



**ALTERAÇÕES NO EPITÉLIO DO INTESTINO MÉDIO DE PUPA DE
Ceraeochrysa claveri (Navás, 1911) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE)
ALIMENTADA NA FASE DE LARVA COM OLÉO DE NIM
(*Azadirachta indica*, A. Juss)**

*Elton Luiz Scudeler*¹; *Daniela Carvalho dos Santos*²

RESUMO: Os efeitos da ingestão do óleo de nim na fase larval sobre o epitélio pupal do intestino médio de *Ceraeochrysa claveri* foram avaliados a nível histológico e ultraestrutural. Ovos de *Diatraea saccharalis* foram imersos em soluções de 0,5; 1 e 2% de óleo de nim e posteriormente oferecidos como alimento para larvas de *C. claveri* durante toda fase larval. O intestino médio de pupas com 5 dias foram coletados e processados para análise em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo constatado alterações no formato celular e nuclear das células colunares, além de alterações na distribuição das microvilosidades apicais, assim como maior presença de protusões citoplasmáticas, além do rompimento da membrana plasmática apical. Deste modo, a ingestão do óleo de nim mostrou-se tóxica, causando alterações dose dependentes no epitélio pupal de *C. claveri*.

PALAVRAS-CHAVE: Crisopídeo; morfologia; ultraestrutura.

INTRODUÇÃO

O intestino médio (IM), segundo maior órgão dos insetos, tem como função a produção e secreção de enzimas digestivas, absorção, armazenamento e manutenção da homeostase. Formado por um epitélio simples ou pseudoestratificado, é constituído principalmente por células colunares, regenerativas e endócrinas apoiado sobre uma membrana basal, em torno da qual dispõem camadas fibras musculares circulares e longitudinais.

Após o último instar larval, os insetos entram em metamorfose, nesta condição, células regenerativas proliferam e diferenciam em um epitélio simples cuboidal, e este epitélio pré-pupal separa do resto do epitélio larval, que uma vez no lúmen, sofre progressiva degeneração, permitindo a recaptura de nutrientes que nele estavam armazenados (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010).

Ceraeochrysa claveri é predador polífago na fase larval, encontrado em muitas culturas de interesse econômico, exercendo importante papel no controle biológico, reduzindo a densidade populacional de diversos artrópodes praga. Sua preservação deve ser considerada ao buscar e utilizar produtos seletivos a esta população de inimigo

¹Mestrando do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Botucatu, SP. Bolsista Fapesp (processo nº 2010/03606-9). escudeler@ibb.unesp.br

²Docente do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP. daniela@ibb.unesp.br

natural, sendo uma alternativa o uso de derivados de plantas com bioatividade contra artrópodes (FREITAS, 2002; VEIGAS Jr., 2003).

O óleo de nim (*Azadirachta indica*) (Meliaceae) apresenta efeitos colaterais para inúmeras espécies de insetos praga, sendo também referenciado como um produto de baixa toxicidade aos inimigos naturais e de rápida degradação no ambiente (SCHMUTTERER, 1990). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de alterações no epitélio pupal do IM a nível histológico e ultraestrutural, ocasionadas pela ingestão do óleo de nim por larvas de *C. claveri*, em condições laboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Pupas de *C. claveri* foram obtidas da criação mantida no Laboratório de Insetos, com temperatura controlada $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Para realização do experimento, pupas tratadas com óleo de nim foram obtidas de larvas de *C. claveri* que receberam como alimento durante toda a fase larval ovos de *Diatraea saccharalis* (Lep: Crambidae). Estes ovos foram tratados com soluções de 0,5; 1 e 2% de óleo de nim emulsionável (formulação comercial Natuneem®) diluído em água destilada, onde as posturas de *D. saccharalis* eram imersas por 5s e posteriormente secas a temperatura ambiente. Pupas controle foram resultantes de larvas alimentadas com ovos tratados apenas em água destilada.

Para análise, pupas com cinco dias precedente de larvas tratadas e controle foram dissecadas pela região dorsal, onde o IM foi isolado, fixado em Karnovsky e submetido à técnica de inclusão em metacrilato-glicol. Cortes histológicos foram corados por Hematoxilina e Eosina (H.E.) e posteriormente analisados e documentados ao microscópio Axioskop 40 da Zeiss com sistema de captura de imagens AxioVision 4.7.

Já para análise ultraestrutural, o IM foi fixado em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M por 24h, pós fixado em tetróxido de ósmio a 1%, desidratados em soluções crescentes de etanol e secos em ponto crítico. Em seguida, realizou-se a metalização com pó de ouro e posterior examinação e documentação fotográfica em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) QUANTA 200 da FEI Company.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pupas controle apresentaram na região anterior do IM colunares cilíndricas, com superfície basal irregular, citoplasma pouco basófilo, com escassos vacúolos na região média e apical e grânulos citoplasmáticos na região apical. O núcleo esférico está localizado preferencialmente na região basal das células com grânulos homogêneos de cromatina dispersos (Fig.1A). Já em pupas tratadas com óleo de nim a 1% as células colunares apresentaram-se mais estreitas com formato irregular, assim como aumento de irregularidade no contorno da região basal e apical, com núcleos menores e mais densos (Fig. 1B). É possível observar no quinto dia de pupação o epitélio larval na cavidade intestinal sofrendo progressiva degeneração (Figs. 1B-D).

Na região média do IM de pupa controle as células colunares possuem formato cúbico, com superfície basal e apical regulares, citoplasma pouco basófilo com grânulos na região média e apical. Núcleos esféricos e grandes são localizados preferencialmente na região basal das células (Fig. 1C). No tratamento a 2% as células colunares apresentaram formato pavimentoso, núcleos basófilos ovais e condensados (Fig.1D). Nenhuma alteração foi observada nos feixes musculares circulares e longitudinais que envolvem o epitélio intestinal, assim como na região posterior do IM.

A análise ultraestrutural da superfície interna do IM permitiu visualizar somente a superfície apical das células colunares, por serem as mais altas, numerosas e apresentarem grande quantidade de microvilosidades voltadas em direção ao lúmen.

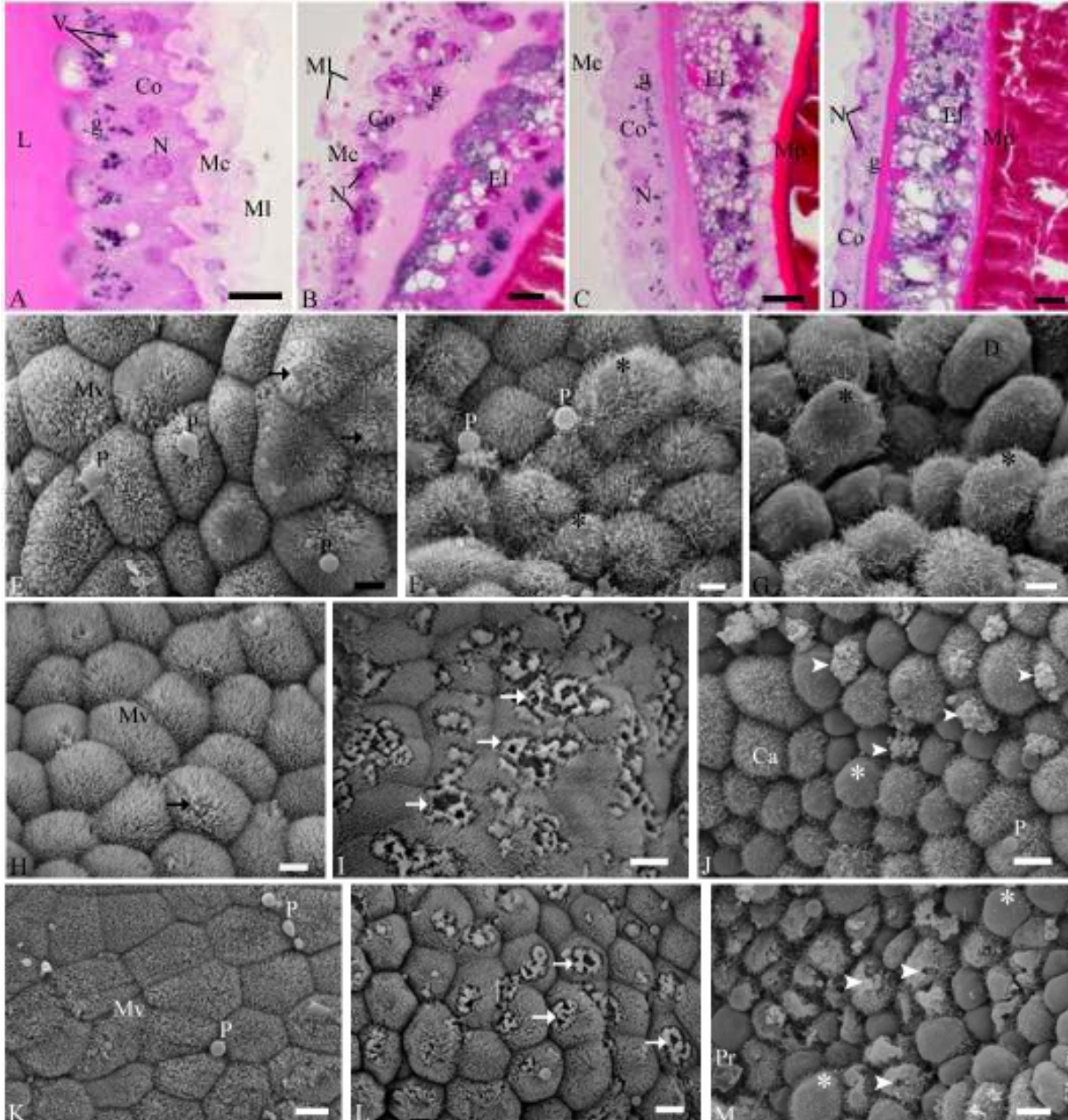


Figura 1. (A) Região anterior do IM de pupa controle. Células colunares (Co) cilíndricas, com escassos vacúolos (V), grânulos citoplasmáticos (g), núcleo esférico (N) descondensado na região basal. Feixes de fibras musculares longitudinais (MI) e circulares (Mc). Lúmen (L); (B) Região anterior do IM de pupa tratada com nim a 1%. Células colunares (Co) estreitas com formato irregular, núcleos menores e densos (N), epitélio larval (El) em degeneração do lúmen; (C) Região média o IM de pupa controle. Células colunares (Co) cúbicas; (D) Região média do IM de pupa tratada a 2%. Células colunares (Co) com formato pavimentoso com núcleos (N) densos. Barras = 20 µm, coloração: HE.; (E) Região anterior do IM de pupa controle. Células colunares abauladas, com microvilosidades (Mv) uniforme, escassez de protusões citoplasmáticas (P), pontos com poucas microvilosidades (→); (F) Região anterior do IM de pupa tratada com óleo de nim a 1,0%. Microvilosidades escassas e desorganizadas (*); (G) Região anterior do IM de pupa tratada a 2,0%. Células colunares com região apical dilatada (D), microvilosidades irregulares e escassas (*); (H) Região média do IM de pupa controle. Células levemente abauladas, com microvilosidades exuberantes (Mv) e poucos pontos de formação de protusões citoplasmáticas (→); (I) Região média do IM de pupa tratada a 0,5%. Superfície de células exibindo áreas com microvilosidades desorganizadas (→). (J)

Região média do IM de pupa tratada a 2,0%. Células colunares abauladas (Ca), escassas microvilosidades proeminentes (*), protusões citoplasmáticas lisas (P), eliminação de conteúdo citoplasmático (►); (K) Região posterior do IM de pupa controle. Células colunares achatadas e justapostas, com microvilosidades regulares (Mv), pequenas protusões citoplasmáticas lisas (P); (L) Região posterior do IM de pupa tratada 1,0%. Detalhe da superfície de algumas células colunares exibindo áreas arredondadas com padrão distinto de distribuição de microvilosidades (→). (M) Região posterior do IM de pupa tratada a 2,0%. Células colunares com microvilosidades escassas (*), protusões citoplasmáticas com membrana colabada e enrugada (Pr). Notar o rompimento da membrana plasmática apical (►) em algumas células colunares, liberando conteúdo citoplasmático para o lúmen e adquirindo aspecto enrugado e colabado. Barras: F, G = 4 µm; E, H = 5 µm; K = 7 µm; I, J, L, M = 8 µm.

Em pupas controle, a região anterior do IM apresentou células colunares abauladas, com microvilosidades exuberantes distribuídas uniformemente. Poucas protusões citoplasmáticas apicais lisas e arredondadas foram observadas. Pequenos pontos na superfície apical com escassez de microvilosidades podem indicar a formação de protusões (Fig. 1E).

Alterações significativas puderam ser constatadas nos tratamentos com óleo de nim a 1 e 2%, onde observamos progressiva desorganização e escassez de microvilosidades, assim como aumento na quantidade de células com a superfície apical alongada, que provavelmente darão origem a protusões citoplasmáticas (Figs. 1F-G).

Na região média do IM de pupas controle as células colunares são levemente abauladas, com microvilosidades distribuídas regularmente. Poucos pontos apresentaram microvilosidades esparsas (Fig.1H). Para o tratamento a 0,5%, notou-se a ocorrência de varias áreas arredondadas com microvilosidades desorganizadas, apresentando microvilosidades desorganizadas na lateral e ausência de microvilosidades na área central (Fig. 1I). Acreditamos que esta alteração esteja associada à liberação de protusões citoplasmáticas em momentos anteriores.

No tratamento a 2% constatamos maior escassez de microvilosidades, superfície apical abaulada e eliminação de conteúdo citoplasmático na superfície epitelial devido ao rompimento da membrana apical (Fig. 1J).

A região posterior do IM de pupas controle apresentou células bastante achatadas e justapostas, com altura regular, que confere uma superfície epitelial plana. As microvilosidades são regulares e não proeminentes. Poucas protusões lisas e arredondadas foram encontradas desta região (Fig. 1K).

Para o tratamento de 0,5 e 1%, a principal alteração desencadeada foi a ocorrência de áreas circulares com microvilosidades desorganizadas, sendo mais freqüente na concentração de 1%, além das células apresentarem-se mais abauladas (Fig. 1L). A 2% ocorreram severas alterações, dentre elas células colunares com poucas microvilosidades, sendo estas proeminentes e desorganizadas; células rompidas, com membrana colabada e enrugada, além da eliminação do conteúdo citoplasmático (Fig. 1M).

Os resultados histológicos e ultraestruturais mostraram aspectos morfológicos das células epiteliais nas diferentes regiões do IM, que se modificaram de acordo com a concentração do óleo de nim utilizado, sendo o mesmo descrito para trabalhos com a *A. indica* e para outros óleos e extratos vegetais quando ingerido pelos insetos. Algumas das alterações observadas como estreitamento e alongamento das células colunares, núcleos menores e mais densos também foram relatados por Roel et al. (2010) em *Spodoptera frugiperda* alimentadas com óleo de nim.

Poucos trabalhos apontam lesões ultraestruturais na superfície apical das células colunares observadas ao MEV. As alterações mais observadas correspondem à desorganização e espaçamento das microvilosidades, tornando-se escassas e proeminentes em alguns pontos focais, além da dilatação da superfície apical, formação e liberação de protusões citoplasmáticas em direção ao lúmen e rompimento da membrana apical liberando conteúdo citoplasmático no lúmen.

As alterações detectadas nestes tratamentos corroboram com as alterações ocasionadas pelo uso da azadiractina, extratos vegetais e pela ação de toxinas do *Bacillus thuringiensis* como foi observado respectivamente por Nasiruddin e Mordue (Luntz) (1993); Nogueira et al. (1997); Rey et al. (1999); Spies e Spence (1985).

CONCLUSÃO

Constatou-se que a ingestão do óleo de nim mostrou-se prejudicial à integridade do epitélio pupal, pois ocasionou alterações no formato e integridade das células colunares e microvilosidades, sendo estas alterações dose dependentes.

REFERÊNCIAS

FREITAS, S. O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas. In: Parra, J.R.P. (Ed.) **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, cap. 13, p. 209-224.

HAKIM, R.S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. **Annu. Rev. Entomol.** n.55, p.593-608, 2010.

LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall. 1996, 486p.

NASIRUDDIN, M.; MORDUE (LUNTZ), A.J. Effect of azadirachtin on the midgut histology of the locusts *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. **Tissue and Cell**, v.25, n.6, p.875-884, 1993.

NOGUEIRA, N.F.S.; GONÇALVES, M.; GARCIA, E.M.; SOUZA, W. Effect of azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, p.58-63, 1997.

REY, D.; PAUTOU, M.P; MEYRAN, J.C. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic dipter larval. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.173-181, 1999.

ROEL, A.R.; DOURADO, D.M.; MATIAS, R.; PORTO, K.R.A.; BEDNASKI, A.V.; COSTA, R.B. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.54, n.3, p.505-510, 2010.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annu. Rev. Entomol.**, v.35, p.271-297, 1990.

SPIES, A.G.; SPENCE, K.D. Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. **Tissue & Cell**, v.17, n.3, p.379-394, 1985.

VEIGAS Jr., C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quím. Nova**, v.26, n.3, p.390-400, 2003.