

JÚLIO CÉSAR MELO PODEROSO

**O EXTRATO DE NEEM (*Azadirachta indica*) CAUSA ALTERAÇÕES NO
DESENVOLVIMENTO NINFAL, NO APARELHO REPRODUTOR E
SISTEMA DIGESTIVO DO PREDADOR *Supputius cincticeps*
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)?**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P742e
2011

Poderoso, Júlio César Melo, 1982-

O extrato de neem (*Azadirachta indica*) causa alterações no desenvolvimento ninfal, no aparelho reprodutor e sistema digestivo do predador *Supputius cincticeps* (*Heteroptera: Pentatomidae*)? / Júlio César Melo Poderoso. – Viçosa, MG, 2011.

xi, 71f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Cola Zanuncio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Supputius cincticeps* - Controle biológico. 2. Manejo integrado de pragas. 3. Extratos de plantas. 4. Inseticidas.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.754

JÚLIO CÉSAR MELO PODEROSO

**O EXTRATO DE NEEM (*Azadirachta indica*) CAUSA ALTERAÇÕES NO
DESENVOLVIMENTO NINFAL, NO APARELHO REPRODUTOR E
SISTEMA DIGESTIVO DO PREDADOR *Supputius cincticeps*
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)?**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós- Graduação em
Entomologia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2011

Prof. José Eduardo Serrão

Prof. Clovis Andrade Neves

Prof. José Cola Zanuncio
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A DEUS que é causa primária de todas as coisas, obrigado pela oportunidade que me foi dada e pela força nos momentos difíceis ao longo de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela oportunidade de realização do curso.

Aos meus familiares, pelo apoio, carinho, pela força e motivação todos os dias de minha vida. Em especial aos meus pais, Hermogenes (in memorian) e Maria de Fátima por todo amor e confiança que sempre depositaram em mim.

Aos Professores José Cola Zanuncio, José Eduardo Serrão e Professora Teresinha Vinha Zanuncio, pela paciência e atenção prestada a mim durante o curso.

Aos amigos e professores Genésio Tâmara Ribeiro e Glaucia Barretto, que sempre confiaram em mim desde o início da graduação em Engenharia Florestal.

Aos amigos da graduação que estiveram comigo nos momentos difíceis e alegres, Aline, Dariele, Gomes, Itamara, Allivia, Heloisa, Eliana, Priscylla, Francis, Emilene, Adailton e Carol. A gente não faz amigos, reconhece-os (Vinícius de Moraes), foi muito bom encontrar vocês em minha caminhada.

Aos irmãos que fiz em Viçosa, amigos que foram colocados por DEUS em minha vida, Kátia Fraga, Carla Ávila, Anderson Puker e Silma Leite.

A Rafael e Joseane Moutinho por terem me recebido em Viçosa de braços abertos me mostrando o caminho a ser trilhado.

A todos os amigos do Laboratório de Controle Biológico, pelo convívio e auxílio em vários momentos e aos bons colegas que fiz no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Aos professores da Pós-Graduação em Entomologia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários, Dona Paula, Miriam e Sr. Moacir, pela disponibilidade, boa vontade e bons serviços prestados.

A todos que torceram e colaboraram para realização desse sonho.

BIOGRAFIA

Júlio César Melo Poderoso, filho de Hermogenes Lima Poderoso e Maria de Fátima Melo Poderoso nasceu no dia 23 de Junho de 1982, na cidade de Aracaju, Sergipe.

Iniciou a graduação em Engenharia Florestal em 2003, Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Sergipe, finalizando-a em dezembro de 2008 quando obteve o título de Engenheiro Florestal. Durante toda a graduação foi estagiário no Laboratório de Pragas Agrícolas e Florestais (LPAF), onde trabalhou com levantamentos de entomofauna em neem, controle biológico e desenvolveu projetos com percevejos predadores e extratos botânicos.

Em março de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, trabalhando com percevejos predadores da subfamília Asopinae, sob orientação do Professor José Cola Zanuncio, defendendo a dissertação em Fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
 1º ARTIGO – Efeito do óleo de semente de <i>Azadirachta indica</i> no desenvolvimento do predador <i>Supputius cincticeps</i> (Heteroptera: Pentatomidae)	15
RESUMO	16
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
Tabela 1	29
Figuras 1 a 3	30
 2º ARTIGO – Efeito do óleo de semente de <i>Azadirachta indica</i> no aparelho reprodutor do predador <i>Supputius cincticeps</i> (Heteroptera: Pentatomidae)	32
RESUMO	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

Figuras 1 a 5.....	46
3º ARTIGO – Efeito do óleo de semente de <i>Azadirachta indica</i> no sistema digestivo e imune celular do predador <i>Supputius cincticeps</i> (Heteroptera: Pentatomidae).....	51
RESUMO.....	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAL E MÉTODOS	55
RESULTADOS.....	57
DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
Figuras 1 a 5.....	67
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71

RESUMO

PODEROSO, Júlio César Melo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **O extrato de neem (*Azadirachta indica*) causa alterações no desenvolvimento ninfal, no aparelho reprodutor e sistema digestivo do predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae)?** Orientador: José Cola Zanuncio. Co-orientadores: Teresinha Vinha Zanuncio e Genésio Tâmara Ribeiro.

A subfamília Asopinae possui espécies importantes de percevejos predadores, como *Supputius cincticeps* (Stal) (Hemiptera: Pentatomidae). Estes percevejos apresentam potencial para o controle biológico de lepidópteros desfolhadores em plantações de eucalipto no Brasil. Inseticidas botânicos, como produtos do neem (*Azadirachta indica*), representam outra alternativa para o controle de insetos herbívoros de sistemas agroflorestais, mas o impacto desse inseticida botânico em percevejos predadores é pouco conhecido. Esse estudo objetivou avaliar o impacto do neem na sobrevivência de ninfas, morfometria de adultos, no aparelho reprodutor, sistema digestivo e imune celular de *S. cincticeps*. Cerca de 30% das ninfas desse predador submetidas a solução a 1,0% de neem tiveram dificuldades na ecdise do terceiro para o quarto estágio. Do total de adultos sobreviventes, de ninfas tratadas com essa solução, 10% apresentaram deformidades no pronoto e asas. Essa solução inseticida reduziu a porcentagem de indivíduos vivos por instar. Fêmeas de *S. cincticeps* apresentaram menor comprimento do ovariolo (6,4mm), menor número total de ovócitos (22,4) e de ovócitos por ovariolo mais desenvolvido (3,86) com óleo de neem a 1,0%. Machos adultos de *S. cincticeps*, de ninfas de segundo estágio

tratadas topicamente com a solução a 1,0 e 0,5%, tiveram área dos testículos, semelhantes (0,67 e 0,69 mm) respectivamente e menor que no controle (0,75 mm²). Esse percevejo predador não apresentou alterações morfológicas no sistema digestivo. O sistema imune celular de adultos de *S. cincticeps* foi ativado após quatro horas da ingestão do óleo de semente de neem. Três tipos de hemócitos: plasmatócitos, prohemocitos e granulócitos foram observados, mas apenas, os plasmatócitos tiveram a dinâmica celular afetada após quatro horas da ingestão da solução inseticida. O óleo de semente de neem altera a morfometria do sistema reprodutivo e não causa alterações no sistema digestivo do percevejo *Supputius cincticeps*.

ABSTRACT

PODEROSO, Júlio César Melo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2011. **Does the neem (*Azadirachta indica*) extract cause nymphal development, the reproductive system and digestive tract of the predator *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae)?** Adviser: José Cola Zanuncio. Co- Advisers: Teresinha Vinha Zanuncio and Genésio Tâmara Ribeiro.

The subfamily Asopinae presents important species of predators, as *Supputius cincticeps* (Stal) (Hemiptera: Pentatomidae). These stinkbug present potential for the biological control of Lepidoptera defoliators in eucalyptus plantations in Brazil. Botanical insecticides, mainly neem (*Azadirachta indica*), are alternative for the control of herbivore insects of agroforestry system, but the impact of that botanical insecticide in stinkbug predators is poor studied. This research evaluated the impact of the neem in the survival of nymphs, adult's morphometry, in the reproductive and digestive tract and cellular immune response of *S. cincticeps*. About 30% of the nymphs of that predator exposed to 1.0% neem solution had difficulties in the ecdysis from the third to the fourth instar. Of the total adult survivors of nymphs treated with this solution, 10% had deformities in the pronotum and wings. This solution insecticide reduced the percentage of living individuals by instar. Females of *S. cincticeps* presented shorter ovariole (6.4mm), lower oocytes (22.4) and oocytes/ovarioles more developed (3.86) with 1.0% neem oil. Adult males of *S. cincticeps*, from second instar of nymphs of treated topically with 0.5 and 1.0 % had area of the testicles, similar (0.67 and 0.69 mm) respectively but smaller than in the

control (0.75 mm²). Changes in in the digestive tract were not observed in *S. cincticeps* exposed to neem solutions. The adult of *S.cincticeps* cellular immune system was activated after four hours of the ingestion of the oil of neem seed. Three haemocytes types, plasmatocytes, prohemocytes and granulocytes were observed, but just, the plasmatocytes had the cellular dynamics affected after four hours of the ingestion of neem solution. The oil of neem seeds alter the morphometry of the reproductive system and it doesn't cause alterations in the digestive system of the stinkbug *S. cincticeps*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Agentes de controle biológico como parasitóides, predadores e entomopatógenos apresentam potencial para o controle de insetos-praga. Essas pragas podem ser controladas por diferentes métodos como o biológico, inoculativo, inoculativo sazonal e inundativo (Bianchi et al. 2006, Tscharncke et al. 2007). Esses métodos são enfatizados no manejo de insetos-praga para reduzir os efeitos adversos do uso indevido de inseticidas organosintéticos (Sosa-Gomez et al. 2009). No entanto, esses inseticidas apresentam vantagens como rapidez de ação, facilidade de uso, economia e eficiência. Entretanto, suas desvantagens incluem largo espectro de ação, atingindo espécies não alvos, como inimigos naturais e contaminação ambiental (Aydin & Gurkan 2006, Ostman et al. 2003, Smagghe et al. 2003).

Inseticidas organosintéticos representam a tática mais utilizada para o controle de insetos-praga, mas podem causar efeitos deletérios a inimigos naturais, como percevejos predadores e organismos não alvos (Kumar et al. 2005, Toews & Subramanyam 2003).

Percevejos predadores são pouco utilizados, mas espécies desse grupo podem ser importantes para programas de Manejo Integrado de Pragas como, *Podisus maculiventris* (Say) e *Perillus bioculatus* (F.) na América do Norte e Europa e *Podisus nigrispinus* (Dallas), *Brontocoris tabidus* (Signoret) e *Supputius cincticeps* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae) na América do Sul (Coudron et al. 2002, De

Clercq 2000, Legaspi 2004, Lemos et al. 2003, 2005a,b, Westich & Houghgoldstein 2001, Wittmeyer et al. 2001, Zanuncio et al. 2003, 2000).

Percevejos Pentatomidae são inimigos naturais de pragas agrícolas e florestais por serem generalistas, agressivos e com alta capacidade reprodutiva predando, principalmente, larvas de Lepidoptera e Coleoptera, além de outros ordens de insetos (De Clercq et al. 2002, Medeiros et al. 2000, Tipping et al. 1999, Yocum & Lemos et al. 2003, Zanuncio et al. 2000, 2002). Espécies dos gêneros *Brontocoris*, *Podisus* e *Supputius* são produzidas e liberadas em programas de controle biológico (Lemos et al. 2003, 2010, Zanuncio et al., 2003).

Supputius cincticeps (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae) preda lagartas desfolhadoras de eucalipto como *Sabulodes caberata caberata* Guenée, 1857 (Lepidoptera: Geometridae) e *Alabama argillacea* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). Este predador pode ser encontrado em muitos agroecossistemas, onde o uso de inseticidas pode limitar seu impacto nos programas de controle biológico (Pereira et al. 2005, Tipping et al. 1999, Zanuncio et al. 1998, 2003).

Inseticidas botânicos são outra alternativa para o controle de insetos pragas por serem biodegradáveis e causarem menores problemas que os inseticidas organosintéticos (Prabakar & Jebanesan 2004, Rahuman & Venktesan 2008). Isto tem aumentado a busca por inseticidas alternativos, com destaque para inseticidas derivados da *Azadirachta indica* A. Juss (El Shafie & Basedow 2003).

Azadirachta indica (neem), nativa do Sul da Ásia, foi distribuída ao longo dos trópicos sendo seu uso mais antigo como planta medicinal com propriedades terapêuticas de suas frutas, sementes, óleo, folhas e raízes (Koul et al. 1990). Além disso, essa planta apresenta um dos principais inseticidas botânicos estudados, a azadiractina (Isman 2006).

Extratos de óleos das sementes e de folhas de *A. indica* são inibidores do crescimento de insetos (Akhtar 2000, Amadioha 2000, Boeke et al. 2004, Garcia & Azambuja 2004, Wennergren & Stark 2000) com atividade biológica contra 400 espécies de insetos e mais de 300 componentes que interferem na fisiologia e no comportamento de insetos, ácaros e nematóides (Al-Rajhy et al. 2003, Kumar et al. 2005, Liang et al. 2003, Mitcheli et al. 2004, Silva et al. 2007).

A ação do extrato de sementes de neem pode ser atribuída ao alto teor de azadiractina, que é o mais potente dos limonóides ou tetranortriterpenóides com atividade tóxica a artrópodes, está presente nas sementes das árvores de neem (Koul et al. 1990, Schmutterer 1990). Outros limonóides, incluindo a salanina, 14 epoxiazadiradiona, melantriol, nimbidina, nimbina, melianona, gedunina, nimbolina, ninbinem, deacetilsalanina, azadiractol, azadirona, vilosinina e meliacarpina foram isolados do neem (Silva et al. 2007).

A azadiractina, uma combinação de tetranortriterpenoides da árvore de neem, *A. indica* (Naumann & Isman 1995, Garcia et al. 2006) interfere na quimiorrecepção e danifica tecidos do corpo gorduroso e intestino de insetos fitófagos (Capinera & Froeba 2007). Esse composto é responsável pelo efeito anti-alimentar, inibição da ecdise, anormalidades morfológicas, mortalidade, repelência, redução do crescimento, reprodução, oviposição, viabilidade de ovos em insetos. No entanto, sua ação depende da espécie de inseto e da concentração aplicada (Bruce et al. 2004, Kumar et al. 2005, Medina et al. 2004, Schmutterer 1990, Su & Mulla 1998, Tedeshi et al. 2001).

O uso das concentrações recomendadas para o controle de pragas possibilita a avaliação do impacto de produtos químicos no momento de sua aplicação. Subconcentrações, por exemplo 50% da recomendada, permitem estudar o impacto dos inseticidas quando decompostos à metade de suas concentrações originais

(Zanuncio et al., 1998, Guedes et al., 2009, 2010). Essa informação permite determinar o tempo necessário, após a aplicação de inseticidas, para as liberações do inimigo natural no campo ou conhecer o impacto de resíduos desses compostos sobre o sistema reprodutivo, digestivo e imune celular das populações imigrantes do inimigo natural.

A área reprodutiva masculina dos Heteropteras consiste de um par de testículos e outro de vasos deferentes que termina em um ducto ejaculatório (Happ 1992, Nijhout 1994, Chapman 1998). Alguns insetos possuem, também, glândulas acessórias que se abrem nos vasos deferentes ou tubos ejaculatórios (Happ, 1992, Chapman 1998a). O aparelho reprodutor feminino é composto por um par de ovários acima ou nas laterais do abdômem, formados por unidades funcionais denominadas ovariolos, ligados pelo pedicelo aos ovidutos laterais e a estes ao oviduto comum que se abre em uma câmara genital (Nijhout 1994, Chapman 1998).

O trato digestivo de insetos é dividido em três regiões principais: intestino anterior (estomodeu), intestino posterior (proctodeu), ambos de origem ectodérmica e intestino médio (ventrículo) originado a partir do endoderma. Esse trato digestivo, na maioria dos insetos é um tubo contínuo da boca ao ânus, mas alguns insetos que se alimentam de fluidos apresentam uma oclusão entre o intestino médio e o posterior, como em alguns Heteroptera sugadores de planta, nos quais a oclusão ocorre entre diferentes partes do intestino médio (Chapman, 1998).

A cutícula e o mesêntero de insetos são a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos e substâncias estranhas (Levy et al. 2009) e a quebra dessa barreira provoca uma série de reações imunológicas divididas em respostas de defesa humoral e celular (Lavine & Strand 2002). O segundo meio de defesa representa reações mediadas pelos hemócitos, conhecida como reação celular (Silva et al. 2002). Essa reação é ativada após o reconhecimento dos patógenos pelo

estímulo por um sistema complexo de resposta baseado em proteínas especializadas dos hemócitos que se ligam a polissacarídeos de bactérias ou fungos (Gillespie et al. 1997).

O inseticida Bioneen (óleo de neem) é recomendado para o controle de pragas pela eficiência de seu princípio ativo, azadiractina. Entretanto, este composto pode afetar a atuação do predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) no controle biológico natural.

2. OBJETIVO

Estudar os efeitos de diferentes concentrações do óleo de semente de neem na sobrevivência de ninfas e nos sistemas reprodutivo, digestivo e imunológico do predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) contribuindo para a compreensão do efeito deste inseticida botânico em organismos não alvo no manejo integrado de pragas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Rajhy, D.H., Alahmed, A.M., Hussein, H.I., Kheir, S.M. 2003. Acaricidal effects of cardiac glycosides, azadirachtin, and neem oil against the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). Pest Management Science 59: 1250-1254.

Amadioha, A.C. 2000. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extract of *Azadirachta indica*. Crop Protection 19: 287–290.

Akhtar, M. 2000. Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). Integrated Pest Management Reviews 5: 57-66.

Aydin, M.H., Gurkan, M.O. 2006. The efficacy of spinosad on different strains of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). Turkish Journal of Biology 30: 5-9.

Bianchi, F.J.J.A., Booij, C.J.H., Tscharntke, T. 2006. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. Proceeding of the Royal Society of London 273: 1715-1727.

Boeke, S.J., Boersma, M.G., Alink, G.M., Loon, J.J.A., Huis, A., Dicke, M., Rietjens, I.M.C.M. 2004. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. Journal of Ethnopharmacology 94: 25-41.

Bruce, Y.A., Gounou, S., Chabi-Olaye, A., Smith H., Schulthess, F. 2004. The effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil on oviposition, development and

reproductive potentials of *Sesamia calamitis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae) and *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). Agricultural and Forest Entomology 6: 223–232.

Capinera, J.L. & Froeba, J.G. 2007. Behavioral response of *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae) to azadirax (neem)-treated host plants. Journal of Economic Entomology 100:117-122.

Coudron, T.A., Wittmeyer, J., Kim, Y. 2002. Life history and cost analysis for continuous rearing of *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae) on a zoophytophagous artificial diet. Journal of Economic Entomology 95: 1159-1168.

Chapman, R.F. The insects - Structure and Function. Cambridge Press, Cambridge.

769p. 1998

De Clercq, P., Mohaghegh, J., Tirry, L. 2000. Effect of host plant on the functional response of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Biological Control 18: 65-70.

De Clercq, P., Wyckhuys, K., Oliveira, H.N., Klapwijk, J. 2002. Predation by *Podisus maculiventris* on different life stages of *Nezara viridula*. Florida Entomologist 85: 197-202.

El Shafie, H.A.F. & Basedow, T. 2003. The efficacy of different neem preparations for the control of insects damaging potatoes and eggplants in the Sudan. Crop Protection 22: 1015–1021.

Garcia, E.S. & Azambuja, P. 2004. Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi* triatomine interactions. Toxicon 44: 431-440.

- Garcia, J.F., Grisoto, E., Vendramim, J.D., Machado, B.P.S. 2006. Bioactivity of neem, *Azadirachta indica*, against spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. *Journal of Economic Entomology* 99: 2010-2014.
- Gillespie J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42: 611-643.
- Guedes, R.N., Magalhães C.L., Cosme, L.V. 2009. Stimulatory sublethal response of a generalist predator to permethrin: hormesis, hormoligosis, or homeostatic regulation? *Journal of Economic Entomology* 102: 170-176.
- Guedes, N.M.P., Tolledo, J., Corrêa A. S., Guedes, R.N.C. 2010. Insecticide-induced hormesis in an insecticide-resistant strain of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Applied Entomology* 134: 142–148
- Happ, G.M. 1992. Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. *Annual Review of Entomology* 37: 303-320.
- Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51: 45-66.
- Koul, O., Isman, M.B., Ketkar, C.M. 1990. Properties and uses of neem (*Azadirachta indica*). *Canadian Journal of Botany* 68: 1–11.
- Kumar P., Poehling H.M., Borgemeister, C. 2005. Effects of different application methods of azadirachtin against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. *Journal of Applied Entomology* 129:489-497.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295-1309.

Legaspi, J.C. 2004. Life history of *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae) adult females under different constant temperatures. *Environmental Entomology* 33: 1200-1206.

Lemos, W.P., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2003. Effects of diet on development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), a predator of the cotton leafworm. *Journal of Applied Entomology* 127: 389-395.

Lemos, W.P., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2005a. Morphology of female reproductive tract of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on different diets. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45: 129-138.

Lemos, W.P., Serrão, J.E., Ramalho, F.S., Zanuncio, J.C., Lacerda, M.C., 2005b. Effect of diet on male reproductive tract of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Journal of Biology* 65:91-96.

Lemos, W.P., Zanuncio, J.C., Ramalho, F.S., Zanuncio, V.V., Serrão, J.E. 2010. Herbivory affects ovarian development in the zoophytophagous predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Pest Science* 83: 69–76

Liang, G.M., Chen, W., Liu, T.X. 2003. Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection* 22: 333-340

Levy, S.M., Moscardi, F., Falleiros, Â.M.F., Silva, R.J., Gregório, E.A. 2009. A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 17-22.

Medeiros, R.S., Ramalho, F.S., Lemos, W.P., Zanuncio, J.C. 2000. Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Applied Entomology* 124: 319-324.

Medina, P., Budia, F., Estal, P. Del., Viñuela, E. 2004. Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *Journal of Economic Entomology* 97: 43–50.

Mitcheli, P.L., Gupta, R., Singh, A.K., Kumar, P. 2004. Behavioural and development effects of neem extracts on *Clavigralla scutellaris* (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae) and its egg parasitoid, *Gryon fulviventre* (Hymenoptera: Scelionidae). *Journal of Economic Entomology* 97: 916-923.

Naumann, K. & Isman, M.B. 1995. Evaluation of neem *Azadirachta indica* seed extracts and oils as oviposition deterrents to noctuid moths. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 76:115-120.

Nijhout, H.F. 1994. Reproduction. pp.142-159. *In*: H.F. Nijhout (ed.). *Insect Hormone*. Princeton University, Princeton.

Ostman, O., Ekbom, B., Bengtsson, J. 2003. Yield increase attributable to aphid predation by ground-living polyphagous natural enemies in spring barley in Sweden. *Ecological Economics* 45: 149-158.

Prabakar, K. & Jebanesan, A. 2004. Larvicidal efficacy of some cucurbitaceous plant leaf extracts against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Bioresource Technology* 95: 113–114.

Pereira, A.I.A., Ramalho, F.S., Zanuncio, J.C. 2005. Susceptibility of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) to gamma-cyhalothrin under laboratory conditions. *Scientia Agricola* 62: 1-6.

Rahuman, A.A. & Venktesan, P. 2008. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. *Parasitology Research* 103:133–139.

Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annual Review of Entomology 35: 271-97.

Silva, J.E.B., Boleli, I.C. Simões, Z.L.P. 2002. Hemocytes types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. Brazilian Journal of Biology 62: 689-699.

Silva, J.C.T., Jham, G.N., Oliveira, R.D.L., Brown, L. 2007. Purification of the seven tetranortriterpenoids in neem (*Azadirachta indica*) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reversed-phase highperformance liquid chromatography. Journal of Chromatography 1151: 203-210.

Smagghe, G., Pineda, S., Carton, B., Del Estal, P., Budia, F., Vinuela, E. 2003. Toxicity and kinetics of methoxyfenozide in greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Management Science 59: 1203-1209

Sosa-Gómez, D.R., Silva, J.J., Lopes, I.O., Corso, I.C., Almeida, A.M., Moraes, G.C., Baur, M.E. 2009. Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. Journal of Economic Entomology 102: 1209-1216.

Su, T. & Mulla, S. 1998. Ovicidal activity of neem products (azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of the American Mosquito Control 14: 204-209.

Tedeschi, R., Alma, A., Tavella, L. 2001. Side-effects of three neem (*Azadirachta indica* A. Juss) products on the predator *Macrolophus caliginosus* Wagner (Het., Miridae). Journal of Applied Entomology 125: 397-402.

Toews, M.D. & Subramanyam, B. 2003. Contribution of contact toxicity and wheat condition to mortality of stored-product insects exposed to spinosad. Pest Management Science 59: 538-544.

Tipping, P.W., Holko, C.A., Abdul-Baki, A.A., Aldrich, J.R. 1999. Evaluating *Edovum puttleri* Grissell and *Podisus maculiventris* (Say) for augmentative biological control of Colorado potato beetle in tomatoes. *Biological Control* 16: 35-42.

Tscharntke, T., Bommarco, R., Clough, Y., Crist, T.O., Kleijn, D., Rand, T.A., Tylianakis, J.M., Nouhuys, S.V., Vidal, S. 2007. Conservation biological control and enemy diversity on a landscape scale. *Biological Control* 43: 294-309.

Yocum, G.D. & Evenson, P.L. 2002. A short-term auxiliary diet for the predaceous stink bug, *Perillus bioculatus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Florida Entomologist* 85: 567-571.

Wennergren, U. & Stark, J. 2000. Modelling long-term effects of pesticides on populations: beyond just counting dead animals. *Journal of Applied Ecology* 10: 295–302.

Westich, R. & Houghgoldstein, J. 2001. Temperature and host plant effects on predatory stink bugs for augmentative biological control. *Biological Control* 21: 160-167.

Wittmeyer, J.L., Coudron, T.A., Adams, T.S. 2001. Ovarian development, fertility and fecundity in *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae): an analysis of the impact of nymphal, adult, male and female nutritional source on reproduction. *Invertebrate Reproduction & Development* 39: 9-20.

Zanuncio, T.V., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., Guedes, R.N.C. 2003. Permethrin-induced hormesis on the predator *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae). *Crop Protection* 22: 941-947.

Zanuncio, J.C., Molina-Rugama, A.J., Santos, G.P., Ramalho, F.S. 2002. Effect of body weight on fecundity and longevity of the stinkbug predator *Podisus rostralis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 1225-1230.

Zanuncio, J.C., Zanuncio, T.V., Guedes, R.N.C., Ramalho, F.S. 2000. Effect of feeding on three *Eucalyptus* species on the development of *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Biocontrol Science and Technology* 10:443-450.

Zanuncio, J.C., Batalha, V.C., Guedes R.N.C., Picanço M.C. 1998. Insecticide selectivity to *Supputius cincticeps* (Stal) (Het., Pentatomidae) and its prey *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology* 122: 457-460

1º Artigo

EFEITO DO ÓLEO DE SEMENTE DE *Azadirachta indica* NO
DESENVOLVIMENTO DO PREDADOR *Supputius cincticeps*
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)

Efeito do óleo de semente de *Azadirachta indica* no desenvolvimento do predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae)

RESUMO – O predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) encontrado em sistemas agroflorestais, é um agente importante de controle biológico de insetos herbívoros. Extratos naturais, conhecidos, como inseticidas botânicos, são outra alternativa para o controle de insetos herbívoros, destacando-se o neem (*Azadirachta indica*). Percevejos predadores e inseticidas botânicos podem ser utilizados em consórcio em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), mas o impacto dessas substâncias sobre predadores é pouco conhecida. Por isto, a avaliação de aspectos morfométricos e a sobrevivência de adultos de ninfas que tiveram contato com óleo de neem, são importantes para se entender e aplicar essa espécie em programas de proteção agro-florestal. Esse predador apresentou maior período ninfal com óleo de neem. Trinta por cento das ninfas de *S.cincticeps*, submetidas ao tratamento com a solução de neem a 1,0%, tiveram dificuldade na ecdise do terceiro para o quarto estágio. Do total de adultos sobreviventes, 10% apresentaram deformidades no pronoto e asas. O óleo de semente de neem reduziu a sobrevivência em todos os estádios de *S. cincticeps*, sendo pouco seletivo e afeta este percevejo predador.

Palavras-chave: Percevejo predador, Pentatomidae, neem

INTRODUÇÃO

Inseticidas organosintéticos são os mais utilizados para o controle de pragas, (Kumar et al. 2005, Toews & Subramanyam 2003) por apresentarem rapidez de ação, facilidade de uso, economia e eficiência, mas seu largo espectro de ação atinge espécies não-alvos como inimigos naturais além de causar contaminação ambiental. Esses produtos são uma das principais causas da ressurgência de pragas e redução de espécies benéficas como percevejos predadores (Casida & Quistad 1998, Matos Neto et al. 2002, Ostman et al. 2003).

Desvantagens dos inseticidas organosintéticos aumentaram o interesse pelo controle biológico, visando a diminuição do controle químico e o restabelecimento do equilíbrio ambiental, devido a importância dos inimigos naturais no manejo integrado de pragas (Guedes et al. 2009). A subfamília Asopinae (Heteroptera: Pentatomidae) apresenta predadores de pragas, com destaque para *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851), *Podisus rostralis* (Stal, 1860), *Podisus maculiventris* (Say, 1832) *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) e *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1863) (Tipping et al. 1999, Vivan et al. 2003). *Supputius cincticeps* preda lagartas desfolhadoras de eucalipto e, por isto, tem sido utilizado no controle biológico desses herbívoros (Zanuncio et al. 1998, 2003).

Inseticidas botânicos são outra alternativa para o controle de pragas por serem biodegradáveis e causarem menores problemas que os inseticidas organosintéticos (Prabakar & Jebanesan 2004, Rahuman & Venktesan 2008). Isto tem aumentado a busca por inseticidas alternativos, com destaque para os extratos e óleo da *Azadirachta indica* (neem) A. Juss (El Shafie & Basedow 2003).

A azadiractina é um dos compostos mais importantes do óleo de semente de neem, é uma combinação de tetranortriterpenoides com atividade inseticida (Naumann & Isman 1995, Garcia et al. 2006) interferindo na quimiorrecepção e

danificando os tecidos do corpo gorduroso e intestino de insetos fitófagos (Capinera & Froeba 2007). Esse composto é responsável pelo efeito anti-alimentar, inibição da ecdise, anormalidades morfológicas, mortalidade, repelência e redução do crescimento, reprodução, oviposição e viabilidade de ovos de insetos (Bruce et al. 2004, Kumar et al. 2005, Medina et al. 2004, Su & Mulla 1998, Tedeshi et al. 2001). Possui, também, efeito regulador de crescimento, associado a interferência no sistema neuroendócrino dos insetos, afetando algumas funções fisiológicas, como a muda, síntese de proteínas, reprodução, diapausa e comportamento em insetos, mas sua ação depende da espécie de inseto e da concentração aplicada (Schmutterer 1990).

O Bioneen é um inseticida obtido das sementes do neem que é recomendado para o controle de pragas e, por isto, foi avaliado os efeitos de diferentes concentrações do óleo de semente de neem na sobrevivência de ninfas e morfometria de adultos do predador *S. cincticeps*.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação e Manutenção dos Percevejos Predadores

Os insetos utilizados foram provenientes do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Adultos de *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae) foram criados em gaiolas teladas de 60 x 40 x 40cm, com pupas da presa alternativa *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1785) (Coleoptera: Tenebrionidae). A água foi disponibilizada, diariamente, em tubos cilíndricos de 5 mL tampados com algodão umedecido. As posturas foram coletadas nas gaiolas diariamente e transferidas para placas de Petri (9,0 x 1,5 cm) com algodão umedecido. Após a eclosão, as ninfas do predador foram mantidas nas placas até a fase adulta. Como alimento foi oferecido pupa de *T.*

molitor até a fase adulta a cada dois dias. A criação foi mantida em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas (Genta et al. 2009, Lemos et al. 2009).

A criação de *Tenebrio molitor* foi mantida em bandejas plásticas (40 x 20 x 10cm, comprimento, largura e altura respectivamente), com farelo de trigo e pedaços de chuchu como fonte suplementar de alimento e água. A criação é mantida em sala climatizada $24^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ umidade relativa e fotofase de 14 horas (Genta et al. 2009).

Ação do óleo de neem no desenvolvimento de *Supputius cincticeps*

Trezentas ninfas de *S. cincticeps* no primeiro dia do segundo estágio foram submetidas a três tratamentos, duas diluições de Bioneem, 1,0% (1mL de inseticida para 1L de água) (T1) e 0,50% (0,5mL de inseticida para 1L de água) (T2) foram preparadas e o controle teve, apenas, água destilada (T3) (Islam et al. 2010, Singha et al 2007). O produto foi dissolvido em água e aplicado 1 μL da solução no dorso de cada ninfa com uma micro seringa (Riba et al. 2003, Guedes et al 2009, 2010).

Cada tratamento teve 10 repetições, tendo cada uma 10 ninfas do predador em placas de petri, totalizando 100 ninfas por tratamento. Os insetos foram mantidos em laboratório, à temperatura de $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 5\%$ de umidade relativa. Os parâmetros avaliados foram: (a) duração de cada estágio em dias; (b) porcentagem de sobrevivência; (c) peso de machos e fêmeas adultos; (d) largura; (e) comprimento de machos e fêmeas adultos.

A sobrevivência de ninfas de *S. cincticeps* foi avaliada a cada 24 horas e os indivíduos mortos contados e registrados por tratamento durante 48 horas, pois poderiam estar vivos em processo de desintoxicação (Zanuncio et al. 2001). As ninfas sobreviventes, do mesmo tratamento, foram reunidas, identificadas pelo código do respectivo tratamento e data do experimento e mantidas até a fase adulta.

Os dados de *S. cincticeps* foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS

Ninfas de *S. cincticeps* tratadas topicamente com 1,0% com a solução do inseticida botânico (Bioneem) apresentaram maior período ninfal e menor sobrevivência no terceiro, quarto e quinto estádios (Tab. 1). Ninfas desse predador apresentaram menor porcentagem de indivíduos sobreviventes no terceiro e quinto estádios no tratamento com 0,5% do óleo (Tab. 1).

O óleo de neem afetou o desenvolvimento de *S. cincticeps* a partir do terceiro estádio, quando 30% das ninfas tratadas com óleo a 1,0%, não sobreviveram e apresentaram dificuldades na ecdise (Fig 2) e cerca de 10% dos adultos de ninfas tratadas com essa concentração apresentaram deformidades no escutelo e asas (Fig. 3).

A largura ($F= 31,88$, $p<0,01$) e o comprimento ($F= 20,29$, $p<0,01$) de machos, a largura ($F= 14,15$, $p<0,01$) e o comprimento ($F= 7,86$, $p<0,01$) de fêmeas de *S. cincticeps* foram maiores no controle (Fig. 1). O óleo de semente de neem, aplicado na fase imatura de *S. cincticeps*, originou machos e fêmeas menores.

O peso de adultos de *S. cincticeps* provenientes de ninfas com a solução do inseticida a 1,0%, foi menor para machos ($F = 8,70$, $p<0,01$) e fêmeas ($F = 5,67$, $p<0,01$) (Fig. 1). O peso de machos e fêmeas adultas com 0,5% de neem foi semelhante aqueles do controle (Fig. 1).

DISCUSSÃO

A aplicação do óleo de sementes de neem, em ninfas de segundo estádio do *S. cincticeps*, mostra efeito da azadiractina ao longo do desenvolvimento do inseto,

uma combinação de tetranortriterpenoides, que pode interferir na ecdise, causar deformidades em insetos sobreviventes e morte (Mordue & Blackwell 1993).

A redução da sobrevivência de *S. cincticeps* com o aumento da concentração do inseticida neem é semelhante aos resultados para *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae), sendo a mortalidade causada pela toxicidade de componentes ativos, principalmente a azadirachtina (Abudulai et al. 2003, Riba et al. 2003).

Ninfas de segundo estágio de *S. cincticeps* apresentaram dificuldade na ecdise, demonstrando o efeito regulador de crescimento da azadirachtina no sistema neuroendócrino e afetando funções fisiológicas controladas por ações neurohormonais, como a muda dos insetos (Mordue & Blackwell 1993, Schmutterer 1990). No entanto nenhuma deformidade foi observada no aparelho bucal de adultos de *S. cincticeps* de ninfas expostas ao neem, mas no escutelo e asa foram observadas deformações semelhantes ao observado em indivíduos adultos de *Nezara viridula* tratados topicamente com óleo de semente de neem (Singha et al. 2007).

O aumento na duração da fase ninfal de *S. cincticeps*, com 1,0 e 0,5% do extrato de neem, pode afetar o desempenho reprodutivo desse predador, pois fêmeas do *S. cincticeps* com fase ninfal mais curta pode depositar maior número de ovos como relatado para *P. nigrispinus* (Medeiros et al. 2003). Além disso, deformidades com 1,0% de óleo de neem podem, também, prejudicar a reprodução, pois a corte é importante para o reconhecimento e aquisição de informações importantes do co-específico, como por exemplo a história de vida do parceiro sexual. Nessa etapa, insetos podem selecionar parceiros por preferências fenotípicas, como aspectos visuais como tamanho ou coloração (Arnqvist et al. 1997, Dukas et al. 2005, 2006).

Deformidade no escutelo e asas em predadores tratados com o inseticida a 1,0% pode ser atribuída a maior concentração dos componentes ativos (Isman et al.

1990) ou relacionada ao solvente utilizado, pois a azadirachtina é altamente solúvel em solventes polares (Jarvis et al. 1999).

Menores peso, largura e comprimento de machos e fêmeas de *S. cincticeps* mostram impacto negativo da aplicação tópica do extrato de neem no segundo estágio desse predador e sugere não haver recuperação dos indivíduos sobreviventes. Alterações de parâmetros morfométricos é importante, pois o peso de fêmeas de Asopinae apresentou relação positiva com sua taxa reprodutiva (Oliveira et al. 2005).

O óleo de semente de neem possui efeito anti-alimentar, o que pode reduzir a fecundidade em adultos de ninfas do predador *S. cincticeps*, tratadas topicamente, pela baixa quantidade do alimento consumido durante a fase ninfal e/ou adulta desses inimigos naturais (Kumar et al. 2005, Lemos 2001, Medina et al. 2004, Molina-Rugama et al., 1997, 1998, Mordue & Blackwell 1993, Tedeshi et al. 2001, Wittmeyer et al. 2001).

Inseticidas seletivos representam uma estratégia efetiva para conservação do controle biológico. O óleo de neem não foi compatível com o predador *S. cincticeps*, por ter interferido na mudança de estágio, reduzido a sobrevivência e interferido em aspectos morfométricos desse predador. O óleo de neem por contato tópico atuou nos aspectos avaliados para *S. cincticeps*. O óleo de neem utilizado em controle de pragas é pouco seletivo ao percevejo *S. cincticeps*.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abudulai, M. Shepard, B.M., Mitchell, P.L. 2003. Antifeedant and toxic effects of a neem (*Azadirachta indica* A. Juss) based formulation Neemix against *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of Entomological Science 38: 398–408.

Arnqvist, G., Thornhill, R., Rowe, L. 1997. Evolution of animal genitalia: morphological correlates of fitness components in a water strider. Journal of Evolution Biology 10: 613-640.

Bruce, Y.A., Gounou, S., Chabi-Olaye, A., Smith, H., Schulthess F. 2004. The effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil on oviposition, development and reproductive potentials of *Sesamia calamitis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae) and *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). Agricultural and Forest Entomology 6: 223–232.

Casida, J.E. & Quistad, G.B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? Annual Review of Entomology 43: 1-16.

Capinera, J.L. & Froeba, J.G. 2007. Behavioral response of *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae) to azadirex (neem) treated host plants. Journal of Economic Entomology 100: 117-122.

Dukas, R. Experience improves courtship in male fruit flies. 2005. Animal Behavior 69: 1203-1209.

Dukas, R., Clark, C.W., Abbott, K. 2006. Courtship strategies of male insects: when is learning advantageous? *Animal Behavior* 72: 1395-1404.

El Shafie, H.A.F. & Basedow, T. 2003. The efficacy of different neem preparations for the control of insects damaging potatoes and eggplants in the Sudan. *Crop Protection* 22: 1015–1021.

Garcia, J.F., Grisoto, E., Vendramim, J.D., Machado, B.P.S. 2006. Bioactivity of neem, *Azadirachta indica*, against spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. *Journal of Economic Entomology* 99: 2010-2014.

Guedes, N.M.P., Tolledo, J., Corrêa A. S., Guedes, R.N.C. 2010. Insecticide-induced hormesis in an insecticide-resistant strain of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Applied Entomology* 134: 142–148

Guedes, R.N., Magalhães C.L., Cosme, L.V. 2009. Stimulatory sublethal response of a generalist predator to permethrin: hormesis, hormoligosis, or homeostatic regulation? *Journal of Economic Entomology* 102: 170-176.

Genta, F.A., Bragatto, I., Terra, W.R., Ferreira, C. 2009. Purification, characterization and sequencing of the major b-1,3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 861-874.

Isman, M.B., Koul, O., Luczynski, A., Kaminski, J. 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1406–1411.

Jarvis, A.P., Morgan, E.D., Edwards, C. 1999. Rapid separation of triterpenoids from neem seed extracts. *Phytochemistry* 10: 39–43.

Kumar, P., Poehling, H.M., Borgemeister, C. 2005. Effects of different application methods of azadirachtin against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*

Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. *Journal of Applied Entomology* 129: 489- 497.

Lemos, W.P., Zanuncio, J.C., Ramalho, F.S., Serrão, J.E. 2009. Fat body of the zoophytophagous predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) females: Impact of the herbivory and age. *Micron* 40: 635–638.

Lemos, W.P., Medeiros, R.S., Ramalho, F.S., Zanuncio, J.C. 2001. Effects of plant feeding on the development, survival, and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *International Journal of Pest Management* 27: 89-93

Matos Neto, F.C., Zanuncio, J.C., Picanço, M.C., Cruz, I. 2002. Reproductive characteristics of the predator *Podisus nigrispinus* fed with an insect resistant soybean variety. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 917-924.

Medina, P., Budia, F., Del Estal, P., Viñuela, E. 2004. Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *Journal of Economic Entomology* 97: 43–50.

Medeiros, R.S., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2003. Temperature influence on the reproduction of *Podisus nigrispinus*, a predator of the Noctuidae larva *Alabama argillacea*. *Biocontrol* 48: 695-704.

Mordue, A.J. & Blackwell, A. 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology* 39: 903–924.

Molina-Rugama, A.J., Zanuncio, J.C., Torres, J.B., Zanuncio, T.V. 1997. Longevidad y fecundidad de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) y frijol. *Revista de Biología Tropical* 45: 1125-1130

Molina-Rugama, A.J., Zanuncio, J.C., Zanuncio, T.V., Oliveira, M.L.R. 1998. Reproductive strategy of *Podisus rostralis* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae) females under different feeding intervals. *Biocontrol Science and Technology* 8: 583-588

Naumann, K. & Isman, M.B. 1995. Evaluation of neem *Azadirachta indica* seed extracts and oils as oviposition deterrents to noctuid moths. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 76:115-120.

Oliveira, I., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., Zanuncio, T.V., Pinon T.B.M., Fialho, M.C.Q. 2005. Effect of female weight on reproductive potential of the predator *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1852) (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 295-301.

Ostman, O., Ekbom B., Bengtsson, J. 2003. Yield increase attributable to aphid predation by ground-living polyphagous natural enemies in spring barley in Sweden. *Ecological Economics* 45:149-158.

Prabakar, K. & Jebanesan, A. 2004. Larvicidal efficacy of some cucurbitaceous plant leaf extracts against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Bioresource Technology* 95: 113–114.

Rahuman, A.A. & Venktesan, P. 2008. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. *Parasitology Research* 103:133–139.

Riba, M., Marti, J., Sans, A. 2003. Influence of azadirachtin on development and reproduction of *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Applied Entomology* 127: 37–41.

Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annual Review of Entomology 35: 271-297.

Singha, A., Thareja V., Singh, A.K. 2007. Application of neem seed kernel extracts result in mouthpart deformities and subsequent mortality in *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of Applied Entomology 131: 197–201.

Su, T. & Mulla, S. 1998. Ovicidal activity of neem products (azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of the American Mosquito Control 14: 204–209.

Tedeschi, R., Alma A., Tavella, L. 2001. Side-effects of three neem (*Azadirachta indica* A. Juss) products on the predator *Macrolophus caliginosus* Wagner (Heteroptera: Miridae). Journal of Applied Entomology 125: 397-402.

Tipping, P.W., Holko, C.A., Abdul-Back, A.A., Adrich, J.R. 1999. Evaluating *Edovum puttleri* and *Podisus maculiventris* (Say) for augmentative biological control of Colorado potato beetle in tomatoes. Biological Control 16: 35-42.

Toews, M.D. & Subramanyam, B. 2003. Contribution of contact toxicity and wheat condition to mortality of stored-product insects exposed to spinosad. Pest Management Science 59: 538-544.

Wittmeyer, J.L., Coudron, T.A., Adams, T.S. 2001. Ovarian development, fertility and fecundity in *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae): an analysis of the impact of nymphal, adult, male and female nutritional source on reproduction. Invertebrate Reproduction and Development 39: 9-20

Vivan, L.M., Torres, J.B., Veiga, A.F.S.L. 2003. Development and reproduction of the predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*, in relation to two different prey types and environmental conditions. Biocontrol 48: 155-168.

Zanuncio, J.C., Batalha, V.C., Guedes R.N.C., Picanço M.C. 1998. Insecticide selectivity to *Supputius cincticeps* (Stal) (Het., Pentatomidae) and its prey *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep., Noctuidae). Journal of Applied Entomology 122: 457-460

Zanuncio, T.V., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., Guedes, R.N.C. 2003. Permethrin-induced hormesis on the predator *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae). Crop Protection 22: 941-947.

Zanuncio, J.C., Molina-Rugama, A.J., Serrão, J.E., Pratissoli, D. 2001. Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with combinations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. Biocontrol Science and Technology 11: 331-337.

Tabela 1. Duração e sobrevivência (dias) (média $\pm$ EP) por estágio do predador de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) submetidos ao óleo de sementes de *Azadirachta indica* nas concentrações de 0,5% (T1), 1,0% (T2) ou água (controle) (T3) sob 24 ± 3 °C e $70 \pm 5\%$ de UR e fotoperíodo de 14hs.

	Duração (dias)/ Estádio				
	segundo	terceiro	quarto	quinto	Período ninfal
T1	2,33 $\pm$ 0,17b	4,16 $\pm$ 0,32a	3,57 $\pm$ 0,22b	4,44 $\pm$ 0,24b	14,47 $\pm$ 0,95b
T2	4,17 $\pm$ 0,23a	4,58 $\pm$ 0,21a	6,51 $\pm$ 0,38a	6,12 $\pm$ 0,33a	21,38 $\pm$ 0,14a
T3	2,12 $\pm$ 0,16b	3,37 $\pm$ 0,11b	3,53 $\pm$ 0,23b	4,75 $\pm$ 0,18b	13,75 $\pm$ 0,04b
F=	5,22 (P> 0,05)	4,16 (P> 0,05)	3,36 (P> 0,05)	6,36 (P> 0,05)	7,29 (P> 0,05)
	Sobrevivência (%) / Estádio				
	segundo	terceiro	quarto	quinto	adulto
T1	94,00 $\pm$ 0,16a	78,20 $\pm$ 0,11b	79,06 $\pm$ 0,23ab	87,55 $\pm$ 0,18b	92,30 $\pm$ 0,04a
T2	92,00 $\pm$ 0,23a	72,34 $\pm$ 0,21b	64,86 $\pm$ 0,38b	72,72 $\pm$ 0,33c	93,50 $\pm$ 0,14a
T3	94,00 $\pm$ 0,17a	95,55 $\pm$ 0,32a	87,87 $\pm$ 0,22a	97,05 $\pm$ 0,24a	95,00 $\pm$ 0,95a
F=	0,649 (P< 0,05)	3,42 (P< 0,05)	8,24(P< 0,05)	4,80 (P> 0,05)	2,49 (P> 0,05)

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (P< 0,05) (Teste Tukey).

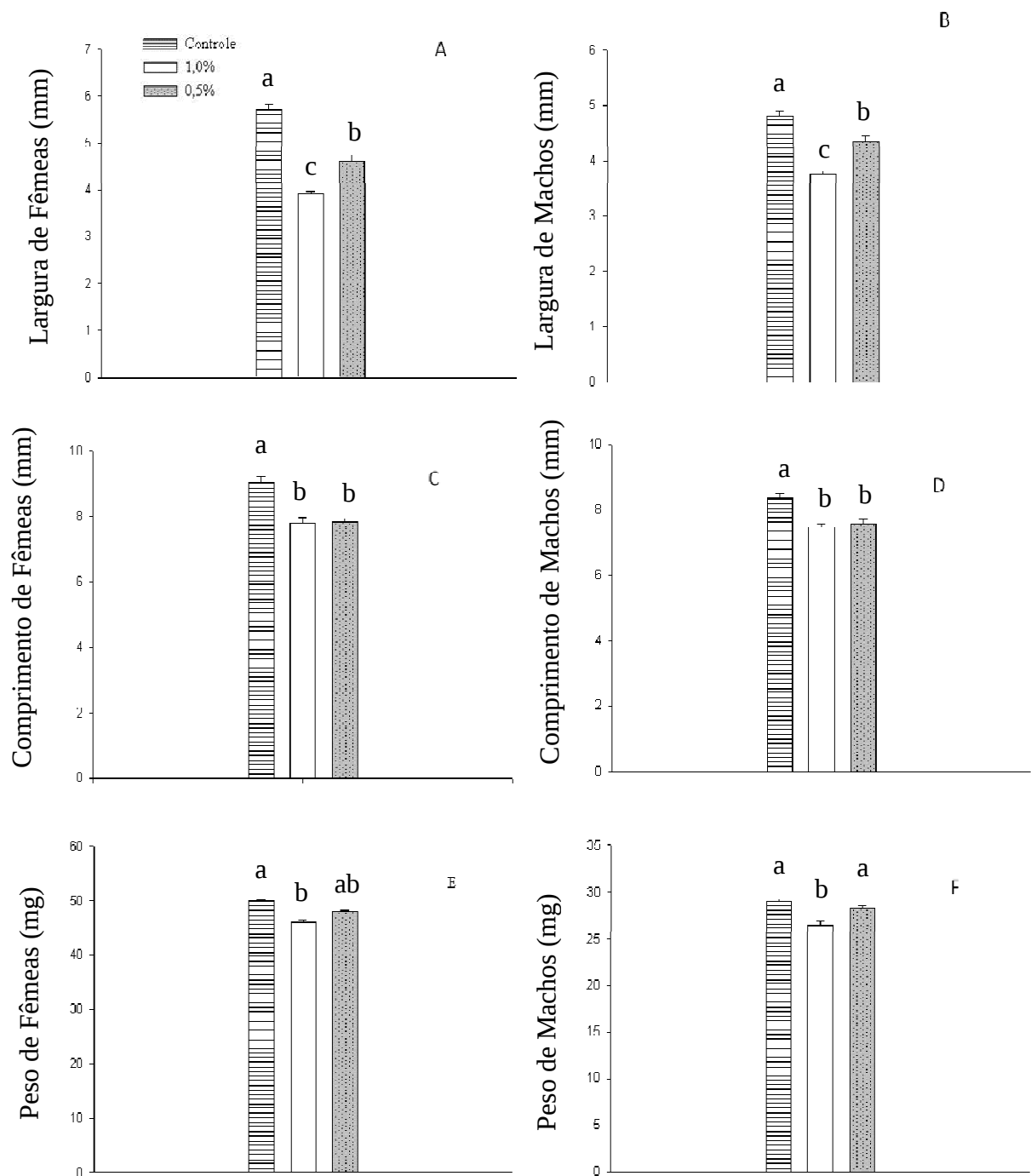


Figura 1: Peso (mg), largura (mm) e comprimento (mm) de machos e fêmeas adultos (média $\pm$ EP) de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) emergidos após submetidos as concentrações de 1,0% e 0,5% do óleo de semente de *Azadirachta indica* e com água sob 24 ± 3 °C e $70 \pm 5\%$ de UR e fotoperíodo de 14hs. Médias seguidas de mesma letra, entre tratamentos, não diferem entre si ($P < 0,05$) (Teste Tukey).



Figura 2: Ninfas de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) com dificuldade na troca de estágio após submetidas a concentração de 1,0% do óleo de sementes da *Azadirachta indica* sob 24 ± 3 °C e $70 \pm 5\%$ de UR e fotoperíodo de 12hs.



Figura 3: Adulto de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) com deformações obtidas, de ninfas do segundo estágio submetidas a concentração de 1,0% do óleo de sementes de *Azadirachta indica* sob 24 ± 3 °C e $70 \pm 5\%$ de UR e fotoperíodo de 12hs.

2º Artigo

EFEITO DO ÓLEO DE SEMENTE DE *Azadirachta indica* NO APARELHO REPRODUTOR DO PREDADOR *Supputius cincticeps* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)

Efeito do óleo de semente de *Azadirachta indica* no aparelho reprodutor do predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae)

RESUMO – O predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) apresenta potencial para o controle biológico de insetos herbívoros. Inseticidas botânicos são uma alternativa no controle de insetos herbívoros com destaque para produtos do neem (*Azadirachta indica*). Percevejos predadores e inseticidas botânicos podem ser utilizados em consórcio no Manejo Integrado de Pragas (MIP), mas o impacto dessas substâncias sobre predadores é pouco conhecida. O impacto do óleo de semente de neem no aparelho reprodutor de adultos de *S. cincticeps* é importante para o entendimento e aplicabilidade desse predador em programas de proteção agro-florestal. Fêmeas de *S. cincticeps* tratadas topicamente com óleo de neem a 1,0% apresentaram menor comprimento do ovário (6,4 mm), menor número total de ovócitos (22,4) e de ovócitos por ovário mais desenvolvido (3,86) com óleo de neem a 1,0%. Machos adultos de *S. cincticeps* de ninfas de segundo estágio tratadas topicamente com as soluções a 1,0 e 0,5%, tiveram áreas semelhantes de testículos, 0,67 e 0,69 mm respectivamente, e menor que o controle (0,75 mm²). O óleo de neem afetou morfometricamente o aparelho reprodutor de *S. cincticeps*, o que pode interferir no sucesso reprodutivo desse percevejo predador.

Palavras-chave: Percevejo predador, Pentatomidae, neem, aparelho reprodutor

INTRODUÇÃO

Supputius cincticeps (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae) uma das espécies de Asopinae mais comuns na região Neotropical (Zanuncio et al. 1998, 2003) é importante para o controle biológico em sistemas agroflorestais. Apesar disto, a morfologia interna da área reprodutiva desse predador é, ainda, pouco estudada (Lemos et al. 2003).

A área reprodutiva masculina dos Heteropteras consiste de um par de testículos e outro de vasos deferentes que termina em um ducto ejaculatório (Happ 1992, Nijhout 1994, Chapman 1998a). Alguns insetos possuem, também, glândulas acessórias que se abrem nos vasos deferentes ou tubos ejaculatórios (Happ, 1992, Chapman 1998a).

O aparelho reprodutor feminino é composto por um par de ovários acima ou nas laterais do abdômem, formados por unidades funcionais denominadas ovariolos, ligados pelo pedicelo aos ovidutos laterais e a estes ao oviduto comum que se abre em uma câmara genital (Nijhout 1994, Chapman 1998b).

A pressão da sociedade e pesquisadores por uma agricultura economicamente viável e ecologicamente correta aumenta a importância de inimigos naturais no controle de insetos pragas, especialmente por problemas ambientais e impactos ecológicos dos produtos químicos (Casida & Quistad 1998, Ostman et al. 2003).

Inseticidas botânicos são outra alternativa para o controle de insetos pragas por serem biodegradáveis e causarem menores problemas que inseticidas organossintéticos (Prabakar & Jebanesan 2004, Rahuman & Venktesan 2008). Isto aumenta a busca por inseticidas alternativos, com destaque para aqueles derivados da *Azadirachta indica* A. Juss (El Shafie & Basedow 2003).

A azadiractina é o composto responsável pelo efeito anti-alimentar, inibição da ecdise, anormalidades morfológicas, mortalidade, repelência, redução do crescimento, reprodução e viabilidade de ovos de insetos (Bruce et al. 2004, Kumar et al. 2005, Medina et al. 2004, Su & Mulla 1998, Tedeschi et al. 2001). Esse produto apresenta efeito regulador de crescimento associado a interferência no sistema neuroendócrino dos insetos e afetando funções fisiológicas controladas por ações neurohormonais, como a muda, síntese de proteínas, reprodução, diapausa e comportamento (Schmutterer 1990).

O inseticida Bioneen é recomendado para o controle de pragas, mas pode afetar o predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). O objetivo da presente pesquisa foi estudar os efeitos de diferentes concentrações do óleo de semente de neem no sistema reprodutivo do predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae).

MATERIAL E MÉTODOS

Criação e Manutenção dos Percevejos Predadores

Adultos de *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae) foram obtidos de criação em gaiolas teladas de 60 x 40 x 40cm, com pupas da presa alternativa *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1785) (Coleoptera: Tenebrionidae) do Laboratório de Controle Biológico de Insetos. A água foi disponibilizada, diariamente, em tubos cilíndricos de 5 mL tampados com algodão umedecido. As posturas de *S. cincticeps* depositadas nas gaiolas foram, coletadas, diariamente, e transferidas para placas de Petri (9,0 x 1,5 cm) com algodão umedecido. Após a eclosão, as ninfas desse predador foram mantidas nessas placas até a fase adulta. Pupas de *T. molitor* foram oferecidas a cada dois dias até a fase adulta de *S. cincticeps* (Genta et al. 2009). A criação foi mantida em sala climatizada com

temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas (Lemos et al. 2009).

Aplicação do óleo de *Azadirachta indica* em *Supputius cincticeps*

Ninfas de *S. cincticeps*, no primeiro dia do segundo estágio, foram submetidos aos tratamentos: 1,0% (1mL de inseticida para 1L de água) (T1) e 0,50% (0,5mL de inseticida para 1L de água) (T2) foram preparadas e o controle teve, apenas, água destilada (T3) (Islam et al. 2010, Singha et al. 2007). O produto foi dissolvido em água e aplicado 1 μ L da solução no dorso de cada inseto com uma microseringa (Riba et al. 2003, Guedes et al 2009).

Trezentas ninfas de *S. cincticeps* foram individualizadas em placas de Petri (9.0 x 1.2 cm), com um chumaço de algodão embebido em água destilada.

Cada tratamento teve 10 repetições, tendo cada uma 10 ninfas desse predador, totalizando 100 ninfas por tratamento em delineamento, inteiramente, casualizado.

Morfometria do ovário

Quinze fêmeas adultas de *S. cincticeps* com 15 dias de idade, obtidas de ninfas expostas a solução de neem, foram utilizadas, pois o pico reprodutivo desse predador ocorre por volta da terceira semana após a emergência (Zanuncio et al., 2005). Estas fêmeas foram mortas com acetato de etila e depositadas em tubos de vidro com fixador Zamboni (Stefanini et al. 1967). Os ovários (esquerdo e direito) foram mantidos nesse fixador e armazenados em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL à temperatura ambiente.

O comprimento do ovariolo mais desenvolvido de cada ovário e os números de ovócitos por ovariolo mais desenvolvidos e de ovócitos por ovário de *S. cincticeps* foram quantificados com auxílio do programa Image Pro-Plus, versão 4.5.1.29 (MediaCybernetics) (Lemos et al. 2005a).

Os dados de morfometria foram analisados por variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Morfometria do testículo

Quinze machos por tratamento de *S. cincticeps* com 15 dias de idade foram utilizados, pois o pico reprodutivo desse predador ocorre por volta da terceira semana após a emergência dos mesmos (Zanuncio et al. 2005). Esses insetos foram mortos com acetato de etila e depositados em tubos de vidro com fixador Zamboni (Stefanini et al., 1967). Os testículos de *S. cincticeps* foram mantidos nesse fixador em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL à temperatura ambiente. Descrições anatômicas e as características morfológicas dos testículos de 10 indivíduos de *S. cincticeps* foram realizadas por tratamento. A área total do testículo de *S. cincticeps* foi quantificada com o programa Image Pro-Plus.

Os dados da área dos testículos foram analisados por variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

RESULTADOS

A genitália interna de fêmeas de *S. cincticeps* apresentou coloração branca, com um par de ovários formado por um conjunto de ovariolos, dois ovidutos laterais, um oviduto comum, glândulas acessórias e vagina (Fig. 1). Essas estruturas localizam-se, ventralmente, na cavidade abdominal desse inseto, imediatamente, abaixo do tubo digestivo e estendendo-se da cápsula genital até o início do tórax.

A aplicação do óleo de neem, a 1,0%, em ninfas de segundo estágio reduziu o comprimento do ovariolo mais desenvolvido nos ovários de fêmeas de *S. cincticeps* comparada ao controle e com óleo a 0,5% ($F=9,50$; $P<0,05$) (Fig. 2).

O número de ovócitos por ovário ($F= 11,30$; $P< 0,05$) e por ovariolo mais desenvolvido ($F= 26,14$; $P< 0,05$) de *S. cincticeps* em fêmeas do tratamento com 1,0% da solução foram menores que o controle (Fig. 3).

A genitália interna de machos de *S. cincticeps* localiza-se, ventralmente, na cavidade abdominal do corpo, imediatamente, abaixo do tubo digestivo e estendendo-se da cápsula genital até o início do tórax e envolvida pelo corpo gorduroso. Machos desse predador apresentaram um par de testículos, dois canais deferentes, um ducto ejaculatório e o órgão copulador (aedeagus) (Fig. 4A). Os testículos de *S. cincticeps* localizam-se na região distal do abdômen, exibiram coloração vermelho intenso e estrutura compacta com forma arredondada ou ligeiramente alongada (Fig. 4B).

Os canais deferentes apresentaram coloração vermelho e aspecto de filamentos longos unidos ao ducto ejaculatório e o órgão copulador de machos de *S. cincticeps* tem aspecto esclerotizado (Fig. 4B).

Machos de *S. cincticeps* tratados com óleo de neem a 1,0 e 0,5% apresentaram testículos ($F= 11,73$; $P< 0,05$) menores em área que os do controle, porém sem efeito do tratamento (Fig. 5).

DISCUSSÃO

A caracterização e localização da genitália interna de fêmeas de *S. cincticeps* foram semelhantes as de outras espécies de Heteroptera predadores, exceto pela coloração branca da genitália em *S. cincticeps* (Adams 2001, Lemos et al. 2005a, Wittmeyer et al. 2001).

A redução do comprimento do ovário de *S. cincticeps*, exposto ao óleo de neem, foi semelhante ao de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) após exposição a diferentes concentrações de permetrina (Batalha et

al. 1997). Isso demonstra que o efeito desse composto sobre *S. cincticeps* pode ser semelhante ao de inseticidas orgânicos sintéticos.

Componentes do óleo de semente de *A. indica* são responsáveis pelo efeito anti-alimentar, inibição da ecdise, anormalidades morfológicas, mortalidade, repelência, redução do crescimento, reprodução e oviposição (Kumar et al. 2005, Medina et al. 2004, Mordue & Blackwell 1993, Schmutterer 1990, Tedeshi et al. 2001). A dieta pode afetar o peso de *S. cincticeps* e a atividade anti-alimentar causada pelo neem pode alterar morfométricamente o aparelho reprodutor de adultos desse predador. Insetos exibem “trade-offs” entre sobrevivência e reprodução em condições de escassez, isso pode ter ocorrido para *S. cincticeps* expostos a solução do inseticida botânico, sendo esse comportamento crítico para estabilização de populações de predadores, particularmente Pentatomidae (De Clercq et al. 2000, Pereira et al. 2008).

O menor número de ovócitos pode ser explicado pelo efeito anti-alimentar deste composto e sua influência no processo de vitelogênese (Mordue & Blackwell 1993, Wittmeyer et al. 2001).

A caracterização e localização da genitália interna de machos de *S. cincticeps* foram semelhantes aos de outros Heteroptera predadores (Adams 2001, Lemos et al. 2005b) com testículos avermelhados, dorsalmente ao intestino. Essa coloração avermelhada intensa parece ser uma característica morfológica comum entre espécies desse grupo de percevejos predadores (Lemos et al. 2005b).

O menor tamanho do testículo de *S. cincticeps*, após aplicação tópica do óleo de semente de neem pode, também, estar relacionado ao efeito anti-alimentar dessa substância, o que afeta a morfometria dos testículos de adultos desse percevejo predador. Isso foi observado em testículos de *P. nigrispinus*, com acentuado grau de

morte celular de acordo com o alimento oferecido e demonstrando efeito negativo na genitália interna desse predador (Kumar et al. 2005, Lemos et al. 2005b).

Características da genitália de machos podem, também, influenciar o sucesso da fertilização de fêmeas, o que reforça a hipótese de que a seleção sexual seja responsável por uma evolução rápida e divergente das estruturas genitais de animais com fertilização interna (Danielsson & Askenmo, 1999). Machos de *S. cincticeps* tratados com óleo de neem podem ter menor sucesso reprodutivo, no entanto esses mecanismos são pouco conhecidos e demonstra a necessidade de se estudar a variação intraespecífica na transferência de esperma nos insetos (Danielsson & Askenmo, 1999).

Os limites de mortalidade e os efeitos daninhos em percevejos predadores por inseticidas são importantes, pois esses podem, também, afetar a reprodução e comportamento de espécies não alvo, podendo causar a supressão do *S. cincticeps* (Zanuncio et al. 2003). O óleo de semente de neem, apesar de ser relatado como seletivo, afetou a morfometria do aparelho reprodutor de *S. cincticeps*, o que pode ocasionar problemas na reprodução desse predador.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, T.S. 2001. Morphology of the internal reproductive system of the male and female two-spotted stink bug *Perillus bioculatus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) and the transfer of products during mating. *Invertebrate Reproduction and Development* 39: 45-53.

Batalha, V.C., Zanuncio, J.C., Picanço, M.C., Guedes, R.N.C. 1997. Selectivity of insecticides to *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) and its prey *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ceiba* 38: 19-22.

Bruce, Y.A., Gounou, S., Chabi-Olaye, A., Smith, H., Schulthess F. 2004. The effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil on oviposition, development and reproductive potentials of *Sesamia calamitis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae) and *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Agricultural and Forest Entomology* 6: 223-232.

Casida, J.E. & Quistad, G.B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual Review of Entomology* 43: 1-16.

Chapman, R.F. 1998a. Reproductive System: female. pp. 295-324. *In*: R.F. Chapman (ed.). *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University, Cambridge, 770p.

Chapman, R.F. 1998b. Reproductive System: male. pp. 268-294. *In*: R.F. Chapman (ed.). *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University, Cambridge, 770p.

Danielsson, I. & Askenmo, C. 1999. Male genital traits and mating interval affect male fertilization success in the water strider *Gerris lacustris*. Behavioral Ecology and Sociobiology 46: 149-156.

De Clercq, P., Mohaghegh, J., Tirry, L. 2000. Effect of host plant on the functional response of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Biological Control 18: 65-70.

El Shafie, H.A.F. & Basedow, T. 2003. The efficacy of different neem preparations for the control of insects damaging potatoes and eggplants in the Sudan. Crop Protection 22: 1015–1021.

Genta, F.A., I. Bragatto, W.R. Terra & C. Ferreira. 2009. Purification, characterization and sequencing of the major b-1,3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. Insect Biochemistry and Molecular Biology 39: 861-874.

Guedes, R.N., Magalhães C.L., Cosme, L.V. 2009. Stimulatory sublethal response of a generalist predator to permethrin: hormesis, hormoligosis, or homeostatic regulation? Journal of Economic Entomology 102: 170-176.

Happ, G.M. 1992. Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. Annual Review of Entomology 37: 303-320.

Islam, M.T., Steven, J.C., Ren, S. Compatibility of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* with neem against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, on eggplant. 2010. Entomologia Experimentalis et Applicata 134: 28–34.

Kumar, P., Poehling, H.M., Borgemeister, C. 2005. Effects of different application methods of azadirachtin against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. Journal of Applied Entomology 129: 489- 497.

Lemos, W.P., Ramalho, F.S., Serrao, J.E., Zanuncio, J.C. 2003. Effects of diet on development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), a predator of the cotton leafworm. *Journal of Applied Entomology* 127: 389-395.

Lemos, W.P. F.S. Ramalho, J.E. Serrão & J.C. Zanuncio. 2005a. Morphology of female reproductive tract of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on different diets. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 129-138.

Lemos, W.P., Serrão, J.E., Ramalho, F.S., Zanuncio, J.C., Lacerda, M.C. 2005b. Effect of diet on male reproductive tract of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Journal of Biology* 65: 91–96.

Lemos, W.P., Zanuncio, J.C., Ramalho, F.S., Serrão, J.E. 2009. Fat body of the zoophytophagous predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) females: Impact of the herbivory and age. *Micron* 40: 635–638.

Medina, P., Budia, F., Del Estal, P., Viñuela, E. 2004. Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *Journal of Economic Entomology* 97: 43–50.

Mordue, A.J. & Blackwell, A. 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology* 39: 903–924.

Nijhout, H.F. 1994. Reproduction. pp.142-159. *In*: H.F. Nijhout (ed.). *Insect Hormone*. Princeton University, Princeton.

Ostman, O., Ekbom, B., Bengtsson, J. 2003. Yield increase attributable to aphid predation by ground-living polyphagous natural enemies in spring barley in Sweden. *Ecological Economics* 45: 149-158.

Prabakar, K. & Jebanesan, A. 2004. Larvicidal efficacy of some cucurbitaceous plant leaf extracts against *Culex quinquefasciatus* (Say). Bioresource Technology 95: 113–114.

Pereira, A.I.A. Ramalho, F.S. Malaquia, J.B. Bandeira, C.M., Silva, J.E.S., Zanuncio J.C. 2008. Density of *Alabama argillacea* larvae affects food extraction by females of *Podisus nigrispinus*. Phytoparasitica 36: 84-94.

Rahuman, A.A. & Venktesan, P. 2008. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. Parasitology Research 103:133–139.

Riba, M, Marti, J., Sans, A. 2003. Influence of azadirachtin on development and reproduction of *Nezara viridula* L. (Het., Pentatomidae). Journal of Applied Entomology 127: 37–41.

Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annual Review of Entomology 35: 271-97.

Singha, A., Thareja V., Singh, A.K. 2007. Application of neem seed kernel extracts result in mouthpart deformities and subsequent mortality in *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of Applied Entomology 131: 197–201.

Stefanini, M., Martino, C., Zamboni, L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. Nature 216: 173 -174.

Su, T. & Mulla, S. 1998. Ovicidal activity of neem products (azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of the American Mosquito Control 14: 204–209.

Tedeschi, R., Alma A., Tavella, L. 2001. Side-effects of three neem (*Azadirachta indica* A. Juss) products on the predator *Macrolophus caliginosus* Wagner (Heteroptera: Miridae). Journal of Applied Entomology 125: 397-402.

Wittmeyer, J.L., Coudron, T.A., Adams, T.S. 2001. Ovarian development, fertility and fecundity in *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae): an analysis of the impact of nymphal, adult, male and female nutritional source on reproduction. *Invertebrate Reproduction and Development* 39: 9-20.

Zanuncio, J.C., Batalha, V.C., Guedes R.N.C., Picanço M.C. 1998. Insecticide selectivity to *Supputius cincticeps* (Stal) (Het., Pentatomidae) and its prey *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology* 122: 457-460

Zanuncio, T.V., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., Guedes, R.N.C. 2003. Permethrin-induced hormesis on the predator *Supputius cincticeps* (Staal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae). *Crop Protection* 22: 941–947.

Zanuncio, J.C., Beserra, E.B., Molina-Rugama, A.J., Zanuncio, T.V., Pinon T.B.M., Maffia V.P. 2005. Reproduction and longevity of *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with larvae of *Zophobas confusa*, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) or *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 771-777.

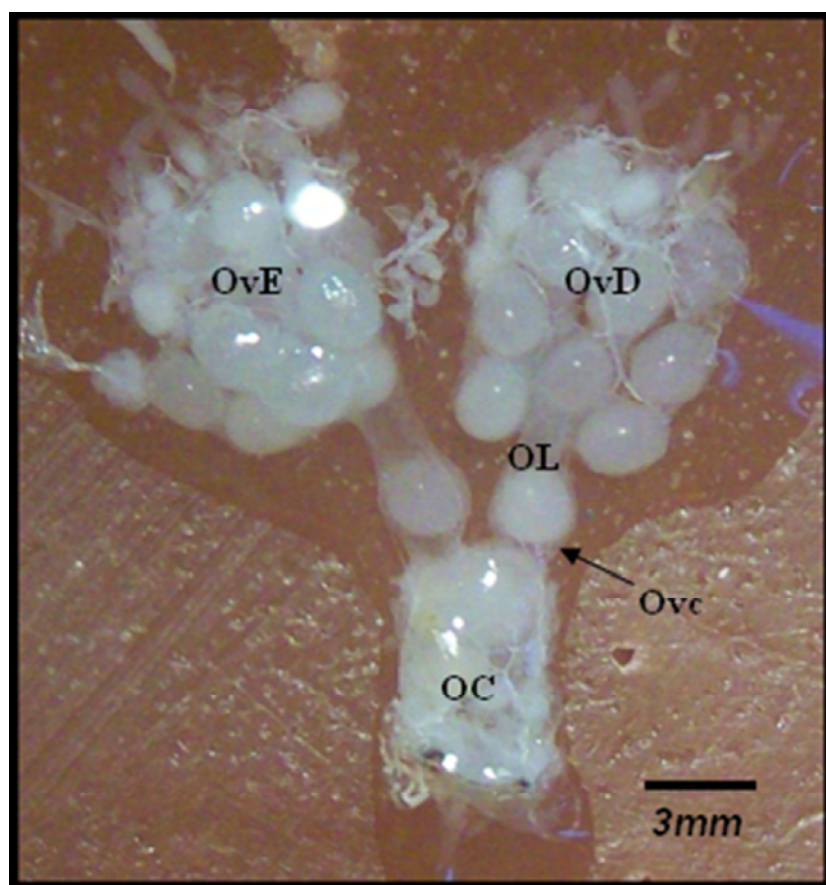


Fig. 1. Genitália interna de fêmeas de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). OC, oviduto comum; OL, oviduto lateral; Ovc, ovócito; OvD, ovário direito; OvE, ovário esquerdo.

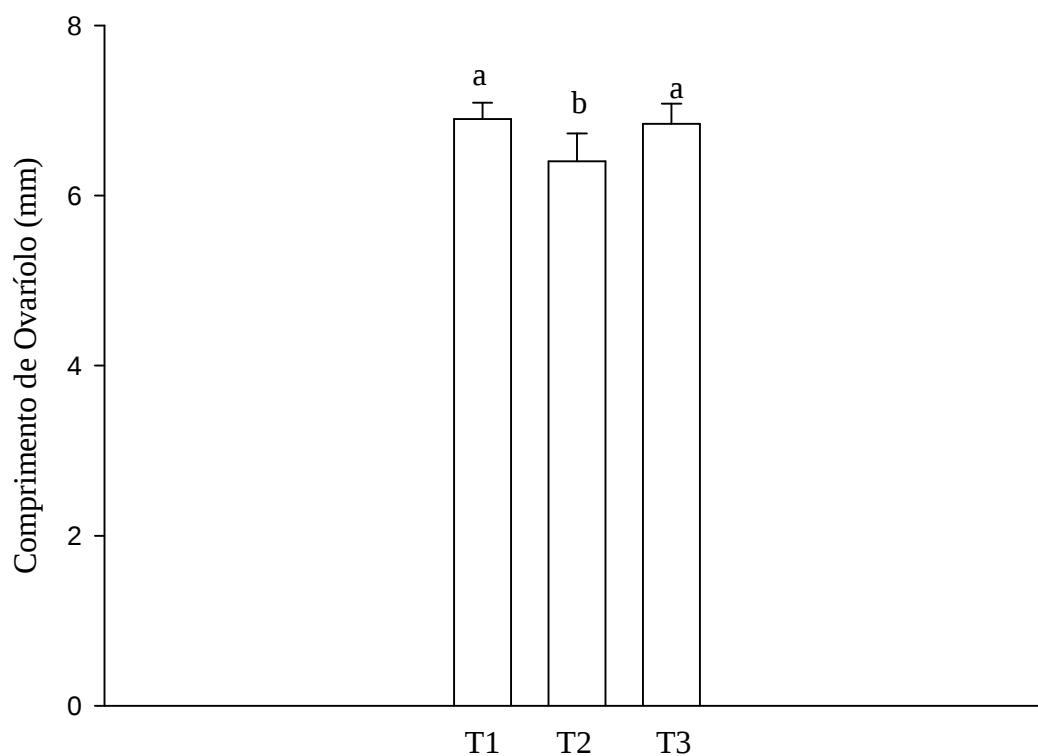


Fig. 2. Comprimento do ovariolo mais desenvolvido de fêmeas de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) com 15 dias de idade de ninfas submetidas as concentrações de 1,0% (T2) ou 0,5% (T3) do óleo de semente de *Azadirachta indica* ou tratados com água (T1) sob $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14hs. Médias seguidas de mesma letra, entre tratamentos, não diferem entre si ($P < 0,05$) (Teste de Tukey).

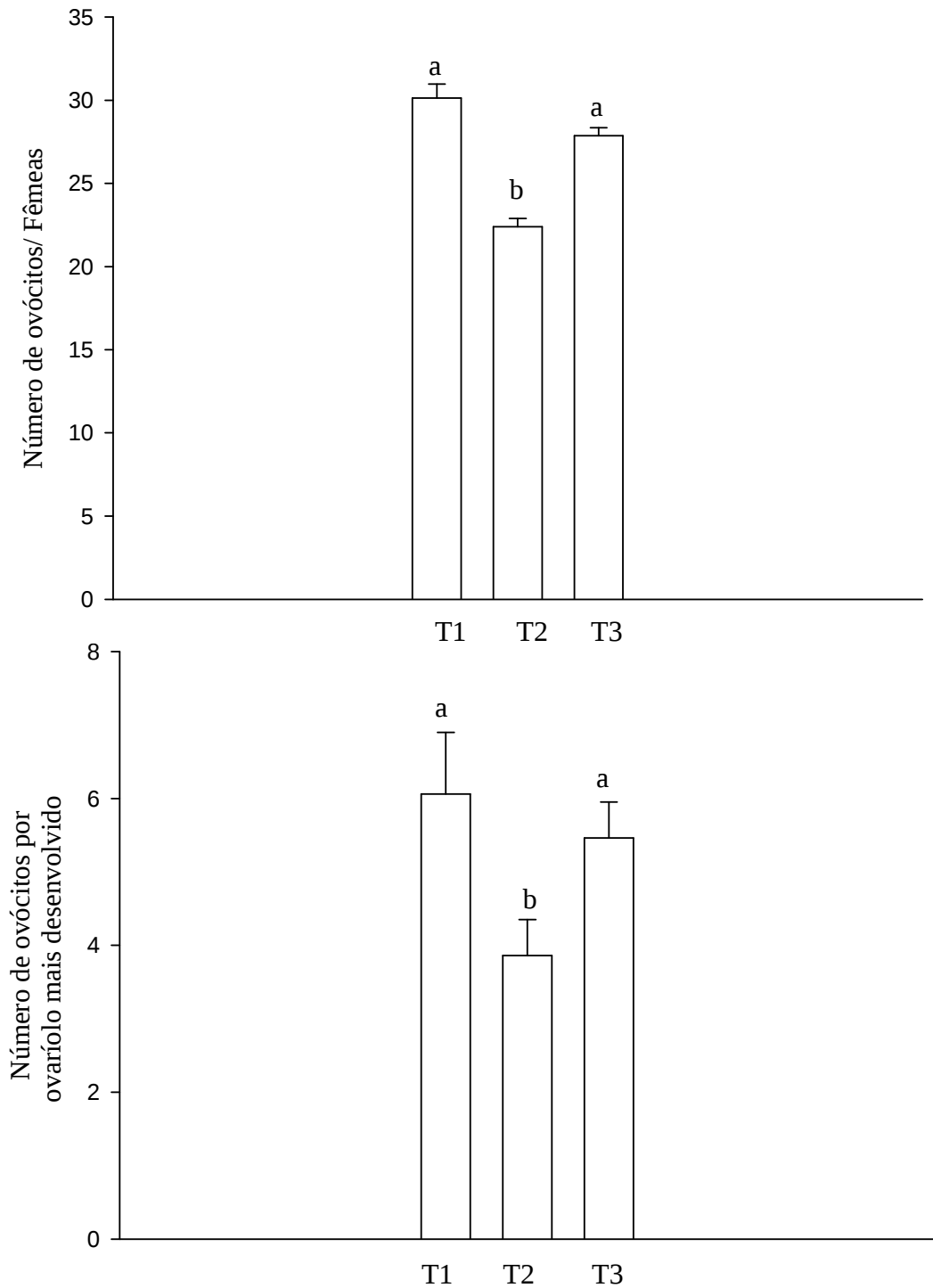


Fig. 3. Número de ovócitos por ovário (A) e por ovaríolo mais desenvolvido (B) de fêmeas de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) com 15 dias de idade, de ninfas submetidas as concentrações de 1,0% (T2) ou 0,5% (T3) do óleo de semente de *Azadirachta indica* ou tratados com água (T1) sob $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14hs. Médias seguidas de mesma letra, entre tratamentos, não diferem entre si ($P < 0,05$) (Teste de Tukey).

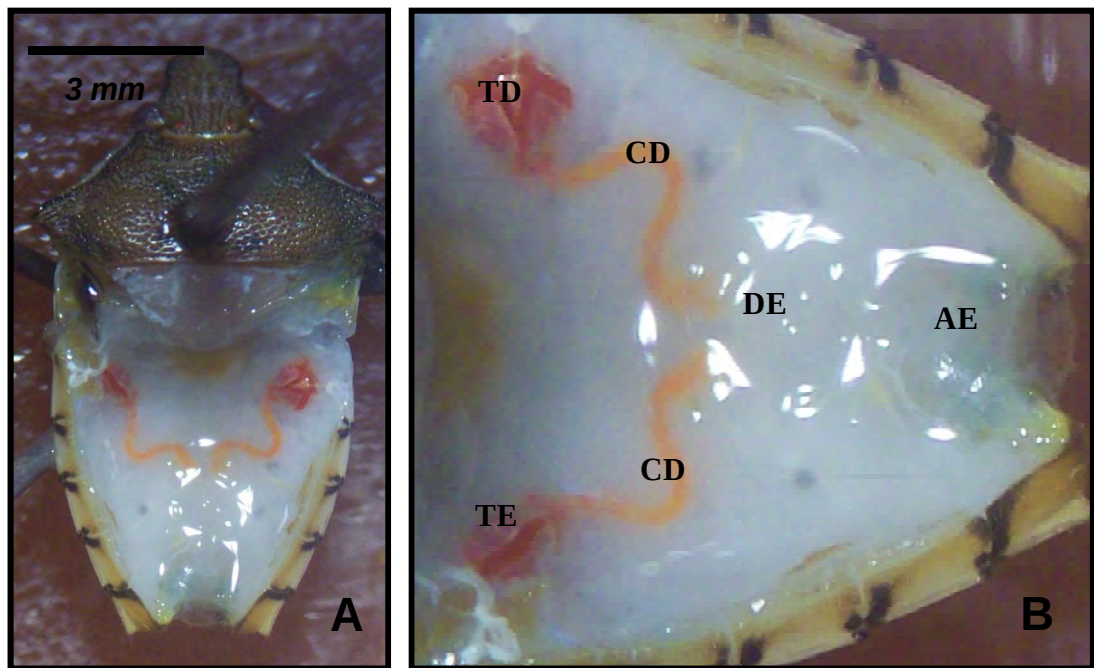


Fig. 4. Visão geral da genitália interna (A) e detalhe do testículo de machos de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) (B). TD, testículo direito; TE, testículo esquerdo; CD, canal deferente; DE, ducto ejacutório; AE, aedeagus.

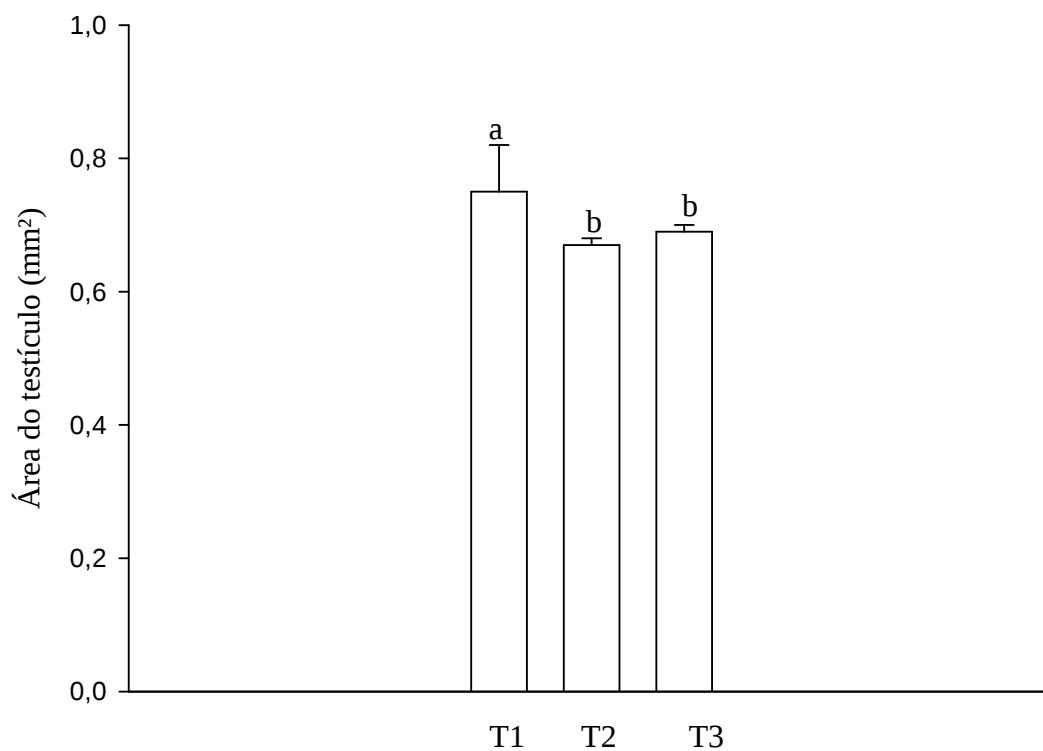


Fig. 5. Tamanho do testículo (média $\pm$ erro padrão) de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) com 15 dias de idade de ninfas submetidas as concentrações 1,0% (T2) ou 0,5% (T3) do óleo de semente de *Azadirachta indica* ou tratados com água (T1) sob $25 \pm 3^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14hs. Médias seguidas pela mesma letra, entre tratamentos, não diferem entre si ($P < 0,05$) (Teste Tukey).

3º Artigo

EFEITO DO ÓLEO DE SEMENTE DE *Azadirachta indica* NO SISTEMA DIGESTIVO E IMUNE CELULAR DO PREDADOR *Supputius cincticeps* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)

Efeito do óleo de semente de *Azadirachta indica* nos sistema digestivo e imune celular do predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae)

RESUMO – O predador *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) encontrado naturalmente em sistemas agroflorestais, é um agente importante de controle biológico de insetos herbívoros. Extratos de plantas, como o óleo de sementes de neem (*Azadirachta indica*) são outra alternativa no controle de insetos herbívoros. Percevejos predadores e inseticidas botânicos podem ser utilizados em Programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), mas o impacto dessas substâncias sobre predadores é pouco conhecida. Por isto, estudos sobre o sistema digestivo e imune celular do percevejo *S. cincticeps*, após ingerirem solução do óleo de neem a 1,0% são importantes para o entendimento e aplicabilidade dessa espécie em programas de proteção agro-florestal. Esse percevejo predador não apresentou alteração morfológica no sistema digestivo. No entanto, o sistema imune celular de adultos desse predador foi ativado após quatro horas da ingestão do óleo de neem. Três tipos de hemócitos: plasmatócitos, prohemocitos e granulócitos foram observados, mas, apenas, a dinâmica dos plasmatócitos foi afetada após quatro horas da ingestão da solução inseticida. Adultos do percevejo predador *S. cincticeps* podem apresentar resposta ativa para plasmatócitos após a ingestão do óleo de sementes de neem.

Palavras-chave: Percevejo predador, Pentatomidae, neem, defesa celular

INTRODUÇÃO

O trato digestivo de insetos é dividido em três regiões principais: intestino anterior (estomodeu), intestino posterior (proctodeu), ambos de origem ectodérmica e intestino médio (ventrículo) originado a partir do endoderma. Esse trato digestivo, na maioria dos insetos é um tubo contínuo da boca ao ânus, mas alguns insetos que se alimentam de fluidos apresentam uma oclusão entre o intestino médio e o posterior, como em alguns Heteroptera sugadores de planta, nos quais a oclusão ocorre entre diferentes partes do intestino médio (Chapman, 1998).

As células epiteliais do intestino médio estão envolvidas na produção de enzimas e absorção de nutrientes, sendo apoiadas em fibras musculares dispostas em duas camadas: uma interna circular e uma externa longitudinal. O epitélio é formado por três tipos celulares com modificações estruturais de acordo com a função que desempenham: células digestivas ou principais, células regenerativas e células endócrinas. As células principais possuem tempo limitado de vida e são, continuamente, substituídas pelas células regenerativas (Chapman, 1998).

A resposta imunológica de insetos, especialmente de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae), *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae), *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), *Hyalophora cecropia* L. (Lepidoptera: Saturniidae) e *Manduca sexta* Johannson (Lepidoptera: Sphingidae) foi estudada. Aspectos da resposta imunológica humoral celular estão sendo descritos em nível de espécie (Asano & Ashida 2001, Cerenius & Söderhäll 2004, Feldhaar & Gross 2008, Gillespie et al. 1997, Hoffmann & Reichhart 2002, Hoffmann 2003, Schmid-Hempel 2005, Trenczek 1998, Vilcinskas & Götz 1999).

A cutícula e o mesêntero de insetos são a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos e substâncias estranhas (Levy et al. 2009) e a quebra dessa barreira provoca uma série de reações imunológicas divididas em respostas de

defesa humoral e celular (Lavine & Strand 2002). A primeira realiza processos de coagulação da hemolinfa, melanização e produção de peptídeos antimicrobianos sem a participação direta dos hemócitos (Vilmos & Kurucz 1998). O segundo meio de defesa representa reações mediadas pelos hemócitos, conhecida como reação celular (Silva et al. 2002). Essa reação é ativada após o reconhecimento dos patógenos pelo estímulo por um sistema complexo de resposta baseado em proteínas especializadas dos hemócitos que se ligam a polissacarídeos de bactérias ou fungos (Gillespie et al. 1997).

Compostos do óleo de semente de neem podem afetar a dinâmica hemocitária de percevejos (Figueiredo et al. 2006). Essas células são morfológicamente distintas e circulam, livremente, na hemolinfa dos insetos e auxiliam na resposta imune celular (Gillespie et al. 1997, Lavine & Strand 2002). Essas células atacam e isolam microorganismos e substâncias invasoras por fagocitose e pela formação de cápsula multicelular ao redor dos mesmos (encapsulação) por agregados ou nódulos (Lavine & Strand 2002). No entanto, a resposta da defesa celular do sistema imune de insetos mediada por hemócitos precisa ser estudada principalmente para Heteroptera (Lavine & Strand 2002).

Percevejos da família Pentatomidae são inimigos naturais de pragas agrícolas, sendo generalistas, agressivos e com alta capacidade reprodutiva predando, principalmente, larvas de Lepidoptera e Coleoptera (Lemos et al. 2003, Tipping et al. 1999). *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae), uma das espécies de Asopinae mais comuns na região Neotropical, é importante para o controle biológico em sistemas agroflorestais. (Zanuncio et al. 1998, 2003).

Extratos de óleos das sementes, aquosos e etanólicos de folhas da *Azadirachta indica* (neem) inibem o crescimento de insetos (Akhtar 2000, Amadioha 2000, Boeke et al. 2004, Garcia & Azambuja 2004, Wennergren & Stark

2000). Extratos de neem apresentaram atividade biológica contra 400 espécies de insetos com mais de 300 componentes que atuam na fisiologia e no comportamento de insetos, ácaros e nematóides (Al-Rajhy et al. 2003, Kumar et al. 2005, Liang et al. 2003, Mitcheli et al. 2004, Silva et al. 2007).

O efeito de neem como regulador de crescimento está supostamente associado a sua interferência no sistema neuroendócrino dos insetos, afetando diferentes funções fisiológicas controladas por ações neurohormonais, como o processo de muda, a síntese de proteínas, reprodução, diapausa e comportamento (Mordue & Nisbet 2000). Porém são escassos os relatos a respeito da interferência do neem sobre a histofisiologia do canal alimentar em insetos.

Extratos de neem são importantes para o controle de insetos praga, mas o efeito da ingestão desses produtos no sistema digestivo e na dinâmica imune celular de predadores é pouco estudado. Este trabalho tem como objetivo avaliar a morfologia do sistema digestivo e a dinâmica hemocitária do predador *S. cincticeps*, após a ingestão da solução de óleo de neem.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação e Manutenção dos Percevejos Predadores

Os insetos utilizados foram provenientes de criação do Laboratório de Controle Biológico de Insetos. Adultos de *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae) foram criados em gaiolas teladas de 60 x 40 x 40cm, com pupas da presa alternativa *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1785) (Coleoptera: Tenebrionidae). A água foi disponibilizada, diariamente, em tubos anestésicos de 5 mL tampados com algodão umedecido. As posturas desse predador foram coletadas nas gaiolas, diariamente, e transferidas para placas de Petri (9,0 x 1,5 cm) com algodão umedecido. Após a eclosão, as ninfas foram mantidas nessas placas até a

fase adulta. Uma pupa de *T. molitor* foi oferecida até a fase adulta a cada dois dias (Genta et al. 2009). A criação é mantida em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas (Lemos et al. 2009).

Estrutura do intestino médio de *Supputius cincticeps* alimentados com neem

Adultos de *S. cincticeps*, após 24 horas da emergência, foram individualizados em potes plásticos de 500 mL, com tubos plásticos de 2,5 mL contendo água. Esses indivíduos permaneceram em jejum durante cinco dias, para o esvaziamento de seu trato digestivo e receberam água, para evitar a mortalidade dos mesmos. Após esse período, os indivíduos foram submetidos aos tratamentos. No primeiro tratamento, foram dissecados em jejum e nos demais após duas, quatro e dezesseis horas do início da alimentação com óleo de sementes de neem a 1,0% (1L de inseticida para 100L de água) em tubos plásticos de 2,5 mL (Fialho et al. 2009, Figueiredo et al. 2006).

Os percevejos predadores foram imobilizados e, em seguida, dissecados sob estereomicroscópio, tendo seu trato digestivo removido em solução salina para insetos ($0,1\text{ M NaCl} + 0,1\text{M KH}_2\text{PO}_4 + 0,1\text{M Na}_2\text{HPO}_4$). A seguir, o intestino médio foi dividido nas porções anterior, média e posterior e fixadas em solução de Zamboni (Stefanini et al. 1967). As amostras foram desidratadas em séries de etanol, incluídas em resina JB4, seccionadas a $3\text{ }\mu\text{m}$ e corados com azul de toluidina.

Coleta da hemolinfa, identificação e contagem dos hemócitos

Amostras de $2\text{ }\mu\text{L}$ de hemolinfa de cada percevejo foram coletadas com micropipeta. O material foi acondicionado em tubos Eppendorf com $20\text{ }\mu\text{L}$ de solução anticoagulante e $4\text{ }\mu\text{L}$ de corante Giemsa. Essas amostras foram transferidas para câmara de Neubauer, onde os hemócitos foram identificados e contados sob microscópio (aumento de 400X) (Eleftherianos et al. 2009, Silva et al. 2002).

Delineamento experimental e análise estatística

Adultos de *S. cincticeps* alimentados com a solução do óleo de sementes de neem a 1,0 % por duas, quatro e dezesseis horas foram utilizados para se estudar o efeito dessa solução na resposta imune celular de *S. cincticeps*. O controle foi composto por adultos de *S. cincticeps* alimentados, apenas, com água destilada. Um total de dez predadores foram utilizados por tratamento, totalizando 60 insetos.

Os resultados obtidos após duas, seis e doze horas do início do tratamento foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P = 0,05$).

RESULTADOS

A estrutura das células digestivas foi, de modo geral, uniforme. A parede do intestino médio de *S. cincticeps* é formada por uma camada simples de células revestidas, externamente, por outra de células musculares organizadas em uma túnica circular interna e outra longitudinal externa. As células digestivas das regiões anterior, média e posterior do intestino médio de *S. cincticeps* são colunares com ápice dilatado, grânulos e borda estriada sem alterações nessas estruturas nos diferentes períodos após exposição a solução do óleo de semente de neem a 1,0%.

Três hemócitos: granulócito, plasmatócito e prohemócito (Fig. 1) foram identificados em *S. cincticeps*. Os granulócitos apresentaram formato esférico ou oval, citoplasma com grânulos pequenos, basófilos, geralmente, esféricos e núcleo morfológicamente irregular (Fig. 1A). Os plasmatócitos mostraram núcleo volumoso, pouco heterocromático e alguns exibiram prolongamentos citoplasmáticos (Fig. 1B). Os prohemócitos apresentaram aspecto esférico com núcleo bastante volumoso e citoplasma em uma pequena faixa periférica (Fig. 1C).

O total de hemócitos aumentou após quatro horas da ingestão da solução mas com número semelhante ao do controle ($F = 2,93$; $P > 0,05$). O número dessas células foi semelhante para insetos tratados e no controle em hemolinfa de *S. cincticeps* após duas e 16 horas da ingestão do óleo de neem (Fig. 2).

O número de plasmatócitos foi semelhante ao controle após duas horas da ingestão desse composto, mas aumentou após quatro horas da ingestão da solução do óleo de sementes de neem ($F= 25,97$; $P < 0.05$) (Fig. 3).

O número de granulócitos, em percevejos que ingeriram a solução de óleo de semente de neem e no controle ($P= 2,88$; $P > 0.05$), não variou com o tempo de ingestão (Fig.4). A quantidade de prohemócitos foi semelhante no controle e entre tratamentos com neem ($P= 1.9320$; $P > 0.05$) (Fig. 5).

DISCUSSÃO

Insetos podem iniciar o processo de digestão injetando saliva no alimento antes de ingeri-lo, o que é conhecido como digestão extra-oral. O processo final de digestão ocorre no intestino médio, como observado em todos os estádios de alguns Hemiptera, principalmente, predadores (Chapman 1998, Nation 2002). Este processo resulta em alta eficiência da digestão alimentar e utilização de nutrientes em heterópteros predadores (Cohen 1990). A digestão extra oral de *S. cincticeps* pode explicar a degradação dos componentes do óleo de neem antes de entrarem em contato com o sistema digestivo e não ocasionando danos a esse predador.

Hemócitos de *S. cincticeps* e suas características morfológicas foram semelhantes aqueles de Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Orthoptera (Brayner et al. 2005, Figueiredo et al. 2006, Hillyer & Christensen 2002, Ling et al. 2003, Ribeiro & Brehélin 2006, Silva et al. 2000).

O aumento no número de hemócitos totais em indivíduos de *S. cincticeps* demonstra um sistema imune celular ativo após quatro horas da alimentação, no entanto controle e tratamento são semelhantes. O sistema imunológico de *S. cincticeps* pode ter sido ativado logo após a alimentação, pois os hemócitos responderam rapidamente (Figueiredo et al. 2006, Han et al. 1998, Jalali & Salehi 2008). Os hemócitos apresentaram grande variedade de funções, sendo quatro bem

documentadas e geralmente aceitas; 1- a fagocitose de pequenas partículas, 2- encapsulação de grandes objetos estranhos, 3-coagulação do sangue por aglutinação celular ou por contribuição da precipitação do plasma e 4- armazenamento e distribuição de materiais nutritivos (Inque et al. 2001; Russo et al. 2001, Silva et al. 2002).

A maior produção de plasmatócitos após quatro horas da ingestão da solução de óleo de neem e o menor número dessas células após duas e 16 horas da ingestão. Essas células, de diâmetro entre 7,1 e 9,7 μm , estão envolvidas no processo inicial de fagocitose (Fuguet & Vey 2004). Os hemócitos circulam livremente na hemolinfa rapidamente, migram para o local da infecção e, eventualmente, fagocitam e destroem invasores como bactérias, fungos, vírus, protozoários ou substâncias estranhas, (Giulianini et al. 2003, Russo et al. 2001, Silva et al. 2000).

O número constante de granulócitos na hemolinfa de *S. cincticeps*, após os diferentes períodos de ingestão, demonstra que o óleo de neem não afeta funções de defesa atribuídas a essas células. Os granulócitos apresentam diâmetro de 7,9 a 12,9 μm (Giulianini et al. 2003) e observadas, freqüentemente, em processos de defesa como encapsulação e formação de nódulos (Gillespie et al. 2000, Jiravanichpaisal et al. 2006, Lavine & Strand 2002, Tojo et al. 2000).

Os prohemócitos encontrados em menor quantidade e sem variações significativas após a ingestão do óleo de semente de neem estão envolvidas na formação de outros tipos celulares, o que ajuda a explicar o fato de que substâncias tóxicas do óleo de semente de neem não terem reduzido sua produção. Os prohemócitos são relatados como “células-tronco”, se diferenciam em um ou mais tipos de hemócitos (Lavine et al. 2008), possuem diâmetro de 6,9 μm e núcleo volumoso que chega a atingir cerca de 4.0 μm de diâmetro (Giulianini et al. 2003).

A ingestão do óleo de neem alterou a dinâmica dos plasmatócitos de indivíduos adultos de *S. cincticeps*. Esse predador responde reconhecendo as substâncias daninhas após quatro horas da ingestão, no entanto os demais tipos hemocitários não respondem a ingestão da solução de neem.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERENCIA

Amadioha, A.C. 2000. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extract of *Azadirachta indica*. Crop Protection 19: 287–290.

Asano T. & Ashida M. 2001. Cuticular prophenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and demonstration of its transport from the hemolymph. Journal of Biological Chemistry 276: 11100-11112.

Akhtar, M. 2000. Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). Integrated Pest Management Reviews 5: 57-66.

Al-Rajhy, D.H., Alahmed, A.M., Hussein, H.I., Kheir, S.M. 2003. Acaricidal effects of cardiac glycosides, azadirachtin, and neem oil against the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). Pest Management Science 59: 1250-1254.

Boeke, S.J., Boersma, M.G., Alink, G.M., Loon, J.J.A., Huis, A., Dicke, M., Rietjens, I.M.C.M. 2004. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. Journal of Ethnopharmacology 94:25-41.

Brayner F.A., Araújo, H.R.C., Cavalcanti, M.G.S., Alves, L.C., Peixoto, C.A. 2005. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Micron 36: 359-367.

Cerenius, L. & Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunological Reviews 198: 116-126.

Chapman, R.F. 1998. Alimentary canal, digestion and absorption. pp. 38-68. In: R.F. Chapman (ed.). The Insects: Structure and Function. Cambridge University, Cambridge, 770p.

Cohen, A.C. Feeding adaptations of some predaceous Hemiptera. 1990. *Annals of the Entomological Society of America* 83: 1215-1223.

Eleftherianos, I., Xu, M., Yadi, H., Ffrench-Constant, R.H. Reynolds, S.E. 2009. Plasmacyte-spreading peptide (PSP) plays a central role in insect cellular immune defenses against bacterial infection. *The Journal of Experimental Biology* 212: 1840-1848.

Feldhaar, H. & Gross, R. 2008. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection* 10: 1082-1083.

Fialho, M.C.Q., Zanuncio, J.C., Neves, C.A., Ramalho, F.S., Serrão, J.E. 2009. Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Annals of the Entomological Society of America* 102: 119-127.

Figueiredo, M.B., Castro, D.P., Nogueira, N.F.S., Garcia, E.S., Azambuja, P. 2006. Cellular immune response in *Rhodnius prolixus*: Role of ecdysone in hemocyte phagocytosis. *Journal of Insect Physiology* 52: 711–716.

Fuguet, R. & Vey, A. 2004. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: in vivo studies. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 152-167.

Garcia, E.S. & Azambuja, P. 2004. Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi* triatomine interactions. *Toxicon* 44: 431-440.

Genta, F.A., Bragatto, I., Terra, W.R., Ferreira, C. 2009. Purification, characterization and sequencing of the major b-1,3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 861-874.

Gillespie J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42: 611-643.

Gillespie J.P., Burnett C., Charnley, A.K. 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. Journal of Insect Physiology 46: 429-437.

Giulianini, P.G., Bertolo, E., Battistella, S., Amirante, G.A. 2003. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis. Tissue & Cell 35: 243-251.

Han, S.S., Lee, M.H., Kim, W.K. 1998. Hemocytic differentiation in hemopoietic organ of *Bombix mori* larvae. Zoological Science 15: 371-379.

Hillyer, J.F. & Christensen, B.M. 2002. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Histochemistry and Cell Biology 117: 431-440.

Hoffmann, J.A. 2003. The immune response of Drosophila. Nature 426: 33-38.

Hoffmann, J.A. & Reichhart, J.M. 2002. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. Nature Immunology 3: 121-126.

Inoue, N., Hanada, K., Tsuji, N.I., Garashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T. Fujisaki, K. 2001. Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology 38: 514-519.

Jalali, J. & Salehi, R. 2008. The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) during post-embryonic development. Munis Entomology & Zoology 3: 199-216.

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology 211: 213-236.

Kumar P., Poehling H.M., Borgemeister, C. 2005. Effects of different application methods of azadirachtin against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. *Journal of Applied Entomology* 129:489-497.

Lavine, M.D. & Strand, M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295-1309.

Lemos, W.P., Zanuncio, J.C., Ramalho, F.S., Serrão, J.E. 2009. Fat body of the zoophytophagous predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) females: Impact of the herbivory and age. *Micron* 40: 635–638.

Lemos, W.P., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2003. Effects of diet on development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae), a predator of the cotton leafworm. *Journal of Applied Entomology* 127: 389-395.

Levy, S.M., Moscardi, F., Falleiros, Â.M.F., Silva, R.J., Gregório, E.A. 2009. A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 17-22.

Liang, G.M., Chen, W., Liu, T.X. 2003. Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection* 22: 333-340

Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R. Kiguchi, K. 2003. Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. *Histochemistry and Cell Biology* 120: 505-511.

Mitcheli, P.L., Gupta, R., Singh, A.K., Kumar, P. 2004. Behavioural and development effects of neem extracts on *Clavigralla scutellaris* (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae) and its egg parasitoid, *Gryon fulviventre* (Hymenoptera: Scelionidae). *Journal of Economic Entomology* 97: 916-923.

Mordue, A.J. & Nisbet A.J. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29: 615-632.

Nation, J.L. *Insect Physiology and Biochemistry*. Washington: CRC Press. 485 p. 2002.

Ribeiro, C. & Brehélin, M. 2006. Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology* 52: 17–429

Russo, J., Brehélin, M., Carton, Y. 2001. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *Journal of Insect Physiology* 47: 167-172.

Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology* 50: 529-551.

Silva, C., Dunphy, G.B., Rau, M.E. 2000. Interaction of hemocytes and propheneloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 24: 367-379.

Silva, J.E.B., Boleli, I.C. Simões, Z.L.P. 2002. Hemocytes types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. *Brazilian Journal of Biology* 62: 689-699.

Silva, J.C.T., Jham, G.N., Oliveira, R.D.L., Brown, L. 2007. Purification of the seven tetranortriterpenoids in neem (*Azadirachta indica*) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reversed-phase highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1151: 203-210.

Stefanini, M., Martino, C., Zamboni, L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216: 173 -174.

Tipping, P.W., Holko, C.A., Abdul-Baki, A.A., Aldrich, J.R. 1999. Evaluating *Edovum puttleri* Grissell and *Podisus maculiventris* (Say) for augmentative biological control of Colorado potato beetle in tomatoes. *Biological Control* 16: 35-42.

Trenczek, T. 1998. Endogenous defense mechanisms of insects. *Zoology* 101: 298-315.

Tojo, S., Naganuma F., Arakawa, K. Yokoo, S. 2000. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* 46: 1129-1135.

Vilcinskas, A. & Götz, P. 1999. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Advances in Parasitology* 43: 267-313.

Vilmos, P. & Kurucz, E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* 62: 59-66.

Wennergren, U. & Stark, J. 2000. Modelling long-term effects of pesticides on populations: beyond just counting dead animals. *Journal of Applied Ecology* 10: 295–302.

Zanuncio, J.C., Alves, J.B., Zanuncio, T.V., Garcia, J.F. 1994. Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *Forest Ecology and Management* 65: 65-73.

Zanuncio, J.C., Batalha, V.C., Guedes R.N.C., Picanço M.C. 1998. Insecticide selectivity to *Supputius cincticeps* (Stal) (Het., Pentatomidae) and its prey *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology* 122: 457-460

Zanuncio, T.V., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., Guedes, R.N.C. 2003. Permethrin-induced hormesis on the predator *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae). *Crop Protection* 22: 941-947.

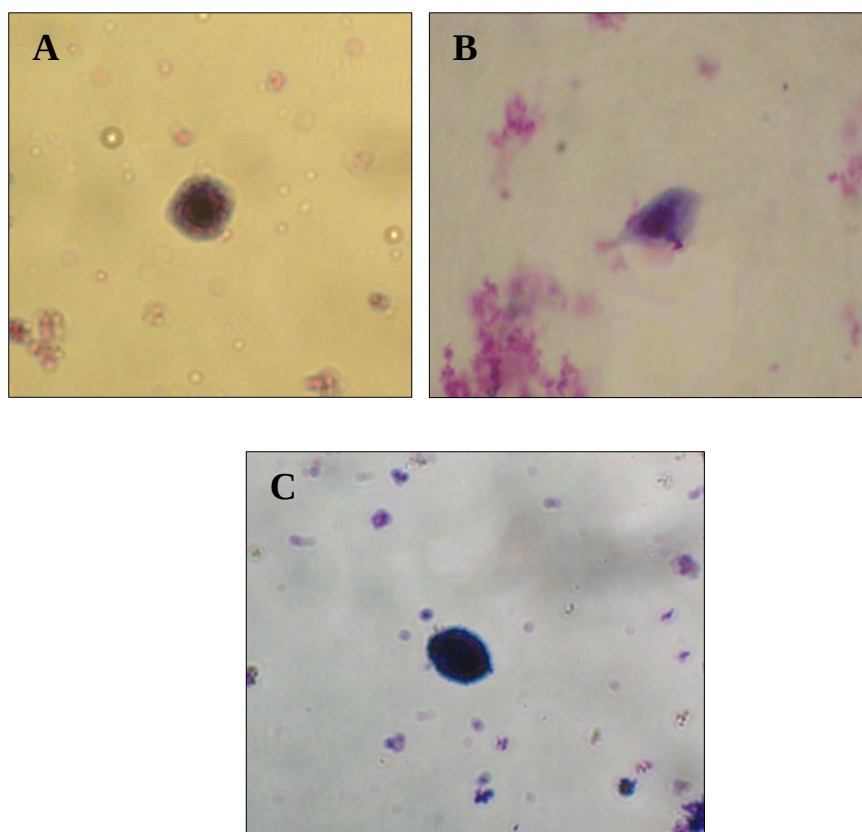


Fig. 1. Fotomicrografias (aumento de 650X) de hemócitos de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae): granulócito (A), plasmatócito (B) e prohemócito (C).

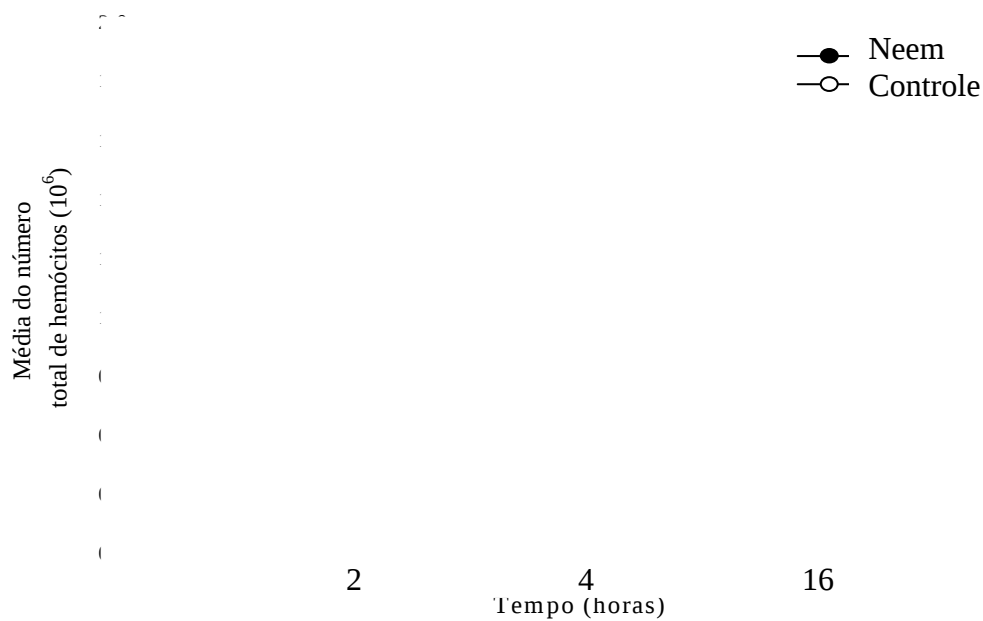


Fig. 2. Hemócitos (média $\pm$ SE) de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) no tratamento com óleo de semente de neem.

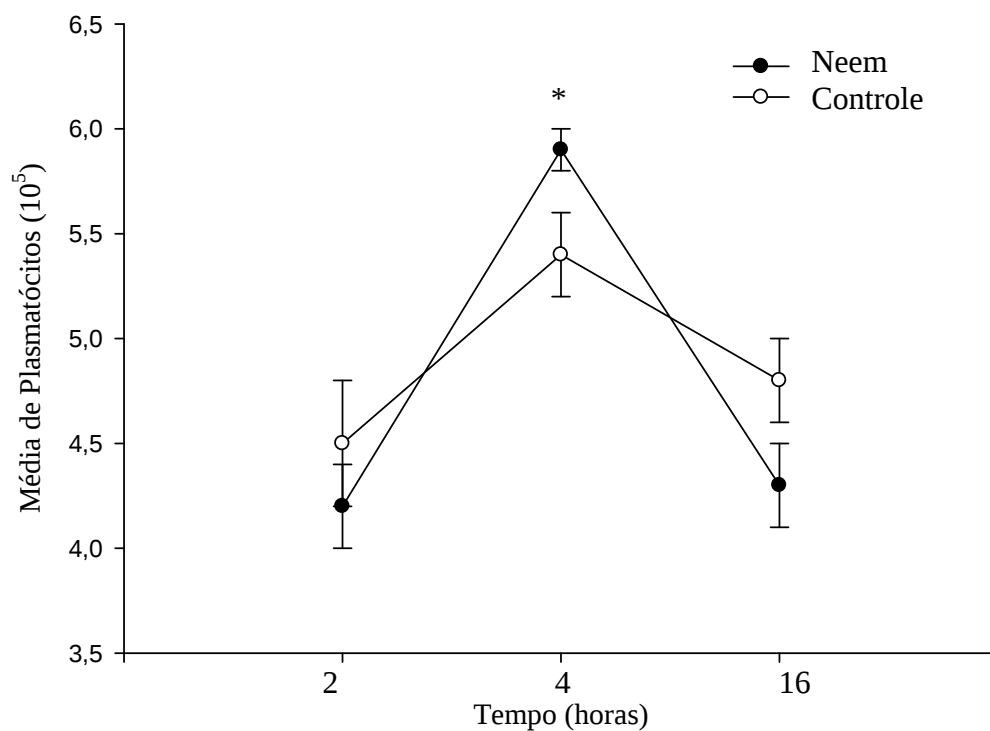


Fig. 3. Plasmatócitos (média $\pm$ SE) de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) no tratamento com óleo de semente de neem.

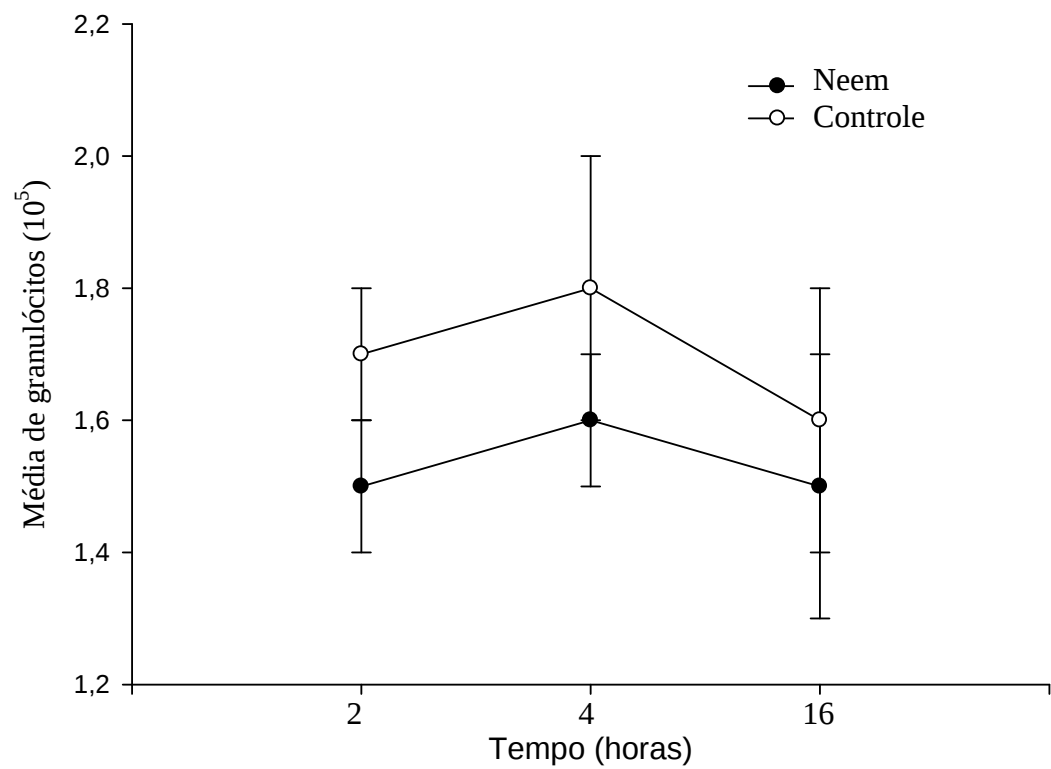


Fig. 4. Granulócitos (média $\pm$ SE) de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) no tratamento com óleo de semente de neem.

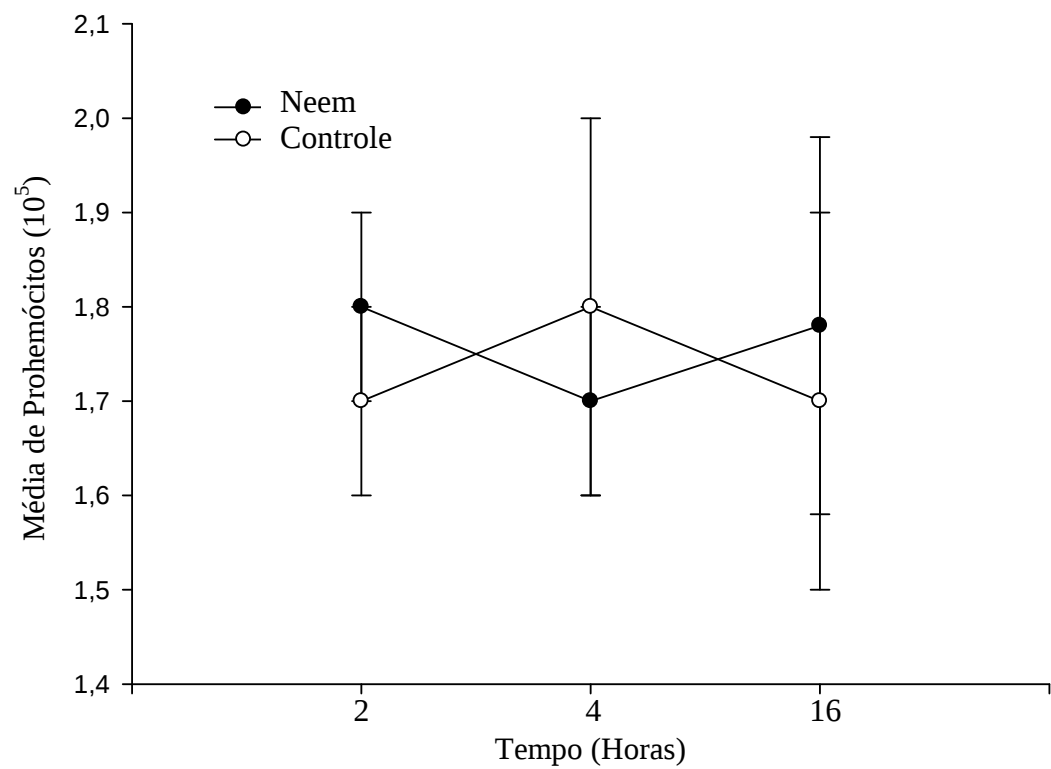


Fig. 5. Prohemócitos (média $\pm$ SE) de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) no tratamento com óleo de semente de neem.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O período ninfal, sobrevivência e características morfométricas do *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae), após ser submetido ao óleo de sementes de neem citado como eficiente contra pragas e seletivo, é importante pois esse predador é distribuído na América do Sul e com potencial para programas de controle biológico. O óleo de sementes de neem reduziu a sobrevivência, o tamanho e o peso de ninfas e adultos de *S. cincticeps* por aplicação tópica, e a morfometria do aparelho reprodutivo desse predador. Isto mostra que o óleo de sementes de neem não é compatível com o percevejo predador *S. cincticeps*.

A ingestão do óleo de neem, em adultos de *S. cincticeps*, não afetou o sistema digestivo, mas o sistema imune celular desse predador foi ativado após quatro horas da ingestão do óleo de neem. Isto demonstra que adultos desse predador possuem mecanismos de defesa ativo após ingerir esse produto.