas aos tratamentos foi determinada usando o reagente de Griess (Green *et al.* 1981), sendo avaliada pela concentração do íon nitrito (NO^{2-}). Para isso, foram coletados 10 μL de hemolinfa por larva. Um *pool* de 50 μL de hemolinfa foi adicionado em 70 μL de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% (H_3PO_4), caracterizando uma repetição. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento. As titulações do NO^{2-} foram obtidas após cinco minutos de incubação em temperatura ambiente, através de 50 μL de cada amostra (hemolinfa/sulfanilamida) mais 50 μL de NEED (dihidroclorito de naftiletienoamina) a 0,1% (Faraldo *et al.* 2005). A leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas (ELx800 - Biotek[®]) com filtro 562nm e do programa Gen5 Elisa (Biotek[®]). A curva padrão foi obtida com concentrações crescentes de nitrito de sódio 0,8–200 μM . A quantidade de nitrito das amostras foi correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, empregando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute 2001) e transformados para Log (x) para assumir normalidade.

Atividade da Fenoloxidase. Amostras de 10 μL de hemolinfa/larva/tratamento foram diluídas em 300 μL de tampão fosfato de sódio a 0,1M e mantidas em freezer -20°C até sua utilização. Foram transferidas três repetições de 50 μL da mistura hemolinfa/tampão para microplacas de 96 poços. A ativação da fenoloxidase foi realizada pelo uso de 50 μL L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) 4g/L (Sigma-Aldrich, St. MO, USA). A absorbância foi obtida em leitora de microplacas (ELx800 - Biotek[®]) com filtro 492nm em intervalos de dois minutos, durante 2h. Cada tratamento constou de dez repetições de cinco larvas cada. A atividade específica da fenoloxidase foi obtida durante a fase linear da reação nos 20 minutos iniciais de avaliação. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade,

empregando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute 2001) e os dados transformados em \sqrt{x} para assumir normalidade.

Resultados

Sobrevivência Larval. Os óleos essenciais associados ou não ao Bta reduziram a sobrevivência larval em comparação à testemunha, destacando-se o tratamento com pimenta longa na concentração de 50 mg/L + Bta, seguido do tratamento com pimenta longa na mesma concentração. Entretanto, no 14^o dia os tratamentos Bta e pimenta longa na concentração de 30 mg/L + Bta tiveram comportamento semelhante aos tratamentos mencionados (Fig. 2).

O óleo de cravo da Índia nas concentrações 30 e 50 mg/L apresentou menor percentagem de sobrevivência, em relação aos demais tratamentos durante todo o período de avaliação. Porém, quando associado ao Bta e este quando sozinho apresentaram maior percentagem de sobrevivência, em relação à testemunha até a metade do período de avaliação. Após este período, observou-se redução na sobrevivência das larvas tratadas com Bta, seguido do óleo de cravo da Índia nas concentrações de 30 e 50 mg/L + Bta (Fig. 3).

Pesos, Períodos Larval e Pupal e Razão Sexual. A análise estatística do peso larval (Tabela 1) mostrou que o tratamento Bta apresentou a menor média, diferindo apenas da testemunha e pimenta longa na concentração 50 mg/L. O tratamento com o óleo de pimenta longa na concentração 30 mg/L associado ou não ao Bta reduziu significativamente o período larval. Para o peso pupal, o tratamento com Bta teve o mesmo comportamento para o parâmetro peso larval, porém também diferiu do tratamento com pimenta longa na concentração 30 mg/L. Já o período pupal foi menor no tratamento pimenta longa 30 mg/L + Bta, diferindo de pimenta longa nas duas concentrações e do Bta. Não se observou diferença significativa para o parâmetro razão sexual.

Os parâmetros biológicos para o tratamento com o óleo de cravo da Índia, associado ou não ao Bta e apenas este, demonstraram que todos os tratamentos reduziram significativamente o peso larval em relação à testemunha (Tabela 2). Para o período larval, os tratamentos com os óleos sem adição do Bta mostraram as maiores médias diferindo apenas da testemunha e do Bta. Para o peso pupal, todos os tratamentos com cravo da Índia reduziram significativamente, em relação à testemunha. O período pupal foi alongado nos tratamentos cravo da Índia nas duas concentrações associado ao Bta. A razão sexual não diferiu entre os tratamentos.

Longevidade. Pimenta longa na concentração 50 mg/L reduziu, consideravelmente, a longevidade dos insetos, vindo em seguida, Bta, pimenta longa 50 mg/L + Bta, pimenta longa 30 mg/L + Bta e pimenta longa 30 mg/L, em relação à testemunha (Fig. 4).

No bioensaio com cravo da Índia (Fig. 5), a menor longevidade foi observada para o tratamento Bta, seguido dos tratamentos com 30, 50 mg/L e 50 mg/L associado ao Bta que não apresentaram diferença entre si. O tratamento com cravo da Índia na concentração de 30 mg/L + Bta apresentou uma maior longevidade comparada aos demais tratamentos.

Número Total de Ovos e Larvas Eclodidas. Todos os tratamentos reduziram, significativamente, o número de ovos em comparação à testemunha (Tabela 3), ressaltando que as menores médias foram visualizadas para os tratamentos com o óleos nas menores concentração (30 mg/L) sem adição de Bta. Com relação ao número de larvas eclodidas verificou-se que os tratamentos com óleo de pimenta longa, associados ou não com o Bta e cravo da Índia + Bta apresentaram as menores médias, diferindo da testemunha.

Dosagem de Óxido Nítrico. As larvas tratadas com o óleo de pimenta longa na concentração 50 mg/L associado ao Bta apresentaram a maior média da produção de óxido nítrico diferindo apenas dos tratamentos pimenta longa 50 mg/L e da testemunhas (Tabela 4).

Atividade da Fenoloxidase na Hemolinfa. Houve um aumento na atividade da enzima fenoloxidase nas larvas submetidas ao tratamento de pimenta longa na concentração 30 mg/L associado ao Bta e uma diminuição na atividade dessa enzima no tratamento com cravo da Índia na concentração 30 mg/L. Os demais tratamentos não diferiram da testemunha (Tabela 5)

Discussão

A sobrevivência larval de *S. frugiperda* foi afetada pelos tratamentos. Na avaliação com o óleo de pimenta longa os resultados foram mais expressivos na maior concentração associado ou não ao Bta. Para o cravo da Índia a eficiência foi observada sem a associação com Bta nas duas concentrações. Isso sugere um efeito inibidor do óleo de cravo da Índia sobre a atividade do Bta, pois de acordo com Cox *et al.* (2000), Lambert *et al.* (2001), Oussalah *et al.* (2006) alguns óleos essenciais atuam nas bactérias danificando seu citoplasma e a membrana da parede celular, podendo levar ao vazamento de macromoléculas e lise celular. Além disso, há relatos de que o eugenol, substância majoritária do cravo da Índia, possui atividade bactericida (Dorman & Deans 2000, Oussalah *et al.* 2006, Pereira *et al.* 2008), fato que pode ter ocorrido em nossos resultados mesmo com baixas concentrações desse óleo.

Os óleos de pimenta longa e cravo da Índia reduziram, significativamente, o número total de ovos em todas as concentrações testadas com ou sem associação com o Bta. No entanto, o efeito na viabilidade dos ovos não foi evidenciado no óleo de cravo da Índia nas duas concentrações sem o Bta.

O fato do óleo de pimenta longa ocasionar alterações na biologia desta praga está provavelmente associado aos compostos orgânicos presentes nesta espécie vegetal. Segundo Bergo *et al.* (2005), Fazolin *et al.* (2007), Silva & Bastos (2007), Lima *et al.* (2009) esta espécie apresenta uma grande diversidade de compostos orgânicos como os metabólitos secundários

safrol (componente majoritário) e butóxido de piperonila, sendo este último, um agente sinérgico de inseticidas. Além disso, monoterpenos também são compostos comumente encontrados no óleo de pimenta longa. Diversos estudos em insetos de grãos armazenados têm demonstrado que os monoterpenos apresentam ação fumigante, repelente e ovicida, além de afetarem a sua biologia (Lee *et al.* 2003, Coitinho *et al.* 2006, Silva *et al.* 2009). Lima *et al.* (2009), utilizando o óleo essencial de pimenta longa em *S. frugiperda*, demonstraram que após 48h de ingestão, as lagartas de 1º e 3º ínstar submetidas a $CL_{50} = 16,2$ mg/mL e $CL_{50} = 9,4$ mg/mL, respectivamente apresentaram redução significativa na atividade alimentar e aumento da mortalidade, quando comparadas à testemunha.

Em relação aos efeitos observados para óleo de cravo da Índia, alguns autores (El-Hag *et al.* 1999, Raina *et al.* 2001) atribuíram as propriedades inseticidas ao eugenol, acetato de eugenol e betacariofileno. De acordo com Birah *et al.* (2010) o tratamento por imersão em folhas de milho com o óleo de cravo da Índia interferiu nos parâmetros biológicos de *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. As lagartas foram submetidas à concentração de 15% do extrato, apresentando redução de 12,22% na sobrevivência, 1,12% no crescimento larval e 0,28% no desenvolvimento total. O extrato também afetou a fecundidade e fertilidade do inseto.

Todos os tratamentos provocaram diminuição na oviposição, quando comparados à testemunha, interferindo na reprodução. Resultados semelhantes foram evidenciados com outros insetos. O caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr.), quando submetido às concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50µL de óleo essencial de pimenta longa/20g de feijão, apresentaram redução no número de ovos e adultos emergidos (Pereira *et al.* 2008). O óleo de cravo da Índia na concentração de 25g por Kg⁻¹ de feijão, também diminuiu a oviposição de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Paranhos *et al.* 2005).

Segundo Sousa & Vendramim (2001), Torres *et al.* (2001) e Borgoni & Vendramim (2003), os metabólitos secundários presentes nas plantas provocam efeitos adversos na biologia e imunologia dos insetos como inibição alimentar, diminuição do peso, inibição da biossíntese da quitina, inibição do crescimento, interferência com alguns transmissores envolvidos na regulação da biossíntese do ecdisônio e redução da fecundidade.

Dentro do contexto imunológico, a fenoloxidase é uma enzima cuja função é atuar na oxidação de compostos fenólicos. O resultado desta oxidação é a formação da melanina, que está relacionada a importantes processos fisiológicos, como a esclerotização da cutícula, cicatrização de feridas, mediação do processo de reconhecimento de patógenos e parasitóides (Wilson *et al.* 1999, Silva 2002, Negreiro *et al.* 2004). Outra substância sinalizadora do sistema imune dos insetos é o óxido nítrico (NO). O aumento da sua produção, pelos hemócitos, ocorre em resposta à presença de agentes estranhos (Gourdon *et al.* 2001, Foley & O`Farel 2003, Faraldo *et al.* 2005).

Os resultados da análise imunológica humoral encontrada na nossa pesquisa demonstraram que, apenas a concentração de 30 mg/L do óleo de pimenta longa associado ao Bta promoveu um aumento da atividade da fenoloxidase, enquanto que o cravo da Índia nessa mesma concentração associado ao Bta reduziu, significativamente. Esses resultados são pertinentes uma vez que, segundo Mordue & Nisbet (2000) as substâncias presentes em plantas inseticidas podem atuar sobre quimiorreceptores, estimulando células deterrentes específicas, ou bloqueando os fagoestimulantes, como as células receptoras de carboidratos, inibindo assim a alimentação. Assim, as maiores concentrações dos óleos podem ter promovido um efeito deterrente e, conseqüentemente, não estimularam a atividade da enzima. Por outro, lado a atividade bactericida do óleo de cravo da Índia pode ter inibido indiretamente a atividade da fenoloxidase. Ainda Segundo Wilson *et al.*(2001), existe uma estreita relação entre o aumento da fenoloxidase e a toxinas Cry presentes em *B. thuringienis*.

Para os níveis de óxido nítrico, o tratamento pimenta longa 50 mg/L + Bta apresentou a maior média em relação a testemunha e ao tratamento pimenta longa na concentração 50 mg/L. Isso se deve ao fato de que a produção de óxido nítrico é ativada em resposta a infecções com bactérias, fungos, parasitismo, entre outros (Silva *et al.* 2000, Silva 2002, Faraldo *et al.* 2005).

Como conclusão, o óleo essencial de pimenta longa na concentração de 50 mg/L associado ao Bta provocou menor sobrevivência larval, já o cravo da Índia não apresentou-se eficiente para este parâmetro. Porém, os dois óleos, associados ou não ao Bta, interferiram na biologia, entretanto as lagartas submetidas aos tratamentos com o óleo de cravo da Índia associado ou não ao Bta apresentam uma redução significativa no peso larval e pupal. Os óleos dois interferiram na imunidade humoral de *S. frugiperda*. Apenas o óleo de cravo da Índia nas duas concentrações sem Bta não apresentou efeito na viabilidade dos ovos. Os resultados evidenciam que a associação desses óleos com o Bta pode constituir tática promissora para Manejo Integrado de *S. frugiperda*.

Agradecimentos

À FACEPE e, posteriormente a CAPES, pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa. Ao CNPQ pela concessão da bolsa aos demais autores.

Literatura Citada

- Arango, J.A., M Romero & S. Orduz. 2002.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Appl. Microbiol. 28: 466-474.
- Awmack, C.S. & S.R. Leather. 2002.** Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. Annu. Rev. Entomol. 47: 817-844.

- Barbosa, R.H., S.O. Kassab, P.R.B. Fonseca, C. Rossoni & A.S. Silva. 2011.** Inseticidas biológico e natural no controle da *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho cultivado em condições de campo. Rev. Verde 6: 247-251.
- Bergo, C.L., H.A. Mendonça & M.R. Silva. 2005.** Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo essencial. Acta Amaz. 35: 111-117.
- Berlitz, D.L. & L.M. Fiuza. 2004.** Avaliação toxicológica de *Bacillus thuringiensis aizawai* para *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), em laboratório. Biociênc. 12: 115-119.
- Birah, A., T.V.R.S. Sharma, S. Singh & R.C. Srivastava. 2010.** Effect of aqueous leaf extract of cloves (*Syzygium aromaticum*) on growth and development of tobacco caterpillar (*Spodoptera litura*). Indian J. Agr. Sci. 80: 534-537.
- Borgoni, P.C. & J.D. Vendramim. 2003.** Bioatividade dos extratos aquosos de *Trichillia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. Neotrop. Entomol. 32: 65-69.
- Borgoni, P.C. & J.D. Vendramim. 2005.** Efeito Subletal de Extratos Aquosos de *Trichillia* spp. Sobre o Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Milho. Neotrop. Entomol. 34: 311-317.
- Bravo, L. 1998.** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Lead Rev. Art. 56: 317-333.
- Coitinho, R.L.B., J.V. Oliveira, M.G. Gondim Júnior & C.A.G. Câmara. 2006.** Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamays* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. Rev. Caatinga 19: 176-182.
- Cox, S.D., C.M. Mann, J.L. Markham, H.C. Bell, J.E. Gustafson, J.R. Warmington & S.G. Wyllie. 2000.** The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J. Appl. Microbiol. 88: 170-175.
- Delepaul, Q., V.G. Billerbeck, C.G. Roques, G. Michel, C. Marquier-Vinuales & J.M. Bessiere. 2000.** The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. J. Essent. Oil Res. 12: 256-266.
- Dequech, T.B., L.M. Fiusa, R.F.P. Silva & R.C. Zumba. 2007.** Histopatologia de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) infectadas por *Bacillus thuringiensis aizawai* e com ovos de *Campoplex flavicincta* (Hym., Ichneumonidae). Cienc. Rural 37: 273-276.
- Dorman, H.J.D. & S.G. Deans. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88: 308-316.
- El-hag, E.A., A.H. El-nadi & A.A. Zaitoon. 1999.** Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). Phyto. Res. 13: 388-392.

- Estrela, J.L.V., R.N.C. Guedes, C.R.A. Maltha, L.C. Magalhães & M. Fazolin. 2005.** Toxicidade de amidas análogas à piperina para *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Magistra* 17: 69-75.
- Faraldo, A.C., A. Sanunes, L.H. Faccioli, E.A. Del Bel & E. Lello. 2005.** Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* 13: 240-246.
- Fazolin, M., J.L.V. Estrela, V. Catani, M.R. Alécio & M.S. Lima. 2007.** Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC., *Piper aduncum* L. e de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre *Tenebrio Molitor* L., 1758. *Ciênc. Agrotec.* 31: 113-120.
- Ferreira, J.B.S., L.R.A. Alves, L.C.B. Gottardo & M. Georgino. 2010.** Dimensionamento do custo econômico representado por *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho no Brasil. 48º Congresso SOBER. São Paulo, ESALQ, 21p.
- Foley, E. & P.H. O'Farrel. 2003.** Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Develop.* 17: 115-125.
- Green, L.C., K.R. De Luzuriaga, D.A. Wagner, W. Rand, N. Istfan, V.R. Young & S.R. Tannenbaum. 1981.** Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7764-7768.
- Gourdon, I., M.C. Guérin, J. Torreilles & P. Roch. 2001.** Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* 5:1-6.
- Isman, M. B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603-608.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Lambert, R.J.W., P.N. Skandamis, P. Coote & G.J.E. Nychas. 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91: 453-462.
- Lee, S., C.J. Peterson & J.R. Coats. 2003.** Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J. Stored Prod. Res.* 39: 77-85.
- Lill, J. & T. Marquis. 2001.** The effects of leaf quality on herbivore performance and attack from natural enemies. *Ecol.* 126: 418-428.
- Lima, M.P., J.V. Oliveira & E.J. Marques. 2009.** Manejo da lagarta-do-cartucho em milho com formulações de nim e *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*. *Ciênc. Rural* 39: 1227-1230.
- Lima, R.K., M.G. Cardoso, J.C. Moraes, B.A. Melo, V.G. Rodrigues & P.L. Guimarães. 2009.** Atividade inseticida do óleo de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre

- lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amaz.* 39: 377-382.
- Miranda, E.M. 2002.** Caracterização e avaliação produtiva de uma população nativa de Pimenta Longa (*Piper hispidinervum*) no Seringal Cachoeira, AC. Brasil. *Acta Amaz.* 32: 9-20.
- Miranda, J.E., J.E.M. Oliveira, K.C.G. Rocha, S.A. Bortoli, H.M.D. Navickiene, M.J. Kato & M. Furlan. 2002.** Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (PIPERACEAE) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Bras. Ol. Fibros.* 6: 557-563.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its actions against insects. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 615-632.
- Nappi, A.J., E. Vass, F. Frey & Y. Carton. 2000.** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nit. Oxide* 4: 423-430.
- Nascimento, G.G.F., J. Locatelli, P.C. Freitas, G.L. Silva. 2000.** Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *J. Microbiol.* 31: 247-256.
- Navickiene, H.M.D., A.A. Morandim, M.O.M. Marques, M.C.M. Young & M.J. Kato. 2006.** Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*. *Quim Nova* 29: 467-470.
- Negreiro, M.C.C., F.G. Andrade & A.M.F. Falleiros. 2004.** Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. *S. Cienc. Agr.* 25: 293-308.
- Ngoh, S.P., L. Choo, F.Y. Pang, Y. Huang, M.R. Kini & S.H. Ho. 1998.** Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Pest. Sci.* 54: 261-268.
- Omoto, C., B. E. Alves & P.C. Ribeiro. 2000.** Detecção e monitoramento de resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) ao Dicofol. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 753-764.
- Oestergaard, J., R.U. Ehlers, A.C. Martínez-Ramírez & M.D. Real. 2007.** Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3623–3629.
- Oussalah, M., S. Caillet, L. Saucier & L. Lacroix. 2006.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. *Cienc. Agrotec.* 21: 37-41.

- Paranhos, B.A.J., C.C. Custódio, N.B.M. Neto & A.S. Rodrigues. 2005.** Extrato de neem e cravo da Índia no controle de *Zabrotes Subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) em sementes de feijão armazenado. Colloq. Agrariae 1: 1-7.
- Pereira, A.A., M.G. Cardoso, L.R. Abreu, A.R. Morais, L.G.L. Guimarães & A.P.S.P. Salgado. 2008.** Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Ciênc. Agrotec. 32: 887-893.
- Pereira, A.C.R., J.V. Oliveira, M.G. Gondim Junior & C.A.G. Câmara. 2008.** Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Ciênc. Agrotec. 32: 717- 724.
- Raina, V.K., S.K. Srivastava, K.K. Aggarwa, K.V. Syamasunda & S. Kumar. 2001.** Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. J. Flav. Frag. 16: 334-336.
- Rodrigues, S.R., G.V. Coutinho, W.S. Garcez, F.R. Farcez & D. P. F. Zanella. 2008.** Activity insecticide of etanolic extract of plants on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Agrarian 1: 132:144.
- SAS Institute (2001)** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Silva, A.B., J.L. Batista & C.H. Brito. 2009.** Influência de produtos de origem vegetal na oviposição e no desenvolvimento embrionário de *Euborellia annulipes* (Dermaptera:Anisolabididae). Eng. Ambien. 6: 54-65.
- Silva, C., B.D. Gary & M.E. Rau. 2000.** Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. Dev. Comp. Immunol. 24: 367-379.
- Silva, C.C.A. 2002.** Aspectos do sistema imunológico dos insetos. Biotecnol. Cienc. Desenv. 24: 68-72.
- Silva, D.M. & C.N. Bastos. 2007.** Antifungal activity of essential oils of Piper species against *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora capsici*. Fitopatol. Bras. 32: 143-145.
- Silva, M.T.B. 1999.** Fatores que afetam a eficiência de inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* Smith em milho. Ciênc. Rural 29: 383-387.
- Souza, A.P. & J.D. Vendramim. 2001.** Atividade inseticida de extratos de aquosos de meliácea sobre a mosca branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). Neotrop. Entomol. 30: 133-137.

- Tavares, M.A.G.C. 2002.** Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col.: Curculionidae). Dissertação de Mestrado, USP, Piracicaba, 71p.
- Torres, A. L., R. Barros, J.V. Oliveira. 2001.** Efeitos de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol. 30: 151-156.
- Tremiliosi, L.M.M., M.C. Neves, V.C. Vieira, V.B. Bergamasco, R.A. Polanczyk & M.V. Franco. 2008.** Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* ativos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Científica 36: 86-96.
- Uribe, D., W. Marinez & J. Céron. 2003.** Distribution and diversity of cry genes in native straining of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from colombia. J. Invert. Patholo. 82: 119-127.
- Wilson, R., C. Chen, N.A. Ratcliffe & C. W. Chen. 1999.** Innate immunity in insects: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign in the cockroach, *Blaberus discoidalis*. J. Immunol. 162: 1590-1596.
- Wilson, K. , C.C. Sheena, A. F. Reeson & J. K. Pell. 2001.** Melanism and disease resistance in insects. Ecol. Lett. 4: 637-649.
- Wiseman, B.R. 1999.** Corn earworm, p. 59-61. In K.L. Steffey, M.E Rice, J. All, D.A. Andow, M.E Gray & J.W. Duyn (eds.), Handbook of corn insects. Lanham, Entomol. Soc. America, 427p.

Tabela 1. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* cujas as larvas foram tratadas com óleo essencial de pimenta longa, associado ou não ao Bta. Temperatura: $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, UR: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

Tratamentos ¹	Parâmetros biológicos				
	Peso larval (g)	Período larval (dias)	Peso pupal (g)	Período pupal (dias)	Razão sexual
Testemunha	0,295±0,01 a	7,7±0,14 ab	0,170±0,03 a	8,3±0,22 bc	0,5±0,03 a
Pimenta longa 30	0,250±0,02 ab	5,8±0,07 c	0,156±0,02 ab	10,1±0,42 a	0,3±0,09 a
Pimenta longa 30 + Bta	0,225±0,01 ab	8,9±0,10 a	0,125±0,05 c	7,8±0,28 c	0,45±0,07 a
Pimenta longa 50	0,293±0,03 a	6,6±0,63 bc	0,171±0,05 a	9,1±0,28 ab	0,53±0,13 a
Pimenta longa 50+ Bta	0,221±0,03 ab	9,2±0,90 a	0,133±0,06 bc	8,0±0,26 bc	0,60±0,11 a
Bta	0,167±0,09 b	8,1±0,07 ab	0,125±0,06 c	9,3±0,22 ab	0,43±0,07 a
	$F_{5,28}=5,19^{0,0025}$	$F_{5,28}=7,21^{0,0003}$	$F_{5,29}=15,60^{0,0001}$	$F_{5,28}=9,20^{0,0001}$	$F_{5,29}=0,87^{0,5165}$

¹Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey HSD (P>0,05).

Tabela 2. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* cujas as larvas foram tratadas com óleo essencial de cravo da Índia, associado ou não ao Bta. Temperatura: $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, UR: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

Tratamento ¹	Parâmetros Biológicos				
	Peso larval (g)	Período larval (dias)	Peso pupal (g)	Período pupal (dias)	Razão sexual
Testemunha	0,295±0,01 a	7,7±0,14 c	0,170±0,03 a	8,3±0,22 c	0,52±0,03 a
Cravo da Índia 30	0,208±0,01 b	10,0±0,09 ab	0,133±0,05 bc	9,2±0,22 bc	0,54±0,09 a
Cravo da Índia 30 + Bta	0,210±0,02 b	8,1±0,68 bc	0,124±0,07 bc	11,2±0,61 a	0,52±0,09 a
Cravo da Índia 50	0,222±0,09 b	9,5±0,31 ab	0,135±0,05 b	9,0±0,16 bc	0,63±0,13 a
Cravo da Índia 50 + Bta	0,169±0,01 b	8,8±0,21 abc	0,109±0,02 c	9,8±0,11 ab	0,45±0,07 a
Bta	0,167±0,09 b	8,1±0,07 c	0,125±0,06bc	9,3±0,22 bc	0,43±0,07 a
F ^{Valor de P}	F _{5,29} =11,44 ^{0,001}	F _{5,29} =7,45 ^{0,002}	F _{5,29} =13,65 ^{0,001}	F _{5,28} =10,38 ^{0,001}	F _{5,29} = 0,58 ^{0,713}

¹Medias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey HSD (P>0,05).

Tabela 3. Média do número total de ovos/fêmea e número de larvas eclodidas de *Spodoptera frugiperda*, submetidas aos tratamentos no 3º ínstar. Temperatura: $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, UR: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

Tratamento (n = 10) ¹	Média de ovos (\pm E.P) ²	Média de eclosão (\pm E.P) ²
Testemunha	1604,8 \pm 235,63 a	97,2 \pm 0,37 a
Pimenta longa 30	389,2 \pm 57,36 b	77,8 \pm 3,62 bcd
Pimenta longa 30 + Bta	531,8 \pm 113,14 b	67,8 \pm 6,73 cde
Pimenta longa 50	731,2 \pm 41,09 b	71,6 \pm 2,27 cd
Pimenta longa 50 + Bta	694,2 \pm 111,28 b	65,8 \pm 5,17 de
Cravo da Índia 30	451,0 \pm 121,60 b	89,4 \pm 0,50 ab
Cravo da Índia 30 + Bta	724,6 \pm 118,60 b	56,0 \pm 3,00 e
Cravo da Índia 50	790,4 \pm 113,14 b	87,4 \pm 1,43 ab
Cravo da Índia 50 + Bta	644,2 \pm 94,67 b	75,2 \pm 2,00 bcd
Bta	541,0 \pm 62,71 b	82,0 \pm 1,48 abc
F ^{Valor de P}	F= 7,38 ^{0,0001}	F= 14,18 ^{0,0001}

¹N = número de repetições.

²Medias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey HSD (P>0,05).

Tabela 4. Concentrações de óxido nítrico (μM de NO_2^- / μL de hemolinfa) em larvas de *Spodoptera frugiperda* submetidas aos óleos essenciais de pimenta longa e cravo da Índia, associados ou não ao Bta.

Tratamento (n = 10) ¹	Média (\pm EP) ²
Testemunha	19,3 \pm 2,38 b
Pimenta 30	28,8 \pm 5,23ab
Pimenta 50	24,2 \pm 6,50 b
Pimenta 30 + Bta	54,8 \pm 11,45ab
Pimenta 50 + Bta	70,3 \pm 16,02 a
Cravo da Índia 30	42,2 \pm 9,49 ab
Cravo da Índia 50	27,2 \pm 3,01 ab
Cravo da Índia 30 + Bta	39,2 \pm 12,62ab
Cravo da Índia 50 + Bta	60,4 \pm 18,03ab
Bta	29,0 \pm 5,08 ab
F ^{Valor de P}	F= 2,55 ^{0,0117}

¹N= número de repetições.

²Medias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey HSD (P>0,05).

Tabela 5. Atividade de fenoloxidase (OD/min/mg) em larvas de *Spodoptera frugiperda* submetidas aos óleos essenciais de pimenta longa e cravo da Índia, associados ou não ao Bta.

Tratamento (n = 10)	Média (\pm EP) ²
Testemunha	0,02 \pm 0,016 ab
Pimenta longa 30	0,04 \pm 0,001 ab
Pimenta longa 50	0,09 \pm 0,055 ab
Pimenta longa 30 + Bta	0,15 \pm 0,068 a
Pimenta 50 longa + Bta	0,06 \pm 0,012 ab
Cravo da Índia 30	0,01 \pm 0,004 b
Cravo da Índia 50	0,05 \pm 0,034 ab
Cravo da Índia 30 + Bta	0,05 \pm 0,011 ab
Cravo da Índia 50 + Bta	0,09 \pm 0,027 ab
Bta	0,04 \pm 0,005 ab
F ^{Valor de P}	F= 2,79 ^{0,0107}

¹N= número de repetições.

²Medias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey HSD (P>0,05).



Figura 1. Teste de fitotoxicidade com folhas de milho tratadas com os óleos de cravo da Índia e pimenta longa nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 60; 50 e 30 mg/L mg/L DMSO (A) – cravo da Índia; (B) – pimenta longa. Classificação: 1000 e 50 – fitotoxicidade intensa; 250 e 125 – fitotoxicidade moderada; 60, 50 e 30 – fitotoxicidade leve.

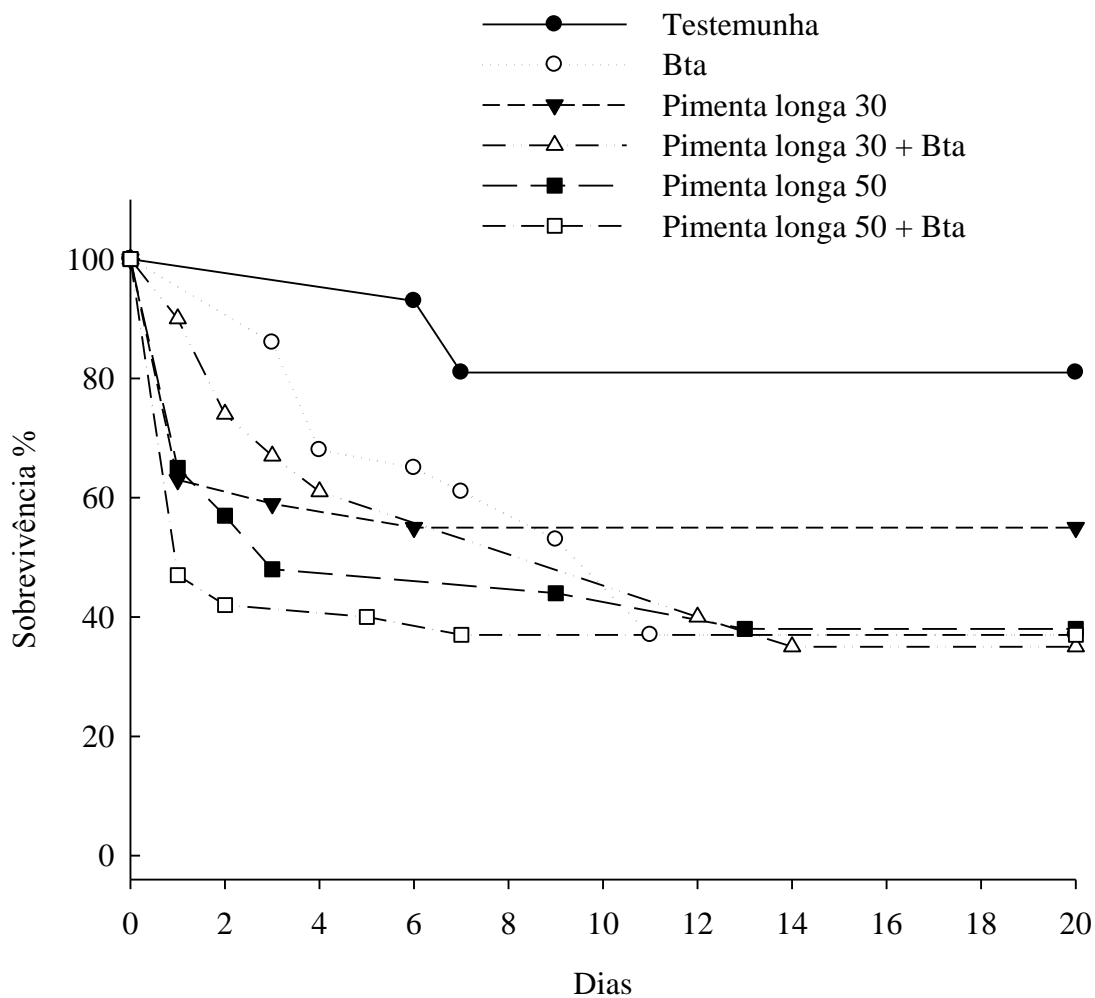


Figura 2. Sobrevivência diária de larvas a partir do 3º ínstar de *Spodoptera frugiperda* tratadas com óleo pimenta longa, associado ou não ao Bta. Temp.: $25,2 \pm 1,4$ °C, UR: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

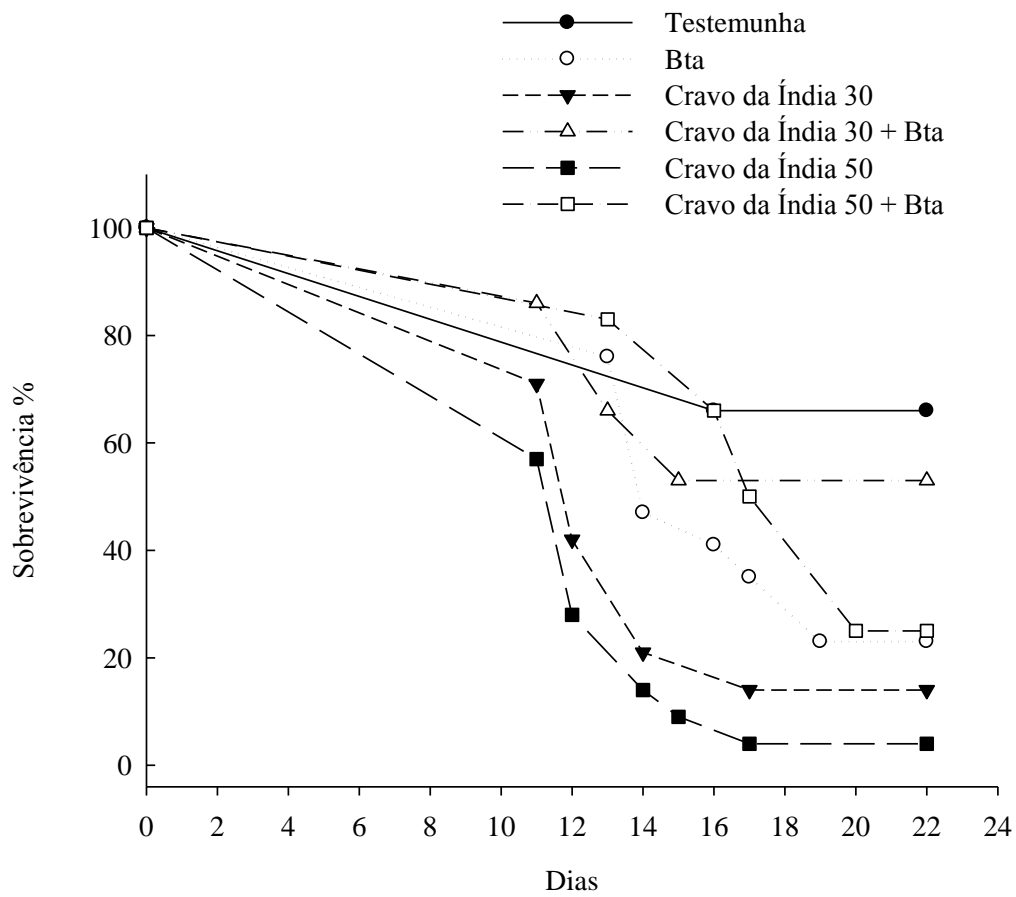


Figura 3. Sobrevivência diária de larvas a partir do 3º ínstar de *Spodoptera frugiperda* tratadas com óleo de cravo da Índia, associado ou não ao Bta. Temp.: $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, UR: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

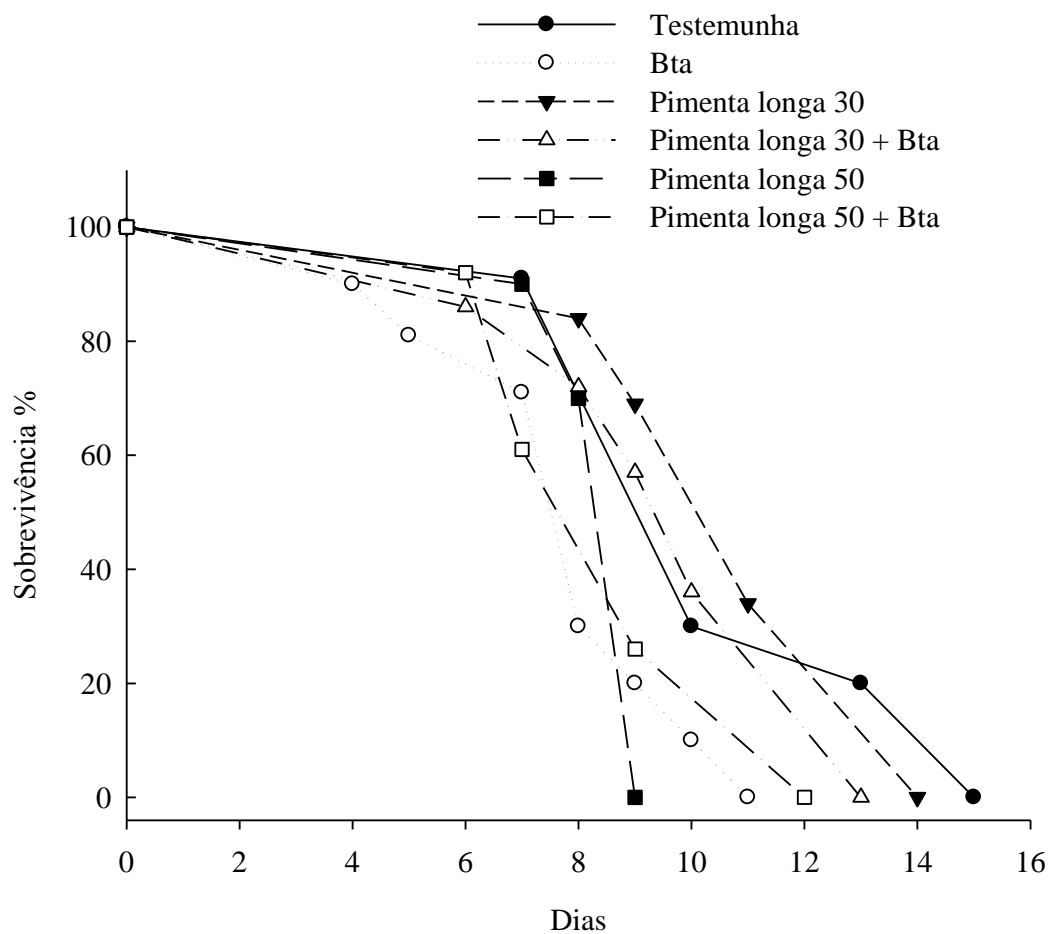


Figura 4. Longevidade diária de adultos de *Spodoptera frugiperda*, oriundas de larvas de 3º ínstar tratadas com óleo de pimenta longa, associado ou não ao Bta. Temp.: $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, UR: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

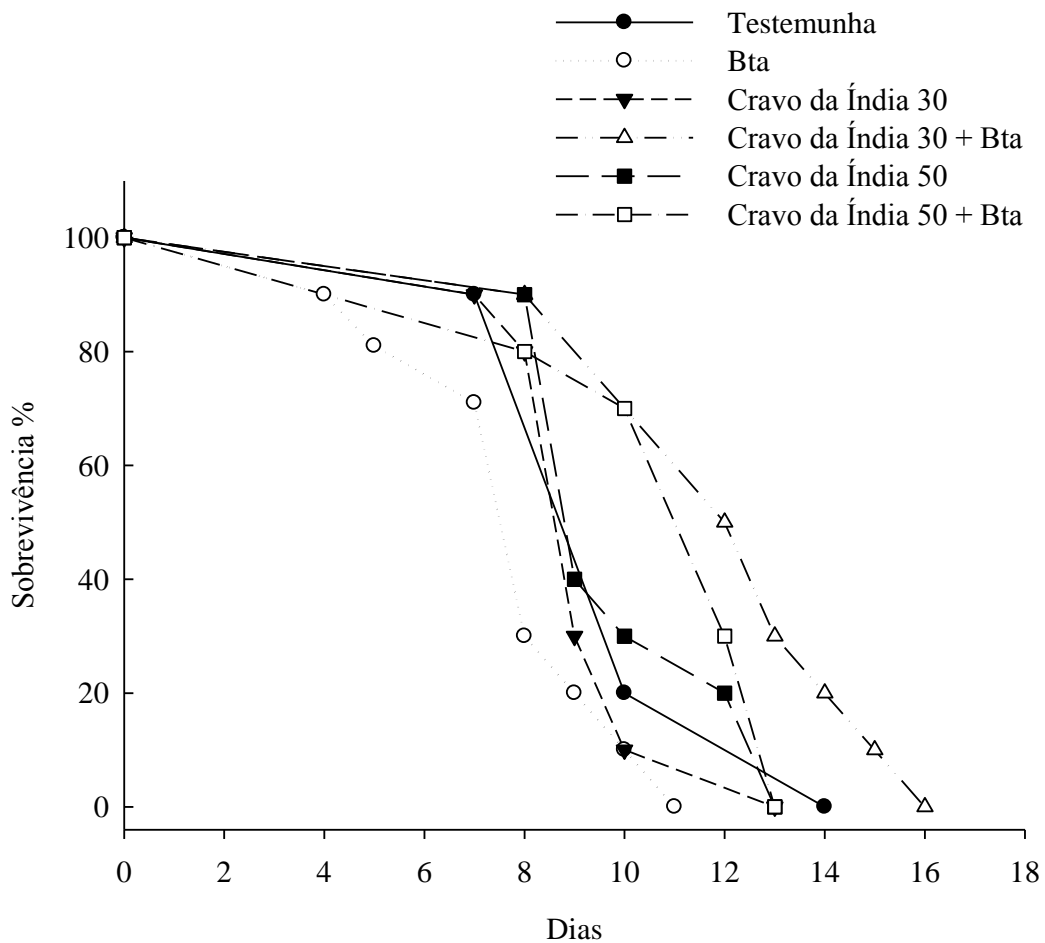


Figura 5. Longevidade diária de adultos de *Spodoptera frugiperda*, oriundas de larvas de 3º ínstar tratadas com cravo da Índia, associado ou não ao Bta. Temp.: $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, UR: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

CAPÍTULO 3

EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE A ESPERMATOGÊNESE E HISTOQUÍMICA DOS OVARÍOLOS DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E SEU REFLEXO NA FERTILIDADE

GLAUCILANE S. CRUZ¹, VALERIA WANDERLEY-TEIXEIRA², JOSE V. OLIVEIRA¹, ÁLVARO A.C.
TEIXEIRA², ALICELY A. CORREIA¹, THIAGO J.S. ALVES¹, FRANKLIN M. CUNHA¹

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

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

Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, Oliveira, J.V., A.A.C. Teixeira, Correia, A.A. & Cunha, F.M. Efeito de óleos essenciais sobre a espermatogênese e histoquímica dos ovários de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e seu reflexo na fertilidade. A ser submetido

RESUMO - A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga com ampla distribuição geográfica e difícil controle devido à grande capacidade de dispersão, ampla gama de hospedeiros, além da resistência e o alto custo dos inseticidas. Como alternativas ao controle deste inseto, pesquisas têm focado o uso de óleos essenciais, que oferecem larga variedade de moléculas com grande diversidade nas suas estruturas e atividade biológica. Na literatura, poucas pesquisas enfocam as alterações que esses óleos possam ocasionar ao aparelho reprodutor dos insetos. Assim, essa pesquisa objetivou testar a hipótese de que os óleos de pimenta longa e cravo da Índia nas concentrações de 30 e 50 mg/L afetam a espermatogênese e histoquímica dos ovários e causam impacto na fertilidade de *S. frugiperda*. Foram utilizadas nos experimentos lagartas do último instar e adultos com 24 h de idade. Testículos e ovários foram coletados, fixados em formol 10% e incluídos em historesina. Os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina, Tricômio de Mallory, para detecção de tecido conjuntivo, Ácido Periódico-Schiff (P.A.S.), para carboidratos neutros e Azul de Bromofenol, para compostos protéicos. Os resultados demonstraram que os óleos essenciais de pimenta longa e cravo da Índia afetaram a espermatogênese e histoquímica dos ovários de *S. frugiperda*, refletindo negativamente na sua reprodução. No entanto, os efeitos do óleo de pimenta longa foram mais expressivos demonstrando ser uma ferramenta promissora para o controle desta praga, adequando-se ao MIP, modulando a sobrevivência da prole e seu sucesso na cultura.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta do cartucho, reprodução, histoquímica, histologia, pimenta longa, cravo da Índia

EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON SPERMATOGENESIS AND THE HISTOCHEMISTRY
OF THE OVARIOLES OF *Spodoptera frugiperda* (JE SMITH) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) AND ITS IMPACT ON FERTILITY

ABSTRACT - The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), is an insect pest with broad geographic distribution and difficult control due to the high dispersal ability during the the growing season, wide host range, besides the resistance and the high cost of pesticides. As alternatives to control this insect, research has focused on the use of essential oils, which offer a large variety of molecules with diversity in their structures and biological activity. In literature few studies focus on the changes that these oils may lead to the reproductive system of insects. Thus, we tested the hypothesis that the clove and long pepper oils at low concentrations 30 and 50 mg/L affect spermatogenesis and the histochemistry of the ovarioles, as well as its impact on *S. frugiperda* fertility. Last instar larvae and newly emerged adults (24 h) were used. Testicles and ovarioles were collected, fixed in 10% formalin and embedded in historesin. The sections were stained with toluidine blue, Mallory, for detection of connective tissue, periodic acid-Schiff (PAS) for neutral carbohydrates and Bromophenol Blue for protein compounds. The results showed that clove and long pepper essential oils at the concentrations of 30 and 50 mg/L have affected spermatogenesis and the histochemistry of the ovarioles of *S. frugiperda*, reflecting negatively in its reproduction. However, the effects of long pepper oil were more expressive proving to be a promising tool to control this pest, adapting to MIP, modulating the survival of offspring and its success in the culture.

KEY WORDS: Fall armyworm, reproduction, histochemistry, histology, long pepper, clove of india

Introdução

O impacto econômico negativo de pragas na agricultura é de grande expressão pelo fato de danificarem um grande número de culturas e produtos alimentícios armazenados. No Brasil, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), destaca-se como praga-chave da cultura do milho, considerada de elevada importância social e econômica, distribuindo-se do Norte ao Sul do País (Duarte *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2006). Os danos ocasionados por este inseto na cultura do milho ocorrem durante todo o ano, inclusive no período “safre”, que também oferece boas condições para o seu desenvolvimento, sendo a resistência e o alto custo dos inseticidas utilizados, os principais problemas encontrados para o seu controle (Yu *et al.* 2003, Lima *et al.* 2006, Castro *et al.* 2006).

Como alternativas ao controle deste inseto, algumas pesquisas têm focado o uso de óleos essenciais (Isman 2000, Borgoni & Vendramim 2003, Lima *et al.* 2009). No entanto, os inseticidas botânicos, atualmente constituem apenas 1% do mercado mundial (Rozman *et al.* 2007). Esses produtos oferecem larga variedade de moléculas com grande diversidade nas suas estruturas e atividade biológica (Reigosa & Pedrol 2002). Alguns óleos essenciais têm se destacado por seus efeitos de repelência/deterrência em lagartas de *S. frugiperda*, como, por exemplo, os obtidos da pimenta longa (*Piper hispidinervum* Jacq.) e do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* L.) (Miranda 2002, Miranda *et al.* 2002, Estrela *et al.* 2005, Navickiene *et al.* 2006, Lima *et al.* 2009).

Na literatura poucas pesquisas enfocam as alterações que esses óleos possam ocasionar ao aparelho reprodutor dos insetos. Por outro lado, alterações histopatológicas provocadas por inseticidas sintéticos nas gônadas de insetos têm mostrado que a exposição à doses subletais afeta, grandemente, o desenvolvimento das gônadas (Shehata *et al.* 2006, Ghazawi *et al.* 2007, Habluetzel *et al.* 2007, Senthil *et al.* 2008). No caso da utilização de inseticidas botânicos, esses

estudos limitam-se apenas ao uso de azadiractina, onde Abdel-Rahman (2004) relatou desintegração das células germinativas e dos feixes de espermatozóides em testículos de *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) e inibição da oogênese (Medina *et al.* 2004) e espermatogênese (Abdel-Rahman *et al.* 2004).

Dessa forma, nossa pesquisa testou a hipótese de que os óleos de pimenta longa e cravo da Índia, em baixas concentrações, afetam a espermatogênese e histoquímica dos ovários, bem como o seu impacto na fertilidade de *S. frugiperda*, para que possa ter um melhor entendimento da sua biologia e métodos adequados de controle de insetos-praga. Visando diminuir a dependência aos inseticidas sintéticos, e, assim, melhorar a sustentabilidade dos sistemas de cultivo.

Material e Métodos

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

Obtenção e Criação dos Insetos. Larvas de *S. frugiperda* foram obtidas da criação estoque do Laboratório de Entomologia Agrícola, à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12h, as quais foram alimentadas com folhas de milho híbrido duplo AG 1051. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, com duas plantas/vaso de 5L com solo + húmus de minhoca na proporção 2:1 + 12,13g de N-P-K (formulação 4-14-8).

Obtenção dos Óleos Essenciais. O cravo da Índia foi adquirido em casas comerciais de especiarias na cidade do Recife, PE, e no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos do Departamento de Química da UFRPE foi submetido à hidrodestilação por 2 h. O óleo essencial foi extraído por meio de um aparelho tipo Clevenger modificado, posteriormente separado da

água, seco com Na_2SO_4 anidro e armazenado à baixa temperatura em recipiente escuro hermeticamente fechado. O rendimento do óleo foi calculado com base no peso do material fresco. O óleo de pimenta longa, extraído das folhas, por sua vez, foi obtido da Embrapa – Acre. As emulsões dos óleos foram preparadas no laboratório de Entomologia Agrícola da UFRPE.

Instalação dos Bioensaios. Pedacos de folhas de milho do híbrido duplo AG 1051, com aproximadamente 6,0 x 4,5cm, com 20 a 40 dias de idade foram imersas nas concentrações de 30 e 50 mg/L de óleo de pimenta longa e cravo da Índia. Essas concentrações foram escolhidas baseadas no teste de fitotoxicidade, conforme descrito no capítulo 2. Para a testemunha as folhas foram imersas apenas em DMSO e água, correspondendo, portanto a cinco tratamentos. Após imersão durante 10 segundos, cada pedaço de folha foi colocado para secar e oferecido às larvas de *S. frugiperda* com 10 dias de idade, e peso médio de, aproximadamente, 78,15 mg (3º instar), durante 48 horas. Em seguida as larvas foram alimentadas com pedaços de folhas não tratados, substituídos, diariamente, até a fase de pupa. Cada tratamento constou de 150 larvas individualizadas em recipientes plásticos de 80 mL, com tampa rosqueada. No último instar larval foram coletados testículos de 10 insetos. Vinte e quatro horas após a emergência foram selecionados 10 machos para coleta dos testículos e 10 fêmeas para coleta dos ovariolos (com a finalidade de observar o efeito dos óleos na constituição do vitelo). Os adultos restantes foram alimentados com solução de mel a 10%, substituída, diariamente, para acompanhar o número total de ovos e ovos viáveis. Os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada a $25,2 \pm 1,4$ °C, $67 \pm 0,7\%$ de UR e fotofase de 12 h.

Histologia e Histoquímica das Gônadas. Após a coleta, as gônadas foram fixadas em formol a 10% por 24 h. Posteriormente, foram desidratadas em banhos crescentes de álcool etílico (70, 80 e 95%), por 10 minutos cada, impregnadas e incluídas em historesina. Por fim, os blocos foram

cortados em micrótomo do tipo Minot (LEICA RM 2035) e submetidos às técnicas de coloração pelo Azul de Toluidina, Tricômio de Mallory, para detecção de tecido conjuntivo, Ácido Periódico-Schiff (P.A.S.), para detecção de carboidratos neutros, e Azul de Bromofenol, para detecção dos compostos protéicos (Junqueira & Junqueira 1983, Michalany 1990). A análise histológica foi realizada, utilizando-se um microscópio de luz OLYMPUS BX-49 e fotografado em fotomicroscópio OLYMPUS BX-51.

Análise do Número Total de Ovos e Ovos Viáveis. Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições, além da testemunha, constando de dois casais acondicionados em gaiolas de PVC com dimensões de 10 cm x 15 cm (diâmetro e altura), revestidas internamente com papel contínuo, como substrato para oviposição. As mariposas foram alimentadas com solução de mel a 10%, e mantidas em câmara climatizada a $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, $67 \pm 0,7\%$ de UR e fotofase de 12 h. As posturas foram coletadas, diariamente, até o final final de oviposição, e acondicionadas em placas de Petri com dimensões de 10 cm de diâmetro e, posteriormente, mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, contou-se o número total de ovos e o número de ovos viáveis. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de significância, usando o programa SAS (SAS Institute, 2001).

Resultados

Histologia dos Testículos e Espermatogênese em Larvas de *Spodoptera frugiperda* sem Tratamento. Os testículos das larvas apresentaram-se revestidos por tecido conjuntivo em toda a sua extensão, com invaginações formando septos, dividindo-se em quatro folículos testiculares (Figs. 1A-B). Na região apical do folículo (germário) evidenciou-se a presença da célula de Verson, uma espermatogônia primária com função semelhante a um trofócito. Caracteriza-se por apresentar citoplasma abundante e núcleo central, próximo às espermatogônias (Fig. 1C).

Verificou-se na região logo abaixo do germário a presença de numerosos cistos, que é uma característica da zona de crescimento (Fig. 1D). Na zona de divisão e redução (localizada após a zona de crescimento) evidenciou-se as espermátides com morfologia, variando de esférica a oval (Fig. 1E), e na última região, zona de transformação, observou-se numerosos espermatozóides (Fig. 1F).

Histologia dos Testículos e Espermatogênese em Lagartas de *Spodoptera frugiperda*, após o Tratamento com o Óleo de Cravo da Índia. Na concentração de 30 mg/L DMSO, os testículos mostraram revestimento e septos de tecido conjuntivo mais espesso em relação à testemunha (Fig. 2A). Desorganização das zonas foliculares com menor quantidade de cistos, poucas espermátides em processo de diferenciação, porém abundância de espermatozóides (Figs. 2B, 2C e 2D). Na concentração de 50 mg/L evidenciou-se redução mais significativa na quantidade de cistos, porém o revestimento e septos de tecido conjuntivo foram semelhantes à testemunha (Figs. 3A-B). Observaram-se, ainda, várias espermátides e espermatozóides (Figs. 3C-D).

Histologia dos Testículos e Espermatogênese em Lagartas de *Spodoptera frugiperda*, após o Tratamento com Óleo de Pimenta Longa. Na concentração de 30 mg/L, o germário e a zona de redução e divisão mostraram-se preservados, porém foi evidenciado na zona de crescimento redução da quantidade de cistos, com várias células vacuolizadas, e na zona de transformação, espermátides, ainda, em diferenciação sem presença, no entanto, de espermatozóides (Figs. 4A, 4B, 4C e 4D).

Na concentração de 50 mg/L evidenciou-se espessamento do revestimento e septos de tecido conjuntivo dos testículos, discreta redução dos cistos e alguns com células vacuolizadas (Figs. 4E-F). Não foram visualizadas espermátides e espermatozóides.

Histologia dos Testículos de Adultos de *Spodoptera frugiperda* Tratados e Não-tratados com os Óleos Essenciais na Fase Larval. Os testículos dos insetos do tratamento controle

apresentaram-se revestidos por tecido conjuntivo, porém sem formação de septos, e conseqüentemente, sem os folículos testiculares característicos da fase larval. Apresentavam-se preenchidos por abundantes feixes de espermatozóides. Associados aos mesmos observaram-se traqueíolas e corpo gorduroso (Figs. 5A, 5B, 5C e 5D). Os testículos mostraram discreta redução da quantidade de feixes de espermatozóides, nos insetos de ambos os tratamentos, nas duas concentrações testadas (Figs. 6A, 6B, 6C e 6D).

Histoquímica dos Ovariolos de Adultos de *Spodoptera frugiperda* Antes e Após Tratamento com os Óleos Essenciais na Fase Larval. Os ovariolos, independente do tratamento, apresentavam-se revestidos por uma delgada bainha de tecido conjuntivo, recobrando as células foliculares. A região do vitelário mostrou-se de modo geral, bem desenvolvida em todos os tratamentos. Nos ovariolos foram evidenciadas entre os ovócitos, células nutrizes, características de ovariolo politrófico (Figs. 7A, 7B, 7C, 7D, 7E e 7F).

A análise histoquímica pelo azul de bromofenol revelou redução no teor de proteínas no vitelo nos ovócitos das fêmeas tratadas com os óleos essenciais, quando comparados com a testemunha, sendo esta redução mais acentuada no tratamento com pimenta longa na concentração de 0,05 mg/mL DMSO (Figs. 8A, 8B, 8C, 8D e 8E). A reação pelo ácido periódico de Schiff mostrou também redução no teor de carboidratos neutros, no vitelo das larvas tratadas com os óleos essenciais em todas as concentrações testadas (Figs. 9A, 9B, 9C, 9D e 9E).

Número Total de Ovos e Larvas Eclodidas. Todos os tratamentos reduziram significativamente, o número total de ovos em comparação à testemunha. Em relação ao número de larvas eclodidas verificou-se que os tratamentos com o óleo de pimenta longa apresentaram as menores médias, seguidos do cravo da Índia nas concentrações de 30 e 50 mg/L, entretanto essa última não diferiu da testemunha (Tabela 1).

Discussão

O ato de alimentação de um inseto herbívoro envolve ganhos e perdas energéticas. Os ganhos energéticos estão relacionados com a metabolização dos constituintes do tecido vegetal e as perdas, com a sobreposição dos compostos secundários presentes nas plantas (Lill & Marquis 2001). Quando o gasto energético é elevado existe comprometimento de componentes importantes na história de vida do inseto, trazendo consequências em diversos aspectos biológicos e reprodutivos (Awmack & Leather 2002).

A presença de vacúolos nas células dos cistos dos folículos testiculares das larvas tratadas com o óleo de pimenta longa nas duas concentrações indica um processo de degeneração, pois, de acordo com Al-Jahdali & Bisher (2007) e Sayım (2007), alterações na fisiologia da membrana podem levar à formação de vacúolos citoplasmáticos, que é uma manifestação comum de degeneração celular. Danos nos folículos testiculares, caracterizado pela desorganização destes e redução no espaçamento do tecido conjuntivo que o revestem, também foram obtidos com o inseticida deltametrina nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,0mL em *Brontocoris tabidus* (Signoret) (Heteroptera: Pentatomidae) (Vargas 2007).

Segundo Bergo *et al.* (2005), Fazolin *et al.* (2007), Silva & Bastos (2007), Lima *et al.* (2009) pimenta longa apresenta uma grande diversidade de compostos orgânicos como os metabólitos secundários safrol (componente marjoritário) e butóxido de piperonila, sendo este último, agente sinérgico de inseticidas. Além disso, monoterpenos também são compostos comumente encontrados no óleo de pimenta longa. Estudos com insetos de grãos armazenados demonstraram que os monoterpenos apresentam ação fumigante, repelente e ovicida, além de afetarem a sua biologia (Lee *et al.* 2003, Coitinho *et al.* 2006, Silva *et al.* 2009). Assim, esses compostos podem ter contribuído para as alterações na espermatogênese. Já o óleo de cravo da

Índia apresenta como componentes, o eugenol, acetato de eugenol e betacariofileno com propriedades inseticidas (El-Hag *et al.* 1999, Raina *et al.* 2001). Porém, esses compostos parecem não interferir de forma tão expressiva no processo da espermatogênese, quando comparado ao óleo de pimenta longa.

Já na fase adulta, os testículos dos insetos submetidos aos tratamentos com os óleos essenciais apresentaram apenas uma discreta redução de feixes de espermatozóides. Isso provavelmente está relacionado ao fato dos óleos terem causado efeito deterrente, levando o inseto a cessar a alimentação e, conseqüentemente, impedindo uma maior interação do organismo com os princípios ativos presentes na pimenta longa e cravo da Índia. Mordue & Nisbet (2000) relatam que substâncias presentes em plantas inseticidas podem atuar sobre quimiorreceptores, estimulando células deterrentes específicas ou bloqueando os fagoestimulantes, como as células receptoras de carboidratos, inibindo, assim, a alimentação. De acordo com Milano *et al.* (2010), o efeito de deterrência pode acarretar em alterações morfofisiológicas sobre o aparelho reprodutor, visto que o desenvolvimento deste em lepidópteros é exclusivamente dependente dos nutrientes adquiridos na fase imatura.

Histoquimicamente, os ovários apresentaram menor quantidade de proteínas no vitelo dos ovócitos, cujas larvas foram tratadas com os óleos essenciais, principalmente na concentração de 50 mg/L de pimenta longa, e redução de carboidratos neutros em todas as concentrações testadas. A redução protéica afeta diretamente a vitelogênese, que é o processo de síntese, transporte e acúmulo de proteínas precursoras do vitelo. Neste processo o corpo gorduroso sintetiza e secreta vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica, catepsina B e lipoforina (principais proteínas precursoras do vitelo) na hemolinfa, que são incorporadas aos ovócitos em desenvolvimento (Raikhel *et al.* 2002). Sendo assim, a redução na quantidade de proteínas pode acarretar resultados negativos na reprodução.

Por outro lado, os carboidratos neutros são importantes fontes de energia para os insetos, sendo armazenados na forma de glicogênio no corpo gorduroso (Oliveira & Cruz-Ladim 2003). Os carboidratos, bem como as proteínas e lipídeos servem como precursores para o metabolismo de diversas substâncias, e sua redução ocasiona efeitos indesejáveis em diversos processos fisiológicos.

As concentrações dos óleos essenciais utilizadas no presente estudo ocasionaram uma diminuição no número de ovos e na eclosão de larvas, exceto pela concentração de 30 mg/L que não diferiu da testemunha quanto a esse parâmetro. Resultados semelhantes foram encontrados por Birah *et al.* (2010) utilizando cravo da Índia sob a forma de extratos, evidenciando uma ação juvenóide, sendo capaz de afetar a fertilidade e fecundidade de mariposas do gênero *Spodoptera*. No presente estudo verificou-se que cravo da Índia na concentração 50 mg/L a pimenta longa nas duas concentrações analisadas apresentaram efeito semelhante ao observado por este autor.

Segundo Costa *et al.* (2004) e Milano *et al.* (2010), a redução do número de ovos e de sua viabilidade são importantes efeitos de óleos essenciais sobre a reprodução dos insetos, pois a diminuição na reprodução está geralmente associada a distúrbios alimentares e deficiência nutricional. Engelman (1998) afirmou que o número de ovários pode ser modificado pela quantidade e qualidade dos nutrientes e metabólitos secundários obtidos durante a diferenciação dos ovários por ovário, trazendo, como consequência, alterações no processo de vitelogenese, maturação de óvulos e produção de ovos.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a utilização dos óleos essenciais de pimenta longa e cravo da Índia nas concentrações de 30 e 50 mg/L afetam a espermatogênese e histoquímica dos ovários de *S. frugiperda*, refletindo na sua reprodução. No entanto, os efeitos do óleo de pimenta longa foram mais expressivos, demonstrando ser uma opção promissora no

controle desta praga, adequando-se ao MIP, atuando negativamente na sobrevivência da prole e no seu sucesso na cultura.

Agradecimentos

À FACEPE e, posteriormente a CAPES, pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa. Ao CNPq pela concessão da bolsa aos demais autores.

Literatura Citada

- Abdel-Rahman, A.G., A.K. El-Sayed, S.H. Laila & A.I. Imam. 2004.** Histological alternations in male testis of *Pectinophora gossypiella* (S.) adults induced by treating larvae with neem formulations, p.764. In 1st Arab Conference of Applied Biological Pest Control, Cairo, Egypt, 171p.
- Al-Jahdali, M.O. & A.S.B. Bisher. 2007.** Testicular histopathological alterations in rats treated with sumithion[®] NP 25/2.5 EC, insecticide. J. Biol. Sci. 7: 520-525.
- Awmack, C.S. & S.R. Leather. 2002.** Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. Annu. Rev. Entomol. 47: 817-844.
- Bergo, C.L., H.A. Mendonça & M.R. Silva. 2005.** Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo essencial. Acta Amaz. 35: 111-117.
- Birah, A., T.V.R.S. Sharma, S. Singh & R.C. Srivastava. 2010.** Effect of aqueous leaf extract of cloves (*Syzygium aromaticum*) on growth and development of tobacco caterpillar (*Spodoptera litura*). Indian J. Agr. Sci. 80: 534-537.
- Borgoni, P.C. & J.D. Vendramim. 2003.** Bioatividade dos extratos aquosos de *Trichillia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepdopetra: Noctuidae) em milho. Neotrop. Entomol. 32: 65-69.
- Castro, D.P., M.G. Cardoso, J.C. Moraes, N.M. Santos & D.P Baliza. 2006.** Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. Rev. Bras. Pl. Med. 8: 27-32.
- Coitinho, R.L.B., J.V. Oliveira, M.G Gondim Júnior & C.A.G. Câmara. 2006.** Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamays* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. Rev. Caatinga 19: 176-182.

- 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.
- Duarte, J.O., J.C. Cruz, J.C. Garcia & M.J. Cardoso. 2006.** Embrapa Sistemas de Produção. Disponível em: www.embrapa.br. Acessado em: 23/11/2009.
- El-hag, E.A., A.H. El-nadi & A.A. Zaitoon. 1999.** Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). *Phyto. Res.* 13: 388-392.
- Engelmann, F. 1998.** *In vitro* germplasm conservation. *Acta Hort.* 461: 41-47
- Estrela, J.L.V., R.N.C. Guedes, C.R.A. Maltha, L.C. Magalhães & M. Fazolin. 2005.** Toxicidade de amidas análogas à piperina para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Magistra* 17: 69-75.
- Fazolin, M., J.L.V. Estrela, V. Catani, M.R. Alcício & M.S. Lima. 2007.** Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC., *Piper aduncum* L. e de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre *Tenebrio Molitor* L., 1758. *Ciênc. Agrotec.* 31: 113-120.
- Ghazawi, N.A., E.D. El-Shranoubi, M.M. El-Shazly & K.L. Abdel Rahman. 2007.** Effect of azadiractin on mortality rate and reproduction system of grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera-Acrididae). *J. Orthop. Res.* 16: 57-65.
- Habluetzel, A., F. Carnevali, L. Lucantoni, L. Grana, A.R. Attili, F. Archilei, M. Antonimi, A. Valbonesi, V. Abbadessa, F. Esposito & S.A. Vander Esch. 2007.** Impact of the botanical insecticide Neem Azal on survival and reproduction of the biting louse *Damalinia limbata* on angora goats. *Rev. Parasitol.* 144: 328-337.
- Isman, M. B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603-608.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira. 1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Editora Santos, 123p.
- Lee, S., C.J. Peterson & J.R. Coats. 2003.** Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J. Stored Prod. Res.* 39: 77-85.
- Lill, J. & T. Marquis. 2001.** The effects of leaf quality on herbivore performance and attack from natural enemies. *Ecology* 126: 418-428.
- Lima, F.W.N., O.S. Ohashi, F.R.S. Souza & F.S. Gomes. 2006.** Avaliação de acessos de milho para resistência a *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. *Acta Amaz.* 36: 147-150.
- Lima, M.P., J.V. Oliveira & E.J. Marques. 2009.** Manejo da lagarta-do-cartucho em milho com formulações de nim e *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*. *Ciênc. Rural* 39: 1227-1230.

- Lima, R.K., M.G. Cardoso, J.C. Moraes, B.A. Melo, V.G. Rodrigues & P.L. Guimarães. 2009.** Atividade inseticida do óleo de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amaz.* 39: 377-382.
- Medina, P., F. Budia, P. del. Estal & E. Vinuela. 2004.** Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *J. Econ. Entomol.* 97: 43-50.
- Michalany, J. 1990.** Técnica Histológica em Anatomia Patológica. São Paulo, Editora Michalany, 247p.
- Milano, P., E.B. Filho, J.R.P. Parra, M.L. Oda & F.L. Cônsoli. 2010.** Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade nas espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae. *Neotrop. Entomol.* 39: 172-180.
- Miranda, E.M. 2002.** Caracterização e avaliação produtiva de uma população nativa de Pimenta Longa (*Piper hispidinervum*) no Seringal Cachoeira, AC. Brasil. *Acta Amaz.* 32: 9-20.
- Miranda, J.E., J.E.M. Oliveira, K.C.G. Rocha, S.A. Bortoli, H.M.D. Navickiene, M.J. Kato & M. Furlan. 2002.** Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (PIPERACEAE) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Bras. Ol. Fibras.* 6: 557-563.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its actions against insects. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 615-632.
- Navickiene, H.M.D., A.A. Morandim, M.O.M. Marques, M.C.M. Young & M.J. Kato. 2006.** Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*. *Quim. Nova* 29: 467-470.
- Oliveira, M.S.S., A.R. Roel, E.J. Arruda & A.S. Marques. 2006.** Efficiency of extracts of plantas in controlo f fall armyworm in corn *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec.* 31: 326-331.
- Oliveira, V.T.P. & C. Cruz-Landim. 2003.** Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociência* 11: 195-205.
- Raikhel, A.S., V.A. Kokozei, J. Zhu, D. Martin, S.F. Wang, C. Li, G. Sun, A. Ahmed, A. Dittimei & N.G. Attardo. 2002.** Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Ins. Bioc. Mol. Biol.* 32: 1275-1286.
- Raina, V.K., S.K. Srivastava, K.K. Aggarwa, K.V. Syamasunda & S. Kumar. 2001.** Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. *J. Flav. Frag.* 16: 334-336.

- Reigosa, M. & N. Pedrol. 2002.** Allelopathy from molecules to ecosystems. Plymouth, Science Publishers, 316p.
- Rozman, V., I. Kalinovic & Z. Korunic. 2007.** Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three storedproduct insects. *J. Stored Prod. Res.* 43: 349-355.
- SAS Institute (2001)** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sayim, F. 2007.** Histopathological effects of dimethoate on testes of rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78: 479-484.
- Senthil, N.S., C.M. Young, S.H. Yul, P.C. Hoon, K. Kalaivani & K.J. Duk. 2008.** Effect of azadiractin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70: 244-250.
- Shehata, M.F., M.W.F. Younes & Y.A. Mahmoud. 2006.** Histopathological effects of gamma irradiation on the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saund.) male gonads. *J. Apl. Sci. Res.* 2: 1053-1058.
- Silva, A.B., J.L. Batista & C.H. Brito. 2009.** Influência de produtos de origem vegetal na oviposição e no desenvolvimento embrionário de *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae). *Eng. Ambien.* 6: 54-65.
- Silva, D.M. & C.N. Bastos. 2007.** Antifungal activity of essential oils of Piper species against *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora capsici*. *Fitopatol. Bras.* 32: 143-145.
- Vargas, P.S.R. 2007.** Modificações do aparelho reprodutor *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) após exposição a deltametrina. Dissertação de Mestrado, UFV, Viçosa, 63p.
- Yu, S.J., S.N. Nguyen & G.E. Abo-Elghar. 2003.** Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pest. Biochem. Physiol.* 77: 1-11.

Tabela 1. Média do número total de ovos e de insetos eclodidos de *Spodoptera frugiperda*, oriundas de larvas de 3º ínstar submetidas aos tratamentos com óleos essenciais de pimenta longa e cravo da Índia. Temp.: $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, UR: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

Tratamento (n = 5) ¹	Média de ovos ($\pm\text{E.P}$) ²	Média de eclosão ($\pm\text{E.P}$) ²
Testemunha	1604,8 \pm 235,63 a	97,2 \pm 0,37 a
Pimenta Longa 30 mg/L	389,2 \pm 57,36 b	77,8 \pm 3,62 c
Pimenta Longa 50 mg/L	731,2 \pm 41,09 b	71,6 \pm 2,27 c
Cravo da Índia 30 mg/L	451,1 \pm 121,60 b	89,4 \pm 0,50 ab
Cravo da Índia 50 mg/L	790,4 \pm 113,14 b	87,4 \pm 1,43 b
F ^{Valor de P}	F = 13,38 ^{0,0001}	F = 24,38 ^{0,0001}

¹N = número de repetições.

²Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.

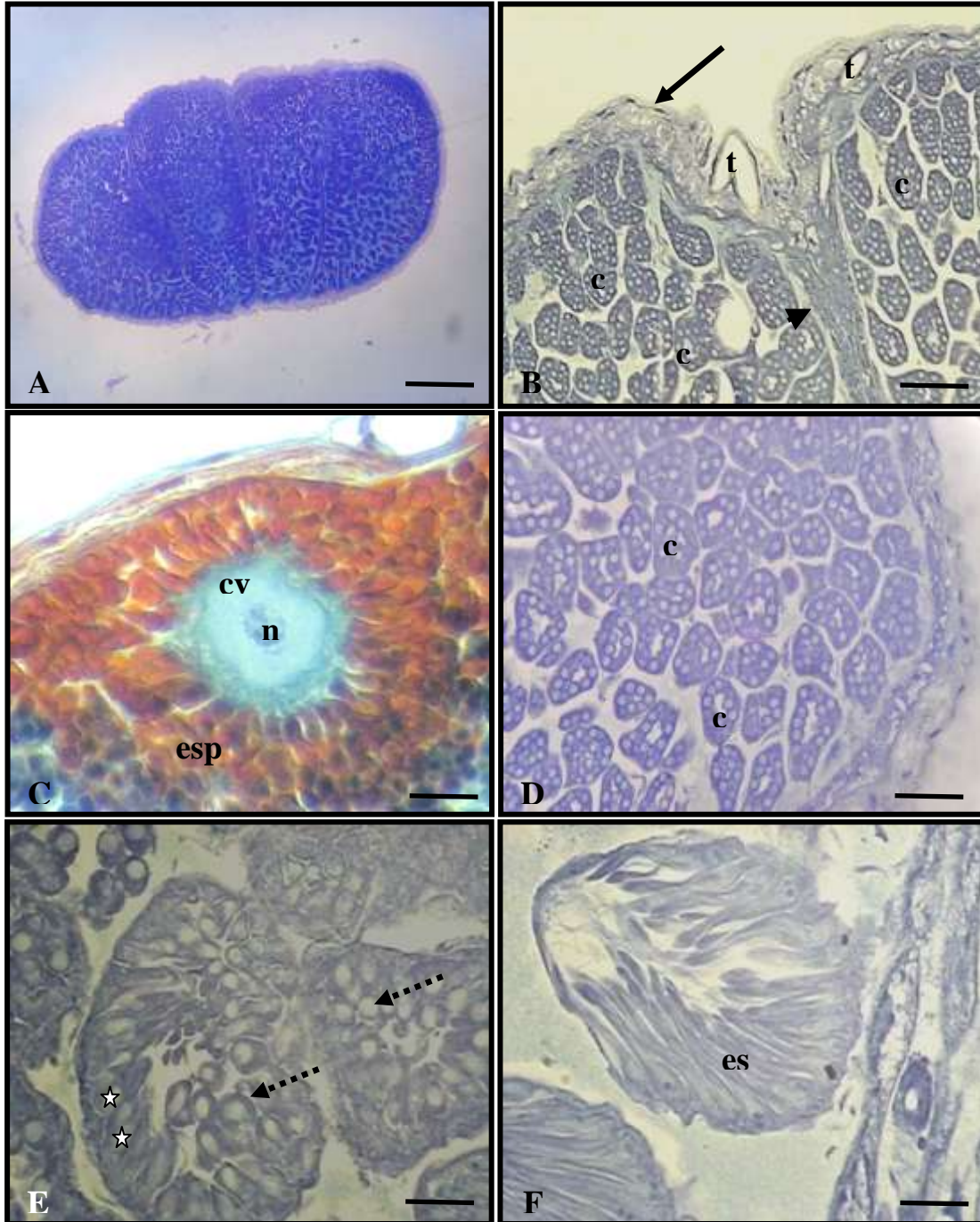


Figura 1. Testículo de larva de *Spodoptera frugiperda* sem tratamento. A – vista geral do testículo. Barra = 200 μ m, Azul de toluidina. B- Detalhe do revestimento testicular. Barra = 100 μ m, Azul de toluidina. C – Germário. Barra = 25 μ m, tricrômico de Mallory. D – zona de crescimento. Barra = 100 μ m, Azul de toluidina. E – Espermátides. Barra = 25 μ m, Azul de toluidina. F – feixe de espermatozóides. Barra = 25 μ m, Azul de toluidina. Seta- tecido conjuntivo, c – cistos, t – traqueólas, ponta de seta – septo de tecido conjuntivo, cv – célula de Verson, n – núcleo, esp – espermatogônias, estrela – espermátides ovais, Seta tracejada - espermátides esféricas, es – espermatozóides.

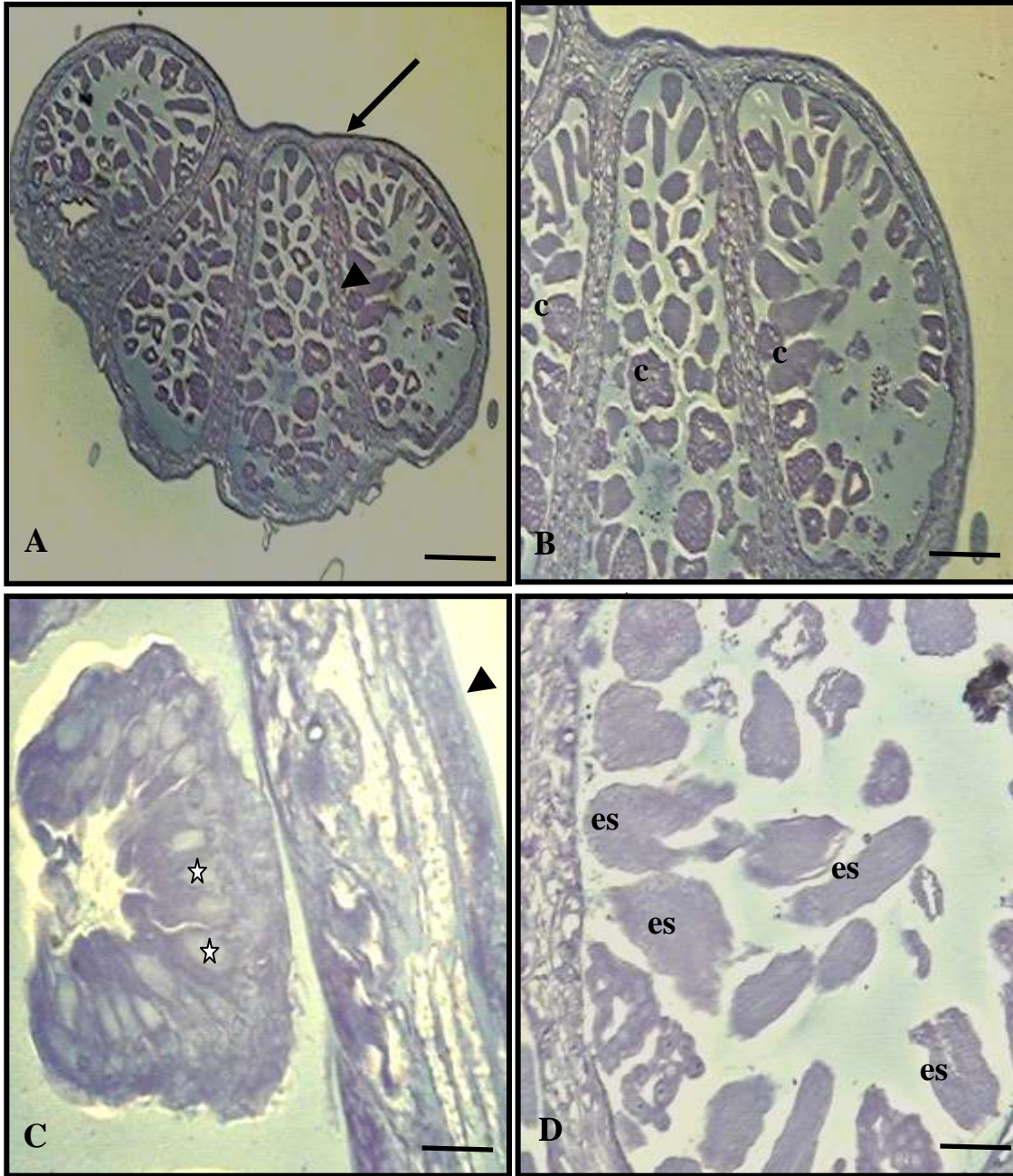


Figura 2. Testículo de larva de *Spodoptera frugiperda* tratadas com o óleo de cravo da índia na concentração de 30 mg/L. A – vista geral do testículo. Barra = 200µm, Azul de toluidina. B- Detalhe do revestimento testicular. Barra = 100µm, Azul de toluidina. C – Espermátides. Barra = 25µm, Azul de toluidina. D – feixes de espermatozóides. Barra = 100µm, Azul de toluidina. Seta- tecido conjuntivo, ponta de seta – septo de tecido conjuntivo, c – cistos, estrela - espermátides ovais, es – espermatozóides.

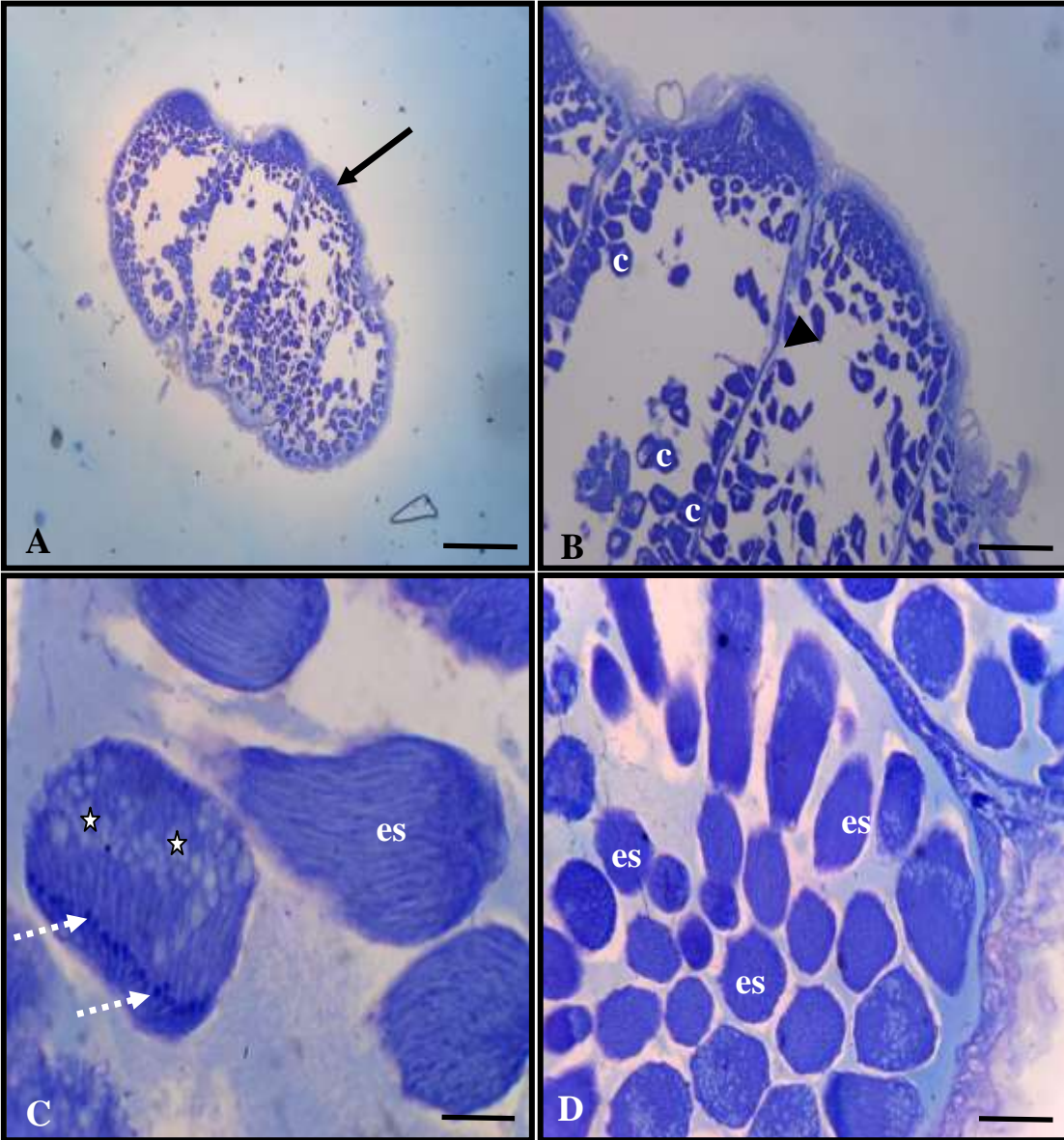


Figura 3. Testículo de larva de *Spodoptera frugiperda* tratada com o óleo de cravo da Índia na concentração de 50 mg/L. A – vista geral do testículo. Barra = 200μm, Azul de toluidina. B- Detalhe do revestimento testicular. Barra = 100μm, Azul de toluidina. C – Espermátides. Barra = 25μm, Azul de toluidina. D – feixes de espermatozóides. Barra = 100μm, Azul de toluidina. Seta- tecido conjuntivo, ponta de seta – septo de tecido conjuntivo, c – cistos, estrela - espermátides ovais, seta tracejada - espermátides esféricas, es – espermatozóides.

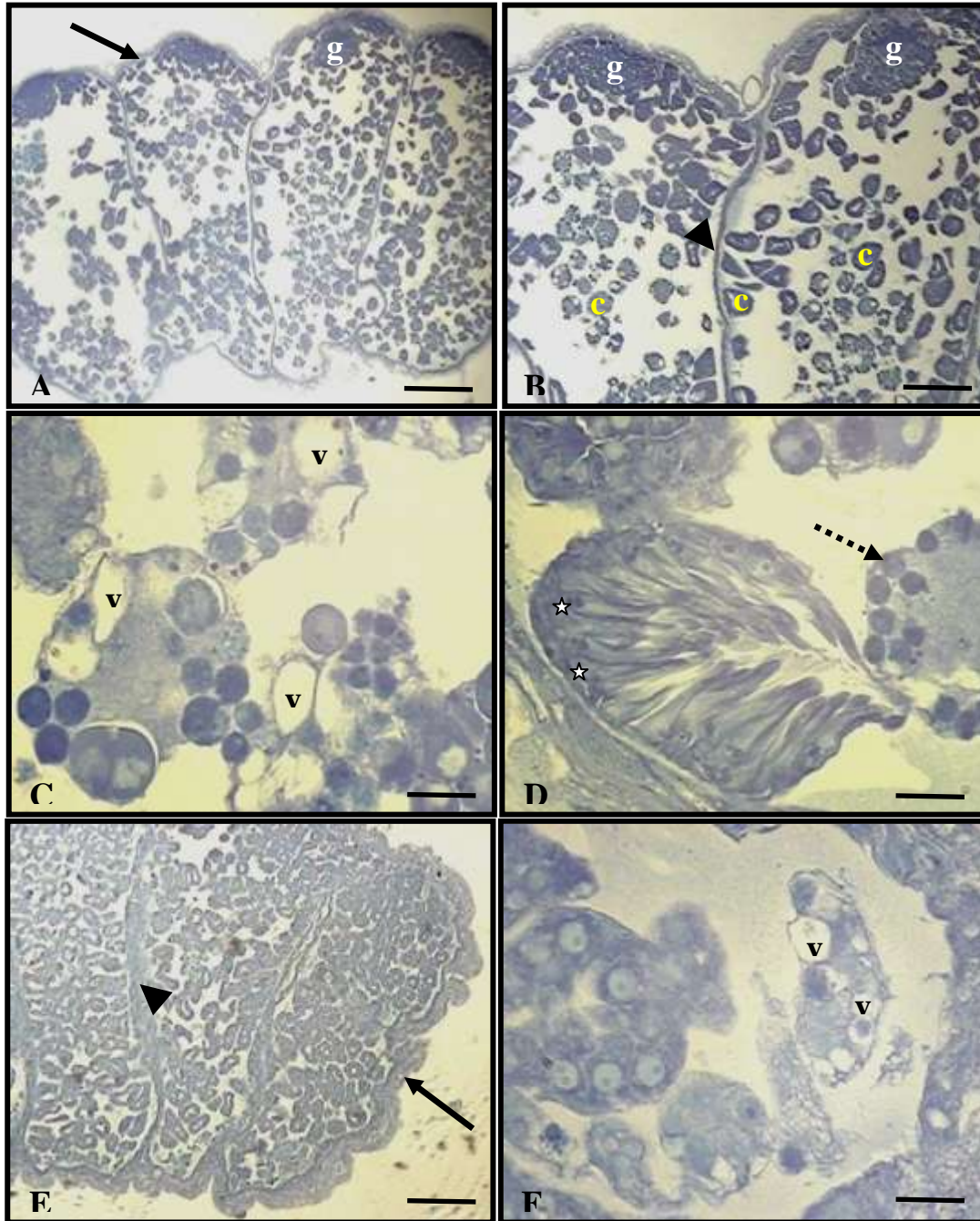


Figura 4. Testículo de larva de *Spodoptera frugiperda* tratada com o óleo de pimenta longa na concentração de 30 mg/L. A – vista geral do testículo. Barra = 200µm, Azul de toluidina. B- Detalhe do revestimento testicular. Barra = 100µm, Azul de toluidina. C – Cistos com células vacuolizadas. Barra = 25µm, Azul de toluidina. D – Espermátides. Barra = 25µm, Azul de toluidina. Testículo de larva de *S. frugiperda* tratada com o óleo de pimenta longa na concentração de 50 mg/L. E - vista geral do testículo. Barra = 200µm, Azul de toluidina. F- Cisto com células vacuolizadas. Barra = 25µm, Azul de toluidina. Seta- tecido conjuntivo, g – germário, ponta de seta – septo de tecido conjuntivo, c – cistos, v – vacúolos, estrela - espermátides ovais, seta tracejada - espermátides esféricas.

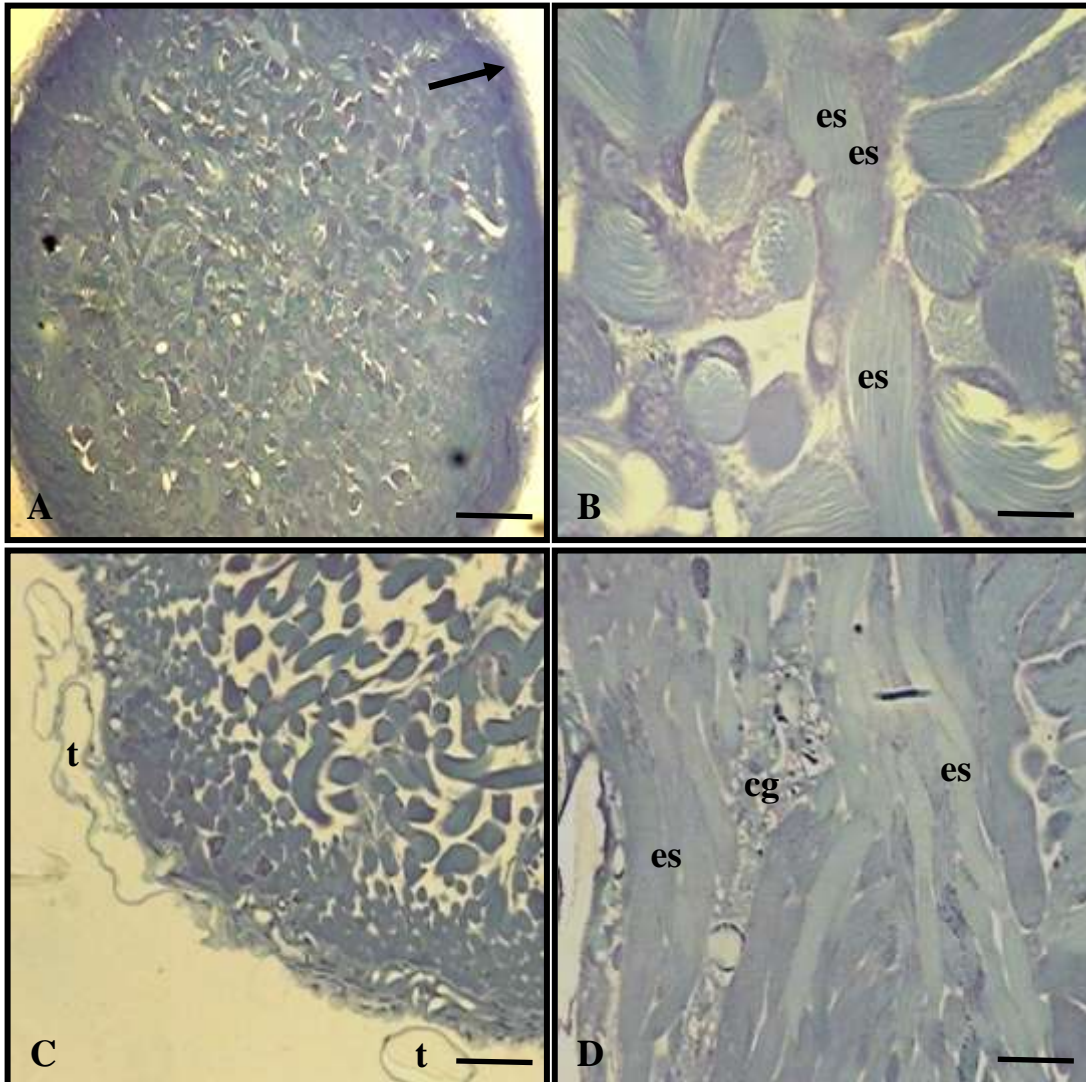


Figura 5. Testículo de adulto de *Spodoptera frugiperda* sem tratamento. A – vista geral do testículo. Barra = 200 μ m, Azul de toluidina. B- feixes de espermatozóides. Barra = 100 μ m, Azul de toluidina. C – Observar abundância de traqueíolas na superfície testicular. Barra = 200 μ m, Azul de toluidina. D – corpo gorduroso e feixes de espermatozóides. Barra = 25 μ m, Azul de toluidina. Seta- tecido conjuntivo, es – espermatozóides, t – traqueíolas, cg – corpo gorduroso.

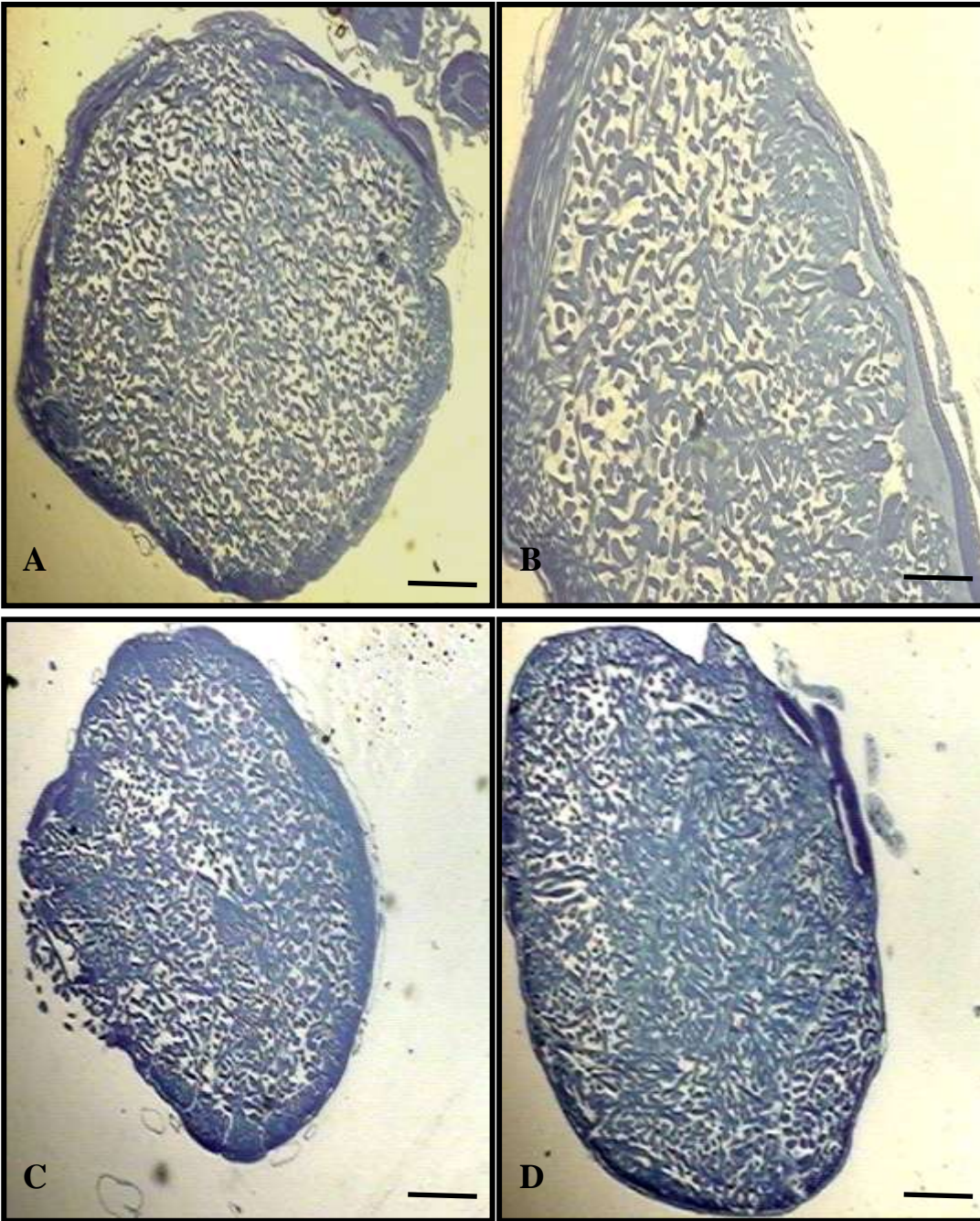


Figura 6. Testículo de adulto de *Spodoptera frugiperda* tratados com óleos: A e B - cravo da Índia nas concentrações de 30 e 50 mg/L, respectivamente. C e D - pimenta longa nas dosagens de 30 e 50 mg/L, respectivamente. Barras = 200 μ m, Azul de toluidina.

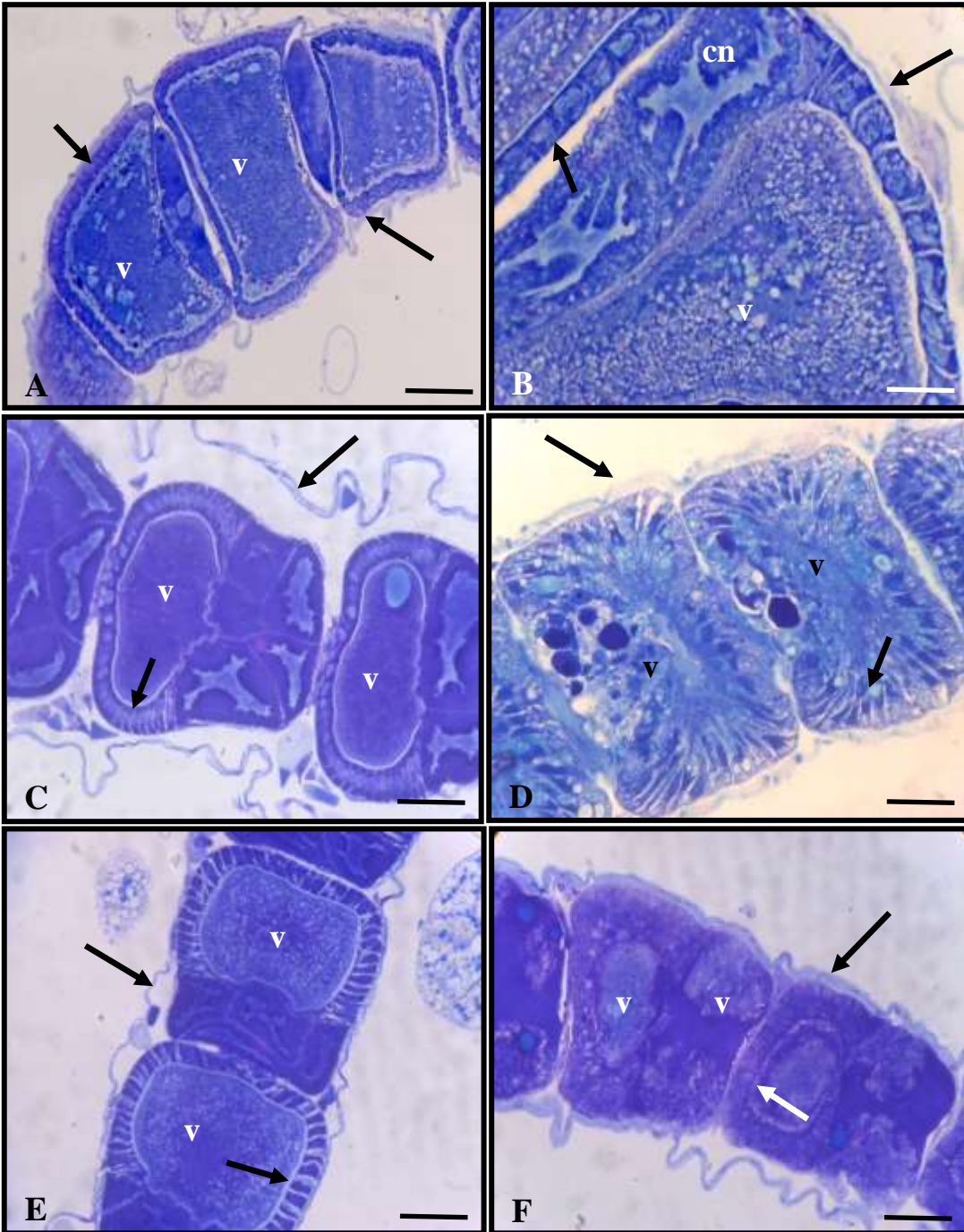


Figura 7. Ovariolo de adultos de *Spodoptera frugiperda*: A e B - sem tratamento. Barras 100µm e 25 µm, respectivamente, Azul de toluidina. C e D – tratadas com óleo de cravo da Índia nas concentrações de 30 e 50 mg/L, respectivamente. Barras = 100µm, Azul de toluidina. E e F - tratadas com óleo de pimenta longa nas concentrações de 30 e 50 mg/L, respectivamente. Barras = 100µm, Azul de toluidina. Seta- bainha de tecido conjuntivo, seta curta – células foliculares, v – vitelo, cn – célula nutriz.

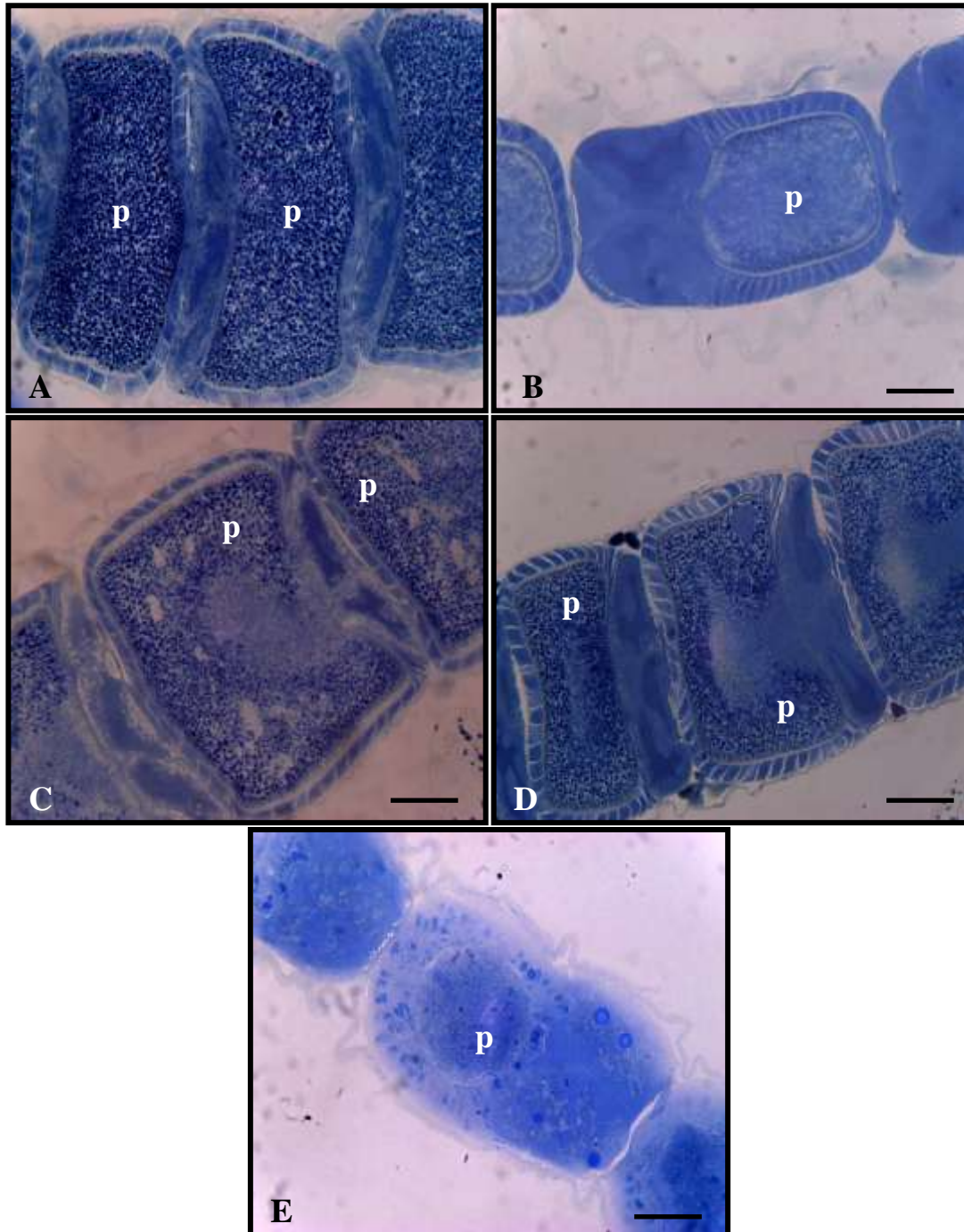


Figura 8. Porção terminal do ovariolo de adultos de *Spodoptera frugiperda*: A - sem tratamento. Barras 100µm, Azul de bromofenol. B e C – tratadas com óleo de cravo da Índia nas dosagens de 30 e 50 mg/L, respectivamente. Barras = 100µm, Azul de bromofenol. D e E - tratadas com óleo de pimenta longa nas dosagens de 30 e 50 mg/L, respectivamente. Barras = 100µm, Azul de bromofenol. p - proteínas.

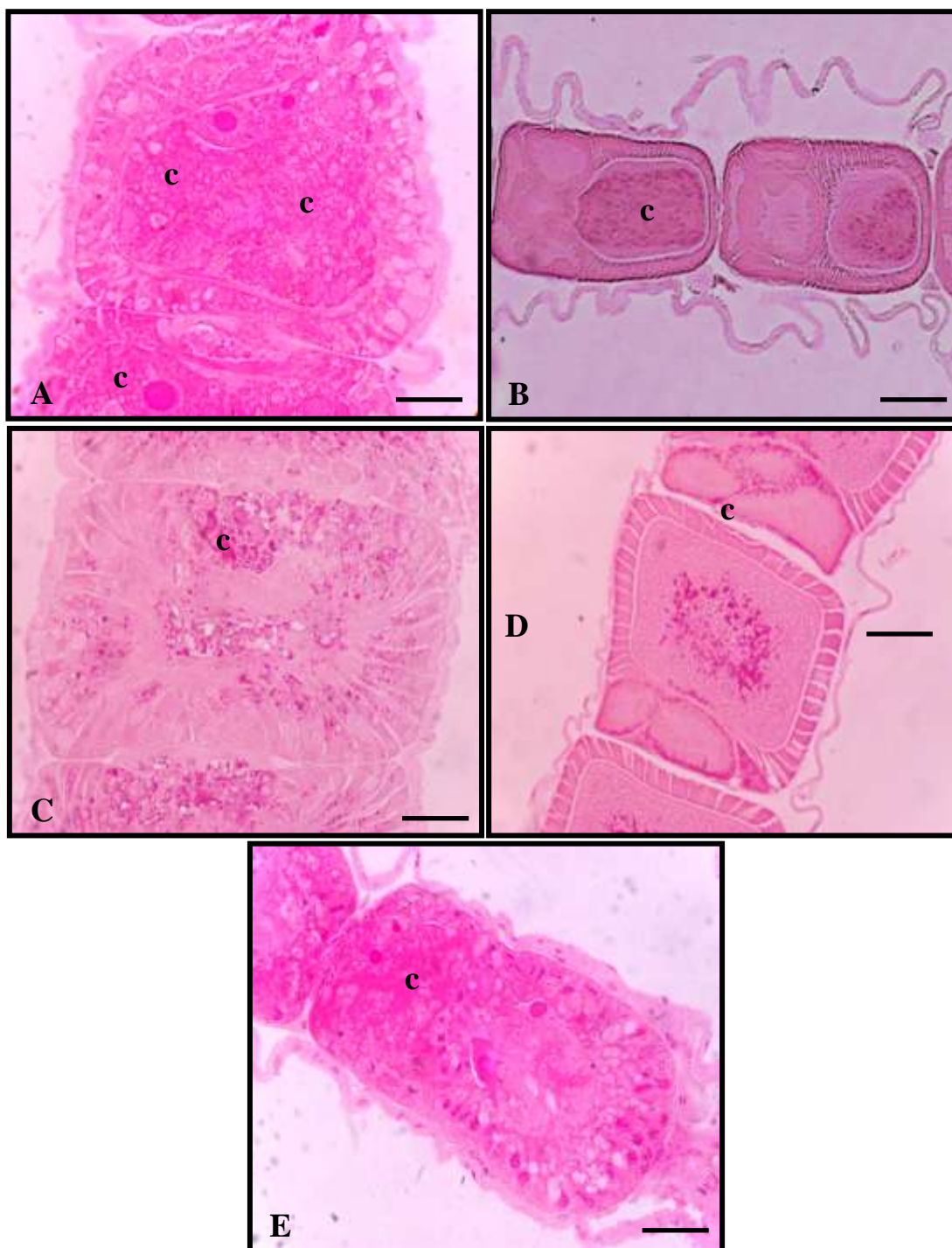


Figura 9. Ovariolo de adultos de *Spodoptera frugiperda*: A – sem tratamento. Barras 100µm µm, P.A.S. B e C – tratadas com óleo de cravo da Índia nas concentrações de 30 e 50 mg/L, respectivamente. Barras = 100µm, Azul de bromofenol. D e E - tratadas com óleo de pimenta longa nas concentrações de 30 e 50 mg/L, respectivamente. Barras = 100µm, Azul de bromofenol. c – carboidratos.