



ESTUDO MORFOLÓGICO DO MESENTERO EM LARVAS DE *Dione juno juno* CRAMER, 1779 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) SUBMETIDAS À TRATAMENTOS COM NIM (*Azadirachta indica*, MELIACEAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

*Anelise Cardoso*¹; *Helio Conte*²; *Satiko Nanya*²

RESUMO: A larva de *Dione juno juno* é a principal praga do maracujá, esta causa muitos prejuízos às plantações. Os bioinseticidas estão sendo utilizados como alternativa para o controle de pragas. Dentre esses, destacam-se, os compostos do nim, *Azadirachta indica*. A azadiractina, principal composto dessa planta, é responsável pela atividade inseticida, podendo causar alterações metabólicas no inseto- alvo levando-o a morte. Um dos principais órgãos atingidos pela azadiractina é o canal alimentar que se divide em três regiões: estomodeo, mesêntero e proctodeo. O mesêntero é a principal região do canal alimentar sendo o local onde ocorre a digestão e absorção dos alimentos. Esse epitélio, em geral é constituído por três tipos de células: as colunares, caliciformes e as regenerativas. O objetivo deste trabalho foi verificar a ação do nim em lagartas de *D. juno juno* sendo que os efeitos observados foram a redução da alimentação e dificuldade das larvas de fazerem a muda. Em preparações histológicas de mesêntero de lagartas alimentadas com diferentes concentrações de nim, observamos alterações na morfologia das células epiteliais, redução do número de células regenerativas e dos ninhos formados por elas, afrouxamento da musculatura associada ao mesêntero. Dessa forma concluímos que o nim é uma alternativa para o uso na agricultura por ser um composto natural e eficiente no controle de *D. juno juno*, podendo ser utilizada no controle biológico desta praga.

PALAVRAS-CHAVE: Alterações morfológicas; histologia; mesêntero; nim.

INTRODUÇÃO

O maracujá é uma fruta de grande importância na fruticultura brasileira, atualmente há pesquisas avançadas na área de melhoramento das plantas para aumentar a produtividade. No Paraná, a cidade de Corumbataí do Sul é a maior produtora da fruta do Estado. No entanto, há um grande problema que atinge as plantações de maracujá, é o ataque das larvas *Dione juno juno* Cramer, 1779 (Lepidoptera: Nymphalidae), a principal praga dos maracujazeiros (*Passiflora sp.*), o seu ataque causa desfolhamento da planta prejudicando a produtividade. A fase de larva é longa e leva cerca de 40 dias sendo o período em que causam os maiores prejuízos à planta (GALLO, *et al.* 2002).

¹ Acadêmica do curso de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/ PR. Bolsista PIBIC/CNPQ. anelise_andre@hotmail.com.

² Docentes da UEM – Departamento de Biologia Celular e Genética – UEM, Maringá/PR hconte@uem.br; snanya@uem.br.

O canal alimentar nos insetos é um tubo que se estende da boca até o ânus, se diferenciando em três regiões, estomodeo ou intestino anterior, mesêntero ou intestino médio e proctodeo ou intestino posterior (BORROR, 1994). O mesêntero é onde ocorre a digestão propriamente dita, onde há envolvimento de enzimas que são produzidas e secretadas, assim como a absorção dos nutrientes, está localizado entre o estomodeo e o proctodeo, constitui-se na maior porção do trato digestivo. O epitélio do intestino médio é constituído por células colunares, responsáveis pelo processamento do alimento, secreção de enzimas digestivas, secreção da matriz peritrófica e absorção dos produtos finais (PINHEIRO, 2006). As células calciformes cooperam atuando na homeostase iônica e na absorção de metabólitos e as regenerativas, repõem as células que foram desgastadas ou perdidas durante o processo de digestão (GÜL, *et al*, 2001; SOUSA, 2009).

Atualmente, os estudos usando bioinseticidas para controle de pragas estão em destaque dentre esses, o nim *Azadirachta indica* A. Juss, da família Meliaceae (SANTOS e ANDRADE, 2000). Em insetos o nim pode ter vários efeitos, dentre eles na alimentação, oviposição e no desenvolvimento. A alteração no desenvolvimento dos insetos é desde a morfologia das células epiteliais até a má formação do exoesqueleto causando deformações graves, levando-o à morte (SCHMUTTERER, 1990). Isso ocorre por causa da semelhança química da azadiractina com o hormônio da ecdise dos insetos, a ecdisona, que perturba a ação do hormônio impedindo a muda e o crescimento (MARTINEZ, 2006).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi analisar as alterações causadas pelo nim no mesêntero das larvas de *D. juno juno*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovos de *D. juno juno* foram coletadas manualmente em plantações de maracujá em área urbana na cidade de Mandaguari/PR 23°31'W, 51°40'S e mantidos em recipientes de plástico em temperatura regulada de 25±1 °C, umidade relativa 70±10% e fotofase de 12 horas, até a obtenção das larvas de 3º instar (17 dias). Em seguida as larvas foram alimentadas com folhas de maracujazeiro tratadas com solução de óleo emulsionável de nim (NATUNEEM® [óleo virgem de nim com teor de azadiractina acima de 1.500 ppm]), nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5 e 1%. Para cada concentração de solução, foram testadas quatro caixas contendo 10 larvas cada uma, totalizando 16 caixas tratadas e uma caixa do controle. Em cada caixa foram colocadas 3 folhas tratadas com solução de nim e o controle com água destilada, por um período de 48h, sendo observado o comportamento alimentar das larvas. Após esse período as folhas foram trocadas por folhas sem tratamento. No intervalo de 48, 72, 96 e 120h após a exposição ao nim, foram observados o comportamento das larvas e de cada intervalo foram retiradas da caixa 3 larvas de cada uma das repetições, cujas larvas foram dissecadas, o mesêntero foi fixado em Boiun aquoso e submetido aos procedimentos histológicos de rotina com inclusão em parafina, cortes de 6 µm, coloração de HE e análise e fotografia das lâminas com auxílio de câmera Sony Cyber-Shot DSC-S650.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise do comportamento das larvas de *D. juno juno* com folhas de maracujazeiro contendo nim verificamos uma redução na quantidade ingerida, nos intervalos de 48, 72, 96 e 120h, especialmente nas concentrações 0,5 e 1%. Foi observada maior redução na alimentação no tratamento após 48h. Após 96h de exposição ao nim, as larvas passaram a ter reações mais lentas e tiveram dificuldades de fazer a muda, ficando presas ao exoesqueleto. As larvas da concentração 0,1% após

120h iniciaram empupamento, mas as pupas formadas eram mais moles do que as pupas formadas pelas larvas do controle. Segundo MORDUE and NISBET (2000), indivíduos da Ordem Lepidoptera são mais sensíveis a ação antialimentar da azadiractina presente no nim a partir das concentrações de 1 ppm, ocorrendo um efeito maior quando o contato com esse composto é por ingestão, forma de contato utilizada em nossos experimentos. SCHMUTTERER, (1990), relata que os efeitos do nim durante a muda dos insetos, podem levar a má formação de pupas, eclosão de insetos com asas e pernas defeituosas.

Em análise histológica do mesêntero de larvas expostas a concentração 0,1%, as células epiteliais apresentaram-se desorganizadas e mais acidófilas. As células colunares apresentam porção apical mais dilatada com grânulos acidófilos, semelhantes às bolsas encontradas no lúmen do intestino e o núcleo volumoso (Fig. 1B e C). As células caliciformes também apresentaram alterações morfológicas, sendo mais arredondadas, núcleo volumoso, ausência do conteúdo celular dentro dos vacúolos (Fig. 1B e C). Observou-se uma redução do tamanho das células regenerativas, presentes somente na base do epitélio e com aparência deformada (Fig 1D). Em algumas regiões do epitélio a musculatura não se encontrou aderida à parede (Fig. 1E). Assim como em 0,1%, as alterações celulares se mantiveram em 0,25%, ocorrendo aumento do volume celular e de secreções das células colunares e caliciformes; redução no tamanho das células regenerativas. As células colunares e caliciformes apresentaram-se mais alongadas, com uma grande variação de tamanhos entre si, não havendo uma uniformidade como observado no controle (Fig. 1A e E). As substâncias secretadas por essas células aparentam similaridade com parte do citoplasma das células secretoras, sendo esse material acidófilo. As células regenerativas além de terem tamanho reduzido, não formam os ninhos de regeneração o que é característico desse tipo de célula em Lepidoptera. Nas concentrações de 0,5 e 1%, as alterações celulares foram similares, de forma que a porção apical das células colunares se encontra dilatada assim como o núcleo, localizado também nessa mesma região, havendo uma grande eliminação de secreção por essas células (Fig. 1E). As células caliciformes apresentam vacúolo vazio e mais dilatado do que o normal. A musculatura do intestino apresentou as fibras mais finas e estas não acompanha o dobramento do epitélio. A região anterior do mesêntero apresentou um maior número de células deformadas, em relação ao controle, além de um grande número de bolsas de secreção. Na concentração de 1% foi observado que as células epiteliais apresentaram-se mais alongadas e separadas entre si.

Quanto aos efeitos da azadiractina a níveis celulares, MORDUE and NISBET (2000) relatam que o efeito desse composto causa a inibição da divisão celular e da maquinaria celular que mantém o metabolismo, perda do tônus muscular, além de causar necrose das células epiteliais do mesêntero e diminuir os ninhos de regeneração. Efeitos também observados em *D. juno juno*, onde a musculatura do epitélio se apresentou frouxa, as células epiteliais, principalmente nas maiores concentrações, estavam desorganizadas, mas sem características de necrosadas. Quanto à diminuição dos ninhos de regeneração observado está de acordo com os obtidos em *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) por CORREIA, *et al.* (2009).

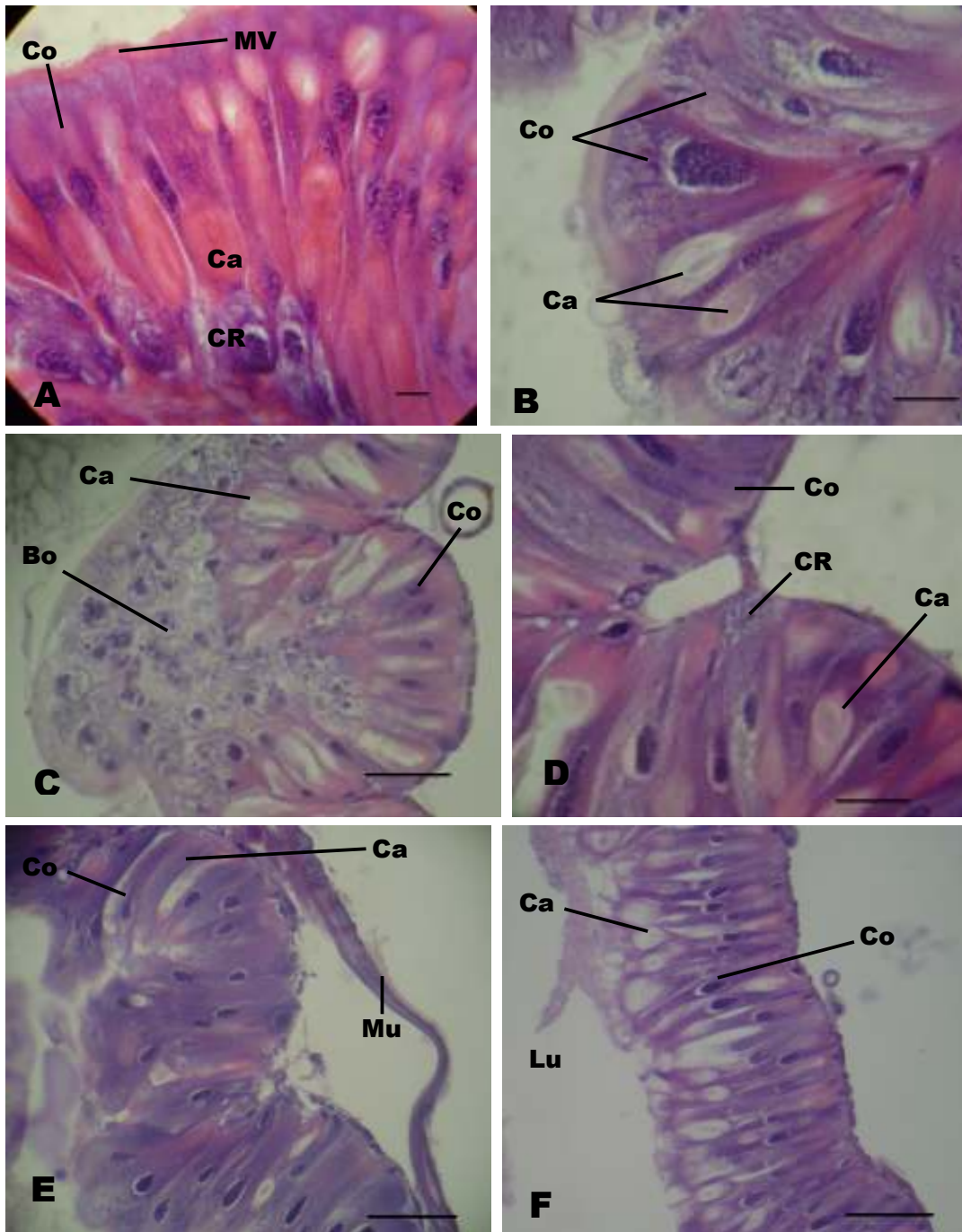


Figura 1: Mesêntero de larvas *D. juno juno* tratados com nim. A= Epitélio do controle. Barra = 10 μ m; B= Células epiteliais com tratamento 0,1%. Barra= 10 μ m; C= Secreção das células epiteliais 0,1%. Barra= 30 μ m; D= Células regenerativas. Barra= 10 μ m; E= Musculatura epitélio com tratamento 0,25%. Barra= 30 μ m; F= Epitélio com tratamento 1%. Barra= 30 μ m. Bo= Bolsas de secreção; Ca= células caliciformes; Co= células colunares; CR= células regenerativas; Lu= Lúmen do mesêntero; Mu= células musculares.

CONCLUSÃO

Concluimos que o extrato de nim é eficiente no controle de *D. juno juno*, pois este leva à redução na atividade alimentar impedindo que os insetos façam a muda. Os efeitos

dessa substância a níveis celulares demonstraram alterações nas células epiteliais do mesêntero, impedindo que ele absorva os nutrientes levando o inseto a morte. Portanto, o extrato de nim na agricultura é uma alternativa para o controle biológico, pois apresenta um custo reduzido em relação aos inseticidas sintéticos e evita a contaminação dos produtores e do meio ambiente pelos agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

BORROR, D.J., TRIPPHON, C.A. **An Introduction to the Study of Insects**, sixth edition, Hardcourt Brace College Publishes, 1994.

CORREIA, A. A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; OLIVEIRA, J. V.; TORRES, J. B. Morfologia do Canal Alimentar de Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Alimentadas com Folhas Tratadas com Nim. **Neotropical Entomology** 38(1):083-091, 2009.

GALLO, D.; NAKANO, O; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.P.R.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GÜL, N.; SAYAR, H.; ÖZSOY, N.; AYVALI, C. A Study of Endocrine Cells in the Midgut of *Agrotis segetum* (Den. and Shiff.) (Lep.: Noctuidae). **Turk J Zool.** 25 (2001) 193-197.

MARTINEZ, S.S. O Nim - *Azadirachta indica* - um Inseticida Natural. **IAPAR**, 2006.

MORDUE (Luntz), A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **An Soc Entomol Brasil** 29: 615-632, 2000.

PINHEIRO, D.O. Variações regionais nas células epiteliais do intestino médio de *Diatraea saccharalis*, Fabricius 1794 (Lepidoptera: Crambidae), em larvas não-parasitadas e na vigência do parasitismo por *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

SANTOS, L.U.; ANDRADE, C.F.S. **Azadirachta indica – A Árvore do Nim e o controle de Piolhos**. Departamento de Zoologia, IB, UNICAMP, 2000.

SCHMUTTERER, H. Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta indica*. **Annu. Rev. Entomol.** 1990. 35:271-297.

SOUSA, M.E.C. Análise Morfológica e Ultra-Estrutural do Mesentero de *Alamamba argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) frente a toxina Cry1Ac. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2009.