



ÉRICA JAQUELINE DE MELO GIANI

ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS FRAGMENTOS FOLIARES DE *Passiflora*
suberosa LINNAEUS e *Passiflora misera* HUMBOLDT, BONPLAND & KUNTH
(PASSIFLORACEAE) NA DIGESTÃO DE LARVAS DE *Heliconius erato phyllis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia e Comportamento Animal
Orientador: Prof. Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira
Co-orientador: Prof. Dr. Rinaldo Pires dos Santos

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Porto Alegre

2009

Análise morfológica dos fragmentos foliares de *Passiflora suberosa* Linnaeus e
Passiflora misera Humboldt, Bonpland & Kunth (Passifloraceae) na digestão de larvas
de *Heliconius erato phyllis*

ÉRICA JAQUELINE DE MELO GIANI

Aprovada em _____

Prof. Geraldo Luiz Gonçalves Soares

Prof. Helena Piccoli Romanowski

Prof. Rosy Mary dos Santos Isaias

Aos amores da minha vida Eduardo, Vítor e Vinícius Giani.

AGRADECIMENTOS

Ao Eduardo pelo companheirismo em todas as horas e aos meus dois queridos filhos Vítor e Vinicius pela compreensão da minha ausência.

Dedico também aos meus pais, que sempre me incentivaram e me apoiaram mesmo distantes.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, professor Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela paciência, ensinamentos transmitidos, pelo profissionalismo, pela orientação clara e a preocupação na formação profissional dos seus orientados.

Ao meu co-orientador, o professor Dr. Rinaldo Pires dos Santos, pelo auxílio paciente e pelos ensinamentos técnicos durante a utilização dos equipamentos, preparação e análises da parte botânica no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) do Departamento de Botânica da UFRGS.

Aos colegas deste laboratório, em especial Adriano Silvério, Carla Peregrin, Érica Duarte, Fernanda Silva, Greta Dettke, Natividade Fagundes, Juliana Troleis, Marco Silva e que sempre me receberam e me apoiaram nas etapas de preparação do material vegetal e pela convivência amigável salutar para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Comportamento e Morfologia de Insetos Ana Aymone, Abner Campos, Danessa Boligon, Denis da Silva, Denise Dell'Aglio, Darli Massardo, Kim Barão e Leonardo Jorge pelo o apoio nas situações necessárias, pela amizade e pelo convívio saudável e descontraído tão importantes para o prosseguimento da rotina de trabalho.

Em especial a Ana Aymone por ser mais que uma colega, por ser uma aliada batalhadora na rotina de trabalho de campo, grande incentivadora e amiga sempre presente.

Às colegas que já deixaram o laboratório Josielma Hofman, Elisete Barp e Solange Kerpel pessoas amigas importantes pelos seus conselhos que me auxiliaram direta e indiretamente neste trabalho.

Agradeço a ARACRUZ pelo auxílio na continuidade do trabalho de campo.

À CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Passiflora suberosa e *Passiflora misera* (Passifloraceae) são plantas hospedeiras com estreitas relações com as borboletas *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). Dentre estas relações, destaca-se, por exemplo, *P. misera*, mais consumida, digerida e assimilada por *H. erato phyllis* do que *P. suberosa*. Embora esta contenha maior teor de nutrientes, *P. misera* proporciona desenvolvimento mais rápido das larvas e maior tamanho dos adultos. Sabe-se ainda que os fragmentos menores de *P. misera*, cortados por estas larvas, possuem uma maior superfície exposta relativa ao volume, enquanto que os fragmentos de *P. suberosa* possuem uma maior superfície exposta absoluta. Não se sabe quais são os nutrientes destas passifloráceas, o mecanismo envolvido na sua extração tampouco a existência de um mecanismo de compensação em relação ao tempo no processo digestivo das larvas. Neste estudo, qualificamos os nutrientes das folhas de *P. misera* e *P. suberosa* e o mecanismo envolvido na sua extração, bem como mensuramos o tempo em que são processados. Para isto, analisamos morfologicamente os fragmentos de ambas as passifloráceas obtidas antes da ingestão e no decorrer do processo digestivo das larvas de *H. erato phyllis*. Com a inclusão destes fragmentos em resina, seguida de cortes seriados em micrótomo, foram realizados testes histoquímicos para detecção de polissacarídeos, proteínas e amido, efetuadas comparações quantitativas em relação ao conteúdo citoplasmático remanescente. Finalmente, com o oferecimento de discos foliares corados com Oil Red[®], mensuramos o tempo em que os fragmentos ingeridos percorrem o intestino das larvas de *H. erato phyllis*. Os testes histoquímicos mostraram que o conteúdo protéico apresentou uma configuração irregular após passar pelo processo digestivo. Não ocorreu a extração de pectinas e a absorção do amido foi

completa para ambas as passifloráceas. Os fragmentos de *P. suberosa* apresentaram maior espessura e menor quantidade de células em relação a *P. misera*. Na análise quantitativa, a região central dos fragmentos de *P. misera* e *P. suberosa* apresentou-se significativamente mais preservada. O tempo médio de digestão não diferiu significativamente entre as duas espécies de planta. Infere-se que a assimilação dos nutrientes não diferiu entre as espécies e que há um gradiente de extravasamento, com a ação enzimática a partir da superfície exposta dos fragmentos foliares em direção ao centro destes. Não existe um mecanismo de compensação da digestibilidade pelo tempo de permanência do alimento no trato digestivo para ambas as passifloráceas.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Material e Métodos	8
2.1 Plantas	8
2.2 Criação das larvas	9
2.3 Análise qualitativa	10
2.3.1 Preparação do material para histoquímica	10
2.3.2 Testes histoquímicos	12
2.4 Análise quantitativa	13
2.4.1 Dimensões lineares dos fragmentos foliares	13
2.4.2 Número total de células das seções dos fragmentos	13
2.4.3 Incidência de Células Alteradas (ICA)	14
2.5 Tempo de digestão	15
2.6 Testes estatísticos	16
3. Resultados	16
3.1 Análise qualitativa	16
3.2 Análise quantitativa	36
3.2.1 Dimensões lineares dos fragmentos foliares	36
3.2.2 Número total de células das seções dos fragmentos foliares	36
3.2.3 Cálculo do ICA	36
3.3 Tempo de Digestão	38
4. Discussão	48
5. Considerações finais	55
6. Referências bibliográficas	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cortes transversais das folhas intactas (controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora misera* nas porções intestinais de larvas de *Heliconius erato phyllis*, coradas com Alcian Blue. 18
- Figura 2. Cortes transversais das folhas intactas (controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora suberosa* nas porções intestinais de larvas de *Heliconius erato phyllis*, coradas com Alcian Blue. 19
- Figura 3. Cortes transversais das folhas de *Passiflora misera* intacta (controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora misera* nas porções intestinais de larvas de *H. erato phyllis* coradas com Coomassie Blue 23
- Figura 4. Cortes transversais das folhas intactas (controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora suberosa* nas porções intestinais de larvas de *Heliconius erato phyllis* coradas com Coomassie Blue. 24
- Figura 5. Cortes transversais das folhas intactas (controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora misera* nas porções intestinais de larvas de *Heliconius erato phyllis* coradas com Lugol. 28
- Figura 6. Cortes transversais das folhas intactas (controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora suberosa* nas porções intestinais de larvas de *Heliconius erato phyllis* coradas com Lugol. 29
- Figura 7. Cortes transversais das folhas intactas (controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora misera* nas porções intestinais de larvas de *Heliconius erato phyllis*, submetidas a reação de PAS. 32
- Figura 8. Cortes transversais das folhas intactas (controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora suberosa* nas porções intestinais de larvas de *Heliconius erato phyllis* submetidas a reação de PAS. 33

Figura 9. Cortes transversais das folhas de *Passiflora misera* e de *Passiflora suberosa* intactas (controle) e dos fragmentos foliares de ambas passifloráceas retirados das porções intestinais de larvas de *Heliconius erato phyllis* submetidas ao PAS.

37

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de <i>P. misera</i> no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Alcian Blue.	21
Tabela II. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de <i>P. suberosa</i> no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Alcian Blue.	22
Tabela III. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de <i>P. misera</i> no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Coomassie Blue.	26
Tabela IV. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de <i>P. suberosa</i> no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Coomassie Blue.	27
Tabela V. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de <i>P. misera</i> no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Lugol.	30
Tabela VI. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de <i>P. suberosa</i> no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Lugol.	31
Tabela VII. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de <i>P. misera</i> no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com PAS.	34
Tabela VIII. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de <i>P. suberosa</i> no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com PAS.	35
Tabela IX. Resumo do teste de Kruskal-Wallis, a respeito da influência dos fatores planta (<i>P. misera</i> e <i>P. suberosa</i>), região (início e meio) e seção (A, B e C)	

no ICA dos fragmentos foliares retirados do intestino posterior de larvas de *H. erato phyllis*. 39

Tabela X. Resultado do teste de Kruskal-Wallis, a respeito da influência da seção no ICA dos fragmentos foliares retirados do intestino posterior de larvas de *H. erato phyllis*. 42

1. Introdução

A maioria dos insetos fitófagos absorve e converte uma pequena porção do alimento que consomem sendo o restante eliminado de forma inalterada (CHAPMAN, 1982; KERPEL, 2004). O alimento nesse caso consiste de polissacarídeos (amido, celulose e hemicelulose) e proteínas. Os polissacarídeos são quebrados em monossacarídeos e as proteínas em aminoácidos para serem absorvidos (CHAPMAN, 1982). A habilidade em adquirir aminoácidos essenciais oriundos das proteínas dos tecidos foliares é o principal limitador no desenvolvimento dos insetos (BERNAYS & CHAPMAN, 1994).

A digestão e absorção dos alimentos estão relacionadas as diferentes funções das partes do intestino dos insetos (BERRIDGE, 1970; CHAPMAN, 1982), que se apresenta dividido em três partes: anterior, médio e posterior (SNODGRASS, 1935; CHAPMAN, 1982). O intestino anterior começa na boca que inclui a cavidade pré-oral (com as glândulas salivares), seguida da faringe, o esôfago e o papo. Na cavidade pré-oral, os tecidos vegetais são cortados pelas mandíbulas e manipulados pelas maxilas e labro (CHAPMAN, 1982; 1995; SCHOONHOVEN *et al.*, 1998). Nesta cavidade, as secreções salivares solubilizam o alimento que seguirá para o intestino anterior (CHAPMAN, 1982; 1995). O papo serve para o armazenamento do alimento (TERRA, 1990). O intestino anterior é um tubo reto nos insetos folípagos. Sua origem é ectodérmica, sendo revestido por uma camada de cutícula que sofre ecdise e, em consequência, nele não há absorção de nutrientes (TERRA, 1990), o que foi comprovado em *Erinnys ello* (Sphingidae) (SANTOS *et al.*, 1983). O proventrículo, que é um órgão triturador, presente em alguns insetos, possui uma válvula para o controle da entrada do alimento no intestino médio (TERRA, 1990).

O intestino médio inclui um tubo que liga o intestino anterior ao posterior, com variações no diâmetro longitudinalmente, de origem endodérmica, sem revestimento por cutícula. Em insetos herbívoros, é geralmente curto e amplo, permitindo um alto fluxo de alimentos com baixo teor nutritivo (BILLINGSLEY & LEHANE, 1996). Os insetos, em geral, podem apresentar cecos gástricos em forma de projeções digitiformes. Em larvas de lepidópteros, porém, não há a presença de cecos gástricos (TERRA, 1990). Esta porção do intestino possui alta alcalinidade em larvas de Trichoptera e Lepidoptera, onde o pH varia de 8-10 (CHAPMAN, 1982). Espécies de Sphingidae, Noctuidae e Pyralidae possuem no intestino anterior pH 7,0. Porém, no intestino médio apresentam pH 9,8, na porção média, 10,5 e, na posterior, em torno de 9,5 (TERRA *et al.*, 1996). Esta alcalinidade em Lepidoptera permite o consumo de vegetais ricos em taninos, os quais em condições de pH menores podem dificultar a absorção de proteínas (MARTIN *et al.*, 1987). O intestino médio constitui-se no local de maior produção de enzimas digestivas e onde ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes (CHAPMAN, 1982; TERRA, 1990).

De acordo com TERRA *et al.* (1996), as principais enzimas digestivas são as peptidases (proteases) e as carbohidrases (glicosidades). As peptidases clivam ligações peptídicas e estão divididas em endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases ou proteinases são classificadas em serina-proteinases, cisteína-proteinases, aspartato-proteinases e metaloproteinases. No lúmen do intestino dos insetos, as comumente encontradas são aspartato-proteinases (pepsina) ativas em pH 3 e as serina-proteinases ativas em pH neutro ou alcalino. As principais serina-proteinases são quimiotripsina e tripsina. Em Lepidoptera, a tripsina foi isolada em pH alto com variação entre 9,5-10 (TERRA & FERREIRA, 1994). As exopeptidases são classificadas em aminopeptidase, carboxipeptidase e dipeptidase hidrolisam os aminoácidos resultantes da quebra das

ligações peptídicas pelas endopeptidases. As principais carboidrases presentes nos insetos são a α -amilase, celulasas e glicosidases. A α -amilase (amilase) hidrolisa ligações glicosídicas presentes nas cadeias principais do amido e glicogênio. A celulase hidrolisa a celulose e a glicosidase hidrolisa oligossacarídeos e dissacarídeos (TERRA, 1990).

Em muitos insetos, o intestino médio é delineado por uma membrana peritrófica (MP), que separa o conteúdo do lúmen em dois compartimentos: o espaço ectoperitrófico - lado externo da membrana e o espaço endoperitrófico - lado interno da membrana (TERRA, 1990). A membrana peritrófica (MP) foi descrita originalmente como um saco membranoso que envolve diretamente o alimento no lúmen intestinal (RICHARDS & RICHARDS, 1977; WIGGLESWORTH, 1930). Consiste de uma matriz de carboidratos e proteínas permeada por uma rede de microfibrilas de quitina, de natureza acelular (TERRA, 1990). A MP confere proteção ao epitélio intestinal contra danos mecânicos, agressões patogênicas, toxinas e outros danos químicos. É semipermeável, e dessa forma seletiva, regulando a passagem de moléculas entre os diferentes compartimentos (ectoperitrófico e endoperitrófico) do intestino médio (LEHANE, 1997). Estudos realizados com a larva de *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae) demonstraram que a tripsina e a α -amilase são secretadas no espaço ectoperitrófico e são difundidas para o espaço endoperitrófico, enquanto que a aminopeptidase e trealase são secretadas no espaço ectoperitrófico, mas não atravessam a membrana peritrófica (TERRA *et al.*, 1996). O tamanho das enzimas é um dos fatores de seleção da passagem destas através da MP, ou seja, as enzimas que chegam ao espaço endoperitrófico são menores do que as enzimas que ficam limitadas ao espaço endoperitrófico (SANTOS & TERRA, 1986). A circulação endo-ectoperitrófica das enzimas estudadas no intestino médio de *E. ello*, mostrou que as

enzimas que entram na região anterior do espaço endoperitrófico são recuperadas à medida que hidrolisam os polímeros, tornando-os menores o suficiente para acompanhá-las através da MP. Assim, as enzimas e os nutrientes deslocam-se para a porção anterior do intestino médio, onde ocorre a digestão final e a absorção do alimento, na superfície das células colunares do epitélio (SANTOS & TERRA, 1984). As células colunares auxiliadas pelas caliciformes absorvem água na região anterior e excretam água na região posterior do intestino médio; as células caliciformes também excretam íons de potássio absorvidos dos tecidos vegetais ingeridos pelas larvas (SANTOS & TERRA, 1986). Assim, além da absorção, o papel das células epiteliais do intestino médio é a síntese e a secreção das enzimas digestivas, as quais são secretadas por vesículas na base da região microvilar destas, além de produzir secreções para a formação da membrana peritrófica (BILLINGSLEY & LEHANE, 1996).

Na região do esfíncter posterior (piloro), que demarca a separação do intestino médio com o posterior, inserem-se os túbulos de Malpighi, responsáveis pela excreção. O intestino posterior inclui íleo, colo e reto (que estão envolvidos na absorção de água e íons, através da ação das papilas retais), terminando com o ânus (SNODGRASS, 1935; CHAPMAN, 1982). Em alguns insetos, é reduzido a um tubo reto e, em outros, modificado em uma câmara de fermentação. Ambos podem abrigar microorganismos que colaboram na digestão (TERRA, 1990). A região posterior do intestino é de origem ectodérmica, sendo revestida por uma camada de cutícula, porém mais permeável que a região do intestino anterior (CHAPMAN, 1982). Nesta porção, ocorre a formação dos *pellets* (fezes), que consiste no empacotamento dos restos alimentares não digeridos (BERNAYS & JANZEN, 1988).

Segundo SCRIBER (1982, 1984), o crescimento e a reprodução dependem da capacidade do inseto de ingerir, digerir e converter o nitrogênio da planta de forma

eficiente e rápida. A maior parte do desenvolvimento dos insetos, na natureza, ocorre nas plantas hospedeiras (HANSON, 1983). *Passiflora suberosa* Linnaeus e *Passiflora misera* Humboldt, Bonpland & Kunth (Passifloraceae) são maracujás nativos do Rio Grande do Sul, sendo as espécies mais utilizadas pelas larvas de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) (KERPEL & MOREIRA, 2005); embora as larvas destes heliconíneos possam utilizar várias espécies de passifloráceas como recurso alimentar (BENSON *et al.*, 1976; MENNA-BARRETO & ARAÚJO, 1985). *Passiflora misera* e *Passiflora suberosa* encontram-se em bordas de matas e clareiras, sendo mais freqüentes na Depressão Central (MONDIN, C. & MOREIRA, G. R. P. UFRGS, dados inéditos). *Passiflora suberosa* é uma liana, suberificada nas porções inferiores, com folhas simples trinervadas, de forma variável, no mesmo indivíduo, desde inteiras até profundamente trilobadas (SACCO, 1980). *P. misera* é uma liana de caule angulado, com folhas simples em geral bilobadas, podendo ser trilobadas (SACCO, 1980).

Nas populações naturais destas passifloráceas podem ser encontradas variações nas características morfológicas e nutricionais, provavelmente devido a fatores edáficos e ambientais (BARP *et al.*, 2006). Algumas destas características compõem barreiras físicas e químicas, que podem dificultar a nutrição dos insetos (STRONG *et al.*, 1984), as quais desempenham um importante papel na seleção correspondente pelos insetos herbívoros (FEENY *et al.*, 1983; WOODMAN & FERNANDES, 1991; BERNAYS & CHAPMAN, 1994).

De acordo com PEETERS (2002), a variedade estrutural das folhas influencia a distribuição e o acometimento pelos insetos herbívoros. Assim como a presença de tricomas, cristais, resinas, características da superfície foliar e cutícula podem se constituir em obstáculos físicos e químicos aos insetos (BECERRA 1994; FERNANDES,

1994). Os tricomas podem proteger a planta contra a herbivoria (WOODMAN & FERNANDES, 1991), podendo variar em densidade de acordo com a parte da planta, a idade do tecido considerado e entre populações (COLEY, 1983; WOODMAN & FERNANDES, 1991; MEDEIROS & MOREIRA 2002, 2005). Por exemplo, a presença de tricomas em forma de ganchos, em *Passiflora adenopoda*, age como eficiente obstáculo para o uso da maioria das larvas dos heliconíneos (GILBERT, 1971). Nos primeiros instares de *Gratiana spadicea* (Coleoptera: Chrysomelidae), a presença dos tricomas estrelados de *Solanum sisymbriifolium* (Solanaceae) está associada a uma alta mortalidade destas larvas (MEDEIROS & MOREIRA, 2005). Recentemente, foi detectado que tais tricomas são em parte ingeridos, o que pode estar associado a estes números (BOLIGON *et al.*, submetido).

Já foi constatado em outros insetos que as características físicas das plantas, como o alto grau de dureza nas folhas, também afetam a herbivoria e interferem na forma de suas mandíbulas (RAUPP, 1985; WALLIN, 1988). Para LUCAS *et al.* (2000), a dureza foliar está relacionada com a espessura e estrutura da epiderme, as quais formam uma barreira física para os insetos. Com base neste assunto, SILVEIRA (2002), ao comparar *P. misera* e *P. suberosa*, percebeu que há uma maior dureza foliar em *P. suberosa*, em folhas maduras. A autora constatou também um maior desgaste nas mandíbulas das larvas de *H. erato phyllis* que consomem as folhas mais duras.

KERPEL (2004) aponta que há um menor custo na utilização e um maior aproveitamento dos nutrientes de *P. misera*, ocasionado por características físicas da planta, de menor dureza e espessura. A autora constatou que a diferença entre o peso do alimento ingerido pelas larvas de *H. erato phyllis* e o dos *pellets* foi significativamente maior em *P. misera*, embora esta contenha uma menor concentração de macronutrientes (nitrogênio, cálcio, magnésio, fósforo e potássio), do que *P.*

suberosa. Além disso, *P. misera* proporciona uma maior taxa de crescimento às larvas e maior tamanho aos adultos (RODRIGUES & MOREIRA, 2004), sendo preferida pelas larvas de *H. erato phyllis* (KERPEL & MOREIRA, 2005).

De acordo com KERPEL (2004), os fragmentos encontrados no intestino das larvas de *H. erato phyllis* alimentadas com *P. misera* são significativamente menores do que aqueles de *P. suberosa*. Estes fragmentos de menor tamanho possuem uma área de exposição relativa ao seu volume maior, proporcionando, supostamente, uma ação mais efetiva das enzimas digestivas para acessar os nutrientes intracelulares. Os nutrientes utilizados por um dado inseto herbívoro mastigador são obtidos dos tecidos foliares possivelmente pelo rompimento mecânico da parede celular, acessando o conteúdo interno das células da periferia do fragmento (SLANSKY & RODRIGUEZ, 1987; HOCHULI, 1996). Tem sido inferido que a parede celular não é digerida por muitos insetos (MARTIN, 1991), deste modo, a limitada habilidade de digestão da celulose impõe um limite definitivo no consumo das plantas. Sendo assim, a parede celular pode desempenhar uma defesa fundamental contra a herbivoria (ABE & HIGASHI, 1991). A obtenção dos nutrientes pelos insetos herbívoros mastigadores pode ocorrer através dos plasmodesmos localizados nas paredes celulares, os quais permitem a comunicação entre as células correspondentes permitindo que seus nutrientes sejam difundidos para o exterior (BARBEHENN, 1992; 2005). Assim, a parede celular parece ser uma barreira que os gafanhotos devem romper mecanicamente para assimilar os nutrientes (CLISSOD *et al.*, 2004). Uma explicação para tal, seria que esses insetos absorvem os nutrientes extravasados das células dos tecidos foliares que atravessam o trato digestivo com as paredes celulares intactas, na sua maioria, rompendo somente a membrana celular. Deste modo, os plasmodesmos e

poros da parede celular permitiriam o fluxo de nutrientes das células do mesofilo (BARBEHENN, 2005).

Nenhum estudo abordou quais são os nutrientes de *P. misera* e *P. suberosa* e o mecanismo envolvido na sua extração, bem como a velocidade em que são processados pelas larvas *H. erato phyllis*. Neste trabalho, procuramos verificar se há um gradiente de extravasamento dos nutrientes nos fragmentos foliares após a digestão. Visamos ainda averiguar se a velocidade difere entre as espécies de passifloráceas para identificar possíveis compensações na taxa de digestão. Qualificamos os nutrientes existentes em *P. misera* e *P. suberosa* comparativamente através da histoquímica. Avaliamos a existência de um mecanismo de extravasamento dos nutrientes celulares através de uma análise quantitativa e mensuramos a velocidade em que os fragmentos ingeridos percorrem o intestino das larvas de *H. erato phyllis*.

2. Material e Métodos

2.1 Plantas

Foram coletadas mudas de *Passiflora misera* e *Passiflora suberosa* no Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Estas foram divididas em dois lotes; metade das mudas foi transplantada para vasos plásticos contendo solo enriquecido com matéria orgânica e mantidas em casa de vegetação sob proteção de tela sombrite 50%, no Departamento de Ecologia da UFRGS e, as demais, foram transplantadas para um passifloreto existente no entorno do prédio do Departamento de Zoologia da UFRGS, mantidas com adubação

orgânica. Estas plantas foram cultivadas para produção de ramos, a serem usados na oviposição dos insetos em insetário, descrito a seguir.

Para a criação das larvas em laboratório, análises e testes, foram coletados ramos de *P. misera* e *P. suberosa*, no Horto florestal Barba Negra, pertencente a Aracruz S.A., localizado no município de Barra do Ribeiro, RS (30° 23'S e 51° 12'W). Esta área é dividida em talhões com o predomínio do cultivo de *Eucalyptus* spp. No interior destes talhões, ocorre um sub-bosque composto de espécies nativas. Entre elas, citam-se o *Butia capitata* (Martius) Becc. (Arecaceae) e *Desmodium* sp. (Fabaceae) (CORRÊA *et al.*, 2001). As plantas hospedeiras, *P. misera* e *P. suberosa*, utilizadas pelas larvas de *H. erato phyllis* encontram-se nas bordas destes talhões (RODRIGUES & MOREIRA, 2002).

2.2 Criação das larvas

Os adultos de *H. erato phyllis* foram coletados no Morro Santana, em Porto Alegre, RS (30° 02' S e 51° 09' W), e transferidos para insetário (dividido em compartimentos de 2,0 x 2,0 x 2,7 m, coberto com uma tela de sombrite 50% de cor preta, localizado no Departamento de Ecologia da UFRGS). Neste foram distribuídos cinco indivíduos (fêmeas) em cada compartimento.

Para a manutenção dos adultos, diariamente foi oferecida uma dieta à base de mel, pólen e água destilada, na proporção de 2:1:7 (FERRO, 1998). Para a oviposição dos heliconíneos, foram utilizados ramos de *P. misera*, com meristema apical preservado, contidos em garrafas plásticas providas de uma estrutura de arame e bambu (MUGRABI-OLIVEIRA & MOREIRA, 1996).

Diariamente, foram realizadas a troca do alimento e a coleta de ovos. Os ovos foram transferidos para placas de Petri com papel filtro umedecido. As larvas foram

transferidas para garrafas plásticas providas de armação de arame e bambu, cobertas por tela de malha fina (MUGRABI-OLIVEIRA & MOREIRA, 1996) contendo ramos de *P. suberosa* ou *P. misera*, conforme o experimento a ser realizado. Estas larvas foram dispostas na superfície apical destes ramos e mantidas nestes, em câmara climatizada (14 horas luz/dia, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$) existente no Departamento de Zoologia da UFRGS, até atingirem o quinto ínstar.

2.3 Análise qualitativa

Os estudos relativos à histologia e histoquímica foram desenvolvidos no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da UFRGS.

2.3.1 Preparação do material para histoquímica

Após a muda para o quinto ínstar, as larvas criadas em *P. misera* ($n = 5$) e em *P. suberosa* ($n = 5$) foram dispostas individualmente em potes plásticos com 9,5 cm de diâmetro por 9,0 cm de altura, onde permaneceram em jejum por 24 horas, com a finalidade de provocar o esvaziamento do conteúdo intestinal. Após, receberam 16 discos de folhas maduras removidas do 5° ao 8° nós (do ápice em direção à base) dos ramos das passifloráceas. Os discos foram cortados com um vazador com $63,3 \text{ mm}^2$ de área. Nos potes, as larvas permaneceram se alimentando por um período de 24 horas. Após este período, foram dissecadas, restando somente o tubo digestivo, contendo a cabeça e segmentos terminais do abdômen para a preservação do conteúdo intestinal. A dissecação foi feita através de um corte na região dorsal utilizando-se uma tesoura microcirúrgica.

Os tubos digestivos das larvas foram fixados em tubos de microcentrífuga (1,5ml) em uma mistura de glutaraldeído 2,5 % e formaldeído 2 % em tampão fosfato

de sódio 0,1 M, pH 7,2 (ROLAND & VIAN, 1991), à temperatura ambiente, por 24 horas. Após, foram lavados em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (três vezes, durante quinze minutos cada) e desidratados em série crescente de etanol (10, 30, 50, 70, 90 e 100%; vinte minutos cada) (JOHANSEN, 1940). Finalmente, foram incluídos em resina acrílica à base de hidroxietilmetacrilato (GERRITS & SMID, 1983). O emblocamento do material em resina foi realizado em molde de fundo retangular de papel parafinado, selado em um banho de parafina líquida, adequado ao tamanho do tubo digestivo das larvas. Seções semifinas, de 3 µm de espessura foram feitas em micrótomo de rotação Microm[®] modelo HM 340E equipado com navalhas descartáveis de vidro de 6mm.

Para as amostras comparativas (controle), folhas maduras intactas, removidas do 5° nó (do ápice em direção à base) de *P. misera* e de *P. suberosa*, foram cortadas à mão livre (4 mm²) com o auxílio de navalha descartável de aço e colocadas em tubos de microcentrífuga (1,5ml) fixadas, desidratadas e incluídas em resina acrílica conforme descrito para a preparação do tubo digestivo.

Para a montagem das lâminas histológicas, os tubos digestivos foram seccionados em três partes, correspondendo a cada uma das três porções intestinais (intestino anterior, médio e posterior). De cada porção, foram confeccionadas oito lâminas com cinco cortes, sendo reservadas duas lâminas por porção do intestino para cada um dos testes histoquímicos. Após a coloração com Azul de Toluidina O 0,05% em tampão de benzoato de sódio, pH 4,4 (O'BRIEN & MCCULLY, 1981), foi usado verniz vitral Acrilex[®] 500 (PAIVA *et al.*, 2006) como meio de montagem. Este procedimento foi realizado com os tubos digestivos das larvas alimentadas com *P. misera* e de *P. suberosa*.

Para o controle, foram confeccionadas duas lâminas com cinco cortes para cada um dos quatro testes histoquímicos para cada espécie de passiflorácea.

2.3.2 Testes histoquímicos

Para se identificar quais as substâncias se encontravam nos fragmentos foliares de *P. misera* e de *P. suberosa* retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato phyllis* comparativamente ao controle, foram realizados os seguintes testes histoquímicos: Alcian Blue em solução acética 3 % (LILLIE, 1965), utilizado para a detecção de ácidos mucopolissacarídeos e pectinas; Comassie Blue com concentração de 0,25 % em solução acética 7 % (SOUTHWORTH, 1973), utilizado para a detecção de proteínas totais; Lugol (IKI, Iodeto de potássio e iodo) utilizado para a detecção de amido (JOHANSEN, 1940); Ácido Periódico Reativo de Schiff (PAS), utilizado para a detecção de polissacarídeos totais (O'BRIEN & MCCULLY, 1981). Os cortes foram oxidados com solução aquosa de ácido periódico a 1 % (HIO_4) durante 10 minutos e corados com o Reativo de Schiff por 30 minutos. Este último foi precedido de Azul de Astra com concentração 0,5 % em ácido tartárico 2 % (ROESER, 1972), utilizado para evidenciar parede celular primária seguido de Fucsina Básica utilizada para evidenciar parede celular secundária lignificada e componentes citoplasmáticos (O'BRIEN & MCCULLY, 1981).

As imagens foram obtidas em microscópio óptico Leica® modelo DMR-HC com câmera digital Leica® modelo DFC 500.

2.4 Análise quantitativa

2.4.1 Dimensões lineares dos fragmentos foliares

Foram mensuradas a espessura e a largura dos cortes transversais de cada fragmento foliar de *P. misera* e *P. suberosa* retirados do intestino posterior de larvas de *H. erato phyllis*, com vistas a comparar o tamanho destes fragmentos entre as passifloráceas e, dessa forma, reavaliar a relação de tamanho correspondente observada por KERPEL (1999), citada anteriormente. Tal procedimento justifica-se pelo fato que essa autora deteve-se na quantificação da área dos fragmentos, com base em imagens digitalizadas da superfície destes, não quantificando as medidas lineares correspondentes (espessura e largura).

Tais medidas foram obtidas a partir de 40 lâminas (10 lâminas/região) por passiflorácea, as quais foram montadas e coradas com Ácido Periódico Reativo de Schiff (PAS). Em cada uma das lâminas, foram medidos 5 cortes transversais dos fragmentos foliares de *P. misera* (5 fragmentos/corte) e para *P. suberosa* (4 fragmentos/corte) totalizando 180 medições. Para as observações e medidas foi utilizado microscópio óptico Olympus® modelo CH 30, equipado com ocular micrométrica.

2.4.2 Número total de células das seções dos fragmentos

Para se testar a hipótese de diferença na quantidade de células dos cortes transversais dos fragmentos foliares entre *P. misera* e *P. suberosa*, essas também foram quantificadas. Para isto, as lâminas contendo os cortes foram dispostas sob microscópio Hund® modelo H 500 em (400x) e foram contadas todas as células contidas em cada um dos fragmentos.

2.4.3 Incidência de Células Alteradas (ICA)

Para testar a hipótese da existência de um gradiente de extravasamento, foram quantificadas as células alteradas nas regiões do início (margem) e meio dos fragmentos. Para as comparações entre as regiões foi calculado o Índice de Células Alteradas (ICA). Consideraram-se células alteradas as que apresentaram uma configuração diferente das células dos fragmentos foliares do controle; ou seja, células com formato irregular ou com perda da sua turgidez.

O ICA foi calculado a partir do quociente entre células alteradas e o total de células dos fragmentos foliares retirados do intestino posterior de larvas de *H. erato phyllis*, alimentadas em *P. misera* (n = 5) e em *P. suberosa* (n = 4). Para isto, foram realizados cortes na região do início (margem) dos fragmentos (n = 10) e na região do meio destes (n = 10). Em cada um dos cortes dos fragmentos, foram definidas três seções (A, B e C), onde cada uma das seções corresponde a um terço do total de células do corte. As seções A e C constituem-se nas extremidades dos cortes que compõem as regiões do início e meio dos fragmentos. A seção B na região do meio constitui-se na porção central dos fragmentos.

Para as amostras comparativas (controle) foram removidas folhas maduras do 5º nó (do ápice em direção à base) dos ramos de ambas as passifloráceas. Para cada passiflorácea, foram seccionados cinco fragmentos, de 1mm², à mão livre, com o auxílio de lâmina de aço paralela a nervura central destas folhas. Foram feitos cortes na região do início (n = 5) e na região do meio (n = 5) destes fragmentos.

Os fragmentos retirados do intestino posterior (tratamento) e os do controle foram armazenados em tubos de microcentrífuga (1,5ml), fixados, desidratados e inclusos em resina acrílica conforme descrito no item 2.3.1.

Para a montagem das lâminas, seções semifinas de 3 μm de espessura foram feitas em micrótomo de rotação Microm[®] modelo HM 340E, equipado com navalhas de aço.

Os cortes foram corados com Ácido Periódico Reativo de Schiff (PAS), precedido de Azul de Astra (ROESER,1972) seguido de Fucsina Básica (O'BRIEN & MCCULLY, 1981) e analisados em microscópio Hund[®] modelo H 500. As imagens foram obtidas em microscópio óptico Leica[®] modelo DMR-HC com câmera digital Leica[®] modelo DFC 500.

2.5 Tempo de digestão

Para se verificar a existência de um mecanismo de compensação, foi medido o tempo de passagem dos fragmentos foliares de ambas as passifloráceas pelo trato digestivo das larvas. Foi definido como tempo de digestão, o período compreendido entre a ingestão do primeiro fragmento dos discos foliares até a formação do primeiro *pellet* (fezes). Este tempo foi mensurado em câmara climatizada (14 horas luz/dia, 25 \pm 1°C), com larvas de quinto ínstar de *H. erato phyllis* para *P. misera* (n = 20) e para *P. suberosa* (n = 20), mantidas isoladamente em potes plásticos. Inicialmente, foram oferecidos três discos foliares de 63,3 mm² de área, por um período de 2 horas. Após este período, foi oferecido um disco foliar corado com Oil Red[®] O Sigma por 1 hora, sendo medido o tempo até a formação do primeiro *pellet* corado. Os *pellets* foram identificados sob lupa Wild[®] M125.

Os discos foliares corados utilizados no experimento foram cortados com um vazador. Após, foram perfurados com o auxílio de uma pinça na sua superfície adaxial e corado com uma solução do corante biológico. Para a preparação da solução do

corante, foi misturado 0,05 g/Kg do corante Oil Red[®] O Sigma em 10ml/Kg de etanol absoluto (STEPHENS *et. al*, 2008).

Para se testar a hipótese de influência do corante no tempo de digestão, foi realizado um experimento similar ao descrito anteriormente, alterando-se a ordem de oferecimento dos discos. Ou seja, primeiro foram oferecidos discos corados e, após, discos não corados. Este procedimento consistiu no tratamento (controle), para larvas de *H. erato phyllis* alimentadas com *P. misera* (n = 20) e *P. suberosa* (n = 16).

2.6 Testes estatísticos

Os dados foram avaliados inicialmente quanto à normalidade, perante o teste de Kolmogorov-Smirnov e, a homocedasticidade, perante o teste de Bartlett. Após, as medidas lineares (altura e largura) das seções transversais dos fragmentos foliares de *P. misera* e *P. suberosa* foram comparadas com o teste não paramétrico U de Mann-Whitney; a quantidade de células das seções transversais comparadas com o teste *t* de Welch; o ICA com o teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas de Dunn e, o tempo de digestão, por meio de ANOVA, seguida de comparações múltiplas de Tukey. Para estes testes estatísticos, foi considerado $\alpha = 0,05$. Para a execução destes testes foi utilizado o software InStat3, v.3.01, seguindo-se os procedimentos descritos em CONOVER (1980) para os testes não-paramétricos e SNEDECOR & COCHRAN (1989) para os testes paramétricos. Os resultados encontram-se representados pelas médias aritméticas e respectivos erros padrões ($\bar{x} \pm EP$), a menos que explicitado.

3. Resultados

3.1 Análise qualitativa

O limbo das folhas maduras de *P. misera*, em seção transversal, apresentou epiderme uniestratificada, com paredes primárias periclinais externas mais espessas na face adaxial. Além disso, suas células possuíam aspecto papiloso e com estômatos somente na face abaxial. Nos fragmentos foliares analisados nas três porções intestinais das larvas de *H. erato phyllis*, em seção transversal, a anatomia geral das células epidérmicas foi compatível com a das folhas maduras (controle). Verificou-se que, em geral, algumas células do parênquima paliçádico, na região do intestino médio, apresentaram paredes sinuosas e sem o aspecto de turgidez encontrado nas células do controle e do intestino anterior. Observou-se ainda a presença de drusas de oxalato de cálcio no vacúolo das células do parênquima esponjoso nos fragmentos foliares de *P. misera* nas três porções intestinais e controle. A bainha perivascular, nos feixes vasculares colaterais, é parenquimática nas folhas de *P. misera* (Fig. 1)

O limbo das folhas maduras de *P. suberosa*, em seção transversal, se diferenciou de *P. misera* por apresentar a parede periclinal externa na face adaxial mais espessa e as paredes anticlinais levemente sinuosas e finas nas células na face adaxial. A anatomia geral das células epidérmicas dos fragmentos foliares, nas três porções intestinais das larvas de *H. erato phyllis*, foi compatível com aquela das folhas do controle (Fig. 2).

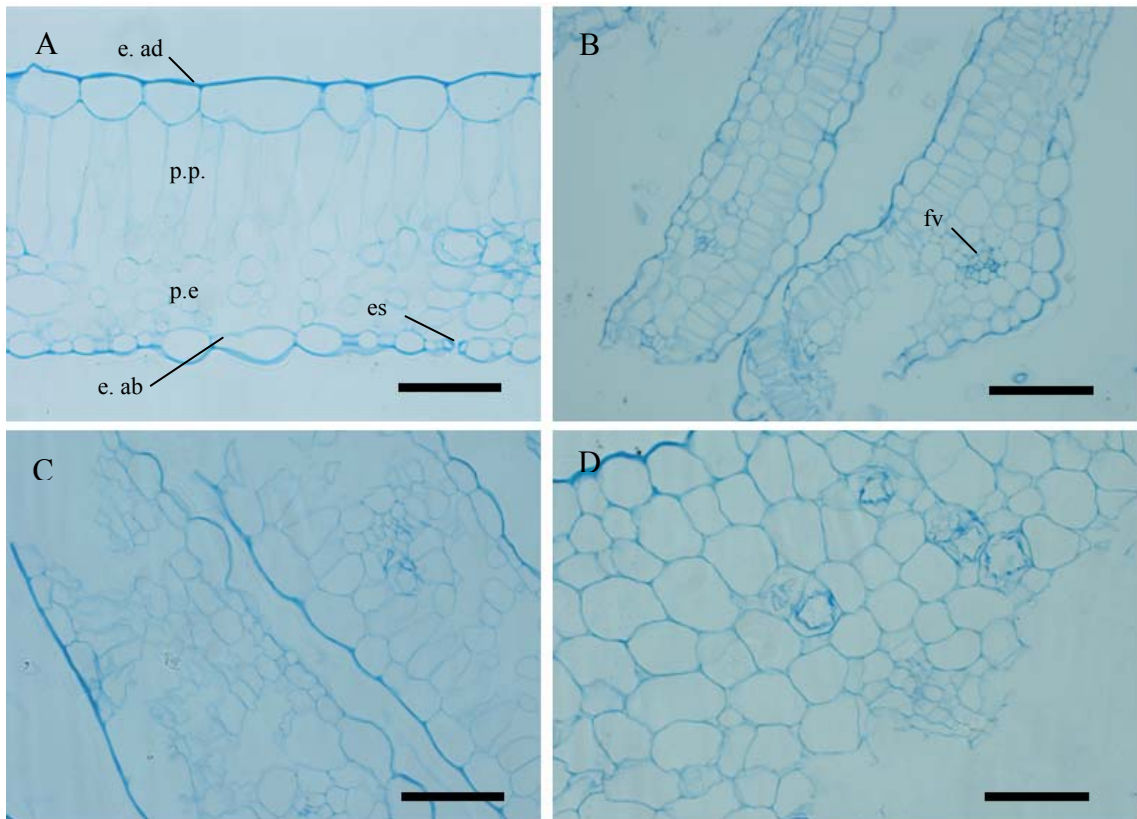


Figura 1. Seção transversal do limbo foliar (folha intacta, controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora misera* nas porções intestinais de larvas de *H. erato phyllis*, coradas com Alcian Blue. A) Controle, B) Intestino anterior, C) Intestino médio e D) Intestino posterior. **e.ab**, epiderme da face abaxial; **e.ad**, epiderme da face adaxial; **es**, estômato; **fv**, feixe vascular; **id**, idioblasto com drusa; **p.e.**, parênquima esponjoso; **p.p.**, parênquima paliçádico. Barras = 50 µm.

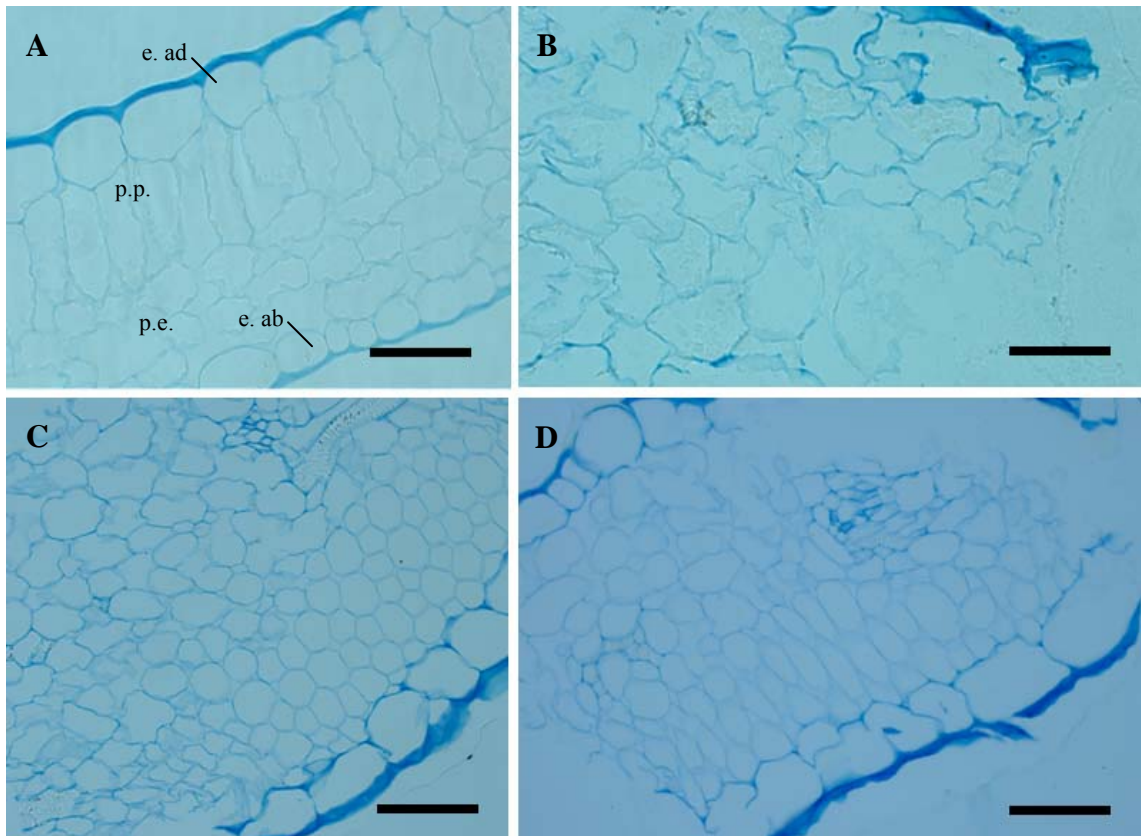


Figura 2. Seção transversal do limbo foliar (folha intacta, controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora suberosa* nas porções intestinais de larvas de *H. erato phyllis*, coradas com Alcian Blue. A) Controle, B) Intestino anterior, C) Intestino médio. D) Intestino posterior. **e.ab**, epiderme da face abaxial; **e.ad**, epiderme da face adaxial; **fy**, feixe vascular; **p.e.**, parênquima esponjoso; **p.p.**, parênquima paliçádico. Barras = 50 µm.

O teste histoquímico com Alcian Blue, em *P. misera*, foi positivo para a detecção de pectinas nas paredes celulares das células epidérmicas (coradas de azul claro) (Tab. I).

Em *P. suberosa*, o teste histoquímico com Alcian Blue foi positivo, corando em azul mais intenso as pectinas nas paredes periclinais externas mais espessas das células epidérmicas (Tab. II).

As células do limbo foliar de *P. misera*, no teste com Coomassie Blue, não mostraram proteínas de reserva, revelando somente aquelas proteínas estruturais e enzimáticas presentes no citoplasma e suas organelas. Não houve reação positiva nas paredes celulares. Ao longo do tubo digestivo, observou-se que a disposição do conteúdo citoplasmático (protéico) existente nas células do mesofilo foliar de *P. misera*, nas três porções intestinais, apresentou uma organização diferente da encontrada no controle. Esta disposição do conteúdo citoplasmático apresentou-se dispersa no intestino anterior e mais irregular, aglomerada e centralizada nos intestinos médio e posterior (Fig. 3).

No mesofilo dos fragmentos foliares de *P. suberosa*, o conteúdo protéico, evidenciado em azul, apresentou-se mais disperso nas células das três porções intestinais em relação à configuração do controle (Fig. 4).

Tabela I. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de *P. misera* no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Alcian Blue (+ intenso; ++ muito intenso; – ausente).

Tecidos	Controle	IA	IM	IP
Epiderme na face adaxial	+	+	+	+
Epiderme na face abaxial	+	+	+	+
Parênquima paliçádico	+	+	+	+
Parênquima esponjoso	+	+	+	+

O sinal + indica coloração da parede celular primária.

Tabela II. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de *P.suberosa* no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Alcian Blue (+ intenso; ++ muito intenso; – ausente).

Tecidos	Controle	IA	IM	IP
Epiderme na face adaxial	+	+	+	+
Epiderme na face abaxial	+	+	+	+
Parênquima paliçádico	+	+	+	+
Parênquima esponjoso	+	+	+	+

O sinal + indica coloração da parede celular primária.

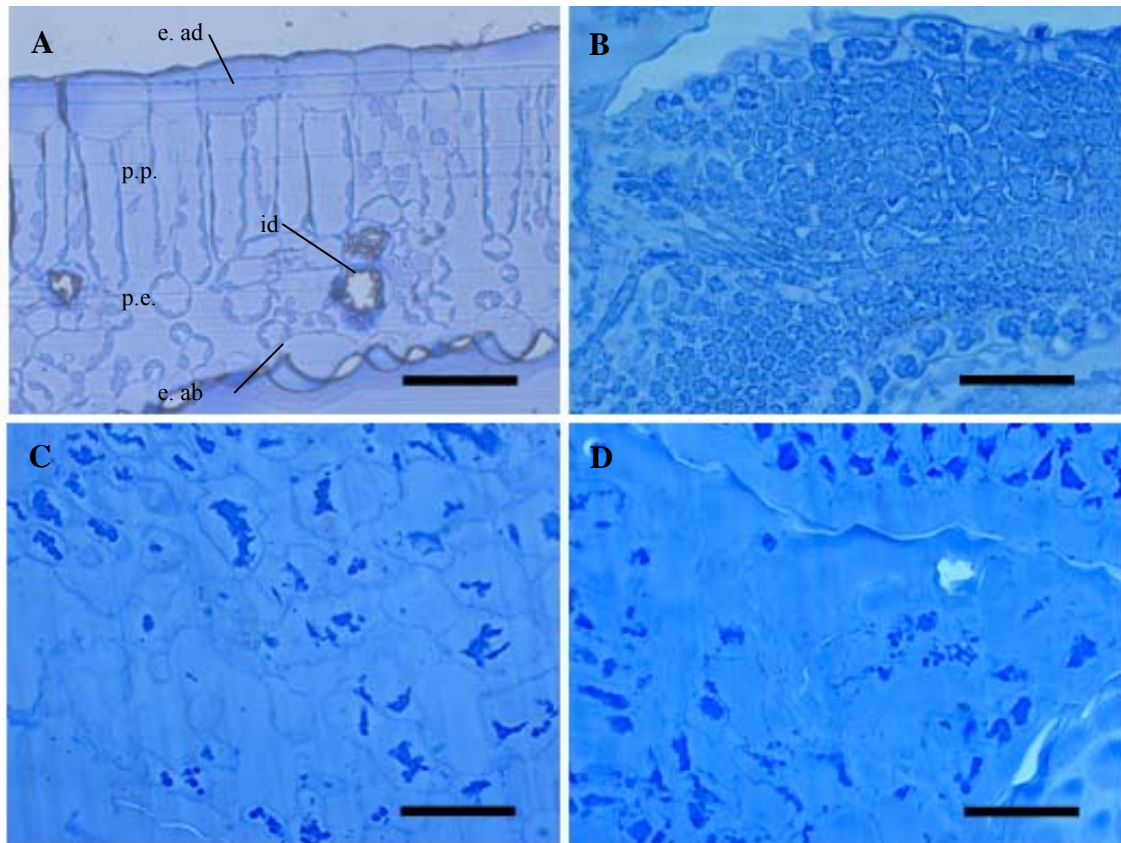


Figura 3. Seção transversal do limbo foliar (folha intacta, controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora misera* nas porções intestinais de larvas de *H. erato phyllis* coradas com Coomassie Blue. A) Controle, B) Intestino anterior, C) Intestino médio e D) Intestino posterior. **e.ab**, epiderme da face abaxial; **e.ad**, epiderme da face adaxial; **id**, idioblasto contendo drusa; **p.e.**, parênquima esponjoso; **p.p.**, parênquima paliçádico. Barras = 50 μ m.

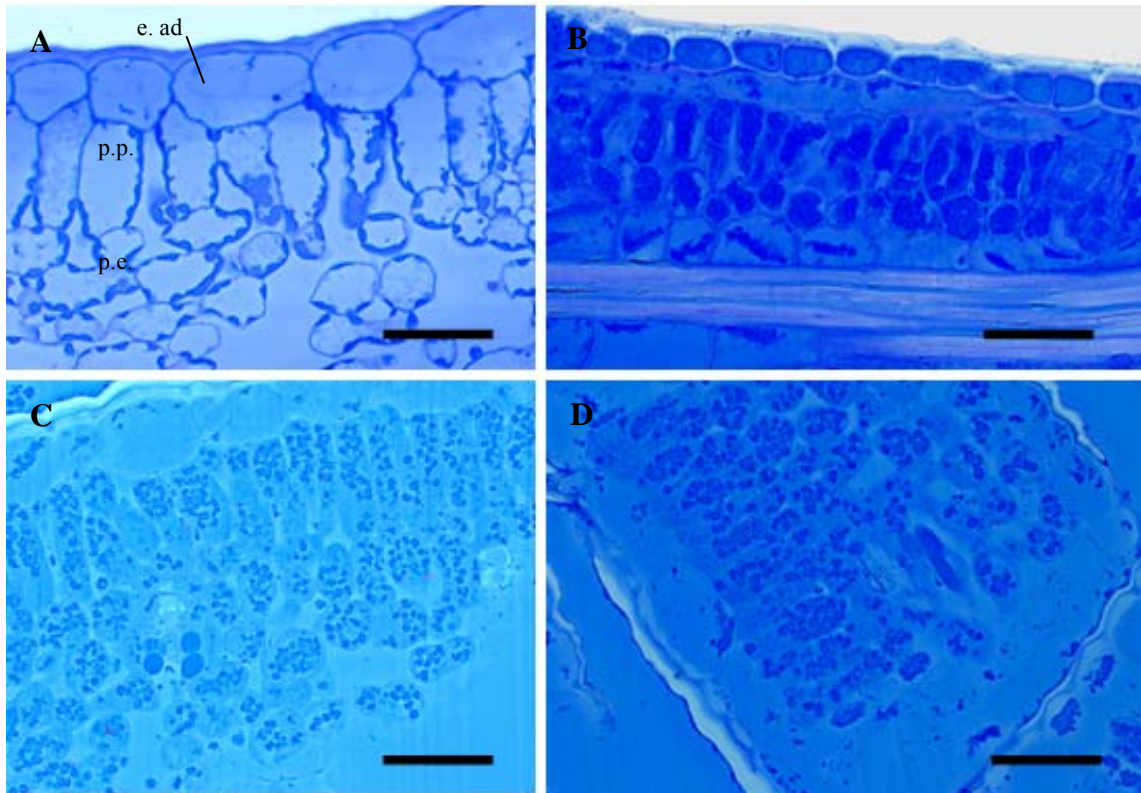


Figura 4. Seção transversal do limbo foliar (folha intacta, controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora suberosa* nas porções intestinais de larvas de *H. erato phyllis* coradas com Coomassie Blue. A) Controle, B) Intestino anterior, C) Intestino médio e D) Intestino posterior. **e.ad**, epiderme da face adaxial; **p.e.**, parênquima esponjoso; **p.p.**, parênquima paliçádico. Barras = 50 μ m.

Nos fragmentos foliares de *P. misera* e *P. suberosa* analisados nas três porções intestinais e controle, visualizou-se o conteúdo protéico (cloroplastos, núcleo e citoplasma) em azul intenso (Tab. III, IV).

A reação com Lugol (IKI) apresentou resultado semelhante para *P. misera* (Fig. 5) e para *P. suberosa* (Fig. 6). Foi positiva para a detecção de pequenos grãos de amido, com coloração marrom escura no interior dos cloroplastos no mesofilo para o intestino anterior (como no controle). Nas células do mesofilo dos fragmentos foliares, de ambas as passifloráceas, analisadas no intestino médio e posterior, não se evidenciou a presença de amido (Tab. V, VI).

A reação do PAS, combinado com Azul de Astra e Fucsina Básica, indicou reação positiva com coloração intensa na parede celular primária (corada em azul) e citoplasma (corado em rosa claro) em todos os tecidos do mesofilo foliar de *P. misera* e *P. suberosa*. O PAS também indicou reação positiva para os grãos de amido (corados em rosa escuro) nas células dos fragmentos foliares do controle e intestino anterior. Houve reação positiva para grãos de amido nas células-guarda nos tecidos foliares dos fragmentos analisados no intestino médio e posterior de *P. misera* (Fig. 7) e *P. suberosa* (Fig. 8). Os grãos de amido não foram identificados nas células do mesofilo foliar dos fragmentos do intestino médio e posterior (Tab.VII, VIII).

Tabela III. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de *P.misera* no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Coomassie Blue (+ intenso; ++ muito intenso; – ausente).

Tecidos	Controle	IA	IM	IP
Epiderme na face adaxial	+	+	+	+
Epiderme na face abaxial	+	+	+	+
Parênquima paliçádico	++	++	++	++
Parênquima esponjoso	++	++	++	++

O sinal + indica coloração de organelas (cloroplastos, por exemplo), núcleo e citoplasma.

Tabela IV. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de *P. suberosa* no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Coomassie Blue (+ intenso; ++ muito intenso; – ausente).

Tecidos	Controle	IA	IM	IP
Epiderme na face adaxial	+	+	+	+
Epiderme na face abaxial	+	+	+	+
Parênquima paliçádico	++	++	++	++
Parênquima esponjoso	++	++	++	++

O sinal + indica coloração de organelas (cloroplastos, por exemplo), núcleo e citoplasma.

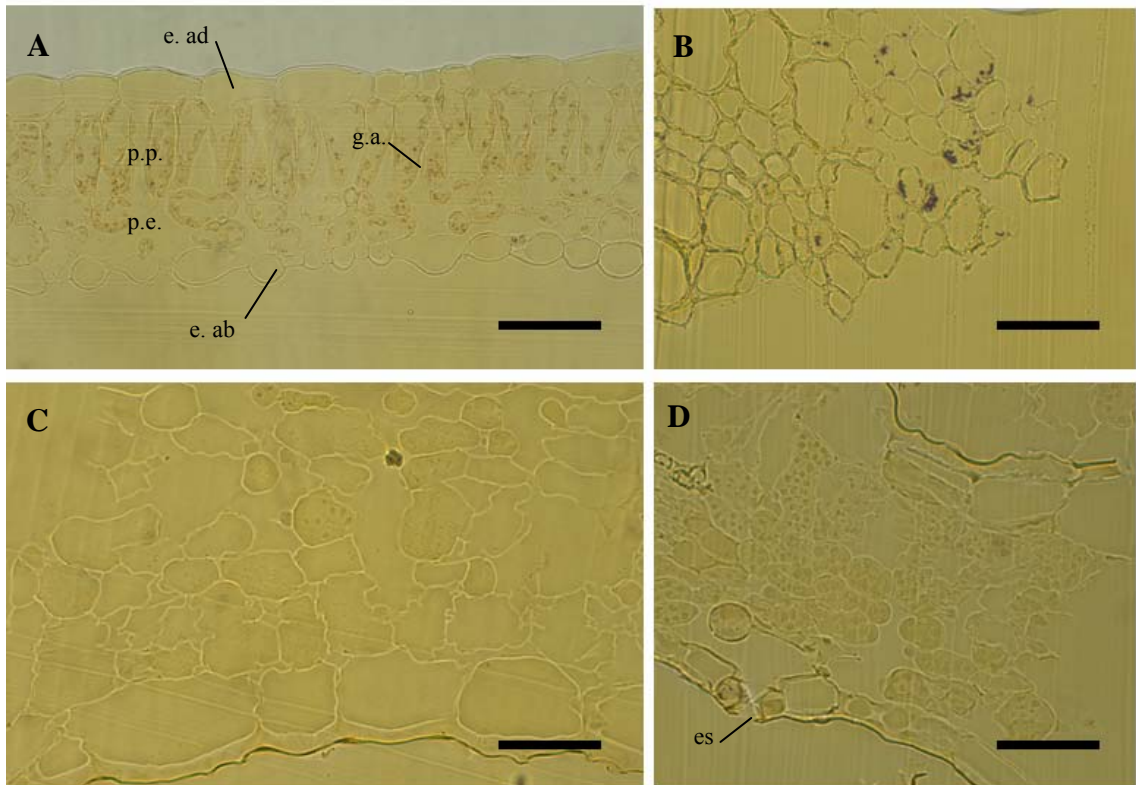


Figura 5. Seção transversal do limbo foliar (folha intacta, controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora misera* nas porções intestinais de larvas de *H. erato phyllis* coradas com Lugol. A) Controle, B) Intestino anterior, C) Intestino médio e D) Intestino posterior. **e.ab**, epiderme da face abaxial; **e.ad**, epiderme da face adaxial; **es**, estômato; **g.a.**, grãos de amido; **p.e.**, parênquima esponjoso; **p.p.**, parênquima paliádico. Barras = 50 µm.

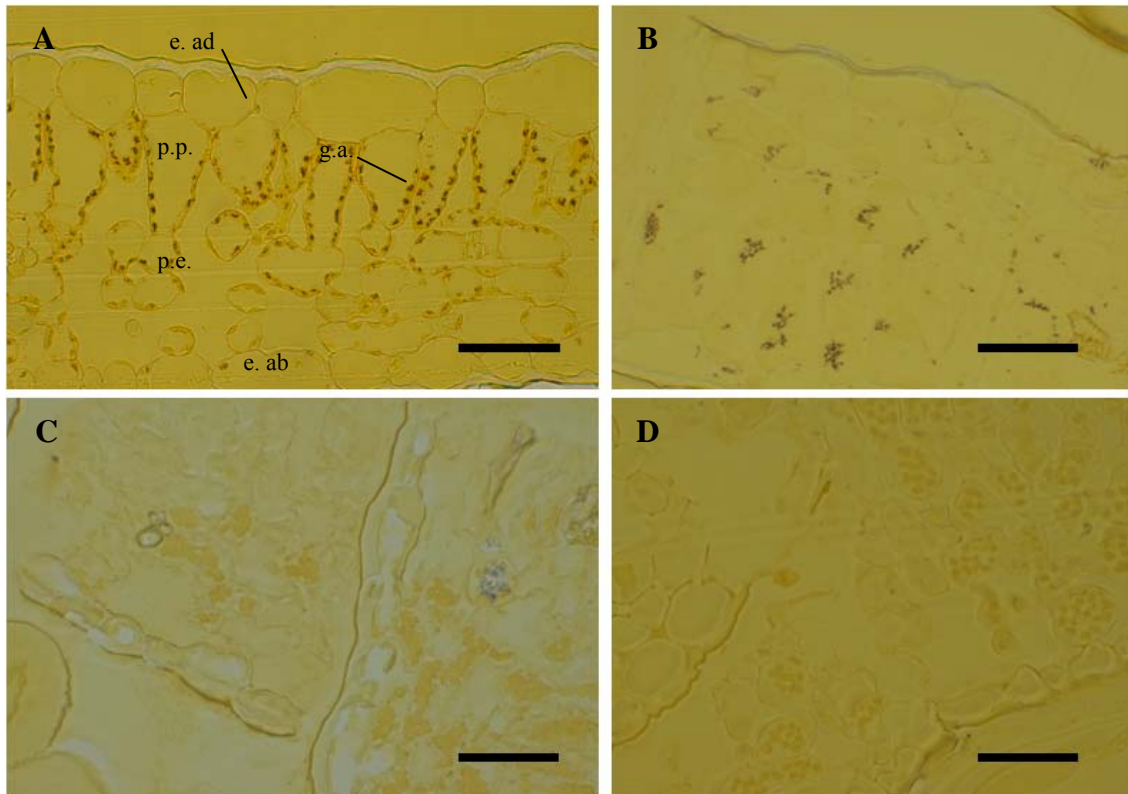


Figura 6. Seção transversal do limbo foliar (folha intacta, controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora suberosa* nas porções intestinais de larvas de *H. erato phyllis* coradas com Lugol. A) Controle, B) Intestino anterior, C) Intestino médio e D) Intestino posterior. **e.ab**, epiderme abaxial; **e.ad**, epiderme adaxial; **g.a.**, grãos de amido; **p.e.**, parênquima esponjoso; **p.p.**, parênquima paliçádico. Barras = 50 μ m.

Tabela V. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de *P. misera* no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Lugol (+ intenso; ++ muito intenso; – ausente).

Tecidos	Controle	IA	IM	IP
Epiderme na face adaxial	–	–	–	–
Epiderme na face abaxial	–	–	–	–
Parênquima paliçádico	+	+	–	–
Parênquima esponjoso	+	+	–	–

O sinal + indica coloração dos grãos de amido.

Tabela VI. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de *P. suberosa* no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com Lugol (+ intenso; ++ muito intenso; – ausente).

Tecidos	Controle	IA	IM	IP
Epiderme na face adaxial	–	–	–	–
Epiderme na face abaxial	–	–	–	–
Parênquima paliçádico	+	+	–	–
Parênquima esponjoso	+	+	–	–

O sinal + indica coloração dos grãos de amido.

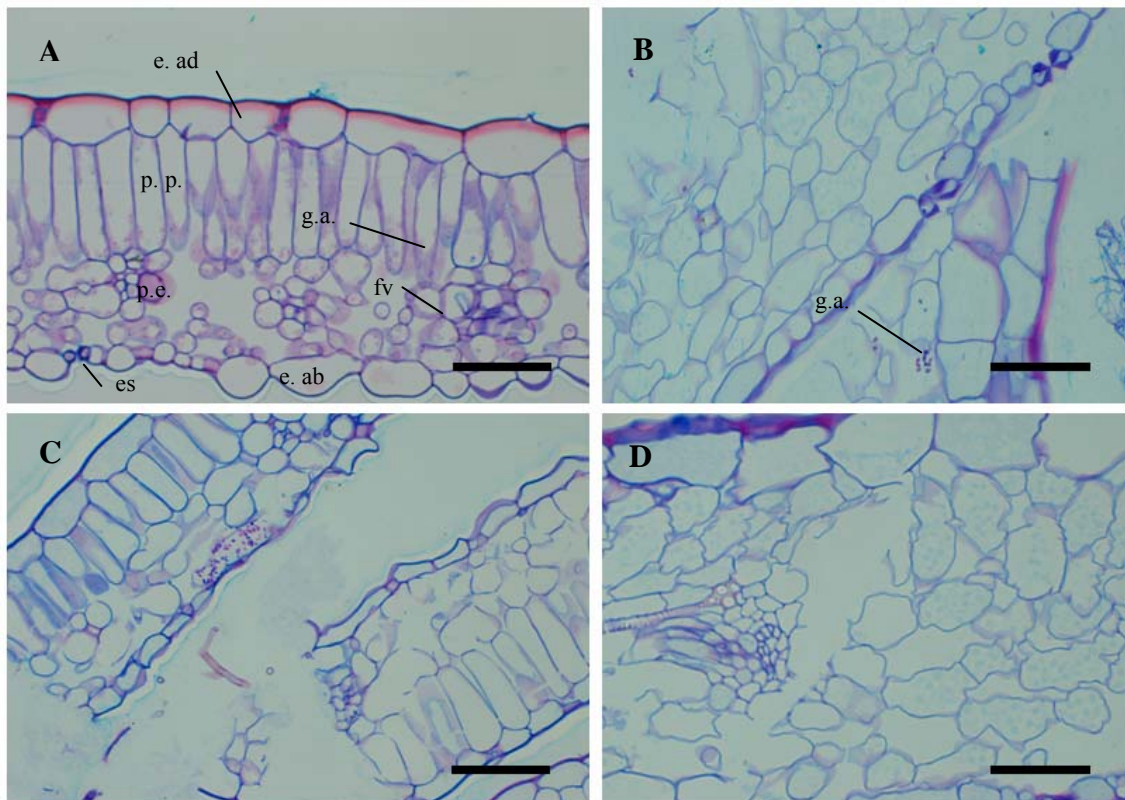


Figura 7. Seção transversal do limbo foliar (folha intacta, controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora misera* nas porções intestinais de larvas de *H. erato phyllis*, coradas com a reação de PAS (precedida de Azul de Astra, seguido de Fucsina Básica). A) Controle, B) Intestino anterior, C) Intestino médio e D) Intestino posterior. **e.ab**, epiderme da face abaxial; **e.ad**, epiderme da face adaxial; **es**, estômato; **fv**, feixe vascular; **g.a.**, grãos de amido; **p.e.**, parênquima esponjoso; **p.p.** parênquima paliçádico. Barras = 50 µm.

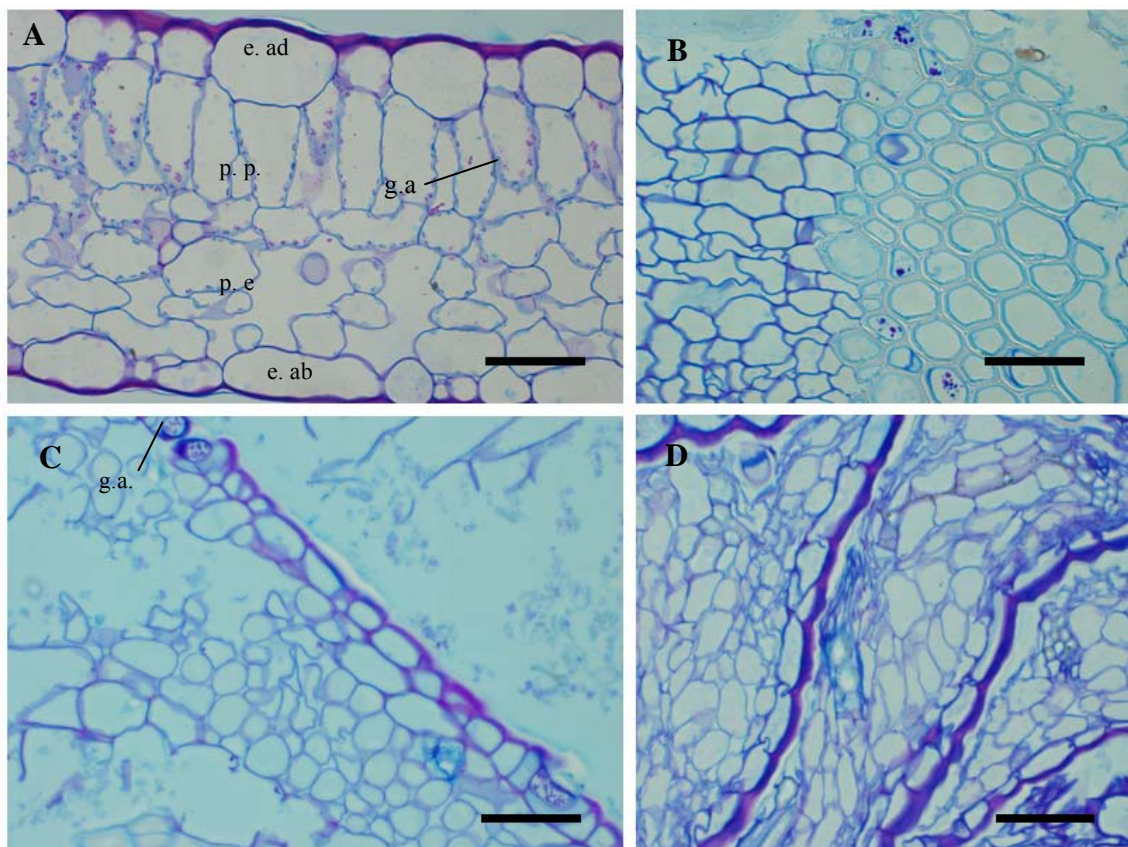


Figura 8. Seção transversal do limbo foliar (folha intacta, controle) e dos fragmentos foliares de *Passiflora suberosa* nas porções intestinais de larvas de *H. erato phyllis* coradas com a reação de PAS (precedida de Azul de Astra, seguida de Fucsina Básica. A) Controle, B) Intestino anterior, C) Intestino médio e D) Intestino posterior. **e.ab**, epiderme da face abaxial; **e.ad**, epiderme da face adaxial; **g.a.**, grãos de amido; **p.e.**, parênquima esponjoso; **p.p.** parênquima paliçádico. Barras = 50 μ m.

Tabela VII. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de *P. misera* no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com PAS. (+ intenso; ++ muito intenso; – ausente).

Tecidos	Controle	IA	IM	IP
Epiderme na face adaxial	–	–	–	–
Epiderme na face abaxial	–	–	–	–
Parênquima paliçádico	+	+	–	–
Parênquima esponjoso	+	+	–	–

O sinal + indica reação positiva para o amido.

Tabela VIII. Resposta histoquímica de folhas intactas e dos fragmentos foliares de *P. suberosa* no intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) corados com PAS (+ intenso; ++ muito intenso; – ausente).

Tecidos	Controle	IA	IM	IP
Epiderme na face adaxial	–	–	–	–
Epiderme na face abaxial	–	–	–	–
Parênquima paliçádico	+	+	–	–
Parênquima esponjoso	+	+	–	–

O sinal + indica reação positiva para o amido

3.2 Análise quantitativa

3.2.1 Dimensões lineares dos fragmentos foliares

A espessura média das seções dos fragmentos foliares retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato pyhllis* foi de $121,25 \pm 3,75 \mu\text{m}$ ($n = 100$) para *P. misera* e de $164,06 \pm 3,44 \mu\text{m}$ ($n = 80$) para *P. suberosa*. A espessura média destas seções diferiu significativamente entre as passifloráceas (teste de Mann-Whitney, $\rho < 0,0001$). A largura média das seções destes fragmentos foi de $384,4 \pm 5,8 \mu\text{m}$ ($n = 100$) para *P. misera* e de $373,8 \pm 5,9 \mu\text{m}$ ($n = 80$) para *P. suberosa*. Não ocorreu diferença significativa entre as passifloráceas (teste de Mann-Whitney, $\rho = 0,32$).

3.2.2 Número total de células das seções dos fragmentos foliares

O número de células das seções dos fragmentos foliares, retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato pyhllis*, diferiu significativamente entre as passifloráceas (teste *t* de Welch = 9,76, $\rho < 0,0001$). *P. misera* apresentou, em média, $125 \pm 3,5$ células ($n = 100$) e *P. suberosa* apresentou $89 \pm 1,3$ células ($n = 80$) por fragmento.

3.2.3 Cálculo do ICA

A anatomia geral dos fragmentos foliares da região do início e meio de *P. misera* e *P. suberosa* foi compatível com a das folhas maduras (controle) conforme descrito no item 3.1. Os fragmentos foliares de ambas as passifloráceas apresentaram células alteradas no parênquima paliçádico e esponjoso. Em ambas as regiões (início e meio), estas células apresentaram paredes sinuosas e sem o aspecto de turgidez encontrado nas células do controle (Fig. 9).

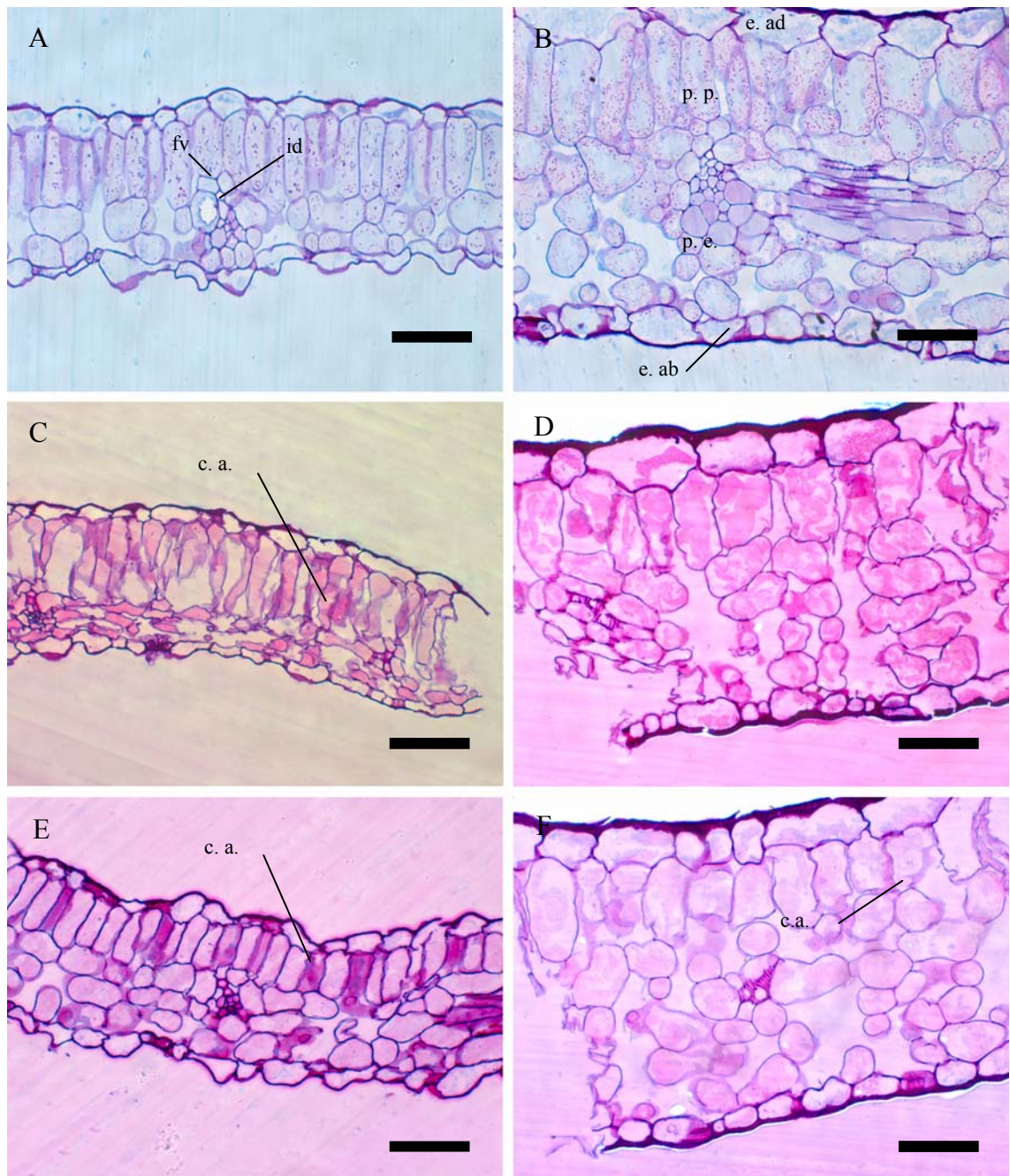


Figura 9. Cortes transversais do limbo foliar de *Passiflora misera* e *Passiflora suberosa*, intactas (controle) e dos fragmentos do limbo de ambas passifloráceas, retirados das porções intestinais de larvas de *H. erato phyllis*, coradas com PAS. A) *P. misera*, controle; B) *P. suberosa*, controle; C) região inicial dos fragmentos de *P. misera*; D) região inicial dos fragmentos de *P. suberosa*; E) região mediana dos fragmentos de *P. misera* e F) região mediana dos fragmentos de *P. suberosa*. **c.a.**, células alteradas; **e.ab**, epiderme abaxial; **e.ad**, epiderme adaxial; **id**, idioblasto com drusa; **es**, estômato; **fv**, feixe vascular, **pe**, parênquima esponjoso; **p.p.**, parênquima paliçádico. Barras = 100 μm .

Para o cálculo do ICA, foram analisados os fatores planta, região e seção (Tab. IX). Ocorreu diferença significativa do ICA entre as regiões do início e meio de *P. misera* e de *P. suberosa* (Fig. 10, 11). Considerando as seções individualmente, os dados obtidos mostraram que houve diferença significativa entre estas em relação aos fatores planta e região (Tab. X). Ocorreu diferença significativa entre as seções da região do início dos fragmentos de *P. misera* (fig. 12) e de *P. suberosa* (fig. 13). Da mesma forma, entre as seções da região do meio dos fragmentos de *P. misera* (fig. 14) e de *P. suberosa* (fig. 15).

3.3 Tempo de Digestão

O tempo de passagem dos fragmentos foliares de *P. misera* e de *P. suberosa* pelo tubo digestivo das larvas de *H. erato phyllis* não diferiu significativamente (Fig. 16).

O tempo de digestão para *P. misera* apresentou um intervalo de 22 a 108 minutos e, para *P. suberosa*, de 20 a 100 minutos. Para o controle do tempo de digestão de *P. misera*, o intervalo foi de 20 a 109 minutos e, para *P. suberosa*, de 23 a 98 minutos.

Tabela IX. Resumo do teste de Kruskal-Wallis, a respeito da influência dos fatores planta (*P. misera* e *P. suberosa*), região (início e meio) e seção (A, B e C) no Índice de células alteradas (ICA) dos fragmentos foliares retirados do intestino posterior de larvas de *H. erato phyllis*. Asteriscos indicam diferença significativa.

Parâmetro	Fator	N	Soma do ranking	GL	KW	ρ	
ICA	Planta	300	<i>P. misera</i>	74.412	1	29.262	<0,0001*
		240	<i>P. suberosa</i>	71.658			
ICA	Região	270	Início	80.629	1	44.044	<0,0001*
		270	Meio	65.441			
ICA	Seção	180	A	55.045	2	98.161	<0,0001*
		180	B	31.957			
		180	C	59.068			

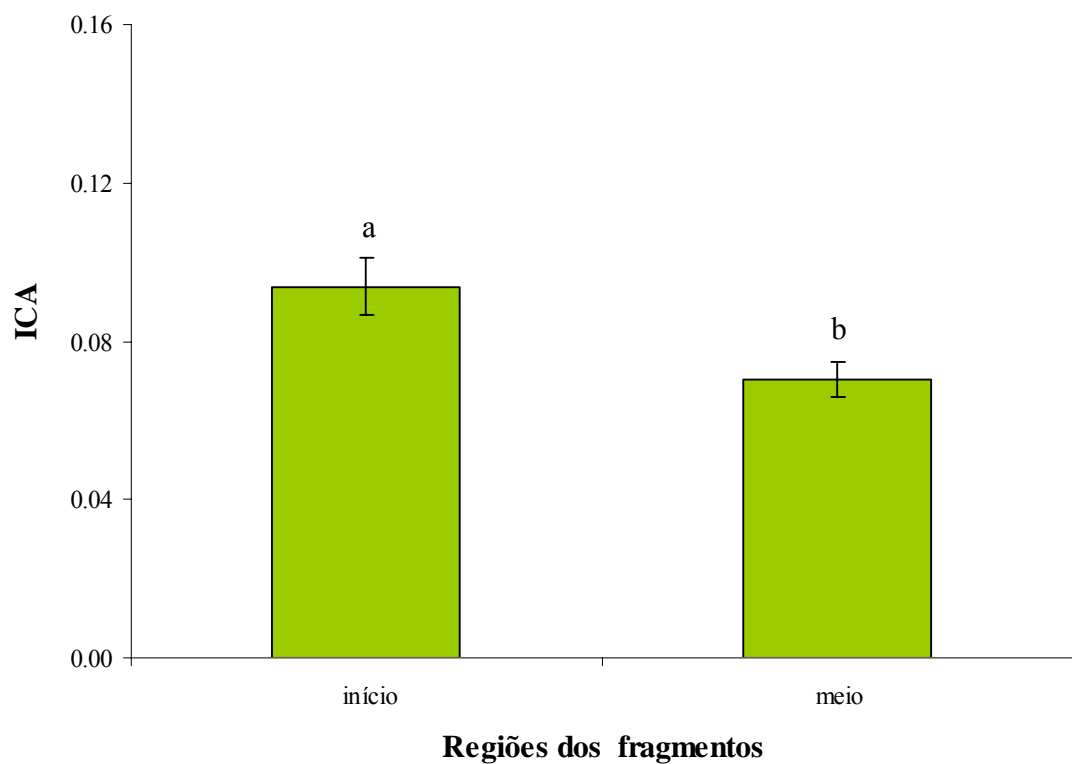


Figura 10. Índice de células alteradas (média \pm erro padrão) das regiões dos fragmentos de *P. misera* retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato phyllis*. Letras diferentes indicam diferença significativa (teste *t* de Welch = 2,672, $n = 50$, $\alpha = 0,05$).

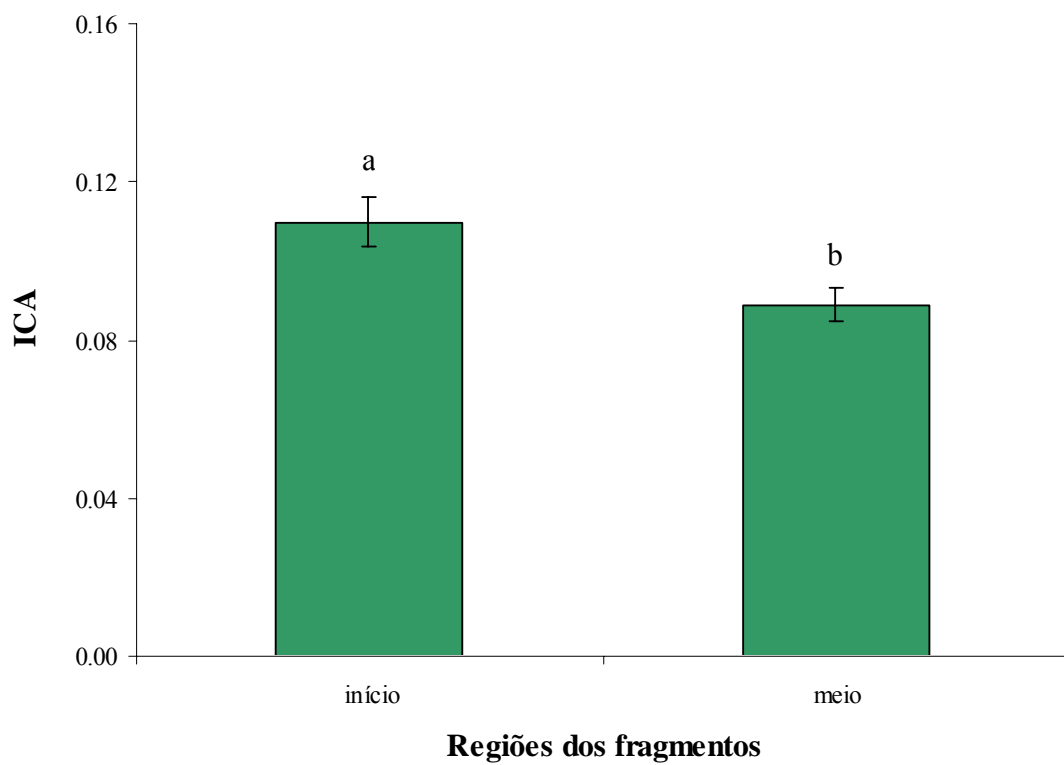


Figura 11. Índice de células alteradas (média \pm erro padrão) das regiões dos fragmentos de *P. suberosa* retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato phyllis*. Letras diferentes indicam diferença significativa (teste *t* de Welch = 2,921, n = 40, α = 0,05).

Tabela X. Resultado do teste de Kruskal-Wallis, a respeito da influência da seção no ICA dos fragmentos foliares retirados do intestino posterior de larvas de *H. erato phyllis* ($\alpha = 0,05$). Na composição das abreviações, na ordem, A, B e C correspondem às seções dos fragmentos; I e M, corresponde às regiões do início e meio dos fragmentos; M e S, referem-se à *P. misera* ou à *P. suberosa*, respectivamente.

Fator	N	Soma do ranking	Média do ranking	Graus de liberdade	KW	ρ
AIM	50	15700	313	11	155	< 0,0001
BIM	50	11828	236			
CIM	50	14548	290			
AMM	50	11822	236			
BMM	50	7482	149			
CMM	50	13033	260			
AIS	40	14361	359			
BIS	40	7502	187			
CIS	40	16692	417			
MAS	40	13163	329			
BMS	40	5145	128			
CMS	40	14796	369			

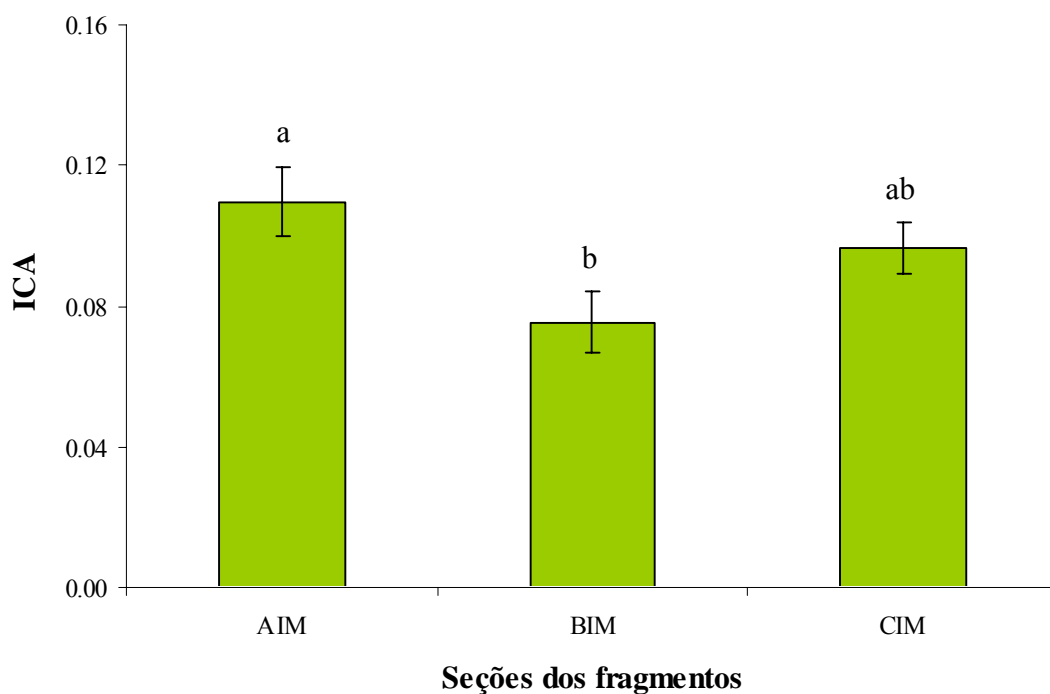


Figura 12. Índice de células alteradas (média \pm erro padrão) nas seções dos fragmentos de *P. misera* retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato phyllis*. Na composição das abreviações, na ordem, A, B e C correspondem às seções dos fragmentos; I e M, corresponde às regiões do início e meio dos fragmentos; M e S, referem-se à *P. misera* ou à *P. suberosa*, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, $n = 50$, $\alpha = 0,05$).

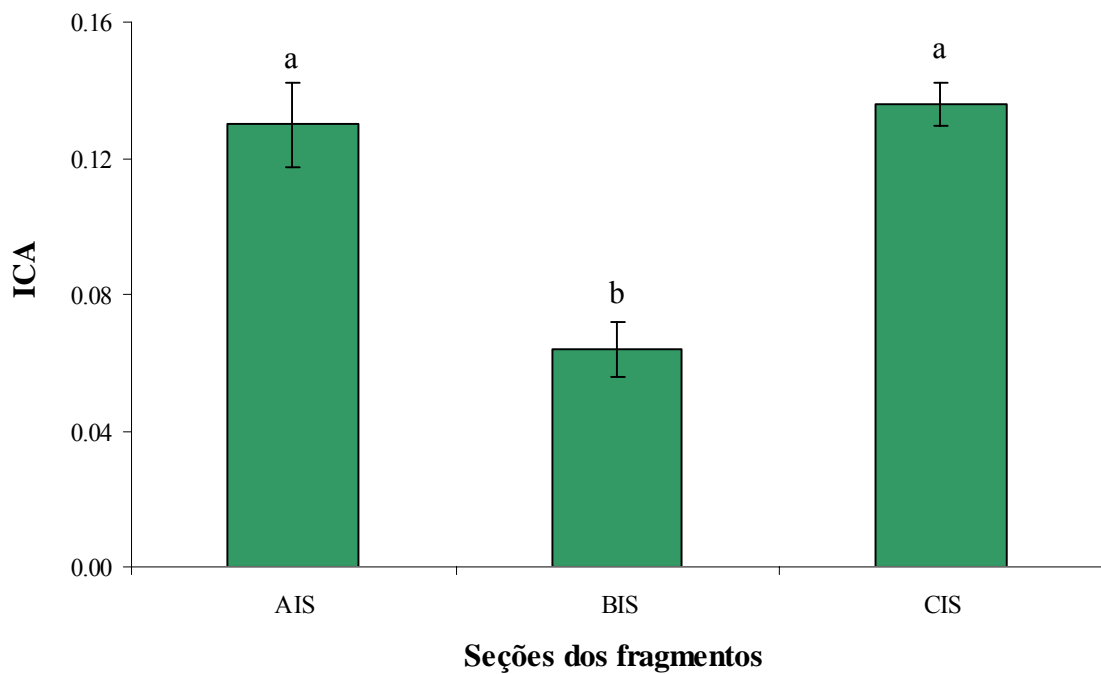


Figura 13. Índice de células alteradas (média ± erro padrão) nas seções dos fragmentos de *P. suberosa* retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato phyllis*. Na composição das abreviações, na ordem, A, B e C correspondem às seções dos fragmentos; I e M, corresponde às regiões do início e meio dos fragmentos; M e S, referem-se à *P. misera* ou à *P. suberosa*, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença significativa (Kruskal-Wallis, $n = 40$, $\alpha = 0,05$).

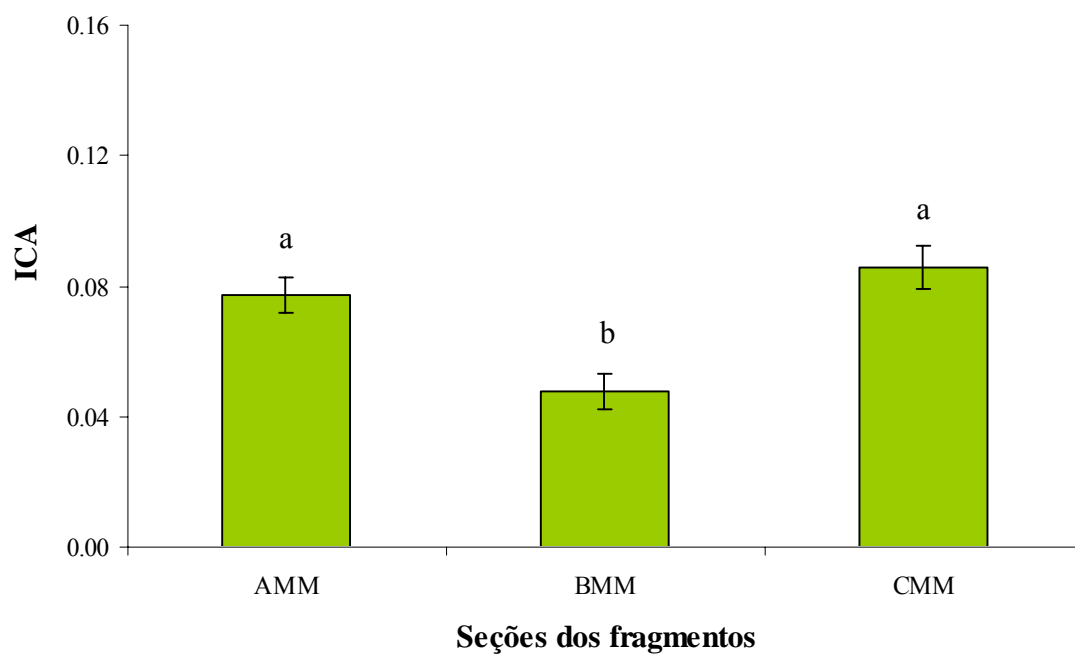


Figura 14. Índice de células alteradas (média ± erro padrão) nas seções dos fragmentos de *P. misera* retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato phyllis*. Na composição das abreviações, na ordem, A, B e C correspondem às seções dos fragmentos; I e M, corresponde às regiões do início e meio dos fragmentos; M e S, referem-se à *P. misera* ou à *P. suberosa*, respectivamente. As letras diferentes indicam diferença significativa (Kruskal-Wallis, n = 50, $\alpha = 0,05$).

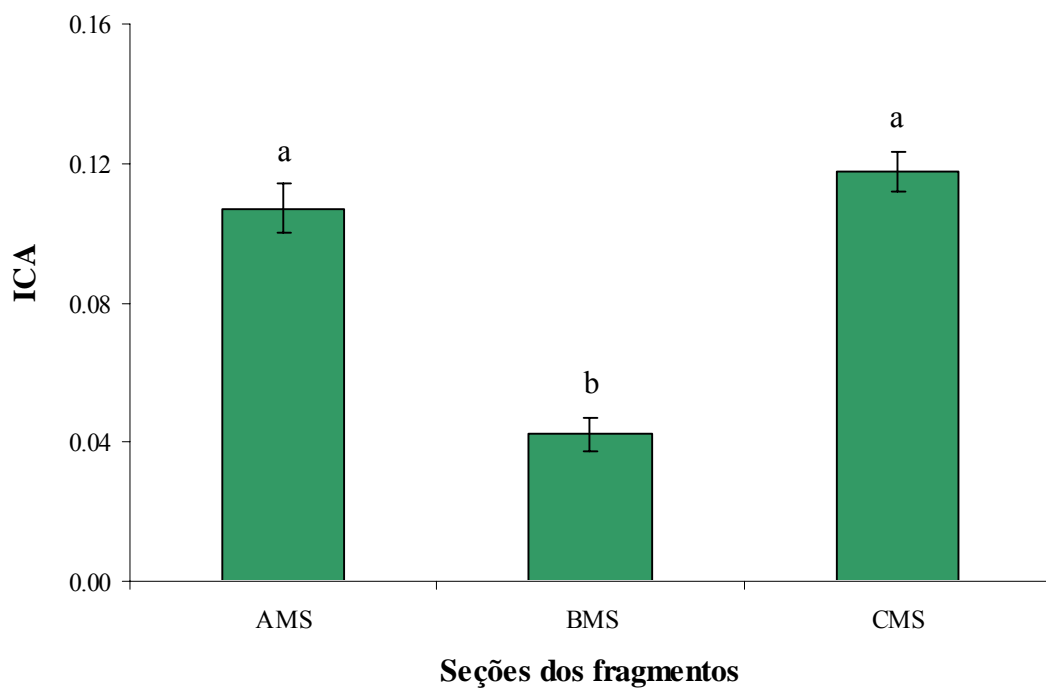


Figura 15. Índice de células alteradas (média \pm erro padrão) nas seções dos fragmentos de *P. suberosa* retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato phyllis*. Na composição das abreviações, na ordem, A, B e C correspondem às seções dos fragmentos; I e M, corresponde às regiões do início e meio dos fragmentos; M e S, referem-se à *P. misera* ou à *P. suberosa*, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, $n = 40$, $\alpha = 0,05$).

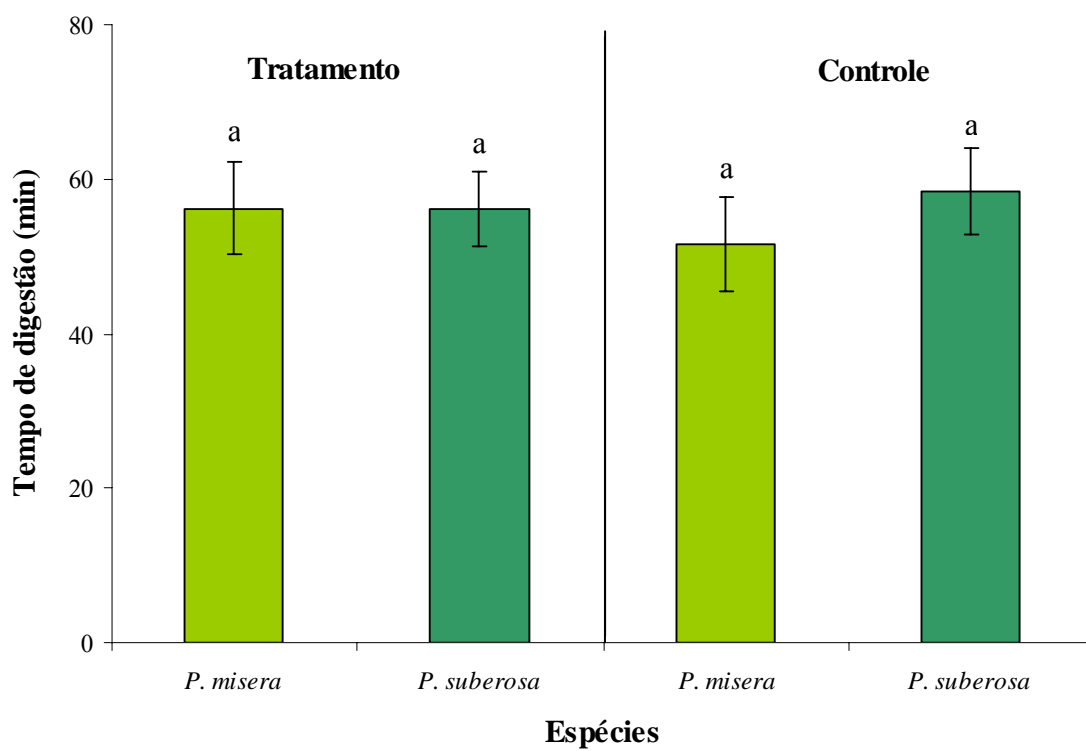


Figura 16. Tempo de digestão (média \pm erro padrão) para os fragmentos de *Passiflora suberosa* e *Passiflora misera* e seus respectivos controles no trato digestivo de larvas de *H. erato phyllis*. Não há diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $n = 20$, $\alpha = 0,05$).

4. Discussão

Em seção transversal, as folhas de *P. misera* e de *P. suberosa*, nas três porções intestinais e controle, apresentaram epiderme uniestratificada, composta por células de perfil papiloso, coincidentes ao descrito para *Passiflora actinia* (KURTZ, 2003). Segundo METCALFE *et al.* (1983), as células epidérmicas formam um sistema de revestimento que confere um caráter de resistência às plantas. Para ESAU (1998), as células epidérmicas podem variar na altura e quase sempre apresentam formato tabular. Inseridos no mesmo plano das células epidérmicas, encontram-se estômatos somente na face abaxial do limbo foliar de ambas as espécies, confirmando o encontrado em *P. actinia* (KURTZ, 2003) e outras espécies de *Passiflora* apontadas por FREITAS (1985).

As paredes periclinais externas das células epidérmicas da face adaxial dos fragmentos foliares de *P. suberosa* apresentaram uma parede primária mais espessa do que em *P. misera*, característica que, de acordo com PYYKKÖ (1966), confere maior proteção para a lâmina foliar contra transpiração e luminosidade excessivas. Para PEETERS (2002), o número de camadas e as paredes espessadas ou lignificadas do mesofilo foliar são algumas das características que podem contribuir para a espessura foliar e constituem-se numa barreira física. A presença de algumas células do parênquima paliádico, com paredes sinuosas nos fragmentos de *P. suberosa* encontrados na região do intestino médio, pode estar associada à perda de água, alterando o turgor das células (TAIZ & ZEIGER, 2006). De modo geral, as passifloráceas, assim como descrito para *P. actinia* (KURTZ, 2003) e para *P. capsularis* (MERUVIA, 1993), apresentaram mesofilo dorsiventral constituído por células vacuoladas com paredes delgadas, as quais são usualmente encontradas na anatomia foliar de folhas maduras de dicotiledôneas (CUTTER, 1987). Em meio ao parênquima esponjoso

dos fragmentos no interior do intestino, de ambas as espécies de passifloráceas, observou-se a presença de cristais de oxalato de cálcio, como encontrados em *P. actinia* (KURTZ, 2003; FREITAS, 1985), os quais podem constituir uma barreira cristalífera. Os cristais de oxalato de cálcio comumente encontrados nas células de vários órgãos têm como principal função remover o excesso de cálcio do sistema. Outras funções geralmente associadas à presença destes cristais são a defesa da planta contra herbivoria e ou a manutenção de nutrientes como reserva de cálcio ou oxalato de cálcio (VOLK *et al.*, 2002). Estes também se constituem de depósitos de produtos de excreção originados dos vacúolos (CUTTER, 1986). No mesofilo de ambas as passifloráceas, visualizaram-se feixes vasculares do tipo colaterais, como já observados por KURTZ (2003), em *Passiflora actinia*, e por MERUVIA *et al.* (1993), em *Passiflora capsularis*.

As pectinas constituem um dos principais polissacarídeos estruturais encontrados na parede celular primária e nas camadas intercelulares das plantas dicotiledôneas e de algumas monocotiledôneas (JARVIS, 1988; SHKODINA *et al.*, 1998). As paredes celulares do mesofilo possuem, como principais carboidratos, celulose, hemicelulose e substâncias pécticas. Os compostos pécticos mantêm unidas as células adjacentes e contribuem para a resistência à seca (ESAÚ, 1998), para a força, flexibilidade e estrutura das paredes celulares e para a regulação da permeabilidade dos plasmodesmos (LINERS *et al.*, 1994). Os polissacarídeos pécticos incluem os ácidos poligacturônicos que são formados por cadeias de ramnoses (ramnogalacturanos I e II) (WILLATS, 2006). O resultado da coloração com Alcian Blue, para a localização de pectinas na lamela média e paredes primária mostrou que as mesmas, nos fragmentos foliares, permaneceram íntegras na sua maioria, comprovado pela ausência de alteração das pectinas e a não fragmentação dos tecidos foliares de ambas as passifloráceas. Não houve a extração de pectinas, pois se consegue visualizar perfeitamente a epiderme nas

faces adaxial e abaxial e os tecidos do sistema fundamental nas três porções intestinais, mesmo após passar pelo processo digestivo. Não foi observada fragmentação dos tecidos durante a digestão, com inexistência da dissolução da lamela média e isolamento de células, nem a dissolução das paredes celulares.

As enzimas que hidrolisam as pectinas são as pectinases e incluem poligalacturonases, pectina esterases e pectina liases (ALKORTA *et al.*, 1998). Segundo TERRA *et al.* (1996), em Lepidoptera as pectinases não têm sido caracterizadas. Logo, explica-se a integridade dos tecidos.

As proteínas são polímeros de moléculas contendo nitrogênio, conhecidos como aminoácidos (RAVEN, 2001). Nas plantas, apenas 5% do nitrogênio está na forma de aminoácidos livres, cuja concentração varia de acordo com o órgão da planta, com a idade das folhas e com os fatores abióticos. Os aminoácidos comumente livres e mais concentrados são o ácido glutâmico, glutamato e aspargina. Os aminoácidos juntamente com as proteínas perfazem cerca de 15 a 40% do peso seco das folhas. A maior parte da proteína solúvel está associada à função estrutural da parede celular sendo de difícil extração (BERNAYS & CHAPMAN, 1994). Coomassie Blue, indicou a presença de proteínas totais nos fragmentos foliares analisados nas três porções intestinais para ambas as passifloráceas. Observou-se uma alteração do conteúdo protéico em ambas as passifloráceas. Esta alteração constituiu-se da existência de células com vacúolos colabados e conseqüente desorganização do seu conteúdo intracelular disposto por todo o compartimento celular em porções aglomeradas amorfas. Algumas células apresentaram ausência deste conteúdo intracelular. Segundo TERRA *et al.* (1985), a digestão das proteínas ocorre parcialmente no lúmen intestinal e é finalizada na superfície das células da porção posterior do intestino médio. As proteases estão presentes nesta última porção do intestino médio (FERREIRA *et al.*, 1990). SHINBO *et al.*

(1996) demonstrou que, em *Bombyx mori*, a digestão das proteínas começa na porção anterior do intestino médio e que a absorção dos aminoácidos ocorre ao longo deste na superfície das células colunares (SANTOS & TERRA, 1984). Na digestão das proteínas no intestino médio, as peptidases são as enzimas responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas. Em Lepidoptera, a peptidase tripsina foi isolada no intestino médio atuando em um pH entre 9,5 e 10 (TERRA & FERREIRA, 1994).

As proteínas são nutrientes importantes para o crescimento e fecundidade dos insetos (SLANKY & FEENY, 1977; MATTSON, 1980). Segundo o estudo de KERPEL (2004), o tempo de desenvolvimento de larvas de *H. erato phyllis* foi maior quando alimentadas em ramos de *P. misera* e *P. suberosa* sem adição de nitrogênio. O contrário foi verificado em larvas de *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) quando alimentadas com plantas com maiores níveis de nitrogênio (SLANSKY & FENNY, 1977).

O amido é um polissacarídeo de reserva estável e insolúvel de carboidratos encontrado na maioria das plantas (TAIZ & ZEIGER, 2006) e sintetizado nos cloroplastos e amiloplastos (RAVEN, 2001). Os grãos de amido são formados por dois polímeros de glicose (amilose e a amilopectina) (FREY-WYSSLING, 1969; MIURA, 1994) A amilose é formada por cadeias lineares de resíduos de glicose com ligações α -(1-4), enquanto que a amilopectina é formada por cadeias ramificadas de resíduos de glicose com ligações α -(1-4) (MARTIN & SMITH, 1995). Grãos de amido, com dimensões e formas diversas, são comumente encontrados em todos os tecidos dos parênquimas clorofilados ou de reserva, especialmente em tubérculos, rizomas e sementes (CUTTER, 1986). Os resultados dos testes histoquímicos com Lugol (IKI) e reação de PAS mostraram a presença de grãos de amido nas células das folhas maduras de *P. misera* e *P. suberosa*. Nas células dos tecidos foliares de *P. misera* e *P. suberosa*, analisadas na região do intestino anterior de larvas de *H. erato phyllis*, verificou-se a presença de grãos de

amido, o que é resultado da não absorção de nutrientes nesta porção intestinal, como apontado por TERRA (1990), e comprovado por SANTOS *et al.* (1983) em estudo com larvas de *Erinnys ello* (Lepidoptera: Sphingidae). A ausência de grãos de amido nas células dos fragmentos foliares de *P. misera* e *P. suberosa*, analisados no intestino médio e posterior, indicou a digestibilidade deste carboidrato pelas larvas de *H. erato phyllis*. De acordo com CHAPMAN (1982) & TERRA (1990), o intestino médio é o local de maior produção enzimática e de maior absorção de nutrientes. Segundo TERRA *et al.* (1985), a maior parte da digestão dos carboidratos ocorre no lúmen da porção anterior do intestino médio destes insetos. Várias enzimas podem ser utilizadas na degradação do amido (α -amilase, β -amilase), mas somente a α -amilase é considerada importante na degradação do amido das células vegetais (SUN *et al.*, 1991). Uma das principais carboidrases presentes nos insetos é a α -amilase (TERRA *et al.*, 1990). Esta carboidrase é secretada por exocitose nas células da região posterior do intestino médio das larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (FERREIRA *et al.*, 1990) e é responsável por hidrolisar ligações glicosídicas que correspondem às cadeias principais do amido e glicogênio (TERRA *et al.*, 1990).

As células-guarda que compõem os estômatos possuem grãos de amido contido nos seus cloroplastos e não apresentam comunicação através dos plasmodesmos as células adjacentes e as demais células epidérmicas (RAVEN, 2001). Deste modo, o fluxo de substâncias nas células-guarda é realizado somente via membrana plasmática (MOHR, 1995); o que explica o resultado positivo para a presença de amido nos tecidos foliares dos fragmentos analisados no intestino médio e posterior de *P. misera* e *P. suberosa*.

Analisando-se a espessura das seções semifinas dos fragmentos foliares das passifloráceas retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato phyllis*, verificou-se

que *P. suberosa* apresentou um limbo foliar com uma espessura média maior em relação a *P. misera*. Corroborando com os dados de DELL'AGLIO inéditos (2008), neste estudo a média do parênquima esponjoso, em *P. misera*, apresentou uma altura média menor do que *P. suberosa*. As células do parênquima paliçádico apresentaram uma altura média menor em *P. misera* do que *P. suberosa*. Em geral, a dureza foliar pode estar associada a uma grande espessura das folhas e, deste modo, atuando na defesa contra a ação dos herbívoros (LUCAS *et al.*, 2000). De acordo com WEI *et al.* (2000), a espessura da parede das células epidérmicas e a densidade do parênquima esponjoso e paliçádico podem agir como uma barreira física na oviposição pelas fêmeas de *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromizidae).

Ao se quantificar o total de células nos fragmentos foliares de *P. misera* e de *P. suberosa*, retirados do intestino posterior das larvas de *H. erato pyhllis*, este foi significativamente maior em *P. misera*; fato que poderia estar associado com o proposto por KERPEL (2004) no qual *P. misera* investe num crescimento mais rápido, enquanto *P. suberosa* apresenta um crescimento lento e persistente.

Os fragmentos foliares retirados do intestino posterior de larvas de *H. erato pyhllis* apresentaram um índice significativamente maior de células alteradas na região do início em *P. suberosa* em comparação a *P. misera* o que, segundo KERPEL (2004), pode estar relacionado a uma superfície exposta absoluta (espessura x perímetro) maior dos fragmentos foliares de *P. suberosa* e uma superfície exposta relativa ao volume maior dos fragmentos foliares de *P. misera*. A porção central das seções destes fragmentos apresentou-se significativamente mais preservada nas regiões do início e meio dos fragmentos de ambas a passifloráceas. As margens nos fragmentos foliares de ambas as passifloráceas, em média, se apresentaram homoganeamente danificadas, não havendo diferença significativa do ICA entre elas. A área da periferia é a região onde é

aplicada a mordida pelas larvas e local de extravasamento dos nutrientes pelo rompimento destas células. Para um acesso enzimático e assimilação dos nutrientes das células mais internas dos fragmentos, os insetos herbívoros devem atravessar a parede celular. De acordo com CLISSOD *et al.*, (2004), esta é uma barreira que deve ser transposta para a assimilação dos nutrientes pelos gafanhotos e deve ser rompida durante o processo de mastigação (SLANSKY & RODRIGUEZ, 1987; HOCHULI, 1996). Deste modo, esta parece exercer uma defesa fundamental contra os herbívoros (ABE & HIGASHI, 1991) devido à incapacidade de alguns insetos para digerir a celulose (MARTIN, 1991). Para BARBEHENN (1992, 2005) os nutrientes obtidos do conteúdo intracelular pelos insetos herbívoros mastigadores durante a passagem dos fragmentos pelo tubo digestivo são extravasados via plasmodesmos. Segundo este autor, os nutrientes podem ser extravasados pelos plasmodesmos das células do mesófilo foliar mantendo a integridade da parede celular, na sua maioria, com o rompimento somente da membrana plasmática. Os plasmodesmos são aberturas nas paredes celulares de células vizinhas através dos quais diminutos filamentos citoplasmáticos estendem-se, permitindo a comunicação entre as células adjacentes, formando o simplasto. O transporte via plasmodesmos é realizado para micromoléculas, tais como açúcares, aminoácidos e macromoléculas tais como proteínas e ácidos nucleicos por meio de um processo ativo dependente de energia (RAVEN, 2001).

De acordo com MATTSON & SCRIBER (1987), o tempo de permanência do alimento no intestino é um dos fatores que influencia na digestibilidade dos tecidos vegetais. Neste estudo, o tempo de passagem dos fragmentos foliares de *P. misera* e de *P. suberosa* pelo tubo digestivo das larvas de *H. erato phyllis* não diferiu significativamente, não havendo uma retenção diferenciada dos fragmentos foliares, o

que comprova a inexistência de um mecanismo de compensação na obtenção dos nutrientes.

5. Considerações finais

A organização estrutural das folhas de ambas as espécies de passifloráceas não apresentou variação quanto à distribuição dos tecidos foliares. A diferença consiste na menor quantidade e maior tamanho das células de *P. suberosa* comparativamente à *P. misera*. O maior tamanho das células de *P. suberosa* implicou a maior espessura de seus fragmentos. A espessura maior dos fragmentos foliares em *P. suberosa* ocasionou o maior índice de células alteradas nas margens dos fragmentos desta passiflorácea em relação a *P. misera*. A área exposta relativa ao volume maior em *P. misera* e a área exposta absoluta maior em *P. suberosa* influenciaram o gradiente de células alteradas em ambas as passifloráceas, o qual foi comprovado pelo maior ICA nas margens dos fragmentos em relação ao centro destes.

Os principais nutrientes qualificados nos fragmentos foliares de ambas as espécies de passifloráceas foram substâncias pécnicas, proteínas e polissacarídeos na forma de amido. As pectinas encontradas na formação das paredes celulares não foram absorvidas durante o processo digestivo. As proteínas evidenciadas foram somente as estruturais e enzimáticas presentes no citoplasma e suas organelas, não ocorrendo proteínas de reserva. Provavelmente foi assimilada a parte composta por aminoácidos livres. A molécula do amido presente em grandes quantidades nas células do mesofilo de folhas madura, precisa ser quebrada para ser absorvida durante a digestão; sendo os plasmodesmos a provável rota de extravasamento dos nutrientes das células do interior dos fragmentos.

Com base nos resultados similares evidenciados pelos testes histoquímicos e tempo médio equivalente para as passifloráceas, inferimos que não há um mecanismo de compensação no processo digestivo das larvas de *H. erato phyllis*. Em estudos futuros, podem ser realizadas análises similares às deste trabalho com outras espécies de heliconíneos e passifloráceas. Pode ser analisado a variação da ultraestrutura das células ao longo da passagem pelo intestino, verificando-se a amplitude da extração dos nutrientes por estes insetos, conforme estudo de BARBEHENN (2005).

6. Referências bibliográficas

(De acordo com as normas da Revista Brasileira de Zoologia)

- ABE, T. & M. HIGASHI. 1991. Cellulose centered perspective on terrestrial community structure. **Oikos**, Copenhagen, **60**: 127-133.
- ALKORTA, I.; C. GARBISU; M. J. LLAMA & J. L. SERRA. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, **33**:21-28.
- BARBEHENN, R. V. 1992. Digestion of uncrushed leaf tissues by leaf-spinning larval Lepidoptera. **Oecologia**, Berlin, **89**: 229-235.
- BARBEHENN, R. V. 2005. Grasshoppers efficiently process C₄ grass leaf tissues: implications for patterns of host-plant utilization. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, **116**: 209-217.
- BARP, E. A.; G. L. G. SOARES; G. GOSMANN; A. M. MACHADO; C. VECCHI & G. R. P. MOREIRA. 2006. Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, **66**: 853-862.

- BECERRA J.X .1994. Squirt-gun defense in *Bursera* and the Chrysomelidae counterploy. **Ecology**, Tempe, **75**: 1991-1996.
- BENSON, W. W; K. S. BROWN, JR. & L. E. GILBERT. 1976. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, Bolder, **29**: 659-680.
- BERNAYS, E. A. & D. H. JANZEN. 1988. Saturniidae and Sphingidae caterpillars: two ways to eat leaves. **Ecology**, Tempe, **69**: 1153-1160.
- BERNAYS, E & R. F. CHAPMAN. 1994. **Host plant selection by phytophagous insects**. London, Chapman & Hall, 321p.
- BERRIDGE, M. J. 1970. A structural analysis of intestinal absorption. *In*: **Symposium of Royal Society of Entomology of London**, London, **5**: 135-150.
- BILLINGSLEY, P. F. & M. J. LEHANE. 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut, p. 3-30. *In*: LEHANE, M. J. & P. F. BILLINGSLEY. (Eds) **Biology of the insect midgut**. London, Chapman & Hall, 486p.
- BOLIGON, D. S.; L. MEDEIROS; R. M. S. ISAIAS & G.R.P. MOREIRA. (submetido). Constraints in larval feeding morphology and selective removal of host plant trichomes by a monophagous cassidine beetle. *In*: JOLIVET, P.; J. A. Santiag-Blay & M. Schmit (Eds.). **Research on Chrysomelidae**, v.2.
- CHAPMAN, R. F. 1982. **The insects: structure and function**. Cambridge, Harvard University Press, 919p.
- CHAPMAN, R. F. 1995. Mechanics of food handling by chewing insects, p. 3-31. *In*: R.F CHAPMAN & G. DE BOER (Eds.). **Regulatory mechanisms in insect feeding**. New York, Chapman& Hall, 398p.
- CLISSOLD, F. J.; G. D. SANSON & J. READ. 2004. Indigestibility of plant cell wall by the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, **112**: 159-168.

- COLEY, P. D. 1983. Differential mechanical defense: herbivory evapotranspiration and leaf hairs. **Ecological Monographs**, Lawrence, **53**: 209-233.
- CONOVER, W. J. 1980. **Practical nonparametric statistics**. New York, John Wiley & Sons, 493p.
- CORRÊA, C. A.; B. E. IRGANG & G. R. P. MOREIRA. 2001. Estrutura floral das angiospermas usadas por *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae) no Rio Grande do Sul. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, **90**:71-84.
- CUTTER, E. G. 1986. **Anatomia vegetal Parte I - células e tecidos**. São Paulo, Rocca, 304p.
- CUTTER, E. G. 1987. **Anatomia vegetal Parte II - órgãos, experimentos e interpretação**. São Paulo, Rocca, 336 p.
- ESAU, K. 1998. **Anatomia de plantas com semente**. São Paulo, Edgard Blücher, 293p.
- KERPEL, S. M. 2004 **Influência do conteúdo nutricional de *Passiflora suberosa* e *Passiflora misera* na performance, nutrição, digestão e comportamento de escolha de oviposição de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae)**. Porto Alegre, Tese de Doutorado, Ecologia, UFRGS, 163p.
- FERNANDES, G. W. 1994. Plant mechanical defenses against insect herbivory. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, **38**: 421-433.
- FERREIRA, C.; G. L. BELLINELLO; A. F. RIBEIRO & W. R. TERRA. 1990. Digestive enzymes associated with the glicocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry**, London, **20**: 839-847.

- FERRO, V. G. 1998. **Criação de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) em condições semi-naturais.** Porto Alegre, Monografia de bacharelado, Instituto de Biociências, UFRGS, 49p.
- FREITAS, P. C. D. 1985. **Estudo farmacológico comparativo de espécies brasileiras do gênero *Passiflora* L.** São Paulo, Dissertação de Mestrado, USP, 117p.
- FREY-WYSSLING, A. 1969. On the molecular structure of starch granules. **American Journal of Botany**, Saint Louis, **7**: 696-701
- GERRITS, P. O. & SMID, L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol metacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, Tokyo, **132**: 81-85.
- GILBERT, L. 1971. Butterfly-plant coevolution: has *Passiflora adenopoda* won the selectional race with Heliconiine butterflies? **Science**, Washington, **172**: 585-586.
- HANSON, F. E. 1983. The behavioral and neurophysiological basis of food plant selection by lepidopterous larvae, p. 3-23. *In*: S. AHMAD (Ed.). **Herbivorous insects: host seeking behavior and mechanisms.** New York, Academic Press, 257p.
- HOCHULI, D. F. 1996. The ecology of plant insect interactions: implications of digestive strategy for feeding by phytophagous insects. **Oikos**, Copenhagen, **75**: 133-141.
- JARVIS, M. C.; W. FORSYTH & J. HENRY. Survey of the pectic content of non lignified monocot cell walls. **Plant Physiology**, Bethesda, **88**: 309-314.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant microtechnique.** New York, Mc Graw-Hill, 5243p.

- KERPEL, S.M. 1999. **Aspectos ecológicos e comportamentais envolvidos na seleção da planta hospedeira por *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae)**. Porto Alegre, Dissertação de Mestrado, Ecologia, UFRGS, 75p.
- KERPEL, S. M. 2004 **Influência do conteúdo nutricional de *Passiflora suberosa* e *Passiflora misera* na performance, nutrição, digestão e comportamento de escolha de oviposição de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae)**. Porto Alegre, Tese de Doutorado, Ecologia, UFRGS, 163p.
- KERPEL, S. M. & G. R. P. MOREIRA. 2005. Absence of learning and local specialization on host plant selection by *Heliconius erato phyllis*. **Journal of Insect Behavior**, New York, **18**: 433-452.
- KURTZ, S. M. T. F.; C. A. M. SANTOS; M. R. DUARTE & M. E.O. SATO. 2003. Morfo-anatomia de folhas de maracujá: *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, La Plata, **2**: 105-112.
- LEHANE, M. J. 1997. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, Stanford, **42**: 525-550.
- LILLIE, R. D. 1965. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. New York, McGraw-Hill Book Company, 751p.
- LINERS, F.; T. GASPAR & P. V. CUTSEM. 1994. Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. **Planta**, Berlin, **192**: 545- 556.
- LUCAS P. W.; I. M. TURNER; N. J. DOMINY & N. YAMASHITA. 2000. Mechanical defences to herbivory. **Annals of Botany**, London, **86**: 913-920.
- MARTIN, J. S.; M. M. MARTIN & E. A. BERNAYS. 1987. Failure of tannic acid to inhibit digestion or reduce digestibility of plant protein in gut fluids of insect herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, **13**: 605-621.

- MARTIN, M. M. 1991. The evolution of cellulose digestion in insect. **Philosophical Transaction of Royal Society of London. Series B**, London, **333**: 281-288.
- MARTIN, C. & A. M. SMITH. 1995. Starch Biosynthesis. **The plant cell**, Waterbury, **7**: 971-985.
- MATTSON, J. W. J. 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, **11**: 119-161.
- MATTSON, W.J. & J. M. SCRIBER. 1987. Nutritional ecology of insect folivores of woody plants: nitrogen, water, fiber and mineral considerations, p 105-146. *In*: SLANSKY, F. J. & J.G. RODRIGUEZ (Eds.) **Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. New York, John Wiley & Sons, 1016p.
- MEDEIROS, L. & G. R. P. MOREIRA. 2002. Moving on hairy surfaces: modifications of *Gratiana spadicea* larval legs to attach on its host plant *Solanum sisymbriifolium*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, **102**: 295-305.
- MEDEIROS, L. & G. R. P. MOREIRA. 2005. Larval feeding behavior of *Gratiana spadicea* (Klug) (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae) on its host plant, *Solanum sisymbriifolium* Lamarck (Solanaceae): interaction with trichomes. **The Coleopterist's Bulletin**, Washington, **59**: 339-350.
- MENNA-BARRETO, Y. & A. M. ARAÚJO. 1985. Evidence for host plant preferences in *Heliconius erato phyllis* from southern Brazil (Nymphalidae). **Journal of Research on Lepidoptera**, Acardia, **24**: 41-46.
- MERUVIA, M. Y. L.; P. VERONICA; C. C. ARMANDO. 1993. Anatomia foliar de *Passiflora capsularis* L (Passifloraceae). **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, **22**:31-44.

- METCALFE, C.R. & I. CHALK. 1983. **Anatomy of dicotyledons**. Oxford, Clarendon Press, United Kingdom, 297 p.
- MIURA, H. & T. SACHIKO. 1994. Endosperm starch properties in several wheat cultivars preferred for Japanese noodles. **Euphytica**, Wageningen, **72**: 171-175.
- MOHR, H. & P. SCHOPFER. 1995. **Plant physiology**. Heidelberg, Springer-Verlag, 628p.
- MUGRABI-OLIVEIRA, E. & G. R. P. MOREIRA. 1996. Size of and damage on shoots of *Passiflora suberosa* (Passifloraceae) influence oviposition site selection of *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera:Nymphalidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, **13**:939-953.
- O'BRIEN, T. P. & M. E. MCCULLY. 1981. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne, Termacarphi Pty Ltd., 345p.
- PAIVA, J. G. A.; S. M. F. CARVALHO; M. P. MAGALHÃES & D. G. RIBEIRO. 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, **2**: 257-264.
- PEETERS, P.J. 2002. Correlations between leaf structural traits and the densities of herbivorous insects guilds. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, **77**:43-65.
- PYYKKÖ, M. 1966. The leaf anatomy of east patagonian xeromorphic plants. **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, **3**:453-622.
- RAVEN, P. H.; R. F. EVERT & S. E. EICHHORN. 2001. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 906p.
- RAUPP, M. J. 1985. Effects of leaf toughness on mandibular wear of the leaf beetle, *Plagioderma versicolora*. **Ecological Entomology**, London, **10**: 73-79.

- RICHARDS, A. G. & P. A. RICHARDS. 1977. The peritrophic membranes of insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, 22: 219-240.
- ROLAND, J. C. & B. VIAN. 1991. General preparation and staining of thin sections, p.1-66. *In*: HALL, J. L. & C. HAWES (Eds.). **Electron microscopy of plant cells**. London, Academic Press, 432.
- RODRIGUES, D. & G. R. P. MOREIRA. 2002. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera:Nymphalidae) and consequences for adults life history. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, 62: 321-332.
- RODRIGUES, D. & G. R. P. MOREIRA. 2004. Seasonal variation in larva host plants and consequences for *Heliconius erato* (Lepidoptera:Nymphalidae) adult body size. **Austral Ecology**, Carlton, 29: 437-445.
- ROESER, K. R. 1972. Die Nadel der schwarzierfer-massenprodukt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, Frankfurt, 61: 33-36.
- SACCO, J. C. 1980. Passifloráceas. *In*: R. Reitz (Ed.) **Flora ilustrada catarinense**. **Herbário Barbosa Rodrigues**. Itajaí, 132 p.
- SANTOS, C. D.; C. FERREIRA & W. R. TERRA. 1983. Consumption of food and spatial organization of digestion in the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, 29: 707-714.
- SANTOS, C. D. & W. R. TERRA. 1984. Plasma membrane-associated amylase and trypsin: intracellular distribution of digestive enzymes in the midgut of the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. **Insect Biochemistry**, London, 14: 587-594.
- SANTOS, C. D. & W. R. TERRA. 1986. Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from *Erinnyis ello* larvae and inferences concerning secretory mechanisms and the permeability of the peritrophic membrane. **Insect Biochemistry**, London, 16: 691-700

- SNEDECOR G. W. & W. G. COCHRAN. 1989. **Statistical methods**. Ames, Iowa State University Press, 503p.
- SCHOONHOVEN, L.M.; T. JERMY & J. J. A. V. LOON. 1998. Plants as insect food: not the ideal, p. 83-120. *In*: L.M. SCHOONHOVEN; T. JERMY & J. J. A. VAN LOON (Eds.), **Insect-plant biology: from physiology to evolution**. New York, Chapman & Hall, 409 p.
- SCRIBER, J. M. 1982. The behavior and nutritional physiology of southern armyworm larvae as a function of plant species consumed in earlier instars. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, **31**: 359-369.
- SCRIBER, J. M. 1984. Host-plant suitability, p. 159-202. *In*: BELL, W. J. & R. T. CARDE (Eds.). **Chemical ecology of insects**. London, Chapman & Hall, 524p.
- SHINBO, H.; K. KONNO; C. HIRAYAMA & K. WATANABE. 1996. Digestive sites of dietary proteins and absorptive sites of amino acids along the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, Columbus, **42**: 1129-1138.
- SHKODINA, O. G.; O. A. ZELTSER; N. Y. SELIVANOV; & V. V. IGNATOV. 1998. Enzymic extraction of pectin preparations from pumpkin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, **12**: 313-316.
- SLANSKY, F. J. & P. FEENY. 1977. Stabilization of the rate of nitrogen accumulation by larvae of the cabbage butterfly on wild and cultivated food plants. **Ecological Monographs**, Durham, **47**: 209-228.
- SLANSKY, F. J. & J. G. RODRIGUEZ. 1987. Nutritional ecology of insects, mites, spiders and related invertebrates: an overview, p. 1-69 *In*: SLANSKY, F. JR. & J. G. RODRIGUEZ (Eds.). **Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. New York, John Wiley & Sons, 1016p.

- SILVEIRA, M. A. P. A. 2002. **Variação na dureza da folha em *Passiflora*, efeito no desgaste das mandíbulas de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae) e conseqüências sobre a herbivoria.** Porto Alegre, Dissertação de Mestrado, Biologia Animal, UFRGS, 44p.
- SNODGRASS, R. E. 1935. **Principles of morphology.** New York, MacGraw Hill, 667p.
- SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, **21**: 73-80.
- STRONG, D. R.; J. H. LAWTON & S. R. SOUTHWOOD. 1984. **Insects on plants: community patterns and mechanisms.** Cambridge, Harvard University Press, 313p.
- SUN, Z. & C. A. HENSON. 1991. A quantitative assessment of the importance of barley seed α -amylase, β -amylase, debranching enzyme, and α -glucosidase in starch degradation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, **284**: 298–305.
- STEPHENS, A.E. A.; A. M. BARRINGTON; V.A. BUSH; N. M. FLETCHER; V. J. MITCHELL & D. M. SUCKLING. 2008. Evaluation of dyes for marking painted apple moths *Teia anartoides* Walker, Lep. Lymantriidae used in a sterile insect release program. **Australian Journal of Entomology**, Brisbane, **47**: 131-136.
- TAIZ, L. & E. ZEIGER. 2006. **Fisiologia Vegetal.** Porto Alegre, Artmed, 719p.
- TERRA, W. R.; C. FERREIRA & F. BASTOS. 1985. Phylogenetic considerations of insect digestion disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry**, London, **15**: 443-449.
- TERRA, W. R.; C. D. SANTOS & A. F. RIBEIRO. 1990. Ultrastructural and biochemical basis of the digestion of nectar and other nutrients by the moth *Erinnyis ello*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, **56**:277-286.

- TERRA, W. R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, **35**: 181-200.
- TERRA, W. R. & C. FERREIRA. 1994. Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, **109b**: 1-62.
- TERRA, W.R., FERREIRA, C. JORDÃO, B.P., DILLON, R.J. 1996. Digestive enzymes, p. 153–194. *In*: LEHANE, M.J., BILLINGSLEY, P.F. (Eds.), **Biology of the insect midgut**. Chapman and Hall, London, 486p.
- VOLK, G.M.; V.J. LYNCH-HOLM; T.A. KOSTMAN; L.J. GOSS & V.R. FRANCESCHI. 2002. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. **Plant Biology**, Berlin, **4**:34-45.
- WALLIN, H. 1988. Mandible wear in the carabid beetle *Pterostichus malanarius* in relation to diet and burrowing behaviour. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, **48**: 43-50.
- WEI, J.; L. ZOU; R. KUANG & L. HE. 2000. Influence of leaf tissue structure on host feeding selection by pea leaf miner *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). **Zoological Studies**, Taipei, **39**: 295-300.
- WIGGLESWORTH, V. B. 1930. The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae mosquitoes. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, Oxford, **73**: 593-616.
- WILLATS, W. G. T.; J. P. KNOX & J. D. MIKKELSEN. (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, **17**: 97–104.
- WOODMAN, R. L. & W. G. FERNANDES. 1991. Differential mechanical defense: herbivory, evapotranspiration and leaf-hairs. **Oikos**, Copenhagen, **60**: 11-19.