

JULIANA MENDONÇA CAMPOS

ATUAÇÃO DA SALIVA E DE SEUS COMPOSTOS NÃO PROTEICOS, *N,N*-
DIMETILANILINA E 1,2,5-TRITIEPANO, DE *Podisus Nigrispinus*
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) SOBRE SUA PRESA

Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Viçosa
Minas Gerais – Brasil
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C198a
2019 Campos, Juliana Mendonça, 1983-
Atuação da saliva e de seus compostos não proteicos,
N,N-dimetilanilina e 1,2,5-tritiepano, de *Podisus nigrispinus*
(Heteroptera: Pentatomidae) sobre sua presa / Juliana Mendonça
Campos. – Viçosa, MG, 2019.
x, 63f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Cola Zanuncio.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Percevejo (Inseto). 2. Saliva. 3. Digestão. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22 ed. 575.754

JULIANA MENDONÇA CAMPOS

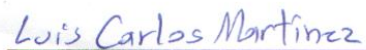
ATUAÇÃO DA SALIVA E DE SEUS COMPOSTOS NÃO PROTEICOS,
N,N-DIMETILANILINA E 1,2,5-TRITIEPANO, DE *Podisus nigrispinus*
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) SOBRE SUA PRESA

Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2019.



Rosenilson Pinto



Luis Carlos Martinez Castrillon



Terezinha Maria Castro Della Lucia



José Eduardo Serrão



José Cola Zanuncio
(Orientador)

Aos meus pais “Toninho e Silvia e à família Buscapé”
Eu dedico de todo meu coração este trabalho e este título.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam, foram solidárias e que torceram por mim. Sinto que este trabalho não é **só meu**. Pelos autores que li, pelos professores com quem tive aulas, pelos colegas que me fizeram aprender com as discussões e conversas e pelos comentários e sugestões feitas aos primeiros rascunhos da tese.

Quero agradecer aos Professores José Eduardo Serrão, Terezinha Della Lucia e Luis Carlos Martinez, pelas sugestões, conselhos, dicas informais, livros emprestados, participação e carinho (a quem agradeço aqui: obrigada). Boa parte das sugestões destas pessoas estão aqui incorporadas. Agradecimento especial faço ao meu orientador, Dr. José Cola Zanuncio e a Co-Orientadora Dra. Rosa Angelica Plata-Rueda, antes de qualquer coisa pela paciência que tiveram comigo, pelos ensinamentos e dicas de pesquisa e pelas horas de leituras gastas no meu trabalho. Suas sugestões nunca soaram audaciosas de quem detém o título de Doutor, mas foram sempre úteis, sempre bem-vindas e acabaram por constituir-se neste trabalho. Muito obrigada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pelo apoio à realização desta pesquisa. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários e amigos dos Laboratórios de Controle Biológico, de Ultraestrutura Celular e do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, pela parceria e apoio na realização dos experimentos, e por permitirem o acesso a toda a documentação, por vezes até, indicando materiais que eu desconhecia. E as secretárias Tatiani e Lídia, pela alegria, telefonemas e por resolver nossos problemas diários.

Seria injusto não citar os amigos, que desde o início acompanharam meu trabalho, em especial, Angelica (Angelita), Gabriela Rolim (Gabis), Valdeir Celestino (Valdeirs) e Luis. Minha família merece poucas palavras, obrigada por vocês existirem. Obrigada por depositarem em mim a confiança. Sei que vocês se orgulham por eu ter atingido esta etapa da minha vida. Mas este orgulho que sentem por mim, resumo numa obrigação de, a cada dia, ser mais digno de representá-los. Pais, manos e sobrinhos, um beijo em cada um de vocês.

E ao José, pelas conversas inspiradoras e pelo incentivo para iniciar o doutorado.

Deus obrigada, por se fazer presente em todos os momentos, me concedendo fé, força e coragem para superar os obstáculos e comemorar as alegrias.

BIOGRAFIA

JULIANA MENDONÇA CAMPOS, filha de Antônio Afonso Campos e Silvia Helena Mendonça Campos, nasceu em 07 de julho de 1983, Rio de Janeiro, Brasil.

Em abril de 2003, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica, Rio de Janeiro, concluindo-o em agosto de 2008.

Em fevereiro de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) da Universidade Federal do Paraná, em nível de Mestrado, submetendo-se à defesa, em 22 de fevereiro de 2013.

Em fevereiro de 2015, iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do professor Dr. José Cola Zanuncio, submetendo-se à defesa de tese no dia 27 de fevereiro de 2019.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. Introdução Geral	1
3. Bibliografia.....	4
CAPÍTULO 1	9
Resumo	9
1. Introdução	10
2. Material e Métodos	12
2.1 Insetos.....	12
2.2 Preparação do extrato de saliva.....	13
2.3 Toxicidade da saliva de <i>Podisus nigrispinus</i> e dos compostos não proteicos ..	13
2.4 Microscopia de luz	13
2.5 Microscopia eletrônica de transmissão	14
2.6 Microscopia confocal	15
2.7 Análises estatísticas.....	15
3. Resultados	16
3.1 Toxicidade.....	16
Tabela 1.....	16
Figura 1	17
3.2 Histopatologia.....	17
Figura 2.	18
Figura 3.	19
3.3 Ultraestrutura	20
Figura 4	21
3.4 Microscopia confocal.....	22
4. Discussão	24
5. Conclusão	27
7. Bibliografia.....	27
CAPÍTULO 2	38
Resumo	38
1.Introdução.....	39
2. Material e métodos	40

2.1 Insetos	40
2.2 Toxicidade dos compostos não proteicos <i>N,N</i> -dimetilanilina e <i>1,2,5</i> -trietilpano ..	41
2.3 Microscopia de luz.....	41
2.4 Microscopia eletrônica de transmissão	42
2.5 Detecção de fragmentação de DNA.....	42
2.6 Análises estatísticas	43
3. Resultados.....	43
3.1 Toxicidade	43
Tabela 1.....	44
Figura 1.	45
3.2 Histopatologia.....	45
Figura 2.	46
Figura 3.	47
3.3 Ultraestrutura	48
Figura 4	49
3.4 Fragmentação de DNA	50
4. Discussão.....	51
5. Conclusão	54
7. Bibliografia.....	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

RESUMO

CAMPOS, Juliana Mendonça e, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Atuação da saliva e de seus compostos não proteicos, *N,N*-dimetilanilina e 1,2,5-tritiepiano, de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) sobre sua presa.** Orientador: José Cola Zanuncio. Coorientadora: Rosa Angelica Plata-Rueda.

Podisus nigrispinus Dallas (Heteroptera: Pentatomidae), um predador zoofitófago, tem potencial para o controle biológico, pois suas ninfas e adultos predam insetos de diversos grupos. A injeção do conteúdo das glândulas salivares de *P. nigrispinus* aumenta a eficiência da extração de nutrientes e a morte de presas, mas os efeitos dos compostos não proteicos na saliva desse inseto e responsáveis pela morte das presas são pouco estudados. Como primeira etapa, a ação nociva, desses compostos, em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), após a injeção de extrato de saliva de *P. nigrispinus* e de seus compostos não proteicos 1,2,5-tritiepiano (TRI) e *N,N*-dimetilanilina (DMA) foi estudada pela toxicidade, histopatologia, citotoxicidade e morte celular. A toxicidade dos compostos foi determinada pela DL₅₀ e DL₉₀ em laboratório, após a injeção de seis doses (18,4; 36,8; 69; 138; 276 e 552 nL) com água destilada no controle de cada composto em lagartas de quinto instar de *S. frugiperda*. Doses pré-estabelecidas do aparelho. A histopatologia, citotoxicidade e morte celular foram avaliadas usando técnicas de microscopia de luz, eletrônica de transmissão e confocal. Na segunda etapa, a atividade tóxica nas lagartas de *S. frugiperda* foi avaliada, após a ingestão de dieta contendo as concentrações letais de DMA e TRI, de acordo com a histopatologia, citotoxicidade e morte celular, analisadas em microscopia de luz, eletrônica de transmissão e detecção de danos de DNA. A toxicidade dos compostos foi determinada pela CL₅₀ e CL₉₀ em laboratório, após a ingestão de alimento por lagartas de quinto instar contendo seis concentrações de cada composto. As concentrações foram

adquiridas a partir do ajuste de 200 µL de acetona nas proporções 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 com 200 µL de cada composto. A injeção do extrato da saliva de *P. nigrispinus* foi tóxica para lagartas de *S. frugiperda*, com DL₅₀ de 89,68 nL/inseto e DL₉₀ de 286,74 nL/inseto. O 1,2,5-tritiepano e *N,N*-dimetilanilina foram tóxicos com DL₅₀ de 66,60 nL/inseto e DL₉₀ de 117,10 nL/inseto, DL₅₀ de 28,92 nL/inseto e DL₉₀ de 92,16 nL/inseto, respectivamente. Após seis horas de injeção, a morte celular e necrose foram observados na região do intestino médio dos insetos tratados com extrato de saliva de *P. nigrispinus* e 1,2,5-tritiepano. Na ingestão, os compostos não proteicos DMA e TRI foram tóxicos com CL₅₀ de 237,59 nL/mL⁻¹ e CL₉₀ de 372,81 nL/mL⁻¹, CL₅₀ de 315,13 nL/mL⁻¹ e CL₉₀ de 674,45 nL/mL⁻¹, respectivamente. Após 1 hora de exposição, a vacuolização citoplasmática foi observada na região do intestino médio dos insetos tratados com esses ambos compostos. O extrato de saliva e os compostos não proteicos DMA e TRI tem efeito nocivo às células do intestino médio de *S. frugiperda*.

ABSTRACT

CAMPOS, Juliana Mendonça e, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Performance of saliva and its non-protein compounds, *N,N*-dimethylaniline and 1,2,5-trithiepane, of *Podisus nigrispinus*** (Heteroptera: Pentatomidae) on their prey. Adviser: José Cola Zanuncio. Co-Adviser: Rosa Angelica Plata-Rueda.

Podisus nigrispinus Dallas (Heteroptera: Pentatomidae), a zoophytophagous predator, has potential for biological control, as its nymphs and adults predate insects of various groups. Injection of the toxic content of salivary glands of *P. nigrispinus* increases the efficiency of nutrient extraction and the death of prey, but the effects of non-protein compounds in the saliva of this insect and responsible for the death of prey are little studied. As a first step, the harmful activity of these compounds in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars after injection of *P. nigrispinus* saliva extract and its non-protein compounds *N,N*-dimethylaniline (DMA) and 1,2,5-tritiepene (TRI) was studied by the lethal concentration, histological, ultracellular and cell death processes. The toxicity of the compounds was determined by the LD₅₀ and LD₉₀ and the mortality in the laboratory after the injection of six concentrations (18,4; 36,8; 69; 138; 276 e 552 nL) of each element in *S. frugiperda* fifth instar caterpillars. The histopathology, cytotoxicity and cell death were evaluated using light microscopy, transmission electron and communication techniques. In the second stage, the insecticidal activity in *S. frugiperda* caterpillars was evaluated after diet ingestion containing lethal concentrations of DMA and TRI, according to histopathology, cytotoxicity and cell death, analyzed in light microscopy, transmission electronics and detection of DNA damage. The toxicity of the compounds was determined by the LC₅₀ and LC₉₀ and the mortality in the laboratory after the ingestion of food by fifth instar caterpillars containing six concentrations of each element.

Concentrations were acquired from the adjustment of 200 μ l of acetone in proportions 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:16, 1:32 with 200 μ l of each compound. Injection of *P. nigrispinus* saliva extract caused death of *S. frugiperda* caterpillars, with LD₅₀ of 89.68 nL/insect and LD₉₀ of 286.74 nL/insect. The 1,2,5-tritiepene and *N,N*-dimethylaniline showed LD₅₀ of 66.60 nL/insect and LD₉₀ of 117.10 nL/insect, LD₅₀ of 28.92 nL/insect and LD₉₀ of 92.16 nL/insect, respectively. After six hours of injection, cell death and necrosis were observed in the midgut region of the insects treated with saliva extract of *P. nigrispinus* and 1,2,5-tritiepene. On ingestion, the non-protein components DMA and TRI had LC₅₀ of 237.59 nL /mL⁻¹ and LC₉₀ of 372.81 nL/mL⁻¹, LC₅₀ of 315.13nL/mL⁻¹ and LC₉₀ of 674.45 nL/mL¹, respectively. After 1 hour of exposure, vacuolization processes and goblet cells were observed in the midgut region of the insects treated with these two compounds. Saliva extract and the non-protein compounds DMA and TRI have an injurious effect on tissues of the middle intestine of *S. frugiperda*.

1. Introdução geral

Veneno é uma toxina, geralmente, produzida por glândulas e injetada em outro organismo por aparelhos especializados para imobilizar ou matar presas (BLUM, 1978). A transferência do veneno de insetos é feita, principalmente, de forma passiva, como em lagartas de Lepidoptera por cerdas e espinhos em contato com outros organismos ou, ativamente, por partes bucais e ferrão em Hemiptera e Hymenoptera, respectivamente (SCHMIDT, 1982).

O veneno de Hemiptera, Hymenoptera e Lepidoptera tem atividade inseticida contra pragas (BAEK et al., 2011, MONGE-FUENTES et al., 2015). Por isso, espécies de Heteroptera são agentes de controle biológico matando, rapidamente, presas, e com ciclos de vida curto e generalistas (ZANUNCIO et al., 1996, DE CASTRO et al., 2013, WALKER et al., 2016). *Geocoris punctipes* (Say, 1832) (Hemiptera: Geocoridae) e *Pristhesancus plagipennis* (Hemiptera: Reduviidae) podem consumir, respectivamente, 1600 ácaros e 220 indivíduos da lagarta rosada do algodão (NEISWANDER, 1925; GRUNDY e MAELZER, 2000).

Pentatomídeos do gênero *Podisus* são agentes de controle biológico usados em programas de manejo integrado de pragas (ZANUNCIO et al., 2011). *Podisus maculiventris* (Say) é a principal espécie usada na Europa e nos EUA e *Podisus nigrispinus* (Dallas) no Neotrópico (OLIVEIRA et al., 2006). Este predador tem sido registrado atacando lagartas desfolhadoras, como *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) (LEMOS et al., 2005), *Musca domestica* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae) (MOLINA-RUGAMA et al., 1997), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (De BORTOLI et al., 2011) e *Thyrinteina arnobia* (Stöll) (Lepidoptera: Geometridae) (OLIVEIRA et al., 2011).

Spodoptera frugiperda é praga de 27 culturas, incluindo milho e soja, além de causar danos em cultivos de espécies de Brassicaceae, Cucurbitaceae, Rutaceae e Solanaceae (JEDER et al., 2017). Lagartas de *S. frugiperda* danificam plantas, geralmente, durante o estágio de vegetativo das mesmas, com consumo foliar e danos indiretos à produção de grãos devido à redução na área fotossintética (VILARINHO et al., 2011). A resistência dessa praga a vários pesticidas aumenta a necessidade de se desenvolver inseticidas de origem natural (SILVA et al., 2017).

Efeitos letais nas presas durante a alimentação e digestão extraoral de hemípteros predadores têm sido estudadas para diferentes espécies como *Belostoma anurum* (Herrich-Schäffer) (Belostomatidae), e *Podisus maculiventris* Say (Pentatomidae) e *Rhynocoris marginatus* (Fab.) (Reduviidae) (BELL et al., 2005; SILVA-CARDOSO et al., 2010; SAHAYARAJ e MUTHUKUMAR, 2011). A digestão extraoral é iniciada com a injeção de saliva, com enzimas digestivas que liquefazem o alimento e facilitam a absorção de nutrientes, antes da ingestão (COHEN, 1995; TERRA e FERREIRA, 2012). A saliva, produzida por glândulas salivares desses predadores, tem diferentes substâncias como água, lipídios, carboidratos e enzimas favorecendo a digestão extraoral e aumentando a eficácia no consumo de presas (MILES e SLOWIAK, 1976; ZENG e COHEN, 2000; AZEVEDO et al., 2007; TERRA e FERREIRA, 2012, FIALHO et al., 2012). O percevejo insere o estilete no corpo das presas e injeta saliva causando rápida paralisia e morte das mesmas (COHEN, 1998; OLIVEIRA et al., 2006; FERREIRA et al., 2008) pela ação de compostos não proteicos e proteicos (SCHMIDT, 1982; MARTÍNEZ et al., 2016).

Dois compostos não proteicos venenosos, *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano, presentes na saliva de *P. nigrispinus* foram relatados como responsáveis pela morte de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), entretanto, não se sabe como

eles atuam sobre as células do corpo dos insetos (MARTÍNEZ et al., 2016). Isto mostra a possibilidade de percevejos predadores poderem produzir toxinas constituídas por compostos não proteicos, altamente, eficientes na predação e com potencial inseticida.

Compostos químicos são alterados conforme as condições físico-químicas ao longo do trato digestivo dos artrópodes, e têm efeito tóxico sobre estruturas de insetos (KNAAK, 2010).

A importância de *P. nigrispinus* para programas de controle biológico e danos causados por *S. frugiperda* no campo aumenta a importância de se conhecer os efeitos de substâncias não proteicas, produzidas por esse predador, no interior da presa.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade e mudanças morfológicas no intestino médio de *S. frugiperda* após a exposição ao extrato de saliva de *P. nigrispinus* e de seus compostos não proteicos 1,2,5-tritriepano e *N,N*-dimetilanilina.

3. Bibliografia

1. AZEVEDO, D.O.; ZANUNCIO, J.C.; ZANUNCIO JR., J.S.; MARTINS, G.F.; MARQUES-SILVAI, S.; SOSSAIII, M.F.; SERRÃO, J.E. Biochemical and morphological aspects of salivary glands of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Biological and Applied Sciences**, v. 50, n. 3, p. 469-477, 2007.
2. BAEK, J.H.; JI, Y.; SHIN, J.S.; LEE, S.; LEE, S.H. Venom peptides from solitary hunting wasps induce feeding disorder in lepidopteran larvae. **Peptides**, v.32, n.3, p.568-572, 2011.
3. BELL, H.A.; DOWN, R.E.; EDWARDS, J.P.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Digestive proteolytic activity in the gut and salivary glands of the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae), effect of proteinase inhibitors. **European Journal of Entomology**, v.102, n.2, p.139-145, 2005.
4. BLUM, S.M. Biochemical defenses of insects. In: Rockstein, M. (Ed.), **Biochemistry of Insects**. Academic Press, New York, 1978, 465-513p.
5. COHEN, A.C. Extra-oral digestion in predacious terrestrial Arthropoda. **Annual Review of Entomology**, v.40, n.1, p.85-103, 1995.
6. COHEN, A.C. Solid-to-liquid feeding: the inside story of extra-oral digestion in predaceous Heteroptera. **Annals of the Entomological Society of America**, v.44, n.2, p.103-117, 1998.
7. De BORTOLI, S.A.; OTUKA, A.K.; VACARI, A.M.; MARTINS, M.I.E.G.; VOLPE, H.L.X. Comparative biology and production costs of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) when fed different types of prey. **Biological Control**, v.58, n.2, p.127-132, 2011.
8. DE CASTRO, A.A., CORRÊA, A.S., LEGASPI, J.C., GUEDES, R.N.C., SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, J.C. Survival and behavior of the insecticide-exposed

predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1043-1050, 2013.

9. FERREIRA, J.A.M.; ZANUNCIO, J.C.; TORRES, J.B.; MOLINA-RUGAMA, A.J. Predatory behaviour of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) on different densities of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v.18, n.2, p.711-719, 2008.

10. FIALHO, M.C.Q.; MOREIRA, N.R., ZANUNCIO, J.C.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R., SERRÃO, J.E. Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 6, p. 850-856, 2012.

11. GRUNDY, P.; MAELZER, D. Predation by the assassin bug *Pristhesancus plagipennis* (Walker) (Hemiptera: Reduviidae) of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) in the laboratory. **Australian Journal of Entomology**, v.39, n.4, p.280-282, 2000.

12. JEDER, M.; BRAGARD, C.; CAFFIER, D.; CANDRESSE, T.; CHATZIVASSILIOU, E.; DEHNEN-SCHMUTZ, K.; GILIOLI, G.; GREGOIRE, J.C.; JAUQUES MIRET, J.A.; NAVARRO, M.N.; NIERE, B.; PARNELL, S.; POTTING, R.; RAFOSS, T.; ROSSI, V.; UREK, G.; VAN BRUGGEN, A.; VAN DER WERF, W.; WEST, J.; WINTER, S.; GARDI, C.; AUKHOJEE, M.; MACLEOD, A. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Spodoptera frugiperda*. **European Food Safety Authority Journal**, v.15, n.7, p.1-37, 2017.

13. KNAAK, N.; TAGLIARI, M.S.; FIUZA, L.M. Histopatologia da interação de *Bacillus thuringiensis* e extratos vegetais no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.83-89, 2010.

14. LEMOS, W.P.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Attack behavior of *Podisus rostralis* (Heteroptera, Pentatomidae) adults on caterpillars of *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.6, p.975-981, 2005.
15. MARTÍNEZ, L.C.; FIALHO, M.C.Q.; BARBOSA, L.C.A.; OLIVEIRA, L.L.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Stink bug predator kills prey with salivary non-proteinaceous compounds. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.68, n.1, p.71-78, 2016.
16. MILES, P.W.; SLOWIAK, D. The accessory salivary gland as the source of water in the saliva of Hemiptera: Heteroptera. **Experientia**, v.15, n.8, p.1011-1012, 1976.
17. MOLINA-RUGAMA, A.J.; ZANUNCIO, J.C.; TORRES, J.B.; ZANUNCIO, T.V. Longevidad y fecundidad de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) y frijol. **Revista de Biología Tropical**, v.45, n.3, p.1125-1130, 1997.
18. MONGE-FUENTES, V.; GOMES, F.M.M.; CAMPOS, G.A.A.; De CASTRO, J.S.; BIOLCHI, A.M.; Dos ANJOS, L.C.; MORTARI, M.R. Neuroactive compounds obtained from arthropod venoms as new therapeutic platforms for the treatment of neurological disorders. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.21, n.31, p.1-9, 2015.
19. NEISWANDER, C.R. On the anatomy of the head and thorax in *Ranatra* (Heteroptera). **Transactions of the American Entomological Society**, v.51, n.4, p.311-320, 1925.
20. OLIVEIRA, J.A.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SOARES, M.J. Morphology and preliminary enzyme characterization of the salivary glands from the

predatory bug *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.96, n.3, p.251-258, 2006.

21. OLIVEIRA, H.N.; ESPINDULA, M.C.; DUARTE, M.M.; PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C. Development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with *Thyrintaina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) reared on guava leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n.3, p.429-434, 2011.

22. SAHAYARAJ, K.; MUTHUKUMAR, S. Zootoxic effects of reduviid *Rhynocoris marginatus* (Fab.) (Hemiptera: Reduviidae) venomous saliva on *Spodoptera litura* (Fab.). **Toxicon**, v.58, n.5, p.415-425, 2011.

23. SCHMIDT, J.O. Biochemistry of insect venoms. **Annual Review of Entomology**, v.27, n.1, p.339-368, 1982.

24. SILVA, S.M.; DA CUNHA, J.P.A.R.; DE CARVALHO, S.M.; ZANDONADI, C.H.S.; MARTINS, R.C.; CHANG, R. *Ocimum basilicum* essential oil combined with deltamethrin to improve the management of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.41, n.6, p.665-675, 2017.

25. SILVA-CARDOSO, L.; CACCIN, P.; MAGNABOSCO, A.; PATRÓN, M.; TARGINO, M.; FULY, A.; OLIVEIRA, G.A.; PEREIRA, M.H.; CARMO, M.G.T.; SOUZA, A.S.; SILVA-NETO, M.A.C.; MONTECUCCO C.; ATELLA, G.C. Paralytic activity of lysophosphatidylcholine from saliva of the waterbug *Belostoma anurum*. **Journal of Experimental Biology**, v.213, n.19, p.3305-3310, 2010.

26. TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbert, L.I. (Ed.), **Insect Molecular Biology and Biochemistry**, 1a ed. Elsevier, 2012, 365-418pp.

27. VILARINHO, E.C.; FERNANDES, O.A.; HUNT, T.E.; CAIXETA, D.F. Movement of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) adults in maize in Brazil. **Florida Entomologist**, v.94, n.3, p.480-488, 2011.
28. WALKER, A.A.; WEIRAUCH, C.; FRY, B.G.; KING, G.F. Venoms of heteropteran insects: a treasure trove of diverse pharmacological toolkits. **Toxins**, v.8, n.43, p.2-32, 2016.
29. ZANUNCIO, J.C.; JUSSELINO-FILHO, P.; RIBEIRO, R.C.; ZANUNCIO, T.V.; RAMALHO, F.S.; SERRÃO, J.E. Hormetic responses of a stink bug predator to sublethal doses of pyrethroid. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.87, n.6, p.608-614, 2011.
30. ZANUNCIO, J.C.; SAAVEDRA, J.L.D.; OLIVEIRA, H.N.; DE GHEELE, D.; DE CLERCQ, P. Development of the predatory stinkbug *Brontocoris tabidus* Signoret Heteroptera: Pentatomidae on different proportions of an artificial diet and pupae of *Tenebrio molitor* L. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, n. 4, p. 619-626, 1996.
31. ZENG, F.; COHEN, A.C. Comparison of a-amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous Heteroptera. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular**, v.126, n.1, p.101-106, 2000.

CAPÍTULO 1

Atuação da saliva e de seus compostos não proteicos, de *Podisus nigrispinus*

(Heteroptera: Pentatomidae) em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Resumo: Durante a predação, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) injeta o conteúdo tóxico de suas glândulas salivares em presas, aumentando a eficiência da extração de nutrientes das mesmas. Este trabalho avaliou a atividade tóxica do extrato de saliva de *P. nigrispinus* e seus compostos, 1,2,5-tritriepano e *N,N*-dimetilnilina, injetado em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), pela toxicidade, alterações histológicas, celulares e morte celular desse inseto. A toxicidade foi avaliada com a dose letal DL₅₀ e DL₉₀, calculados a partir de dados de mortalidade registrados em condições laboratoriais após a injeção de seis concentrações de extrato de saliva e dos compostos não proteicos (18,4; 36,8; 69; 138; 276 e 552 nL) com água destilada no controle foram injetadas no abdomen de lagartas de *S. frugiperda* com um microinjetor (Nanoject II auto nanoliter, Drummond Scientific Co., USA). Doses pré-estabelecidas no aparelho. As alterações morfológicas foram examinadas por microscopia de luz, eletrônica e confocal. O extrato de saliva de *P. nigrispinus* foi tóxico para lagartas de *S. frugiperda*, com DL₅₀ de 89,68 nL/ e DL₉₀ de 286,74 nL/inseto. Os valores de DL₅₀ e DL₉₀ de 1,2,5-tritriepano e *N,N*-dimetilnilina foram 66,60 nL/inseto e 117,10 nL/inseto e 28,92 nL/inseto e 92,16 nL/inseto, respectivamente. Após trinta minutos da injeção, secreções apócrinas, e após seis horas, processos de necrose e rompimento celular no intestino médio dos insetos tratados com extrato de saliva, 1,2,5-tritriepano e *N,N*-dimetilnilina foram observadas. O extrato de saliva e os componentes salivares exerceram efeitos negativos sobre o intestino médio, órgão responsável pela digestão e absorção de

nutrientes. O extrato de saliva do predador *P. nigrisipinus* e seus compostos não proteicos 1,2,5-tritiepano e *N,N*-dimetilanilina são tóxicos a lagartas de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Digestão extraoral, *N,N* dimetilanilina, percevejo, saliva, toxicidade, 1,2,5-tritiepano

1. Introdução

Veneno é uma toxina, geralmente, produzida por glândulas e injetada em outro organismo por órgãos especializados, para imobilizar ou matar presas (BEARD, 1963; SCHMIDT, 1982). Venenos de insetos incluem compostos químicos como ácidos orgânicos, alcaloides, amins biogênica, aminoácidos, polissacarídeos e terpenos (UPADHYAY e AHMAD, 2010; WALKER et al., 2016), embora seus constituintes principais sejam macromoléculas como oligopeptídeos, peptídeos e proteínas (SCHMIDT, 1982; CALVETE et al., 2009; WALKER et al., 2016). Venenos de insetos são transferidos para a presa, ativamente, por partes bucais e ferrão de Hemiptera e Hymenoptera, respectivamente, ou de forma passiva, como em lagartas de Lepidoptera, pelo contato de cerdas e espinhos com outros organismos (SCHMIDT, 1982). Veneno de Hemiptera, Hymenoptera e Lepidoptera podem ter propriedades inseticidas contra pragas (BAEK et al., 2011; MONGE-FUENTES et al., 2015).

A digestão extraoral de percevejos predadores (Heteroptera: Pentatomidae) se inicia com a injeção de saliva na presa. A saliva contém enzimas digestivas que liquefazem o alimento e facilitam a absorção de nutrientes da presa (MILES, 1972; COHEN, 1995). Glândulas salivares de Hemiptera predadores produzem saliva composta de substâncias como carboidratos, enzimas e lipídios favorecendo a digestão extraoral e aumentando a eficácia no consumo das presas (MILES e SLOWIAK, 1976; ZENG e COHEN, 2000; AZEVEDO et al., 2007). O percevejo insere o estilete no corpo das presas e regurgita saliva causando paralisia e morte (COHEN, 1998; OLIVEIRA et al., 2006; FERREIRA et

al., 2008) por compostos proteicos ou não produzidas por suas glândulas salivares (SCHMIDT, 1982; COHEN, 1990; MARTINEZ et al., 2016). Morte de presas, durante a alimentação e digestão extraoral, foi relatada para *Belostoma anurum* (Herrich-Schäffer) (Belostomatidae), *Podisus maculiventris* Say (Pentatomidae) e *Rhynocoris marginatus* (Fab.) (Reduviidae) (BELL et al., 2005; SILVA-CARDOSO et al., 2010; SAHAYARAJ e MUTHUKUMAR, 2011).

Pentatomídeos do gênero *Podisus* são inimigos naturais usados em programas de manejo integrado de pragas (ZANUNCIO et al., 2011). *Podisus maculiventris* (Say) e *Podisus nigrispinus* são as principais espécies usadas nos EUA e no Neotrópico (ALDRICH et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2006). *Podisus nigrispinus* se alimenta de lagartas desfolhadoras, como *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) (SAAVEDRA et al., 1997; LEMOS et al., 2005), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (De BORTOLI et al., 2011, ZANUNCIO et al., 2008) e *Thyriniteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) (OLIVEIRA et al., 2011). A saliva, secretada pelas glândulas salivares principal e acessória, de *P. nigrispinus* tem alta quantidade de carboidratos, lipídeos e proteínas (MARTÍNEZ et al., 2014), além de compostos não proteicos como *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano responsáveis pela morte de presas (MARTINEZ et al., 2016). Isto indica que percevejos predadores produzem toxinas com compostos não proteicos, eficientes na predação e com potencial inseticida.

Embora o *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano sejam tóxicos presentes na saliva de *P. nigrispinus* que causam paralisia e morte da presa (MARTINEZ et al., 2016) o modo de ação destas substâncias precisa ser elucidada.

Orgãos de insetos como o corpo gorduroso, por serem locais de armazenamento de nutrientes e liberação de energia em resposta aos estresses sofridos pelos insetos têm

funções importantes nos processos de sobrevivência de insetos em contato com substâncias tóxicas (ARRESE e SOULAGES, 2010). O intestino médio de inseto participa dos processos de digestão e absorção de alimentos (LEHANE e BILLINGSLEY, 2012) e, em situações de estresses, contribui para o sistema de defesa imunológico pelo desenvolvimento de barreira física impedindo a disseminação de patógenos (SILVA et al., 2016) e com resposta fisiológica para desintoxicação de xenobióticos compostos (DOW, 1987), enquanto os músculos são responsáveis pelos movimentos (BEAULATON e LOCKSHIN, 1977). O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade e mudanças histológicas e ultraestruturais em alguns órgãos após a injeção de extrato de saliva e de seus compostos 1,2,5-tritriepano e *N,N*-dimetilaniлина de *P. nigrispinus*, em lagartas de *S. frugiperda*.

2. Material e Métodos

2.1 Insetos

Adultos de *P. nigrispinus* foram obtidos da criação massal do Laboratório de Controle Biológico do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa Minas Gerais, Brasil) mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e 12 h fotofase. Esses insetos foram alimentados com pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) e folhas de *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex. Maiden) *ad libitum* (NEVES et al., 2010). Lagartas de *S. frugiperda* foram obtidas do Laboratório de Semioquímicos do Departamento de Entomologia da UFV em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Essas lagartas foram colocadas em caixas de polietileno (15 × 9 cm) com dieta artificial constituída por 10 g de ágar, 15,6 g de levedura de cerveja, 25 g de gérmen de trigo, 25 g de proteína de soja, 31,2 g de feijão, 12,5 g de caseína, e 2,5 mL de solução de vitaminas (1,2% de ácido ascórbico, 0,03% pantotenato de cálcio, 0,015% de niacina, 0,008%, riboflavina, 0,004% de tiamina e 0,004% de HCl). A temperatura de

acondicionamento das caixas foi de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas. Machos adultos de *P. nigrispinus* e lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* sem malformações foram utilizadas nos bioensaios independentemente do tamanho e do peso.

2.2 Preparação do extrato de saliva

Cinquenta glândulas salivares de machos de *P. nigrispinus*, por terem menos influências de hormônios que as fêmeas, foram dissecadas em solução salina para inseto ($0,1 \text{ M NaCl} + 0,1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4 + 0,1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$) e lavadas com água destilada para remover a hemolinfa, tecido estranho e cutícula. Essas glândulas salivares foram transferidas para Eppendorf contendo $50 \mu\text{L}$ de água destilada, maceradas e centrifugadas a $10000 \times g$ at 4°C durante 20 min. O extrato de saliva aquoso foi armazenado a -18°C para os bioensaios e o sobrenadante removido.

2.3 Toxicidade da saliva de *Podisus nigrispinus* e dos compostos não proteicos

A toxicidade do extrato de saliva e dos compostos não proteicos sintetizados, 1,2,5-tritiepano (Friedrich-Schiller-Universitaet Jena) e *N,N*-dimetilanilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) da saliva de *P. nigrispinus* foi avaliada em lagartas de *S. frugiperda*. Seis diferentes doses do extrato de saliva e dos compostos não proteicos (18,4; 36,8; 69; 138; 276 e 552 nL) com água destilada no controle foram injetadas no abdome de lagartas de *S. frugiperda* com um microinjetor (Nanoject II auto nanoliter, Drummond Scientific Co., USA). Estas doses já são pré-estabelecidas pelo aparelho. A seguir, as lagartas foram individualizadas em placas de Petri ($90 \times 1,5 \text{ mm}$) e alimentadas com dieta artificial. Vinte e cinco lagartas de quinto instar foram utilizadas por dose e a mortalidade avaliada até 72 horas após a injeção.

2.4 Microscopia de luz

Cinco lagartas de quinto instar de *S. frugiperda*, injetadas com a dose letal estimada DL₅₀ de extrato de saliva, 1,2,5-tritiepano ou *N,N*-dimetilanilina usando o microinjetor (Nanoject II auto nanoliter, Drummond Scientific Co., EUA) em diferentes períodos de tempo (0,5, 1, 3 e 6 horas), foram crioanestesiadas a -4°C. O corpo gorduroso, intestino e músculo, dessas lagartas foram dissecados em solução salina para insetos (0,1 M NaCl + 0,1 M KH₂PO₄ + 0,1 M Na₂HPO₄) e transferidos para solução fixadora de Zamboni (STEFANINI et al., 1967) por 12 h à 5°C. As amostras foram, à seguir, desidratadas em série crescentes de etanol (70°, 80°, 90° e 95°) e embebidas em historesina (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany) por 24 horas. Seções com 3 µm de espessura foram obtidas, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

2.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Em cinco lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* foram injetadas a dose letal estimada DL₅₀ de extrato de saliva e os 1,2,5-tritiepano ou do *N,N*-dimetilanilina de *P. nigrispinus* usando o microinjetor (Nanoject II auto nanoliter, Drummond Scientific Co., EUA) em diferentes períodos de tempo (0,5, 1, 3 e 6 horas) e crioanestesiadas a -4°C. O corpo gorduroso, intestino e músculo de *S. frugiperda* foram transferidos para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 contendo 0,2 M de sacarose por 4 h em temperatura ambiente. As amostras foram, a seguir, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 h, seguindo-se lavagem no tampão e desidratação em série crescente de etanol (70°, 80°, 90° e 99°). As amostras foram embebidas em resina LR White (London Resin Company Ltd.) e as seções ultrafinas (80-90 nm de espessura), obtidas com navalha de vidro em ultramicrotomo PowerTomes PT-X (RMC Boeckeler Instruments Inc., Tucson, AZ, USA), foram contrastadas com acetato de

uranila aquosa 1% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.6 Microscopia Confocal

O corpo gorduroso, intestino e músculo de cinco lagartas de *S. frugiperda* foram expostos por 48 h ao extrato de saliva, 1,2,5-tritiepiano ou ao *N,N*-dimetilnilina (com a dose letal estimada- DL₅₀) seguindo a mesma metodologia de aplicação dos demais testes. Após o tempo determinado, essas estruturas foram dissecadas em 0,1 M de tampão de fosfato de sódio (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) e transferidas para solução fixadora de Zamboni por 2 h. As amostras foram, a seguir, lavadas com PBS contendo 1% de Triton X-100 (PBST) e incubadas com 1,5% de albumina de soro bovino em PBST durante 2 h. As amostras foram incubadas com anticorpo anti-caspase 3 clivada (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a 1:500 em PBST durante vinte e quatro horas a -4°C. Após a incubação, as amostras foram lavadas 10x em PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com isotiosinate de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído 1:500 em PBS por 24h no escuro a -4°C. As peças marcadas para Caspase-3 foram lavadas novamente, e os núcleos das células corados com iodeto TO-PRO-3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) durante 1h. Esses fragmentos foram montadas em laminas de vidro com 50% sacarose e examinadas em microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.7 Análises estatísticas

As doses letais (DL₅₀ e DL₉₀) e os limites de confiança foram determinados por regressão baseada em concentração probit-mortalidade (FINNEY, 1971) com o

procedimento PROC PROBIT do programa SAS User v. 9.0 para Windows (SAS Institute 2002).

3. Resultados

3.1 Toxicidade

A *N,N*-dimetilanilina foi o composto mais tóxico para lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* com $DL_{50}= 28,92$ e $DL_{90}= 92,16$ nL/inseto ($\chi^2= 34,66$; $GL=5$), seguido do 1,2,5-tritiepano com $DL_{50}= 66,60$ e $DL_{90}= 117,10$ nL/inseto ($\chi^2 = 56,48$; $GL=5$) e do extrato de saliva com $DL_{50}= 89,68$ e $DL_{90}= 286,74$ nL/inseto ($\chi^2 = 44,93$; $GL= 5$). A mortalidade foi $< 1\%$ no controle (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1. Concentrações letais (valores de probit) da saliva e de compostos não proteicos de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) após 72 h da injeção

Tratamentos	DL	VE (nL/inseto)	IC nL/inseto		χ^2
			Inferior	Superior	
Saliva	50	89,68	70,34	107,95	44,93
	90	286,74	215,21	478,19	
1,2,5-tritiepano	50	66,60	58,00	74,62	56,48
	90	117,10	101,71	145,78	
<i>N,N</i> - dimetilanilina	50	28,92	22,69	34,82	34,66
	90	92,16	69,42	154,24	

DL_{50} e DL_{90} causando 50, 90 de mortalidade; VE: valor estimado, IC: intervalo de confiança; χ^2 : valor de qui-quadrado. Doses letais e respectivos limites estão baseados em escala logarítmica com nível de $P < 0,0001$.

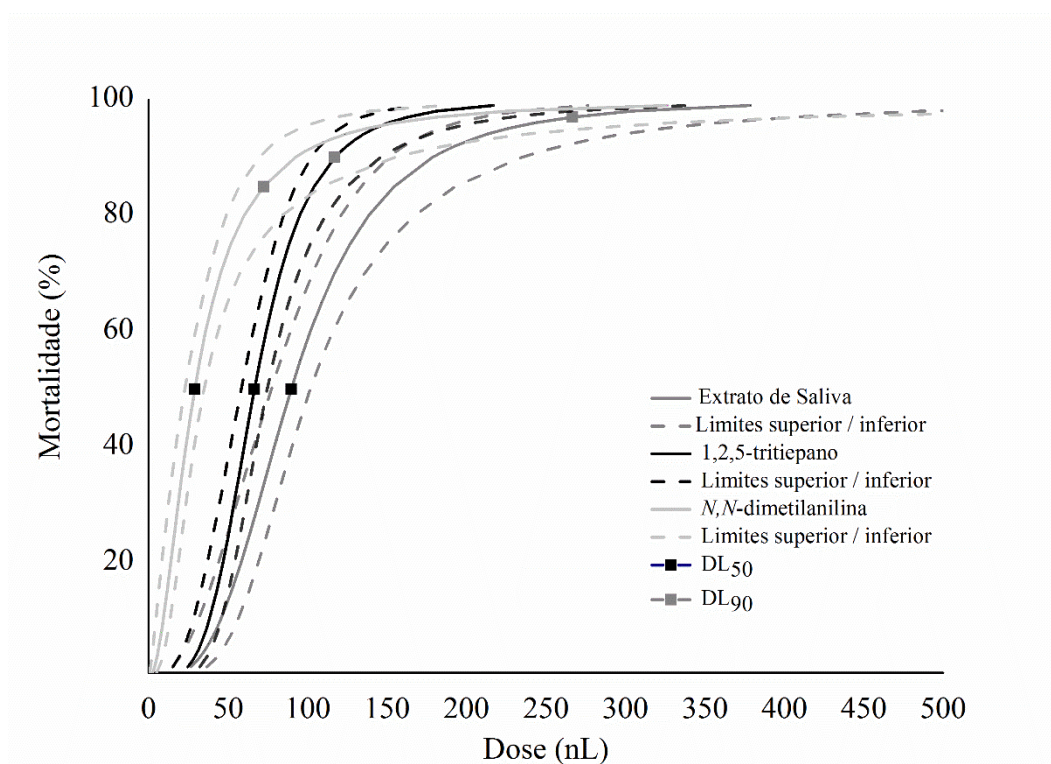


Figura 1. Curva de dose-resposta (DL₅₀ e DL₉₀) do extrato da saliva e de seus compostos não proteicos 1,2,5-tritiepano, N,N-dimetilanilina de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Dados de mortalidade coletados durante 72 horas e usados para calcular os valores DL₅₀ e DL₉₀ ($P < 0.0001$).

3.2 Histopatologia

O corpo gorduroso de lagartas de *S. frugiperda*, no controle, foi formado por células globulares bem desenvolvidas com grânulos citoplasmáticos e núcleos irregulares (Figura 2). As células musculares, dessas lagartas, apresentaram aspecto estriado característico e múltiplos núcleos (Figura 2). A parte basal e apical do epitélio, núcleo e citoplasma do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda*, não expostas ao extrato de saliva e aos compostos não proteicos da saliva de *P. nigrispinus*, estavam preservadas, com formato regular e alguns vacúolos (Figura 2). A injeção do extrato de saliva, 1,2,5-

tritiepato ou do *N,N*-dimetilanilina não alterou a morfologia do corpo gorduroso e dos músculos de lagartas de *S. frugiperda* em todos os períodos analisados.

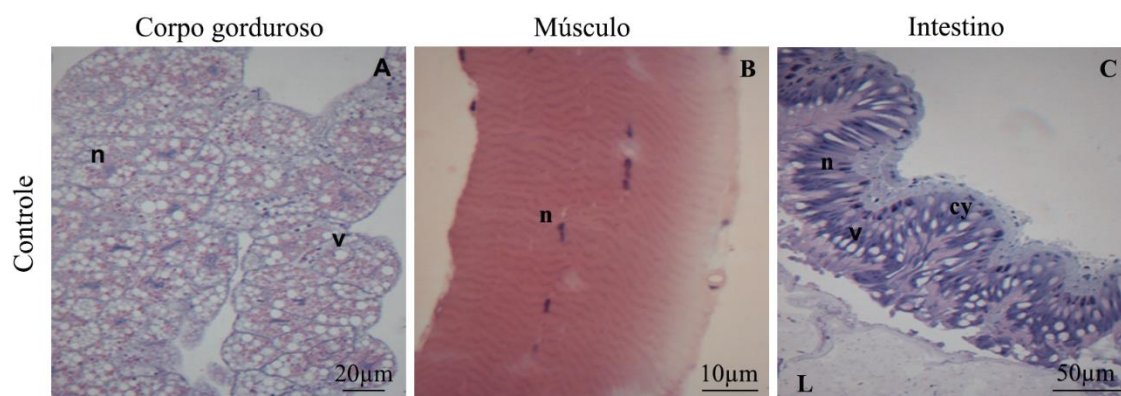


Figura 2. Secções histológicas do corpo gorduroso (A), músculo (B) e intestino médio (C) de lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), mostrando o núcleo bem desenvolvido (n), e alguns vacúolos (v) presentes no citoplasma (cy), vacúolo (v) e lúmen (L).

Alterações histológicas com a ocorrência de pequenas protrusões apicais foram observadas nas células digestivas do intestino médio, de lagartas de *S. frugiperda* expostas a extrato de saliva (Figura 3A), *1,2,5*-tritiepato (3E) ou *N,N*-dimetilanilina (Figura 3I), 30 minutos após serem expostas. Protrusões apicais foram liberadas para o lúmen e algumas células apresentaram ruptura da membrana plasmática e desorganização da matriz peritrófica após 1 h até 6h da exposição ao extrato de saliva (Figura 3B-D) e aos *1,2,5*-tritiepato (3F-H) ou *N,N*-dimetilanilina (Figura 3J-I).

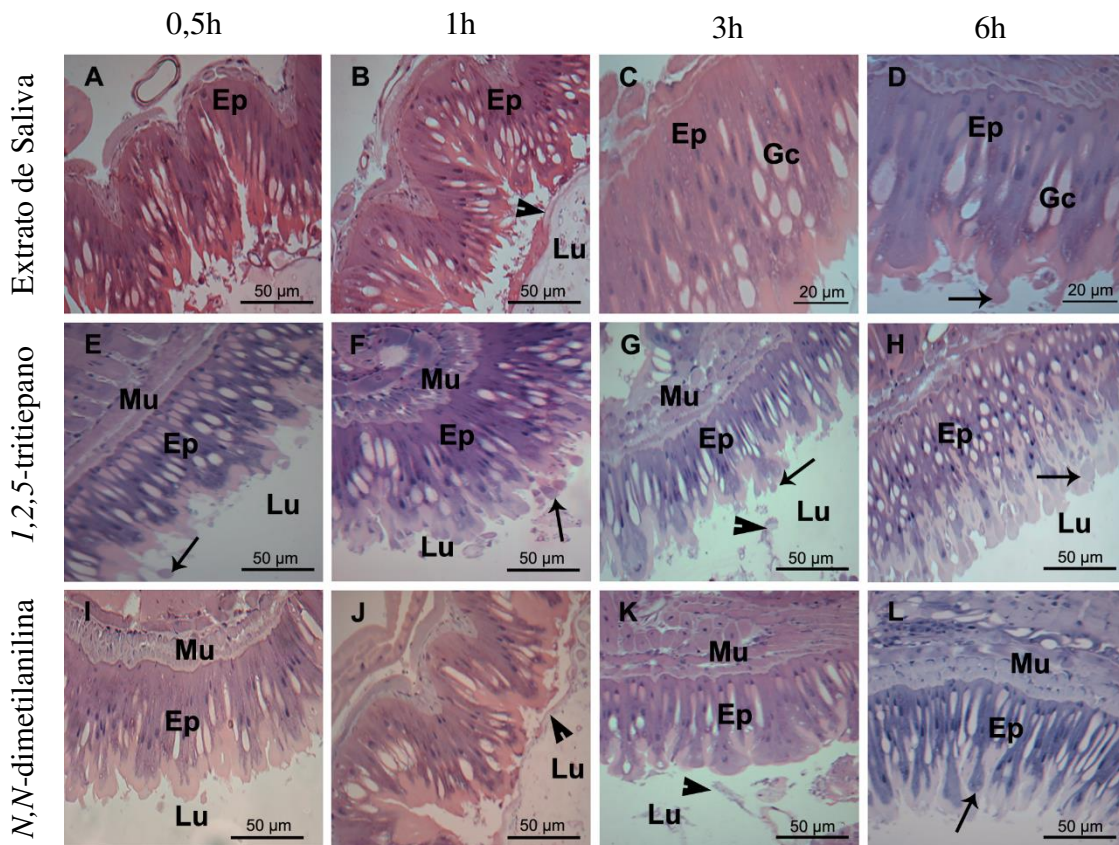


Figura 3. Secções histológicas, em diferentes tempos exposição, do epitélio do intestino médio de lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) após a injeção de extrato de saliva e de seus compostos não proteicos 1,2,5-tritiepano e N,N-dimetilanilina mostrando epitélio colunar (Ep) com algumas células caliciformes (Gc). Protrusões celulares apicais (setas) liberadas para o lúmen (Lu). Em alguns tempos a matrix peritrófica (pontas de seta) estava desorganizada. Mu – músculo visceral

3.3 Ultraestrutura

A estrutura das células epiteliais do intestino médio de *S. frugiperda*, não exposto ao extrato de saliva e seus compostos não proteicos de *P. nigrispinus*, estava organizada no citoplasma com microvilosidades longas e regulares, vacúolos, grânulos de glicogênios e membrana plasmática intacta (Figura 4A, 4E e 4I). Alterações ultraestruturais com autofagia no dos lisossomos e retículo endoplasmático, formação de protusões apicais e liberação de células citoplasmáticas no lúmen, e ocorrência de autofagia e necrose foram observadas em células epiteliais do intestino médio de lagartas expostas ao extrato de saliva de *P. nigrispinus* (Figuras 4B–4F), e ao 1,2,5-tritiepano (Figuras 4C–4K) ou ao *N,N*-dimetilanilina (Figuras 4D–4L).

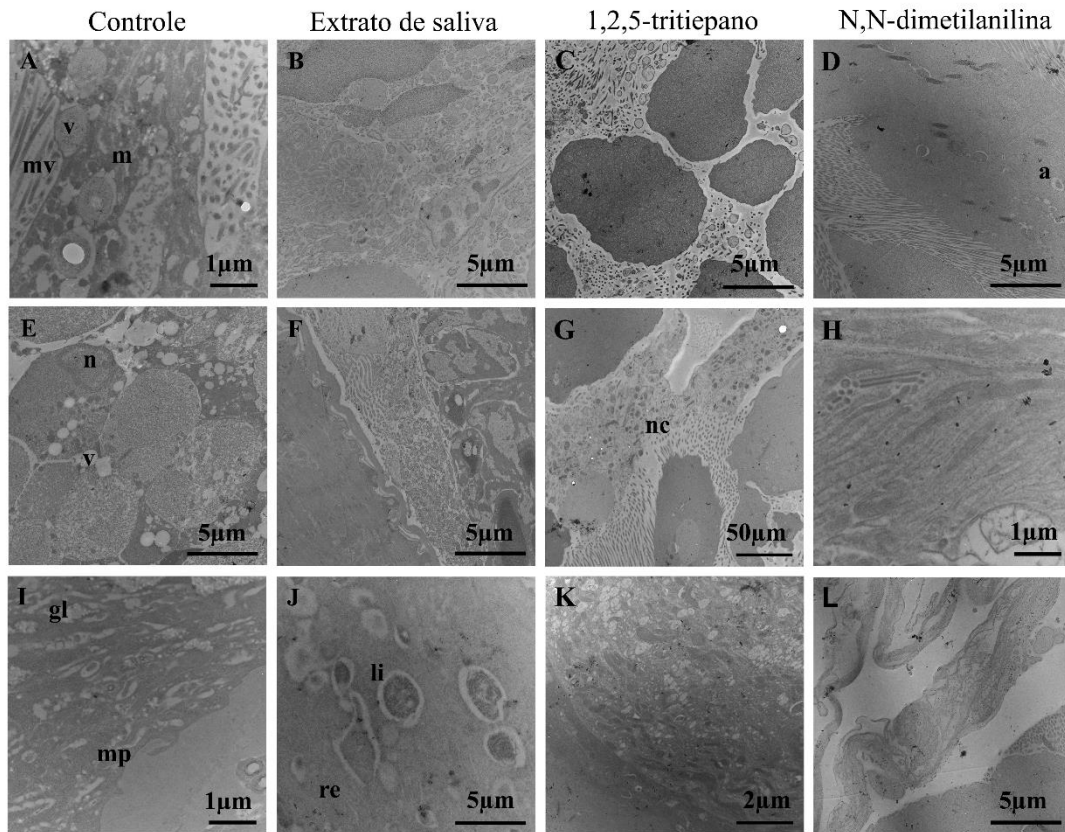


Figura 4. Micrografias eletrônicas de transmissão do intestino médio de lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) após a injeção de extrato de saliva e de seus compostos não proteicos *N,N*-dimetilanilina (E-H) e *1,2,5*-tritiepano (I-L). Controle- Porção apical com presença de microvilosidades (mv), vacúolos (v) e mitocôndrias (m) (A), vista geral da célula digestiva (E) e porção basal da célula digestiva mostrando membrana plasmática (mp) e grânulos glicogênio (gl) (I). Citotoxicidade nas células digestivas após a injeção de extrato de saliva (B, F e J), *1,2,5*-tritiepano (C, G e K) e *N,N*-dimetilanilina (D, H e L) mostrando lisossomos (li), retículo endoplasmático (re) e autofagossomos (a) necrose (nc).

3.4 Microscopia Confocal

Células com reação positiva à caspase-3 clivada no corpo gorduroso, músculo e intestino médio de lagartas de *S. frugiperda*, expostas à saliva e aos compostos não proteicos de *P. nigrispinus*, foram distribuídas aleatoriamente após 48 h da injeção (Figura. 5A - Figura. 5C). Morte celular foi observada no corpo gorduroso após exposição ao 1,2,5-tritiepano (Figura. 5G) e ao extrato de saliva (Figura. 5E) e ao *N,N*-dimetilanilina (5K) e no intestino após injeção do extrato de saliva (Figura. 5F), 1,2,5-tritiepano (Figura. 5I) ou ao *N,N*-dimetilanilina (Figura. 5L).

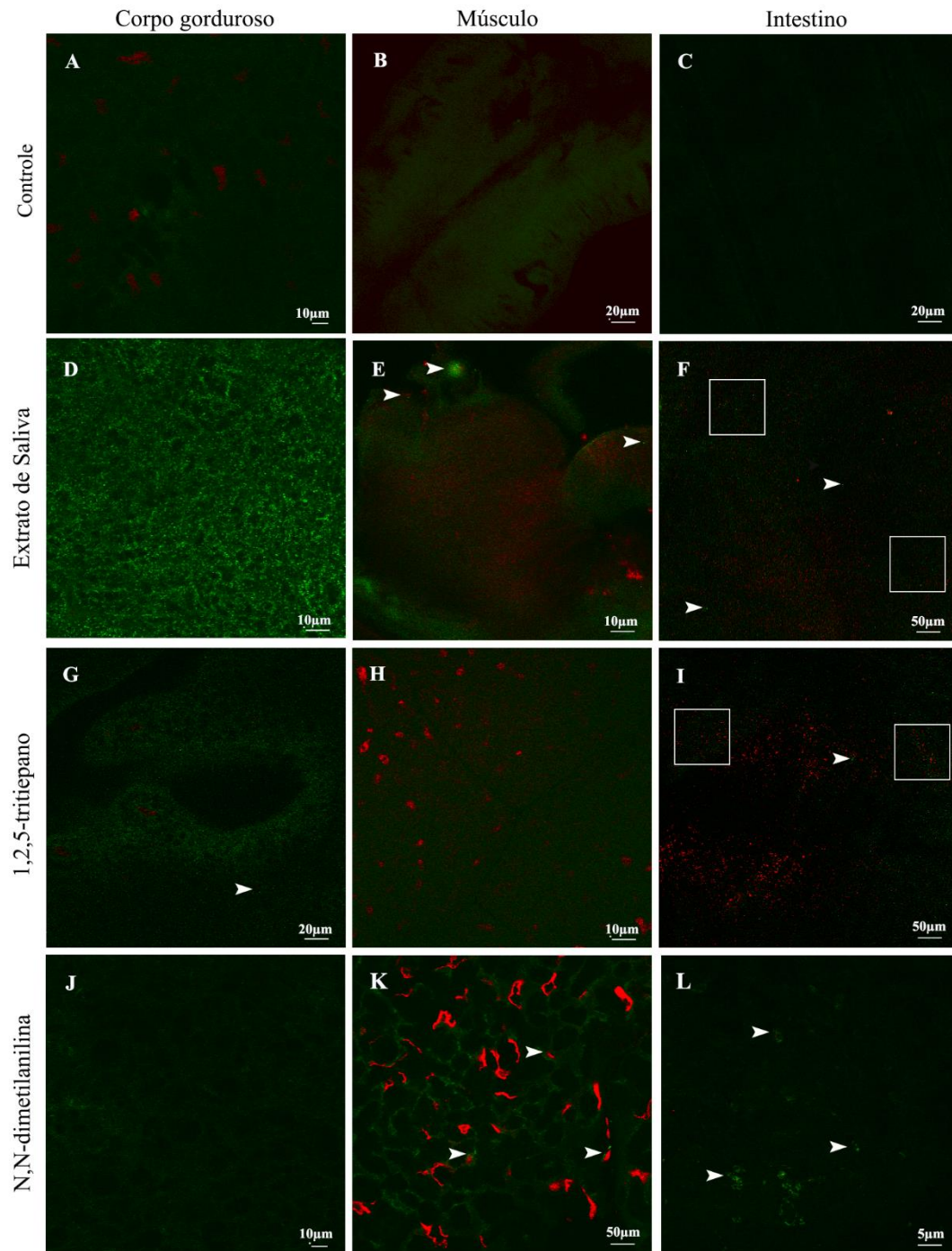


Figura 5. Micrografias de fluorescência confocal do corpo gorduroso, músculo e intestino médio de lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) após 48h de injeção de extrato de saliva, 1,2,5-tritiepano e *N,N*-dimetilaniлина, mostrando células positivas para caspase 3 clivada (setas e quadros) indicando morte celular por apoptose.

4. Discussão

A toxicidade de *Spodoptera frugiperda* à *N,N*-dimetilanilina (DL_{50} = 28,92 nL/inseto) seguida pelo 1,2,5-tritiepano (DL_{50} = 66,60 nL/inseto) mostram ser esse inseto sensível aos compostos não proteicos das glândulas salivares de *P. nigrispinus*. Isto é semelhante ao relatado para *Bracon cephi* Gahan (Hymenoptera: Braconidae), *Creophilus maxillosus* Linnaeus (Coleoptera: Staphylinidae) e *Solenopsis geminata* Fabricius (Hymenoptera: Formicidae) com compostos não proteicos tóxicos de suas presas (BRAND et al., 1972; JEFSON et al., 1983; BAKER et al., 2005). A toxicidade desses compostos não proteicos se deve a diferentes mecanismos como interferência na síntese de proteínas e em processos neurológicos sobre os receptores GABA dos insetos (HUANG et al., 2011). A maior toxicidade de *N,N*-dimetilanilina para lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* que a do 1,2,5-tritiepano e a saliva de *P. nigrispinus* se deve ao *N,N*-dimetilanilina gerar outros compostos xenobióticos, contribuindo para a formação de espécies reativas de oxigênio reponsáveis por danos celulares (MARTÍNEZ-CAYUELA, 1998).

Ausência de alterações histológicas no corpo gorduroso pode ser explicadas pelo fato deste órgão ter, em lepidópteros, capacidade de desintoxicação metabólica, como observado em *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) (HU et al., 2016; TIAN et al., 2017). A maior resistência do músculo a degradação se deve ao aumento da produção de energia pela via glicolítica com as reservas de glicogênio do corpo gorduroso, atendendo as demandas de energias gastas no processo de desintoxicação (NATH, 2002; GUI et al., 2009).

Alterações histológicas induzidas pelo extrato de saliva, 1,2,5-tritiepano e *N,N*-dimetilanilina como o rompimento das células e a presença de projeções na região apical do epitélio reduz a absorção de nutrientes como observado em lagartas de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (De SOUSA et al., 2009, SOUSA et al.,

2010). A desorganização da membrana peritrófica reduz a absorção de nutrientes e processos de desintoxicação. A matriz peritrófica atua como barreira e proteção contra toxinas e substâncias químicas prejudiciais ao inseto (MARTINS et al., 2006), compartimentaliza enzimas e aumenta a eficiência digestiva pela diminuição da taxa de excreção das mesmas (TERRA e FERREIRA, 1981). A desorganização ou ruptura da matriz peritrófica pode levar à diluição de enzimas digestivas por proteínas nos espaços endo e ectoperitróficos, afetando a atividade enzimática (TERRA et al., 1979). A importância desta membrana para sobrevivência dos insetos, faz com que estes organismos invistam grande quantidade de recursos para mantê-la intacta (WANG e GRANADOS, 2001).

Vacuolização citoplasmática intensa, autofagia e necrose foram observadas nas células digestivas do intestino médio 6 h após a exposição ao extrato de saliva de *P. nigrispinus* e aos componentes salivares não protéicos. Resultados semelhantes foram relatados para *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (FIAZ et al., 2018) e *Platymeris rhadamanthus* (Gaerst) (Hemiptera: Reduviidae) (WALKER et al., 2016). Protrusões citoplasmáticas podem estar envolvidas em processos apócrinos e ou apoptose, como observado em *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) expostos a “squamocin” (GABAN et al., 2015) e *Ceraeochrysa claveri* (Navás) (Neuroptera: Chrysopidae) a *Azadirachta indica* (SCUDELER e DOS SANTOS, 2013). A destruição das microvilosidades faz com que o inseto pare de se alimentar e morra devido a ligação a receptores específicos nas membranas apicais de células intestinais. Isto abre ou forma poros seguidos por vacuolização do citoplasma por desequilíbrio osmótico entre os ambientes intracelular e extracelular (BRAVO et al., 2007; SOUSA et al., 2010).

As alterações ultraestruturais deve-se ao potencial oxidativo e eletroquímico da *N,N*-dimetilanilina pode ter sido a causa de sua toxicidade para as lagartas de *S. frugiperda*

(CAO et al., 2014), mostrado por alterações ultraestruturais em células do intestino médio associadas com necrose e apoptose. O composto modifica enzimas por *N*-desmetilação, *N*-oxidação e *N*-hidroxilação, afetando as funções mitocondriais, o potencial de membrana mitocondrial e os níveis intracelulares de ATP e glicose (SCHMUCK e MIHAIL, 2004; KRIEGER, 2010). Mudanças causadas pela *N,N*-dimetilanilina podem induzir o vazamento do citoplasma no lúmen do intestino médio de *S. frugiperda*. Isto se deve ao efeito na biossíntese dos constituintes da membrana, com acúmulo de ácidos graxos (PAPAVIZAS et al., 1978) e contribuindo para a degradação celular. A redução de pontes de dissulfetos foi relatada para mamíferos com as tioredoxinas envolvidas no desencadeamento da morte celular (LU e HOLMGREN, 2012). A característica estrutural estabilizada por duas pontes dissulfureto pode ser encontrada nos sistemas de defesas de alguns insetos (LEE et al., 2014), como *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) (LEE et al., 1998) e *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) (FEHLBAUM et al., 1994). Pontes dissulfetos podem contribuir para a estabilidade de proteínas, como as peritrofinas e se ligarem a constituintes da membrana peritrófica (VUOCOLO et al., 2001).

O 1,2,5-tritiepano é um composto químico orgânico sintetizado da reação de 2-cloro-dissulfureto com sulfureto de sódio (FIELD e FOSTER, 1970) tóxicos para insetos, indicando a atuação desse composto nos processos de necrose e morte celular nas células do intestino médio de *S. frugiperda*. Modificações celulares no intestino médio, principal local de absorção e vulnerável a substâncias xenobióticas (ROEL et al., 2010), indica a ação diversa dos compostos testados.

A apoptose no corpo gorduroso, intestino e músculo de lagarta de quinto instar de *S. frugiperda* após 48 horas de injeção com extrato de saliva 1,2,5-tritiepano e *N,N*-dimetilanilina indica danos à essas células por esses compostos. A indução a morte programada de células em *S. frugiperda* foi atribuída à disfunção mitocondrial (YANG et

al., 2017) e efeitos teratogênicos (YANG et al., 2016). A condensação da cromatina e fragmentação do DNA, independente da ativação da caspases, ativam a apoptose via mitocôndria (BROKER et al., 2005). A forma ativa do grupo de proteases, as caspases, são inconstantes em *S. frugiperda* (YING et al., 2013), sendo necessária a ativação destas proteínas para a iniciação da morte celular nesse inseto (STENNICKE e SALVESEN, 2000).

5. Conclusão

Extrato de saliva de *Podisus nigrispinus* e seus compostos não proteicos 1,2,5-tritiepano e *N,N* dimetilanilina são nocivos em doses letais provocando mudanças histológicas e ultraestruturais severas com degeneração do epitélio do intestino médio de *Spodoptera frugiperda*, causando desorganização celular, fragmentação e protrusão de células, desorganização da matriz peritrófica, vacuolização celular e morte celular.

7. Bibliografias

1. ALDRICH, J.R.; ZANUNCIO, J.C.; VILELA, E.F.; TORRES, J.B.; CAVE, R.D. Field tests of predaceous pentatomid pheromones and semiochemistry of *Podisus* and *Supputius* species (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). **Annais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.1, p.1-4, 1997.
2. ARRESE, E.L.; SOULAGES, J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v.55, n.1, p.207-225, 2010.
3. AZEVEDO, D.O.; ZANUNCIO, J.C.; ZANUNCIO JR, J.S.; MARTINS, G.F.; MARQUES-SILVA, S.; SOSSAI, M.F.; SERRÃO, J.E. Biochemical and morphological aspects of salivary glands of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n.3, p.469-477, 2007.

4. BAEK, J.H.; JI, Y.; SHIN, J.S.; LEE, S.; LEE, S.H. Venom peptides from solitary hunting wasps induce feeding disorder in lepidopteran larvae. **Peptides**, v.32, n.3, p.568-572, 2011.
5. BAKER, J.; HOWARD, R.; MORRILL, W.; MEERS, S.; WEAVER, D. Acetate esters of saturated and unsaturated alcohols (C12–C20) are major components in Dufour glands of *Bracon cephi* and *Bracon lissogaster* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of the wheat stem sawfly, *Cephus cinctus* (Hymenoptera: Cephidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, n.8, p.757-769, 2005.
6. BEAULATON, J.; LOCKSHIN, R.A. Ultrastructural study of the normal degeneration of the intersegmental muscles of *Antheraea polyphemus* and *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera) with particular reference to cellular autophagy. **Journal of Morphology**, v.154, n.1, p.39-58, 1977.
7. BEARD, R.L. Insect toxins and venoms. **Annual Review of Entomology**, v.8, n. 1, p.1-18, 1963.
8. BELL, H.A.; DOWN, R.E.; EDWARDS, J.P.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Digestive proteolytic activity in the gut and salivary glands of the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae), effect of proteinase inhibitors. **European Journal of Entomology**, v.102, n.1, p.139-145, 2005.
9. BRAND, J.M.; BLUM, M.S.; FALES, H.M.; MACCONNELL, J.G. Fire ant venoms: comparative analyses of alkaloidal components. **Toxicon**, v.10, n.3, p.259-271, 1972.
10. BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, **Toxicon**, v.49, n.4, p.423-435, 2007.

11. BRÖKER, L.E.; KRUYT, F.A.E.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clinical Cancer Research**, v.11, n. 9, p.3155-162, 2005.
12. CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v.583, n.11, p.1736-1743, 2009.
13. CAO, F.; KIM, J.; BARD, A.J. Detection of the short-lived cation radical intermediate in the electrochemical oxidation of *N,N*-Dimethylaniline by scanning electrochemical microscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n.52, p.18163-18169, 2014.
14. COHEN, A.C. Feeding adaptations of some predaceous Heteroptera. **Annals of the Entomological Society of America**, v.83, n.6, p.1215-1223, 1990.
15. COHEN, A.C. Extra-oral digestion in predacious terrestrial Arthropoda. **Annual Review of Entomology**, v.40, n.1, p.85-103, 1995.
16. COHEN, A.C. Solid-to-liquid feeding: the inside story of extra-oral digestion in predaceous Heteroptera. **Annals of the Entomological Society of America**, v.44, n.2, p.103-117, 1998.
17. De BORTOLI, S.A.; OTUKA, A.K.; VACARI, A.M.; MARTINS, M.I.E.G.;VOLPE, H.L.X. Comparative biology and production costs of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) when fed different types of prey. **Biological Control**, v.58, n.2, p.127-132, 2011.
18. De SOUSA, M.E.C.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C.; DE SIQUEIRA, H.A.A.; SANTOS, F.A.B.; ALVES, L.C. Ultrastructure of the *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. **Micron**, v.40, n.7, p.743-749, 2009.
19. DOW, J.A. Insect midgut function. **Advances in Insect Physiology**, v.19, n.1, p.187-328, 1987.

20. FEHLBAUM, P.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W. F.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.52, p.33159-33163, 1994.
21. FERREIRA, J.A.M.; ZANUNCIO, J.C.; TORRES, J.B.; MOLINA-RUGAMA, A.J. Predatory behaviour of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) on different densities of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v.18, n.7, p.711-719, 2008.
22. FIAZ, M.; MARTÍNEZ, L.C.; COSTA, M.D.A.S.; COSSOLIN, J.F.S.; PLATA-RUEDA, A.; GONÇALVES, W.G.; SANTANA, A.E.G.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, n.10, p. 1-8, 2018.
23. FIELD, L.; FOSTER, C.H. Biologically oriented organic sulfur chemistry. IV. Synthesis and properties of 1,2,5-trithiepane, a model for study of sulfide and disulfide moieties in proximity. **The Journal of Organic Chemistry**, v.35, n.3, p.749-752, 1970.
24. FINNEY, D.J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridge University, London, 333 pp.
25. GABAN, C.R.G.; DOURADO, D.M.; DA SILVA, L.M.G.E.; PAULO, C.Ã.; CABRINI, I. Morphological changes in the digestive system of *Aedes aegypti* L. induced by (EDTA)]²⁻ Complex ions. **International Journal of Mosquito Research**, v.5, n.21, p.1-9, 2015.
26. GUI, Z.Z.; HOU, C.X.; LIU, T.; QIN, G.X.; LI, M.W.; JIN, B. Effects of insect viruses and pesticides on glutathione s-transferase activity and gene expression in *Bombyx mori*. **Journal of Economic Entomology**, v.102, n.4, p.1591-1598, 2009.

27. HUANG, T.; JANDER, G.; DE VOS, M. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis. **Phytochemistry**, v.72, n.13, p.1531-1537., 2011.
28. HU, J.; LI, F.; XU, K.; NI, M.; WANG, B.; TIAN, J.; LI, Y.; SHEN, W.; LI, B. Mechanisms of TiO₂ NPs-induced phoxim metabolism in silkworm (*Bombyx mori*) fat body. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.129, n.11, p.89-94, 2016.
29. KRIEGER, R. **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology 3th**. Virtual Books, 2010. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=sUrLT9z9i3IC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Hayes%27+Handbook+of+Pesticide+Toxicology+3th&ots=lQHguIUE2N&sig=E0wOl6zzRMnQtftR46zb8uKXbPc&redir_esc=y#v=onepage&q=Hayes'%20Handbook%20of%20Pesticide%20Toxicology%203th&f=false>. Acesso em: 13.ago. 2017
30. JEFSON, M.; MEINWALD, J.; NOWICKI, S.; HICKS, K.; EISNER, T. Chemical defense of a rove beetle (*Creophilus maxillosus*). **Journal of Chemical Ecology**, v.9, n.1, p.159-180, 1983.
31. LEE, J.; LEE, D.; CHOI, H.; KIM, H.H.; KIM, H.; HWANG, J.S.; LEE, D.G.; KIM, J.I. Structure-activity relationships of the intramolecular disulfide bonds in coprisin, a defense in from the dung beetle. **BMB Reports**, v.47, n.11, p.625-630, 2014.
32. LEE, K.H.; HONG, S.Y.; OH, J.E. Synthesis and structure-function study about tenecin1, an antibacterial protein from larvae of *Tenebrio molitor*. **FEBS Letters**, v.439, n.1-2, p.41-45, 1998.
33. LEHANE, M.; BILLINGSLEY, P. 2012. **Biology of the Insect Midgut**. Springer Science & Business Media.
34. LEMOS, W.P.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Attack behavior of *Podisus rostralis* (Heteroptera, Pentatomidae) adults on caterpillars of *Bombyx mori* (Lepidoptera,

- Bombycidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.6, p.975-981, 2005.
35. LU, J.; HOLMGREN, A. Thioredoxin system in cell death progression. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.17, n.12, p.1738-1748, 2012.
36. MARTÍNEZ-CAYUELA, M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. **Ars Pharmaceutica**, v.39, n.1, p.5-18, 1998.
37. MARTINEZ, L.C.; FIALHO, M.C.Q.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Protoplasma**, v.251, n.3, p.535-543, 2014.
38. MARTINEZ, L.C.; FIALHO, M.C.Q.; BARBOSA, L.C.A.; OLIVEIRA, L.L.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Stink bug predator kills prey with salivary non-proteinaceous compounds. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.68, n.1, p.71-78, 2016.
39. MARTINS, G. F., NEVES, L. A. O., SERRÃO, J. E., The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron**, v. 37, n.2, p. 161-168, 2006.
40. MILES, P.W. The saliva of Hemiptera. **Advances in Insect Physiology**, v.9, n.1, p.183-255, 1972.
41. MILES, P.W.; SLOWIAK, D. The accessory salivary gland as the source of water in the saliva of Hemiptera: Heteroptera. **Experientia**, v.15, n.8, p.1011-1012, 1976.
42. MONGE-FUENTES, V.; GOMES, F.M.M.; CAMPOS, G.A.A.; De CASTRO, J.S.; BIOLCHI, A.M.; Dos ANJOS, L.C.; MORTARI, M.R. Neuroactive compounds obtained from arthropod venoms as new therapeutic platforms for the treatment of neurological disorders. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.21, n.31, p.1-9, 2015.

43. NATH, B.S. Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.74, n.2, p.73-84, 2002.
44. NEVES, R.C.S.; TORRES, J.B.; ZANUNCIO, J.C. Production and storage of mealworm beetle as prey for predatory stinkbug. **Biocontrol Science and Technology**, v.20, n.10, p.1013-1025, 2010.
45. OLIVEIRA, J.A.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SOARES, M.J. Morphology and preliminary enzyme characterization of the salivary glands from the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.96, n.3, p.251-258, 2006.
46. OLIVEIRA, H.N.; ESPINDULA, M.C.; DUARTE, M.M.; PEREIRA, F.F.; ZANUNCIO, J.C. Development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) reared on guava leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n.3, p.429-434, 2011.
47. PAPAIVIZAS, G.C.; O'NEILL, N.R.; LEWIS, J.A. Fungistatic activity of propyl-N-(c-dimethylaminopropyl) carbamate on *Pythium* spp. and its reversal sterols. **Phytopathology**, v.68, n.6, p.1667-1671, 1978.
48. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, n.1, p.208-2012, 1963.
49. 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.

50. SAHAYARAJ, K.; MUTHUKUMAR, S. Zootoxic effects of reduviid *Rhynocoris marginatus* (Fab.) (Hemiptera: Reduviidae) venomous saliva on *Spodoptera litura* (Fab.). **Toxicon**, v.58, n.5, p.415-425, 2011.
51. SAS (2002) The SAS System for Windows, Release 9.0. SAS Institute, Cary, N.C.
52. SAAVEDRA, J.L.D.; ZANUNCIO, J.C.; ZANUNCIO, T.V, GUEDES, R.N.C. Prey capture ability of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae) reared for successive generations on a meridic diet. **Journal of Applied Entomology**, v.121, n.1-5, p.327-330, 2007.
53. SCHMIDT, J.O. Biochemistry of insect venoms. **Annual Review of Entomology**, v.27, n.1, p.339-368, 1982.
54. SCHMUCK, G.; MIHAIL, F. Effects of the carbamates fenoxycarb, propamocarb and propoxur on energy supply, glucose utilization and SH-groups in neurons. **Archives of Toxicology**, v.78, n.6, p.330-337, 2004.
55. SCUDELER, E.L.; DOS SANTOS, D.C. Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, v. 44, n.21, p.125-132, 2013.
56. SILVA, F.W.S.; SERRÃO, J.E.; ELLIOT, S.L. Density-dependent prophylaxis in primary anti-parasite barriers in the velvetbean caterpillar. **Ecological Entomology**, v.41, n.2, p.451-458, 2016.
57. SILVA-CARDOSO, L.; CACCIN, P.; MAGNABOSCO, A.; PATRÓN, M.; TARGINO, M.; FULY, A.; OLIVEIRA, G.A.; PEREIRA, M.H.; CARMO, M.G.T.; SOUZA, A.S.; SILVA-NETO, M.A.C.; MONTECUCCO, C.; ATELLA, G.C. Paralytic activity of lysophosphatidylcholine from saliva of the waterbug *Belostoma anurum*. **Journal of Experimental Biology**, v.213, n.19, p.3305-3310, 2010.

58. SOUSA, M.E.C.; SANTOS, F.A.B.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. **Journal of Insect Physiology**, v.56, n.12, p. 1913-1919, 2010.
59. STEFANINI, M.; DE MARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron micro scopy. **Nature**, v.216, n.10, p.173-174, 1967.
60. STENNICKE, H.R.; SALVESEN, G.S. Caspases-controlling intracellular signals by protease zymogen activation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1477, n. 1-2, p.299-306, 2000.
61. TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; De BIANCHI, A.G. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. **Journal of Insect Physiology**, v.25, n.6, p.486-494, 1979.
62. TERRA, W.R.; FERREIRA, C. The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara*. **Journal of Insect Physiology**, v.27, n.5, p. 325-331, 1981.
63. TIAN, J.H.; XUE, B.; HU, J.H.; LI, J.X.; CHENG, X.Y.; HU, J.S.; LI, F.C.; CHEN Y. H.; LI, B. Exogenous substances regulate silkworm fat body protein synthesis through MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. **Chemosphere**, v.171, n.6, p.202-207, 2017.
64. UPADHYAY, R.K.; AHMAD, S. Allergic and toxic responses of insect venom and it's immunotherapy. **Journal of Pharmacy Research**, v.3, n.12, p. 3123-3128, 2010.
65. VUOCOLO, T.; EISEMANN, C.H.; PEARSON, RD.; WILLADSEN, P.; TELLAM, R.L. Identification and molecular characterization of a peritrophin gene, peritrophin-48, from the myiasis fly *Chrysomya bezziana*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, n.9, p.919-932, 2001.

66. WALKER, A.A.; WEIRAUCH, C.; FRY, B.G.; KING, G.F. Venoms of heteropteran insects: a treasure trove of diverse pharmacological toolkits. **Toxins**, v.8, n.43, p.2-32 2016.
67. WANG, P.; GRANADOS, R.R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potencial PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.47, n.2, p.110-118, 2001.
68. YANG, M.; WANG, B.; GAO, J.; ZHANG, Y.; XU, W.; TAO, L. Spinosad induces programmed cells death involves mitochondrial dysfunction and cytochrome C release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. **Chemosphere**, v.169, n.4, p.155-161, 2017.
69. YANG, M.; XIANG, G.; LI, D.; ZHANG, Y.; XU, W.; TAO, L. The insecticide spinosad induces DNA damage and apoptosis in HEK293 and HepG2 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environment Mutagenesis**, v. 812, n.15, p.12-19, 2016.
70. YING, Z.; AO LI, Z. LU.; CHUNFENG, W.; YIN, H.; YUAN, M.; PANG, Y. The *Spodoptera frugiperda* effector caspase Sf-caspase-1 becomes unstable following its activation. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.83, n.4, p.195-210, 2013.
71. ZANUNCIO, J.C.; JUSSELINO-FILLHO, P.; RIBEIRO, R.C.; ZANUNCIO, T.V.; RAMALHO, F.S.; SERRÃO, J.E. Hormetic responses of a stinkbug predator to sublethal doses of pyrethroid. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.87, n.6, p.608-614, 2011.
72. ZANUNCIO, J.C.; SILVA, C.A.D.; LIMA, E.R.; PEREIRA, F.F.; RAMALHO, F.S.; SERRÃO, J.E. Predation rate of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with and without defense by *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, 1, p. 121-125, 2008.

73. ZENG, F.; COHEN, A.C. Comparison of α -amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous Heteroptera. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular**, v.126, n.1, p.101-106, 2000.

CAPÍTULO 2

Compostos salivares não proteicos do percevejo predador causam efeitos histopatológicos e citotóxicos em presas

Resumo: *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano, produzidas nas glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae), são compostos tóxicos que matam as presas. Avaliou-se a atividade tóxica e a citotoxicidade no intestino médio em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) após exposição oral contendo as concentrações letais de *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano. As concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀), em laboratório, foram determinadas de acordo com a mortalidade. Seis concentrações de cada molécula, além do controle (acetona), foram ajustadas em 200 µL de acetona nas proporções 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32. Um total de 200 µL de cada molécula foi utilizado por concentração. Os danos celulares no intestino médio foram avaliados com microscopia de luz e eletrônica de transmissão. A *N,N*-dimetilanilina e CL₅₀ e CL₉₀ de *1,2,5*-tritiepano foram de 237,59 nL/ mL⁻¹ e 315,13 nL/ mL⁻¹ e 372,81 nL/ mL⁻¹ e 674,45 nL/ mL⁻¹, respectivamente. A vacuolização nas células digestivas e caliciformes ocorreu após 1 hora de exposição, no intestino médio dos insetos tratados com *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano. Alterações causadas pela *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano no intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* podem afetar a digestão e a absorção de nutrientes, com impactos negativos no desenvolvimento e sobrevivência dos insetos. Os compostos não proteicos *N,N* dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano têm efeito nocivo danificando o intestino médio de lagarta de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Alterações moleculares, *N,N*-dimetilanilina, saliva, toxicidade, *1,2,5*-tritiepano

1.Introdução

Enzimas digestivas, injetadas durante a digestão extra-oral, possibilitam ao predador obter nutrientes de presas, inclusive de estruturas de difícil digestão (COHEN, 1998). A atividade secretora, principalmente, de proteínas, lipídeos, carboidratos e de outros compostos das glândulas salivares, principal e acessória, de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) é alta (MARTÍNEZ et al., 2014). Compostos não proteicos venenosos como *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano, da saliva de *P. nigrispinus*, matam presas (MARTÍNEZ et al., 2016). Percevejos predadores podem produzir toxinas constituídas por compostos não proteicos, altamente, eficientes na predação e com potencial inseticida.

N,N-dimetilanilina, um composto químico terciário de amina e de um grupo de dimetilamina ligado um fenilo (KRIEGER, 2010), pode modificar enzimas por *N*-desmetilação, *N*-oxidação e *N*-hidroxilação, formando compostos xenobióticos nas células (CUI et al., 2007; WANG et al., 2017). Produtos comerciais a base de grupo amino afetam funções mitocondriais, nos níveis de ATP potencial e intracelular, reduzindo a glicose (SCHMUCK e MIHAIL, 2004). *N,N*-dimetilanilina afeta a biossíntese dos constituintes da membrana, acumulando ácidos graxos (PAPAVIZAS et al., 1978).

O *1,2,5*-tritiepano, composto químico orgânico sintetizado da reação de 2-cloro-dissulfureto com sulfureto de sódio (FIELD e FOSTER, 1970), está presente em plantas e percevejos devido a reação envolvendo a redução de ligações de proteínas ricas em dissulfeto (ORTIZ-ESPÍN et al., 2015). O *1,2,5*-tritiepano, presente em venenos de heterópteros (WALKER et al., 2016), foi relatado na saliva de *P. nigrispinus*, mas seus efeitos sobre presas são desconhecidos (MARTINEZ et al., 2016). Sistemas de defesas de insetos, como *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae) (LEE et al., 1998) e *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) (FEHLBAUM et al., 1994),

tem compostos com característica estrutural estabilizada por duas pontes dissulfureto (LEE et al., 2014).

O intestino médio dos insetos é um órgão para digestão e absorção de nutrientes, mas também é uma barreira físico-química contra patógenos e substâncias químicas (SCUDELER et al., 2016; SILVA et al., 2016). A matriz peritrófica, revestindo o lúmen, é a primeira barreira contra patógenos, e o epitélio do intestino médio possui enzimas desintoxicantes (ZHU et al., 2011; SALVADOR et al., 2014). Esse órgão é um bom alvo para avaliar os efeitos inseticidas e modos de ação (SMAGGHE et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2016).

O objetivo foi avaliar citotoxicidade no intestino médio de lagarta *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) pelo *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritepano presentes na saliva do seu predador *P. nigrispinus*.

2. Material e métodos

2.1 Insetos

Adultos de *P. nigrispinus* foram obtidos da criação massal do Laboratório de Controle Biológico do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil, mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e 12 h fotofase. Esses insetos são alimentados com pupas de *T. molitor* e folhas de *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex. Maiden) *ad libitum* (NEVES et al., 2010). Lagartas de *S. frugiperda* foram obtidas do Laboratório de Semioquímicos do Departamento de Entomologia da UFV em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Essas lagartas foram colocados em caixas de polietileno (15 × 9 cm) e alimentadas com dieta artificial constituída por 10 g de ágar, 15,6 g de levedura de cerveja, 25 g de germen de trigo, 25 g de proteína de soja, 31,2 g de feijão, 12,5 g de caseína, e 2,5 mL de solução de vitaminas (1,2% de ácido ascórbico, 0,03% pantotenato de cálcio, 0,015% de

niacina, 0,008%, riboflavina, 0,004% de tiamina e 0,004% de HCl) e mantidas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas. Machos adultos de *P. nigrispinus* e lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* sem malformações foram utilizadas nos bioensaios independentemente do tamanho e do peso das mesmas.

2.2 Toxicidade dos compostos não proteicos *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano

Os compostos tóxicos *N,N*- dimetilanilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e *1,2,5*-tritiepano (Friedrich-Schiller-Universitaet, Jene, Alemanha) sintetizados foram utilizados para obter as concentrações necessárias para o teste de toxicidade. As concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}), em laboratório, foram determinadas de acordo com a mortalidade. Em cada concentração foi utilizado 200 μL de cada composto. Seis concentrações de cada molécula, além do controle (acetona), foram ajustadas em 200 μL de acetona nas proporções 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32. Diferentes concentrações de cada molécula foram aplicadas em solução de 10 μL em 1 g de dieta artificial. Vinte e cinco lagartas de *S. frugiperda* de quinto instar foram utilizadas por concentração, individualizadas em placas de Petri (90 \times 1,5 mm). O número de lagartas mortas foi contabilizado após exposição ao *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano em intervalos de 12 horas por 72 horas.

2.3 Microscopia de luz

Cinco lagartas de *S. frugiperda* foram alimentadas com dieta com CL_{50} estimado de *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano por 30 minutos, uma, três e seis horas e crioanestesiados a -4°C . O intestino médio de *S. frugiperda* foi dissecado em solução salina para inseto (0,1 M NaCl+ 0,1 M KH_2PO_4 + 0,1 M Na_2HPO_4) e transferido para solução fixadora de Zamboni (STEFANINI et al., 1967) por 12 horas a 5°C . As amostras foram desidratadas em uma série graduada de etanol (70° , 80° , 90° e 95°) e embebidas em

historesina (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). Seções de 3 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas sob microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

2.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Cinco lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* foram expostos à concentração letal estimada CL₅₀ de *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano durante seis horas e crioanestesiadas a -4 °C. O intestino médio de *S. frugiperda* foi transferido para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 contendo 0,2 M de sacarose por 4 h em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 h, seguindo-se lavagem no tampão e desidratação em série crescente de etanol (70°, 80°, 90° e 99°). As amostras foram embebidas em resina LR White (London Resin Company Ltd.) e as seções ultrafinas (80-90 nm de espessura), obtidas com navalha de vidro em ultramicrótomo PowerTomes PT-X (RMC Boeckeler Instruments Inc., Tucson, AZ, USA), contrastadas com acetato de uranila aquosa 1% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.5 Detecção de fragmentação de DNA

Lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* foram alimentadas, durante 6 e 24 horas, com 1g de dieta artificial contendo 10 µL da concentração letal estimada CL₅₀ de *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano. Cinco lagartas de quinto instar foram utilizadas por composto e período analisados, em duas etapas: Primeira etapa: O intestino médio das lagartas foi dissecado e colocado em Eppendorf, acrescentando-se nitrogênio líquido e maceramento em pistilo. Após isto, 200 µL de tampão de extração (Tris: HCl pH8-100mM; NaCl- 100mM; EDTA- 25mM; SDS- 1% e água destilada) foram adicionados,

com 6 μL de Proteinase k, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (Proteinase K-20mg/mL), homogeneizado em agitador, colocados em banho maria a 60 °C por 20 minutos e incubadas no gelo por cinco minutos. A seguir, acrescentou-se 200 μL de solução fenol clorofórmio: álcool isoamílico; os microcubos com as amostras foram agitados levemente até a mistura ficar esbranquiçada e levados para centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos. A fase superior do sobrenadante foi retirada, transferida para outro Eppendorf com 10 μL de acetato de sódio 3M e colocadas no freezer a 20 °C por 12 horas. Segunda etapa: As amostras foram centrifugadas a 12000 RPM por 10 minutos e o líquido descartado, acrescentando-se 80 μL de álcool 70% e centrifugando-se, novamente, a 10000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi retirado e, após a secagem total do pellet, adicionou 20 μL de tampão TE (Tris 4Cl pH 8 -10mM e EDTA 1mM) e tudo foi colocado em banho maria a 37°C por 2 horas.

As amostras de DNA foram colocadas em cuba de eletroforese horizontal com uma corrente elétrica de 300mA e 25V (0,90V/cm) por três horas em solução de brometo de etídio. A imagem digital do gel foi feita por meio do fotodocumentador Quatum -Capt®.

2.6 Estatística

As concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) e os limites de confiança foram determinados por regressão baseada em concentração probit-mortalidade (FINNEY, 1971) com o procedimento PROC PROBIT do programa SAS User v. 9.0 para Windows (SAS Institute 2002).

3. Resultados

3.1 Toxicidade

As CL_{50} e CL_{90} mostraram ser a *N,N*-dimetilanilina o composto mais tóxico, no bioensaio, para lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* com valores de 237,59 e 372,81

nL/ mL⁻¹ ($\chi^2= 26,46$ GL= 5), seguido do 1,2,5-tritiepano com 315,13 e 674,45 nL/ mL⁻¹ ($\chi^2= 25,20$; GL=5), respectivamente. A mortalidade foi <1% no controle (Tabela 1 Figura 1).

Tabela 1. Concentrações letais (Limites inferior/superior) dos compostos químicos de *N,N*- dimetilaniлина e 1,2,5-tritiepano para lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Tratamento	CL	VE (nL/mL ⁻¹)	IC (nL/ mL ⁻¹) Inferior/Superior	χ^2
<i>N,N</i> dimetilaniлина	50	237,59	221,62 - 254,07	26,46
	90	372,81	279,80 - 361,43	
	50	315,13	280,97 - 361,43	25,20
1,2,5- tritiepano	90	674,45	449,97 - 835,70	

As concentrações dos compostos foram aplicadas à dieta e o número de insetos mortos contabilizados durante 72 horas. CL 50, 90 são concentrações que causaram 50 e 90 de mortalidade; VE: valor estimado, IC: intervalo de confiança; χ^2 : valor de qui-quadrado. As concentrações letais e os respectivos limites estão baseados em escala logarítmica com nível de significância em $P < 0,0001$.

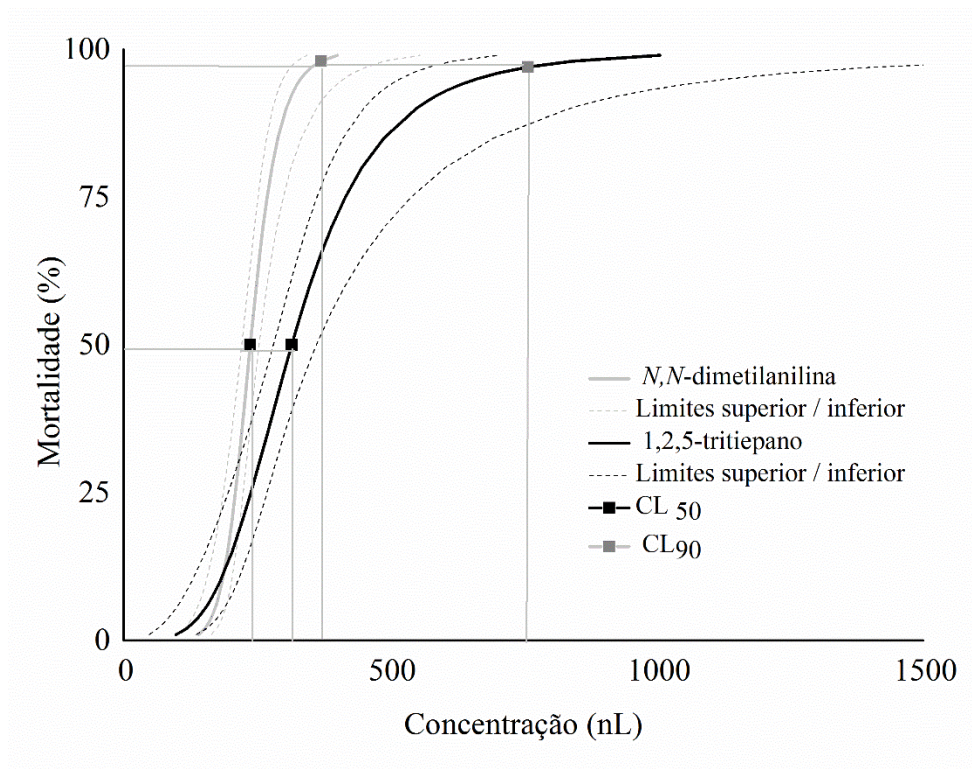


Figura 1. Concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀), calculadas com a mortalidade de lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) durante 72 horas, por compostos dos *N,N*-dimetilanilina (A) e 1,2,5-tritiepato (B), não proteicos de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) por ingestão.

3.2 Histopatologia

O epitélio do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda*, não expostas aos compostos não proteicos da saliva de *P. nigrispinus*, mostrou células colunares altas, matriz peritrófica preservada com formato regular e citoplasma com vacúolos, vesículas e pequenos grânulos. O núcleo foi alongado ocupando a porção mediano-basal das células, com cromatina predominantemente descondensada (Figura 2).

Controle

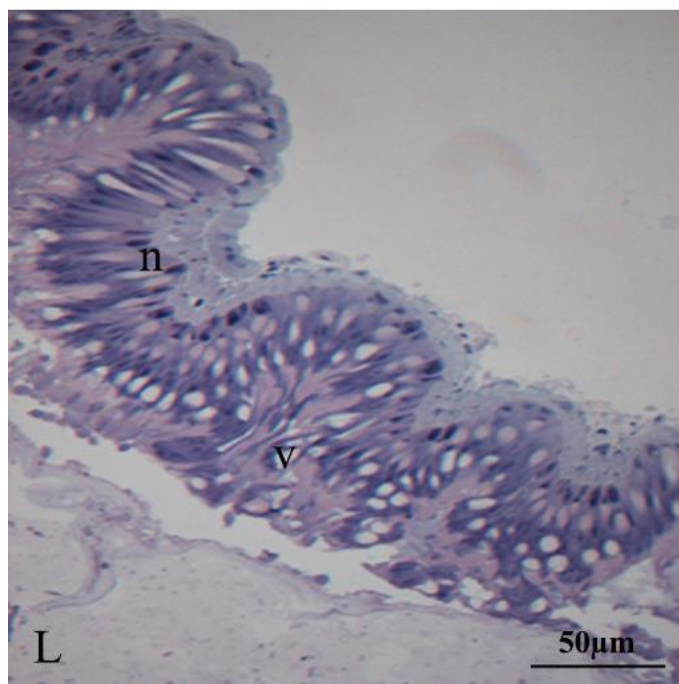


Figura 2. Secção histológica do intestino médio de lagarta de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Vista geral mostrando o núcleo bem desenvolvido núcleo (n) e lúmen (L).

O intestino médio de *S. frugiperda*, após 30 minutos expostos ao *N,N*-dimetilanilina, apresentou sinais de degeneração do epitélio com fragmentos celulares liberados no lúmen (Figura 3A). Após 1h a 3h de exposição, a forma do epitélio era irregular com ruptura da membrana citoplasmática e núcleo com cromatina condensada (Figura 3B, Figura 3C). O número e o tamanho do vacúolo no citoplasma aumentaram após 6 horas de alimentação, ocupando grande parte do volume celular (Figura 3D).

A liberação de fragmentos de células do intestino médio no lúmen foi observada após 30 minutos de alimentação com 1,2,5 tritiepato (Figura 3E). O início da fragmentação epitelial e vacuolização ocorreu após 1h de exposição (Figura 3F). As fragmentações do epitélio aumentaram, progressivamente, até três horas após (Figura 3G). Processos de necroses foram observados após seis horas (Figura 3H).

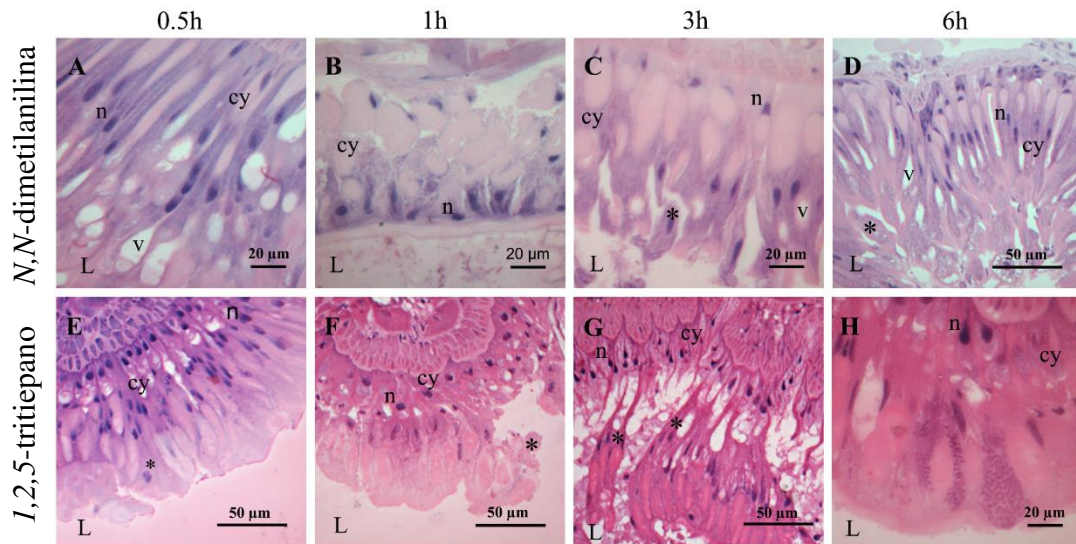


Figura 3. Secções histológicas do intestino médio de lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) após a injeção dos compostos não proteicos. Alterações histológicas no epitélio com a injeção de *N,N*-dimetilalanilina (A-D) e *1,2,5*-tritriepano (E-H) mostrando (n) núcleo (n), citoplasma (cy) irregular com alto números de vacúolos (v) e fragmentação celular (*) via lúmen (L) em diferentes tempo de exposição.

3.3 Ultraestrutura

Células digestivas do intestino médio de *S. frugiperda*, não expostas aos compostos não proteicos de *P. nigrispinus*, apresentaram estrutura bem organizada no citoplasma composto de microvilosidades apicais longas e regulares, vacúolos e membrana plasmática intacta (Figura 4 A e D). O citoplasma da porção apical era rico em vesículas elétrondensas, grânulos de glicogênio e mitocôndrias (Figura 4A), enquanto o basal a célula tinha mitocôndrias associadas a membrana plasmática e grânulos de glicogênio (Figura 4D).

O intestino médio de *S. frugiperda* exposto à CL₅₀ de *N,N*-dimetilanilina apresentou células epiteliais com reduzido número de grânulos de glicogênio e mitocôndrias, presença de autofagossomos e aumento de vacúolos na porção apical (Figura 4B). Na porção basal das células, espaços intracelulares, formados pelas dobras da membrana plasmática, estavam dilatados e com maior quantidade do que no controle (Figura 4E).

A porção apical das células digestivas no intestino médio de *S. frugiperda* exposta ao 1,2,5-tritiepiano mostrou grandes vacúolos, autofagossomos com restos de membranas e poucos grânulos elétrondensos, e algumas vesículas foram liberadas no lúmen (Figura 4C). A porção basal das células digestivas teve um aumento nas dobras da membrana plasmática com poucas mitocôndrias associadas e muitos autofagossomos (Figura 4F).

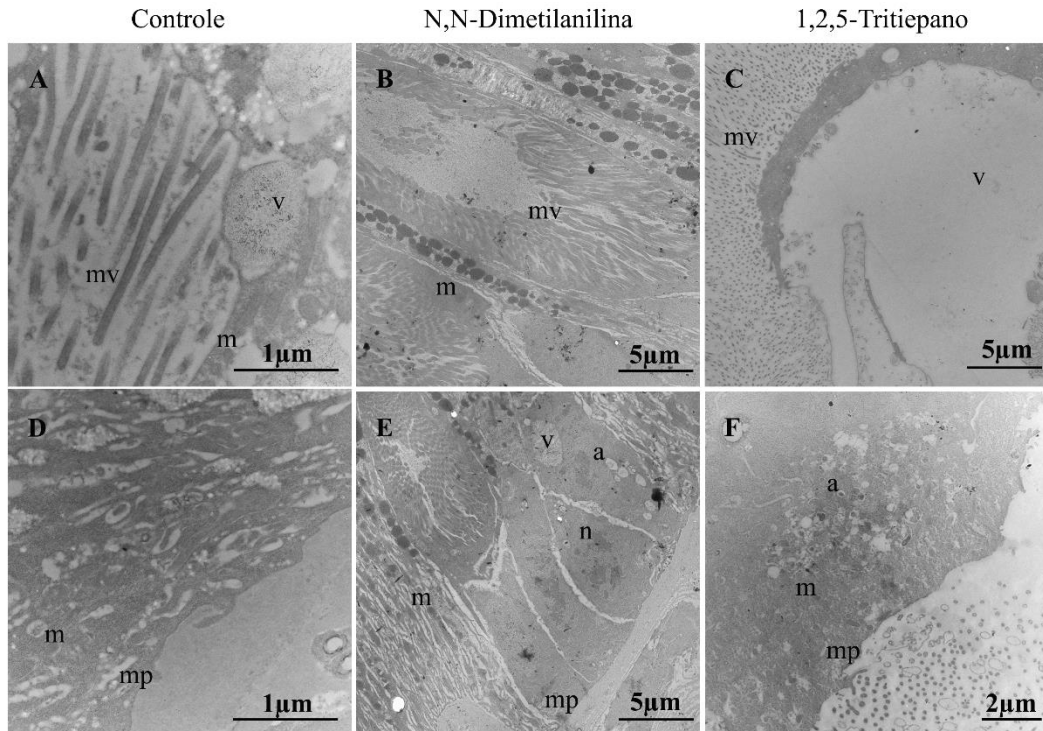


Figura 4. Microfotografia eletrônica de transmissão do intestino médio de lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) após a injeção dos compostos não proteicos. Controle - (A) Porção apical com presença de microvilosidades (mv), vacúolos (v) e mitocôndrias (m), e (D) Porção basal da célula digestiva mostrando membrana plasmática (mp) e mitocôndrias (m) associadas às dobras da membrana plasmática. Citotoxicidade nas células digestivas após a injeção de *N,N*-dimetilanilina (B e E) e 1,2,5-tritiepano (C e F) mostrando núcleo (n) microvilosidades (mv), mitocôndrias (m), vacúolos (v), membrana plasmática (mp) e autofagossomos (a).

3.4 Fragmentação de DNA

As lagartas de *S. frugiperda*, alimentadas durante seis e 24 horas com dietas artificiais contendo *N,N*-dimetilnilina e *1,2,5*-tritiepano tiveram o DNA das células do intestino médio fragmentado em relação ao controle (Figura 5).

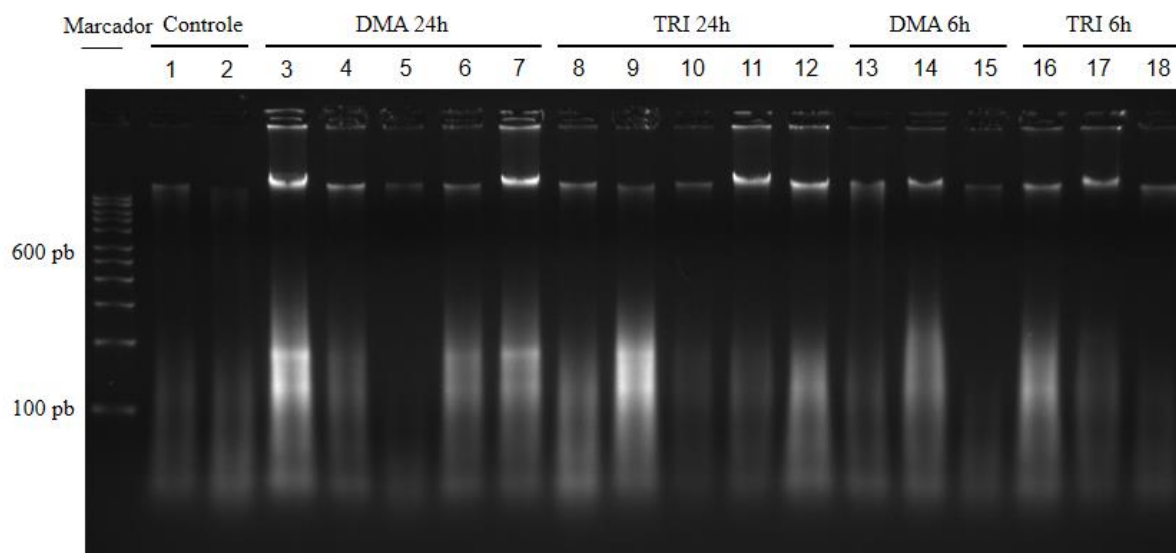


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 3% com morte celular no intestino médio de larvas de quinto estágio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) após injeção de compostos não proteicos. Amostras positivas para *N,N*-dimetilnilina e *1,2,5*-tritiepano nos tempos de 6 e 24 horas. Números de 1-18 indicam repetições biológicas de cada tratamento.

4. Discussão

A toxicidade da *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano contra lagartas de *S. frugiperda* indica que estes compostos não proteicos da saliva do predador *P. nigrispinus* são tóxicos e desempenham algum papel na morte das presas. L-3,4-diidroxifenilalanina não proteica (L-DOPA), L-canavanina e L-homoarginina foram mais tóxicas que os compostos proteicos de larvas de *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) quando incorporadas a dieta desse inseto (JANZEN et al., 1977). A morte de lagartas de *S. frugiperda*, expostas aos compostos não proteicos, mostra o impacto destes compostos como descrito para o *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphididae) alimentado com diferentes proteínas e compostos sintéticos não proteicos como alfa-amanitina, ácido clorogênico e rifampicina (RAHBÉ, 1993). O intestino médio do inseto é um alvo comum dos inseticidas porque suas atividades podem ser interrompidas, aumentando a eficácia do tratamento com redução do crescimento e aumentando a susceptibilidade do organismo a toxinas e patógenos (HEGEDUS et al., 2009; CARNEIRO et al., 2018; FIAZ et al., 2018).

A presença de células digestivas com vesículas, pequenos grânulos e núcleos com cromatina descondensada, no intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* no controle é similar àquelas de outras espécies de Lepidoptera (LEVY et al., 2004).

Degeneração celular no epitélio do intestino médio com liberação do fragmento celular no lúmen, epitélio irregular, ruptura da membrana citoplasmática, núcleo com cromatina condensada e aumento do número de vacúolos em lagarta de *S. frugiperda* exposta com CL_{50} *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano, causam efeitos e mudanças histológicas em regiões que protegem o intestino médio contra danos químicos (TERRA, 1988) e em estruturas envolvidas na digestão, absorção de nutrientes e água, secreção enzimática digestiva e regulação iônica (TERRA et al., 1996; LOEB et al., 2001). Danos semelhantes foram relatados para *S. frugiperda* com nim (*Azadirachta indica*) (ROEL et

al., 2010) e citronela (*Cymbopogon winterianus*) (SILVA et al., 2017) e Spinosad no intestino médio de lagartas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) (ABOUELGHAR et al., 2013). A constante destruição e substituição de células epiteliais mantém a integridade do epitélio do intestino médio (MALAGOLI et al., 2010; ROSTROSKOWSKA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2013), pela diferenciação e proliferação de células regenerativas, e remoção de células epiteliais (NARDI et al., 2012). Mudanças nutricionais (PARK et al., 2008), infecção por patógenos (BATON et al., 2007) e substâncias tóxicas (LOEB et al., 2001; KHAN et al., 2011) são mecanismos que ativam células regenerativas (GIGLIOLLI et al., 2015). A liberação de fragmentos celulares no lúmen do intestino médio pode estar associada à degeneração celular seguida de renovação epitelial para restaurar o tecido danificado (TERRA et al., 1994), permitindo que os insetos sobrevivam a agentes nocivos (CASTAGNOLA et al., 2016).

Alterações ultraestruturais com aumento dos vacúolos autofágicos e diminuição das mitocôndrias associadas às dobras da membrana plasmática basal nas células do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com *N,N*-dimetilanilina e 1,2,5-tritiepano são semelhantes as do inseto exposto à suspensão bacteriana e a proteína Cry1Ba da estirpe *Bacillus thuringiensis thuringiensis* 4412 (PINTO et al., 2010). Células do intestino médio de ninfas de *Callibaetis radiatus* (Navas) (Ephemeroptera: Baetidae), expostas à deltametrina, eram ricas em vacúolos autofágicos (SANTOS et al., 2017). A degeneração das células colunares afeta o processo digestivo, uma vez que estas células são importantes na produção de enzimas e absorção de nutrientes na lagarta de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (HOPKINS et al., 2001). Compostos não proteicos *N,N*-dimetilanilina e 1,2,5-tritiepano afetaram a regeneração celular em lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* devido à alterações nas células epiteliais.

Fragmentação do DNA nas células do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* expostas a *N,N*-dimetilanilina ou 1,2,5-tritiepano afeta a síntese de RNA e DNA, mutações, e recombinação e quebras de DNA associados a proteínas (FILIPSKI, 1983) ligadas ao reparo do intestino médio (HUANG et al., 2016). A *N,N*-dimetilanilina modifica as enzimas por reações de oxidação (ANJUM et al., 1992), demonstrando que este composto tem potencial destrutivo sobre a molécula de DNA. Isto pode ser devido a reações de oxidação e modulação mediada por fatores protéicos com as substâncias químicas que afetam as funções das moléculas biológicas (UEDA, 2009). Resultados semelhantes foram relatados para *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) lagartas de terceiro instar alimentadas com dieta com extrato de folha de *Porteresia coarctata* Takeoka com redução do conteúdo de DNA nos tecidos do intestino médio e corpo do inseto (ULRICHS et al., 2008) e para as de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae), com a α -amanitina reduzindo a atividade do RNA polimerase, em 60% e 70%, respectivamente (ELSHOURBAGY e WILKINSON, 1978). As alterações histológicas e ultraestruturais encontradas causadas pelos *N,N*-dimetilanilina e 1,2,5-tritiepano podem resultar da deterioração do DNA, comprometendo as células do intestino médio. Além disso, podem estar associados a um silenciamento gênico por mecanismo envolvido no processo de defesa das células do intestino médio em insetos (SWEVERS et al., 2011; KATOCH et al., 2012; GARCIA et al., 2017). Danos no DNA das células epiteliais indicam que as lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* são sensíveis a *N,N*-dimetilanilina e 1,2,5-tritiepano, evidenciando o efeito tóxico de compostos não proteicos que podem ser uma estratégia para o manejo da lagarta do cartucho.

5. Conclusão

Os compostos não proteicos, *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-trietilbenzeno, têm efeitos tóxicos com danos histológicos e citológicos do intestino médio de lagartas do quinto instar de *S. frugiperda*.

7. Bibliografias

1. ABOUELGHAR, G.; SAKR, H.; AMMAR, H.A.; NASSAR, A.Y.M. Sublethal effects of Spinosad (Tracer®) on the Cotton Leafworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Plant Protection Research**, v.53, n.3, p.275-284, 2013.
2. ANJUM, F.; RAMAN, A.; SHAKOORI, A.R.; GORROD, J.W. An assessment of cadmium toxicity on cytochrome P-450 and flavin monooxygenase-mediated metabolic pathways of dimethylaniline in male rabbits. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.11, n.4, p.191-195, 1992.
4. BATON, L.A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.C. Morphological evidence for proliferative regeneration of the *Anopheles stephensi* midgut epithelium following *Plasmodium falciparum* ookinete invasion. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.96, n.3, p.244-254, 2007.
5. CARNEIRO, L.S.; TEIXEIRA, S.A.M.V.; GONCALVES, W.G.; FERNANDES, K.M.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Histochemistry, immunohistochemistry and cytochemistry of the anterior midgut region of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Micron**, v.113, n.10, p.41-47, 2018.
6. CASTAGNOLA, A.; JURAT-FUENTES, J.L. Intestinal regeneration as an insect resistance mechanism to entomopathogenic bacteria. **Current Opinion in Insect Science**, v.15, n.3, p.104-110, 2016.

7. COHEN, A.C. Solid-to-liquid feeding: the inside story of extra-oral digestion in predaceous Heteroptera. **Annals of the Entomological Society of America**, v.44, n.2, p.103-117, 1998.
8. CUI, L.; SUN, H.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R.; SKIPPER, P.L. Identification of adducts formed by reaction of N-Acetoxy-3, 5-Dimethylaniline with DNA. **Chemical Research in Toxicology**, v.20, n.11, p.1730-1736, 2007.
9. ELSHOUBAGY, A.N.; WILKINSON, C.F. The role of DNA-dependent RNA polymerases in microsomal enzyme induction in southern armyworm (*Spodoptera eridania*) larvae. **Insect Biochemistry**, v.8, n.6, p.425-433, 1978.
10. FEHLBAUM, P.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W.F.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.52, p.33159-33163, 1994.
11. FIAZ, M.; MARTÍNEZ, L.C.; COSTA, M.D.A.S.; COSSOLIN, J.F.S.; PLATA-RUEDA, A.; GONÇALVES, W.G.; SANTANA, A.E.G.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, n.10, p.1-8, 2018.
12. FIELD, L.; FOSTER, C.H. Biologically oriented organic sulfur chemistry. IV. Synthesis and properties of 1,2,5-trithiepane, a model for study of sulfide and disulfide moieties in proximity. **The Journal of Organic Chemistry**, v.35, n.3, p.749-752, 1970.
13. FILIPSKI, J. Competitive inhibition of nicking-closing enzymes may explain some biological effects of DNA intercalators. **FEBS Letters**, v.159, n.1-2, p.6-12, 1983.
14. FINNEY, D.J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridge University, London, 333 pp.

15. GARCIA, R.A.; MACEDO, L.L.P.; CABRAL DO NASCIMENTO, D.; GILLET, F.X.; MOREIRA-PINTO, C.E.; FAHEEM, M.; BASSO, A.M.M.; SILVA, M.C.M.; SÁ, F.G. Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. **PLoS ONE**, v.12, n.12, p.1-22, e0189600, 2017.
16. GIGLIOLLI, A.A.S.; LAPENTA, A.S.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; ABRAHÃO, J.; CONTE, H. Morpho-functional characterization and esterase patterns of the midgut of *Tribolium castaneum* Herbst, 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae) parasitized by *Gregarina cuneata* (Apicomplexa: Eugregarinidae). **Micron**, v.76, n.9 p.68-78, 2015.
17. GUTIÉRREZ, Y.; SANTOS, H.P.; SERRÃO, J.E.; OLIVEIRA, E.E. Deltamethrin-mediated toxicity and cytomorphological changes in the midgut and nervous system of the mayfly *Callibaetis radiates*. **PLoS ONE**, v.11, n.3, e0152383, 2016.
18. HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; UMUT TOPRAK, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture and function. **Annual Review of Entomology**, v.54, n.1, p.285-302, 2009.
19. HOPKINS, T.L.; HARPER, M.S. Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary Wheat Germ Agglutinin on their formation and structure. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.47, n.2, p.100-109, 2001.
20. HUANG, W.; ZHANG, J.; YANG, B.; BEERNTSEN, B.T.; SONG, H.; LING, E. L. DNA duplication is essential for the repair of gastrointestinal perforation in the insect midgut. **Scientific Reports**, v.6, n.19142, p.1-10, 2016.
21. JANZEN, D.H.; JUSTER, H.B.; BELL, E.A. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Phytochemistry**, v.16, n.2, p.223-227, 1977.

22. KATOCH, R.; THAKUR, N. Insect gut nucleases: a challenge for RNA interference mediated insect control strategies. **International Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.1, n.8, p.198-203, 2012.
23. KHAN, I.; QAMAR, A.; MEHDI, S.H.; SHAHID, M. Histopathological effects of *Datura alba* leaf extract on the midgut of *Periplaneta americana*. **Biology and Medicine**, v.3, n.2, p.260-264, 2011.
24. KRIEGER, R. **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology 3th**. Virtual Books, 2010. Disponível em:
<https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=sUrLT9z9i3IC&oi=nd&pg=PP1&dq=Hayes%27+Handbook+of+Pesticide+Toxicology+3th&ots=lQHguIUE2N&sig=E0wO16zzRMnQtftR46zb8uKXbPc&redir_esc=y#v=onepage&q=Hayes'%20Handbook%20of%20Pesticide%20Toxicology%203th&f=false>. Acesso em: 13.ago. 2017
25. LEE, J.; LEE, D.; CHOI, H.; KIM, H.H.; KIM, H.; HWANG, J.S.; LEE, D.G.; KIM, J.I. Structure-activity relationships of the intramolecular disulfide bonds in coprisin, a defensin from the dung beetle. **BMB Reports**, v.47, n.11, p.625-630, 2014.
26. LEE, K.H.; HONG, S.Y.; OH, J.E. Synthesis and structure-function study about tenecin1, an antibacterial protein from larvae of *Tenebrio molitor*. **FEBS Letts**, v.439, n.1-2, p.41-45, 1998.
27. LEVY, S.M.; FALLEIROS, A.M.F.; GREGÓRIO, E.A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): Light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biology**, v.64, n.3, p.633-638, 2004.
28. LOEB, M.J.; MARTIN, P.A.W.; HAKIM, R.S.; GOTO, S.; TAKEDA, M. Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Insect Physiology**, v.47, n.6, p.599-606, 2001.

29. MALAGOLI, D.; ABDALLA, F.C.; CAO, Y.; FENG, Q.; FUJISAKI, K.; GREGOR, C.A.; MATSUO, T.; NEZIS, I.P.; PAPASSIDERI, I.S.; SASS, M.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; TETTAMANTI, G.; UMEMIYA-SHIRAFUGI, R. Autophagy and its physiological relevance in arthropods. Current knowledge and perspectives. **Autophagy**, v.6, n.5, p.575-588, 2010.
30. MARTÍNEZ, L.C.; FIALHO, M.C.Q.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Protoplasma**, v.251, n.3, p.535-543, 2014.
31. MARTÍNEZ, L.C.; FIALHO, M.C.Q.; BARBOSA, L.C.A.; OLIVEIRA, L.L.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Stink bug predator kill prey with salivary non-proteinaceous compounds. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.68, n.1, p.71-78, 2016.
32. NARDI, J.B.; BEE, C.M. Regenerative cells and the architecture of beetle midgut epithelia. **Journal of Morphology**, v. 273, n.9, p.1010-1020, 2012.
33. NEVES, R.C.S.; TORRES, J.B.; ZANUNCIO, J.C. Production and storage of mealworm beetle as prey for predatory stinkbug. **Biocontrol Science and Technology**, v.20, n.10, p.1013-1025, 2010.
34. PAPAIVIZAS, G.C.; O'NEILL, N.R.; LEWIS, J.A. Fungistatic activity of propyl-N-(c-dimethylaminopropyl) carbamate on *Pythium* spp. and its reversal sterols. **Physiology and Biochemistry**, v.68, n.6, p.1667-1671, 1978.
35. PARK, M.S.; TAKEDA, M. Starvation suppresses cell proliferation that rebounds after refeeding in the midgut of the American cockroach, *Periplaneta americana*. **Journal of Insect Physiology**, v.54, n.2, p.386-392, 2008.
36. PINTO, L.M.N.; DREBES DÖRR, C.N.; FIUZA, M.L. The toxicity and histopathology of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ba toxin to *Spodoptera frugiperda*

(Lepidoptera, Noctuidae). **Microorganisms in Industry and Environment**, v.1, n.1, p.137-140, 2010.

37. ORTIZ-ESPÍN, A.; LOCATO, V.; CAMEJO, D.; SCHIERMEYER, A.; DE GARA, L.; SEVILLA, F.; JIMÉNEZ, A. Over-expression of Trx o 1 increases the viability of tobacco BY-2 cells under H₂O₂ treatment. **Annals of Botany**, v.116, n.4, p.571-582, 2015.

38. RAHBÉ, Y.; FEBVAY, G. Protein toxicity to aphids: an “*in vitro*” test on *Acyrtosiphon pisum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.67, n.2, p.149-160, 1993.

39. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, n.1, p.208-2012, 1963.

40. ROEL, A.R.; DOURADO, D.M.; MATIAS, R.; PORTO, K.R.A.; BEDNASKI, A.V.; DA 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.

41. ROST-ROSZKOWSKA, M.M.; POPRAWA, I.; KLAG, J.; MIGULA, P.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; PRZYBYLOWICZ, W. Differentiation of regenerative cells in the midgut epithelium of *Epilachna cf. nylanderi* (Mulsant 1850) (Insecta, Coleoptera, Coccinellidae). **Folia Biologica**, v.58, n.3/4, p.209-216, 2010.

42. SALVADOR, R.; PRÍNCIPI, D.; BERRETTA, M.; FERNÁNDEZ, P.; PANIEGO, N.; SCIOCCO-CAP, A.; HOPP, E. Transcriptomic survey of the midgut of *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Insect Science**, v.14, n.1 p.1-9, 2014.

43. SANTOS, H.P.; GUTIÉRREZ, Y.; OLIVEIRA, E.E.; SERRÃO, J.E. Sublethal dose of deltamethrin damage the midgut cells of the mayfly *Callibaetis radiatus*

(Ephemeroptera: Baetidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v.25, n.2, p.1-10, 2017.

44. SAS (2002) The SAS System for Windows, Release 9.0. SAS Institute, Cary, N.C.

45. SCHMUCK, G.; MIHAIL, F. Effects of the carbamates fenoxycarb, propamocarb and propoxur on energy supply, glucose utilization and SH-groups in neurons. **Archives of Toxicology**, v.78, n.6, p.330-337, 2004.

46. SCUDELER, E.L.; GARCIA, A.S.G.; PADOVANI, C.R.; PINHEIRO, P.F.F.; DOS SANTOS, D.C. Cytotoxic effects of neem oil in the midgut of the predator *Ceraeochrysa claveri*. **Micron**, v.80, n.1, p.96-111, 2016.

47. SILVA, C.T.S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; CUNHA, F.M.; OLIVEIRA, J.V.; DUTRA, K.A.; FERRAZ NAVARRO, D.M.A.; TEIXEIRA, A.A.C. Effects of citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) midgut and fat body. **Biotechnic and Histochemistry**, v.92, n.1, p.1-13, 2017.

48. SILVA, F.W.S.; SERRÃO, J.E.; ELLIOT, S.L. Density-dependent prophylaxis in primary anti-parasite barriers in the velvetbean caterpillar. **Ecological Entomology**, v.41, n.4, p.451-458, 2016.

49. SMAGGHE, G.; GOODMAN, C.L.; STANLEY, D. Insect cell culture and applications to research and pest management. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v.45, n.3/4, p.93-105, 2009.

50. STEFANINI, M.; DE MARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscope. **Nature**, v.216, n.10, p.173-174, 1967.

51. SWEVERS, L.; LIU, J.; HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Search for limiting factors in the RNAi pathway in silkworm tissues and the Bm5 cell line: The RNA-binding proteins R2D2 and Translin. **PLoS ONE**, v.6, n.5, e20250, 2011.

52. TEIXEIRA, A.D.; FIALHO, M.C.Q.; ZANUNCIO, J.C.; RAMALHO, F.S.; SERRAO, J.E. Degeneration and cell regeneration in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) during post-embryonic development. **Arthropod Structure & Development**, v.42, n.3, p.237-246, 2013.
53. TERRA, W.R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, n.4, p.675-734, 1988.
54. TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.109, n.1, p.1-62, 1994.
55. TERRA, W.R.; FERREIRA C.; BAKER, J.E. Compartmentalizations of digestion. In: LEHANE, M.J.; BILLINGSLY, P.F. (Ed.). **Biology of the Insect Midgut**, London: Chapman and Hall, 1996, 206-235p.
56. UEDA, k. Effect of environmental chemicals on genes and the expression. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 129, n.12, p.1501-1506, 2009.
57. ULRICH, S.; MEWIS, I.; ADHIKARY, S.; BHATTACHARYYA, A.; GOSWAMI, A. Antifeedant activity and toxicity of leaf extracts from *Porteresia coarctata* Takeoka and their effects on the physiology of *Spodoptera litura* (F.). **Journal of Pest Science**, v.81, n.2, p.79-84, 2008.
58. WALKER, A.A.; WEIRAUCH, C.; FRY, B.G.; KING, G.F. Venoms of heteropteran insects: a treasure trove of diverse pharmacological toolkits. **Toxins**, v.8, n.43, p.2-32 2016.
59. WANG, S.M.; YU, M.L.; FENG, K.; LI, X.B.; CHEN, Y.Z.; CHEN, B.; WU, L.Z. Efficient electronic communication-driven photoinduced charge-separation in 2-ureido-4 [1H]-pyrimidinone quadruple hydrogen-bonded N, N-dimethylaniline-anthracene

assemblies. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.355, n.6, p.457-466, 2017.

60. ZHU, Y.C.; GUO, Z.; CHEN, M.S.; ZHU, K.Y.; LIU, X.F.; SCHEFFLER, B. Major putative pesticide receptors, detoxification enzymes, and transcriptional profile of the midgut of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.106, n.2, p. 296-307, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato de saliva de *Podisus nigrispinus* e os compostos não proteicos *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano são nocivos e, em concentrações subletais causam mudanças histológicas e ultraestruturais severas com degeneração do epitélio do intestino médio de *Spodoptera frugiperda*, desorganização celular, e desorganização da matriz peritrófica.

Processos de necrose e morte celular no intestino médio com injeção e ingestão, respectivamente, de extrato de saliva e do *1,2,5*-tritiepano., e a fragmentação de DNA de lagartas de quinto instar de *S. frugiperda*.

Danos no intestino médio indicam a sensibilidade de lagartas de quinto instar de *S. frugiperda* aos *N,N*-dimetilanilina e *1,2,5*-tritiepano, evidenciando o efeito tóxico dos compostos não proteicos que podem ser uma estratégia para o manejo dessa praga.