



**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

JUCELIO PETER DUARTE

**EFEITO SUBLETAL DE *Azadirachta indica* SOBRE A BIOLOGIA E
O SISTEMA IMUNE DE *Spodoptera frugiperda***

PORTO ALEGRE
2019

JUCELIO PETER DUARTE

**EFEITO SUBLETAL DE *Azadirachta indica* SOBRE A BIOLOGIA E
O SISTEMA IMUNE DE *Spodoptera frugiperda***

Tese 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 Doutor em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia e Comportamento Animal

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luiza Rodrigues Redaelli

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Simone Mundstock Jahnke

PORTO ALEGRE
2019

JUCELIO PETER DUARTE

**EFEITO SUBLETAL DE *Azadirachta indica* SOBRE A BIOLOGIA E
O SISTEMA IMUNE DE *Spodoptera frugiperda***

Aprovada em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Josué Sant'Ana
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Carlos Eugênio Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a. Ana Paula Schneid Afonso da Rosa
Embrapa Clima Temperado

AGRADECIMENTOS

Aos meus maravilhosos pais, Leci e Euclides, que me deram educação, carinho e amor. Sempre me incentivaram e apoiaram meus estudos e sempre lutaram para me dar as melhores condições para que eu pudesse me tornar um bom profissional. Por todas as conquistas que tive eu lhes devo. Amo vocês, muito obrigado.

Às minhas lindas irmãs, Cliciana e Leciane, as quais me alfabetizaram e me deram educação básica, ajudando a formar o cidadão que eu sou hoje. Ensinarão-me valores como honestidade e humildade e a respeitar e valorizar as pessoas. Muito obrigado.

À minha orientadora, Luiza Rodrigues Redaelli, que acreditou em mim e na minha proposta. Esteve presente nos momentos mais difíceis, sempre buscando trazer a calma e focando no objetivo final. Extremamente atenciosa e paciente e sempre disposta em ajudar, buscando as melhores soluções para os problemas que surgiam na criação e nos experimentos.

À minha coorientadora, Simone Mundstock Jahnke, que deu sugestões relevantes em todas as etapas dos experimentos e que me ajudou muito nas análises estatísticas, dando propostas que não tinham sido pensadas. Agradeço também pela ajuda nas tomadas de decisões no andamento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Eugênio Silva pelas valiosas sugestões dadas sobre as avaliações imunológicas e pela permissão do uso da leitora de placas no seu laboratório, peça fundamental para a execução da atividade da fenoloxidase.

Ao Prof. Dr. José Antônio Martinelli por autorizar o uso do microscópio de fluorescência, essencial para a avaliação da atividade fagocítica das células.

À minha técnica de laboratório predileta, Fernanda Borges, que estava sempre disposta a resolver todos os problemas que apareciam. Também me ajudou muito no preparo das soluções necessárias para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu eterno bolsista, Samuel, que me ajudou muito na criação e nos experimentos do primeiro artigo. Agradeço também aos outros amigos e colegas de laboratório, Pati, Cláudia, Paloma, Roberta e Nelson; aos que já passaram pelo laboratório, mas que foram muito importantes enquanto estavam presentes, Thaís, Fabi,

Dânia, Joel, Ju e Pri; e aos demais que não estão citados aqui. Muito obrigado a todos vocês, com certeza tornaram os meus dias muito mais alegres e produtivos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que me deu toda a base estrutural para que esse trabalho se desenvolvesse.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro que permitiu o desenvolvimento desta tese.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal pela oportunidade e pelo apoio durante todo o período de curso.

À minha Banca de Acompanhamento, Dr^a. Aline Barcellos Prates dos Santos e Dr. Ricardo Ott, pelas sugestões e palavras de incentivo ao longo desses quatro anos.

E por fim, a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a passar por esta fase.

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract.....	viii
1 Introdução Geral	10
1.1 <i>Spodoptera frugiperda</i>	10
1.2 Imunologia de insetos	13
1.2.1 Resposta inata celular	14
1.2.2 Resposta inata humoral.....	17
1.3 <i>Azadirachta indica</i>	20
1.3.1 Efeito do óleo de <i>A. indica</i> na fisiologia dos insetos.....	24
1.4 Objetivos	29
1.4.1 Objetivo Geral	29
1.4.2 Objetivos Específicos	29
2 Resultados Gerais	31
3 Referências	33
4 Artigo I - Effect of <i>Azadirachta indica</i> (Sapindales: Meliaceae) Oil on <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae and Adults	52
5 Artigo II - Efeito do óleo de <i>Azadirachta indica</i> (Sapindales: Meliaceae) no sistema imune de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	53
6 Considerações Finais	76

RESUMO

Spodoptera frugiperda (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie de importância econômica em diversas plantas cultivadas por consumirem as folhas, reduzindo a área fotossintética e conseqüentemente a produção. O controle deste inseto com inseticidas sintéticos é o mais comum, entretanto, além de não serem eficientes, causam uma série de problemas para o homem e para o ambiente. Assim, outras estratégias para o seu controle têm sido investigadas, como o uso de compostos originados de plantas. Dentre esses produtos se encontra o óleo de *Azadirachta indica* (A. Juss.) (Sapindales: Meliaceae), conhecido também como óleo de nim e responsável por poder provocar a morte e vários problemas no desenvolvimento de insetos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de doses subletais do óleo de *A. indica* sobre aspectos biológicos e imunológicos de *S. frugiperda*. Para avaliar o efeito na biologia, lagartas de segundo ínstar foram, individualmente, alimentadas com dieta artificial contendo óleo vegetal de nim com propanona, nas concentrações de 5.000, 10.000 e 15.000 ppm (1 ppm = µg de óleo/g de dieta) e o grupo controle, o qual recebeu dieta apenas com propanona. Em cada tratamento foram feitas quatro repetições de 35 lagartas, as quais foram diariamente observadas até a pupação e emergência. Avaliou-se a sobrevivência larval, duração dos períodos larval e pupal, peso e viabilidade das pupas, comprimento da asa, porcentagem de adultos deformados, fertilidade, fecundidade e longevidade. O óleo na dieta reduziu a sobrevivência das lagartas e retardou a duração do período larval e pupal. Quando o óleo foi ingerido durante a fase larval o peso das pupas reduziu e a proporção de adultos deformados aumentou. Não houve influência na viabilidade pupal. O óleo de nim também acarretou a redução do tamanho da asa, da fecundidade e da longevidade, mas a fertilidade não foi alterada. Para a avaliação do efeito sobre o sistema imune, lagartas de segundo ínstar foram colocadas, individualmente, em frascos com dieta artificial, propanona e óleo de nim nas concentrações de 125, 250 e 500 ppm além de um grupo controle, o qual recebeu dieta apenas com propanona. As lagartas permaneceram nos frascos até o final do sexto ínstar, antes de atingir a fase de pré-pupa. Para cada um dos tratamentos foram avaliados: o número total de hemócitos, a atividade fagocítica, a das enzimas tipo lisozima e a da fenoloxidase. O número total de hemócios dos insetos expostos às

diferentes concentrações do óleo de nim foi reduzido. Não se observou diferença na porcentagem das células que fagocitaram as esferas de látex quando as lagartas ingeriram óleo de nim. O diâmetro médio dos halos de lise celular, que mede a atividade das enzimas tipo lisozima, foi reduzido apenas nas lagartas que se desenvolveram em dieta contendo 125 e 250 ppm de óleo de nim. Não houve diferença na atividade da fenoloxidase, avaliando-se a absorvância da hemolinfa, quando os insetos ingeriram dieta contendo óleo de nim. Esses resultados sugerem que óleo de nim tem efeito letal e subletal sobre *S. frugiperda*, causando vários problemas no desenvolvimento e no sistema imune, podendo reduzir a probabilidade desses insetos se manterem no ambiente. Além disso, os resultados encontrados podem ser úteis para se traçar estratégias de controle com o uso de bioinseticidas.

Palavras-chave: desenvolvimento, hemócitos, imunologia, lagarta-do-cartucho, nim, produtos vegetais.

ABSTRACT

Spodoptera frugiperda (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) is a pest of economic importance in several crops due to feeding on leaves, reducing the photosynthetic area and hence production. Its control with synthetic insecticides is the most common; however, besides not being efficient, it causes multiple health and environmental problems. Thus, other strategies for its control have been investigated, as the use of botanical compounds. Among these products, *Azadirachta indica* (A. Juss.) (Sapindales: Meliaceae) oil is known by neem oil and responsible for causing death and several problems in insect development. This work aimed to evaluate the effect of sublethal doses of *A. indica* oil on biological and immunological features in *S. frugiperda*. To evaluate the effect on biology, second-instar caterpillars were, individually, fed on artificial diet containing neem vegetable oil with propanone, at 5 000, 10 000 and 15 000 ppm concentrations (1 ppm = μg oil/g diet) and control group, which received diet with just propanone. In each treatment, four replicates of 35 caterpillars were established and they were observed daily until pupation and emergence. We evaluated larval survival, larval and pupal time period, pupal weight and viability, wing length, proportion of deformed adults, fertility, fecundity and longevity. The oil in the diet reduced the caterpillar survival and retarded pupal and larval period. Pupal weight was reduced when the oil was ingested during the larval phase and proportion of deformed adults increased. There was no influence on pupal viability. The neem oil also reduced wing length, fecundity and longevity, but did not alter fertility. To evaluate the effect on immune system, second-instar caterpillars were placed, individually, in containers with artificial diet, propanone and neem oil at 125, 250 and 500 ppm concentrations and control group, which consisted in a diet with just propanone. Caterpillars remained in these containers until the end of the sixth instar, before enter in prepupa phase. For each treatment we evaluated: total haemocyte count, phagocytic activity, lysozyme-like activity and phenoloxidase activity. The total haemocyte count when the insects were subjected to different concentrations of neem oil was reduced. There was no difference in proportion of cells that phagocytosed latex beads when caterpillars have ingested neem oil. The halo diameter of cell lysis, which measures lysozyme-like activity, was only reduced when caterpillars have developed on diets contained neem oil at 125 and 250 ppm concentrations. There was no difference in phenoloxidase activity, by

evaluating the haemolymph absorbance, when insects have ingested an oil-containing diet. These results suggest that neem oil has a lethal and sublethal effect on *S. frugiperda*, causing multiple problems in development and immune system and this may reduce the probability of these insects maintain themselves in the environment. Besides, these results might be useful to design control strategies with the use of bioinsecticides.

Palavras-chave: development, haemocytes, immunology, fall armyworm, neem, botanical products.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Spodoptera frugiperda*

As espécies do gênero *Spodoptera* Guenée, 1852 (Lepidoptera, Noctuidae) são amplamente distribuídas no mundo e das 30 descritas, metade é considerada praga de variadas culturas de importância econômica (Pogue 2002).

Dentre estas, destaca-se a lagarta-do-cartucho ou lagarta-militar, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797), espécie polífaga e cosmopolita, ocorrendo em toda a América, considerada endêmica do continente americano (Juárez et al. 2012) e registrada em 19 estados brasileiros (EPPO 2019). Em 2016 foi registrada pela primeira vez na África, na Nigéria por Goergen et al. (2016), ocorrendo, atualmente, em 44 países africanos (Sisay et al. 2019). É uma praga importante de plantas da família Poaceae como o milho, o sorgo, o arroz e o trigo (Luginbill 1928; Cruz 1995; Busato et al. 2002; Capinera 2008), porém, é também relevante na produção do algodão, feijão, tomate, cana-de-açúcar, amendoim, batata e repolho (Sarmiento et al. 2002). Viana & Prates (2003) a consideraram a principal praga do milho e Cruz (2008) estimou uma perda de 400 milhões de dólares anualmente devido ao sério dano econômico causado por essa espécie nesta cultura.

Os ovos de *S. frugiperda* são de coloração verde clara e colocados em grupos na face inferior ou superior da folha (Sarmiento et al. 2002), eclodindo entre 2 a 4 dias (Luginbill 1928). As lagartas, medindo cerca de 50 mm de comprimento, apresentam coloração variando de parda escura, verde ou preta, três linhas longitudinais amareladas na parte dorsal e a cabeça de cor pardo-escura possuem suturas que se cruzam formando um “Y” invertido, característico da espécie (Sarmiento et al. 2002). A fase larval dura de 12 a 29 dias (Luginbill 1928) e as lagartas passam por seis a sete instares quando

penetram no solo e se transformam em pupas, de cor avermelhada, medindo em torno de 15 mm de comprimento (Sarmiento et al. 2002). Entre 9 a 27 dias (Luginbill 1928), emerge uma mariposa com uma envergadura de 35 mm, asas anteriores de coloração pardo-escura e posteriores branca-acinzentada (Sarmiento et al. 2002). Os autores ainda relataram que a temperatura é o fator ambiental de maior influência sobre o ciclo biológico de *S. frugiperda* e que completam o desenvolvimento ovo-adulto em 30 dias em uma temperatura média de 25 °C. Luginbill (1928) mencionou que os surtos desse inseto estão sempre associados às condições climáticas favoráveis, altas temperaturas e chuvas abundantes.

As lagartas se alimentam das folhas das plantas, reduzindo a área foliar, afetando sua capacidade fotossintética e conseqüentemente a produção (Sarmiento et al. 2002). A partir do 3º ínstar, podem atacar outras partes das plantas hospedeiras, como os botões florais e, principalmente, as maçãs em formação na cultura do algodão (Velooso & Nakano 1983; Luttrell & Mink 1999), as vagens na fase inicial de formação na soja (Barros et al. 2010) e a base da espiga no milho, destruindo grãos ou abrindo caminho para microrganismos e até mesmo provocando a queda da espiga (Cruz et al. 1999b). No milho, as lagartas ainda têm o hábito de se manter dentro do cartucho da planta (Barros et al. 2010).

A grande disponibilidade de hospedeiros ao longo do ano no Brasil cria uma ponte verde que pode favorecer a permanência dessa espécie no ambiente e conseqüentemente dificultar seu controle (Barros et al. 2010). Espécies vegetais distintas plantadas em áreas próximas podem facilitar a transferência de *S. frugiperda* entre as culturas (Nagoshi 2009).

Vista a importância dessa espécie para a agricultura, as medidas de controle são aplicadas de maneira intensa, geralmente, com inseticidas químicos sintéticos (Lima

et al. 2008), porém o uso indiscriminado destes pode aumentar os custos de produção, contaminar o ambiente e deixar resíduos nos alimentos (Da Rosa et al. 2012), além de causar um impacto sobre os inimigos naturais do inseto alvo e favorecer o aparecimento de resistência na população alvo (Martinelli & Omoto, 2006).

Em relação aos inimigos naturais, Molina-Ochoa et al. (2003) relataram uma grande diversidade de parasitoides que se desenvolvem em ovos, larvas ou pupas de *S. frugiperda* nas Américas e no Caribe, totalizando 148 espécies, distribuídas em 14 famílias, sendo Ichneumonidae e Braconidae as com maior diversidade de espécies. Na cultura do milho, Cruz et al. (2009) relataram o parasitoide ovolarval *Chelonus insularis* Cresson, 1865 (Hymenoptera: Braconidae) e os himenópteros parasitoides de larvas *Ophion flavidus* Brullé, 1846, *Campoletis flavicincta* (Ashmead, 1890) e *Eiphosoma* spp. Cresson, 1865 da família Ichneumonidae e *Exasticolus fuscicornis* (Cameron, 1887) e *Cotesia flavipes* Cameron, 1861 da família Braconidae, e ainda, parasitoides larvais da família Tachinidae (Diptera). Silva et al. (2011) relataram ainda os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* Riley, 1871 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Telenomus* Haliday, 1833 (Hymenoptera: Platygastriidae).

Espécies do gênero *Trichogramma* têm sido amplamente utilizadas nos Estados Unidos, China, Europa, Brasil e Índia (Mills 2010) devido a sua eficiência no controle e facilidade de se multiplicar em laboratório (Cruz et al. 1999a). Além desse gênero, *Telenomus* também tem tido destaque para o controle de lepidópteros pragas de várias culturas como algodão, arroz, cana-de-açúcar e milho (Figueiredo et al. 2002). Dentre as espécies desse gênero, *Telenomus remus* Nixon, 1937 é considerado altamente específico para espécies do gênero *Spodoptera* (Figueiredo et al. 2002). Apesar disso, somente o *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 está registrado para o controle desta espécie pelo Ministério da Agricultura (AGROFIT 2019).

Além dos parasitoides, alguns organismos entomopatogênicos podem ser usados para o controle dessa espécie, como os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokín, 1883 (Hypocreales: Clavicipitaceae) e *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., 1912 (Hypocreales: Cordycipitaceae) (Thomazoni et al. 2014), bactérias do gênero *Bacillus* Cohn, 1872 (Bacillales: Bacillaceae), principalmente *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (Cerqueira et al. 2016) e o vírus da poliedrose nuclear (SfMNPV) (Cisneros et al. 2002). Dessas espécies, somente *B. thuringiensis* e o vírus da poliedrose nuclear são registrados pelo Ministério da Agricultura para essa espécie (AGROFIT 2019).

Outra tecnologia que está sendo explorada para o controle dessa lagarta é o uso de plantas Bt, que contém genes obtidos da bactéria *B. thuringiensis*. O milho Bt foi liberado pela primeira vez para a comercialização em 2007 (MON810) contendo a proteína Cry1Ab (Waquil et al. 2013). No entanto, já existe relatos da resistência desse inseto, a campo, em plantas de milho que expressam as proteínas Cry1F (Farias et al. 2014) e Cry1Ab (Omoto et al. 2016) no Brasil.

1.2 Imunologia de insetos

A primeira linha de defesa dos insetos contra a ação de patógenos é representada pela cutícula e pelo mesêntero que formam uma barreira bastante eficiente contra a invasão dos patógenos (Chapman 2013). Quando essa falha, reações imunológicas começam a ser desencadeadas (Fernandes 2010).

O sistema imune como conhecemos a partir dos animais vertebrados é geralmente composto por duas etapas de ativação interligadas e denominadas imunidade inata ou natural e imunidade adaptativa ou adquirida (Jiravanichpaisal et al. 2006). É sabido que os insetos apresentam somente a imunidade inata (Lavine & Strand 2002), a

qual é bastante ativa e composta por elementos celulares de defesa e elementos humorais (Jiravanichpaisal et al 2006). A imunidade celular refere-se àquela mediada por hemócitos, envolvendo mecanismos como a fagocitose, nodulação e o encapsulamento (Lavine & Strand 2002). Já a imunidade humoral, inclui uma série de mecanismos de defesa que não envolve diretamente os hemócitos e estão disponíveis em forma solúvel na hemolinfa, envolvendo mecanismos como a produção de peptídeos antimicrobianos e os complexos de ativação enzimática da coagulação e melanização da hemolinfa (Lavine & Strand 2002)

1.2.1 Resposta inata celular

A resposta inata celular é a mediada por hemócitos, que basicamente incluem a fagocitose, a nodulação (formação de agregados celulares formando nódulos) e o encapsulamento (associação dos nódulos com processos de melanização formando cápsulas), estes últimos ocorrendo em combinação com as defesas humorais (Jiravanichpaisal et al. 2006).

Os hemócitos são responsáveis por reconhecer um corpo estranho tanto pela interação direta dos receptores de superfície destes com as moléculas do organismo invasor como indiretamente, pelo reconhecimento dos receptores humorais que se prendem e opsonizam a superfície do invasor (Lavine & Strand 2002). São derivados do mesoderma embrionário e posteriormente essas células são produzidas por mitose pelos hemócitos circulantes já existentes e/ou a partir de células indiferenciadas em estruturas conhecidas como órgãos hematopoiéticos presentes em imaturos de holometábolos e em todas as fases de hemimetábolos (Chapman 2013). Em *S. frugiperda*, esses órgãos têm uma forma de um lóbulo e estão localizados próximo aos discos imaginais, totalizando

quatro (Gardiner & Strand 2000) e segundo Nakahara et al. (2010), nesses órgãos somente são produzidos pró-hemócitos e plasmatócitos.

Os insetos apresentam vários tipos de hemócitos que são tradicionalmente identificados usando características morfológicas, histoquímicas e funcionais (Lavine & Strand 2002). Os hemócitos mais comumente relatados pela literatura são pró-hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos e oenocitoides (Ratcliffe & Price 1974; Lavine & Strand 2002; Cunha 2007; Klowden 2008). Esses hemócitos foram descritos em espécies de diversos grupos que incluem Collembola, Blattaria, Orthoptera, Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera (Lavine & Strand 2002).

Pró-hemócitos são os menores hemócitos presentes na hemolinfa e são considerados como as células-tronco que embrionicamente dão origem aos outros tipos e não estão envolvidos na fagocitose (Lavine & Strand 2002; Klowden 2008). Plasmatócitos são maiores que os pró-hemócitos e pleiomórficas, frequentemente envolvidos na fagocitose, na formação de cápsulas e nódulos (Ribeiro & Brehélin 2006; Klowden 2008). Granulócitos são esféricos, contendo grânulos basófilos no seu citoplasma (Ratcliffe & Price 1974; Cunha 2007), são responsáveis, principalmente, pela fagocitose e são as primeiras células a entrar em contato, em pequenas quantidades, com um corpo estranho, liberando seus grânulos a fim de atrair plasmatócitos ou, pelo menos, ajudá-los a construir a cápsula ou nódulo (Ribeiro & Brehélin 2006). Os plasmatócitos e os granulócitos compreendem juntos mais de 70% dos tipos de hemócitos em Lepidoptera (Gardiner e Strand 2000)

Existem também outras células menos abundantes como os esferulócitos, os quais são células esféricas e imóveis de função desconhecida (Ribeiro & Brehélin 2006); os oenocitoides, que são os maiores hemócitos, também imóveis (Cunha 2007;

Klowden 2008), encarregados de carregar uma das fenoloxidasas que são responsáveis pela produção de melanina, e os cistócitos, os quais são células arredondadas (Ratcliffe & Price 1974), muitas vezes chamadas de coagulócitos (Gupta 2009), que atuam na coagulação.

Chapman (2013) relatou que em insetos hemimetábolos, o número total de hemócitos (NTH) é geralmente similar entre as formas imaturas e adultas, mas em espécies holometábolos é comum as larvas terem um maior NTH que os adultos, o qual tende a aumentar e ser variável ao longo do desenvolvimento larval. O NTH também pode ser aumentado nos primeiros dias pós-inoculação de um patógeno e reduzir nos últimos estágios da infecção, provavelmente, devido à agregação de hemócitos (nódulos) (Gillespie et al. 2000; Chouvinc et al. 2009).

Os hemócitos possuem várias funções que compreendem a resposta inata celular: fagocitose, nodulação e encapsulamento (Lavine & Strand 2002). A fagocitose é um dos principais processos celulares, que se inicia com o reconhecimento de agentes estranhos pelos receptores de ligação a padrões moleculares específicos ou por marcadores com função de opsoninas (Jiravanichpaisal et al. 2006). Klowden (2008) descreveu as etapas da fagocitose e expõe que após o reconhecimento o processo é seguido pela formação de pseudópodos e a internalização de partículas estranhas para um fagossomo ligado à membrana. Em seguida ele se funde com o lisossoma onde o agente estranho é digerido e destruído pelos compostos que são liberados. O mesmo autor relatou que os plasmatócitos e granulócitos parecem ser os principais hemócitos responsáveis por esse mecanismo de defesa.

A nodulação refere-se ao fenômeno onde vários hemócitos se aderem a agregações de microrganismos (Lavine & Strand 2002). Nas defesas celulares, após a invasão de microrganismos os hemócitos migram rapidamente para o local, fagocitam e

destroem os invasores (Fernandes 2010). Quando a população de patógenos é muito elevada, sendo difícil de ser fagocitada, os hemócitos se agregam e formam nódulos a fim de imobilizá-los e removê-los da circulação (Klowden 2008; Fernandes 2010).

Quando os insetos são infectados por estruturas maiores como larvas e ovos de endoparasitoides, ao invés de formar nódulos, o inseto se defende formando cápsulas (Strand & Pech 1995). Durante o encapsulamento, múltiplas camadas de hemócitos formam uma parede contra o agente estranho, prevenindo que ele tenha contato com as outras células do inseto e acesso a fontes de oxigênio e nutrição (Klowden 2008). São também os plasmatócitos e os granulócitos os envolvidos nesse mecanismo de defesa, começando com o reconhecimento do agente estranho, desencadeando a liberação de grânulos e atraindo plasmatócitos para o local (Klowden 2008). Este mesmo autor ainda afirmou que esses hemócitos se tornam achatados e rodeiam o corpo estranho, podendo formar uma camada de 50 células ou mais. O recrutamento cessa quando a cápsula formada é revestida por glicosaminoglicanas e por fim, melanina (Klowden 2008). Os plasmatócitos e granulócitos são incapazes de realizar o processo de encapsulamento de forma independente (Pech & Strand 1996). O encapsulamento parece apresentar semelhança estrutural com a nodulação, sugerindo ser essencialmente o mesmo processo, embora contra alvos diferentes (Lavine & Strand 2002).

1.2.2 Resposta inata humoral

Esta resposta envolve a produção de peptídeos antimicrobianos, a ativação da coagulação e a cascata de melanização, todas elas ocorrendo sem a participação direta dos hemócitos (Vilmos & Kurucz 1998; Jiravanichpaisal et al. 2006).

O primeiro mecanismo da resposta inata humoral envolve a produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) que ajudam os insetos na defesa contra grupos

específicos de microrganismos (Klowden 2008). As rotas de ativação para a produção de PAMs são ativadas com o a detecção de receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) (Casanova-Torres & Goodrich-Blair 2013). Os RRP são proteínas solúveis ou ligadas à membrana que se acoplam a padrões moleculares associados a patógenos como lipopolissacarídeo, ácido lipoteicoico, peptideoglicano ou *beta*-1,3-glicano que são liberados ou encontrados nas superfícies celulares de bactérias ou fungos (Yu et al. 2002). O reconhecimento de RRP irá ativar uma das duas principais rotas de sinalização presente nos insetos: Toll ou Imd, onde bactérias gram-positivas e fungos geralmente ativam a rota Toll e bactérias gram-negativas geralmente ativam a rota Imd (Rosales 2017). Cada rota vai estimular fatores de transcrição resultando na produção de peptídeos antifúngicos ou antibacterianos pelos corpos gordurosos, os quais são secretados na hemolinfa (Moret & Siva-Jothy 2003). O reconhecimento de uma parede celular fúngica, por exemplo, irá induzir a produção de um peptídeo antifúngico e não de um antibacteriano (Klowden 2008). Algumas dessas respostas antimicrobianas são induzidas inclusive na ausência de antígenos, somente por um ferimento, inferindo-se que isso seja uma resposta profilática do inseto (Moret & Siva-Jothy 2003).

Os PAMs aparecem de duas a quatro horas após uma infecção e podem ser sintetizados a uma taxa que é três vezes maior que a da reprodução de bactérias (Klowden 2008). O mesmo autor relatou que os insetos podem produzir de 10 a 15 diferentes tipos de PAMs, cada um apresentando um espectro distinto. O primeiro PAM a ser relatado em insetos foi a lisozima, em *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) (Rosales 2017). As lisozimas são enzimas responsáveis por hidrolisar as ligações *beta*-(1,4)-glicosídicas entre os ácidos *N*-acetilmurâmico e *N*-acetilglicosamina presentes no peptideoglicano na parede celular bacteriana (Callewaert & Michiels 2010). Os mesmos autores relataram que essas lisozimas estão presentes em todos os

grandes *taxa* de animais vivos e que diferentes tipos de lisozimas podem ser identificados: tipo-c (lisozima extraída de galinhas), tipo-g (lisozima extraída de gansos) e, mais recentemente, o tipo-i (lisozima extraída de invertebrados). Eles ainda afirmaram que os insetos, em sentido amplo, produzem somente as lisozimas tipo-c e tipo-i.

O segundo mecanismo da resposta inata humoral é a coagulação, a qual, após a lesão, é desencadeado um aparato eficiente que rapidamente evita a perda de hemolinfa e também ajuda a impedir que microrganismos entrem e se espalhem pela hemocele (Jiravanichpaisal et al. 2006). A formação do coágulo é intensamente estudada em Lepidoptera, sendo dois tipos de hemócitos envolvidos, os granulócitos e os plasmatócitos (Theopold et al. 2004). Os mesmos autores afirmaram que, em Lepidoptera, a coagulação pode ser dividida em quatro etapas: 1) a degranulação de hemócitos que leva ao estabelecimento de agregados extracelulares que selam o ferimento (*soft clot*); 2) a ativação da cascata da profenoloxidase, que induz a reticulação do coágulo (*hard clot*); 3) a atração dos plasmatócitos e a sua dispersão por todo o coágulo, selando a hemocele e formando a crosta; e 4) a regeneração da epiderme, crescendo em toda a região do ferimento, substituindo a crosta. Gupta (2009) relatou que os cistócitos ou coagulócitos possuem papel importante na coagulação da hemolinfa e que essas células apresentam fenoloxidasas que podem ser extravasadas no processo de coagulação.

O terceiro mecanismo da resposta inata humoral é a cascata da profenoloxidase, a qual catalisa a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos para produzir melanina (Da Silva 2002). O mesmo autor afirmou que esse composto participa de três processos fisiológicos importantes: esclerotização da cutícula, cicatrização de feridas e defesa imunológica. A fenoloxidase

(PO) se encontra na forma de uma proenzima, denominada profenoloxidase (proPO), a qual é ativada proteoliticamente por uma ou duas serinoproteases em resposta às infecções por bactérias, fungos, lipopolissacarídeos (presentes na parede celular de gram-negativas), peptidoglicanas (na parede celular de gram-positivas), beta-1,3 glicanas (na parede celular de fungos e algas), enzimas proteolíticas de parasitoides (tripsina e quimotripsina) e injúrias nos tecidos (Da Silva 2002).

A proPO está presente na hemolinfa ou em hemócitos, e em alguns casos, em ambos, dependendo da espécie do inseto (Gillespie & Kanost 1997). Fenoloxidase é uma enzima bastante ativa e os produtos intermediários de sua ativação são tóxicos tanto para os microrganismos invasores como para o próprio inseto, por isso sua ativação é limitada ao local de infecção, caso contrário poderia levar a uma melanização generalizada e letal para o inseto (Da Silva 2002).

1.3 *Azadirachta indica*

O gênero *Azadirachta* A. Juss. (Sapindales, Meliaceae) compreende três espécies: *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs (nim filipino), *Azadirachta siamensis* Val. (nim tailandês) e *Azadirachta indica* A. Juss. (nim indiano) (Sombastsiri et al. 1995), sendo este último o que possui a maior importância econômica.

Azadirachta indica, planta conhecida como nim indiano, nim ou amargosa, tem origem do Sudeste Asiático e subcontinente indiano (Brahmachari 2004; Campos et al. 2016). Apesar de ter se originado na Ásia, hoje está presente em todos os continentes pela introdução antrópica, principalmente em zonas áridas de clima tropical ou subtropical da Ásia, África, Américas, Austrália e Ilhas do Pacífico Sul (Schmutterer 1995). Segundo este autor, como ou por quem as primeiras sementes foram trazidas para as Américas e onde foram plantadas é desconhecido, mas é possível que tenham

vindo com imigrantes indianos para as ilhas de Trinidad e Tobago ou Guiana. O nim é uma planta tipicamente tropical ou subtropical, persistindo em zonas com temperatura média anual de 21 a 32 °C (Schmutterer 1995), entretanto, pode tolerar temperaturas altas a muito altas, como no nordeste da África central onde estas atingem 50 °C durante o verão. Conforme o autor, em temperaturas baixas como 4 °C ocorre a abscisão foliar e até a morte de plantas jovens.

É uma planta arbórea perene que pode atingir até 30 m de altura e copa com diâmetro de 10 m (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000). Possui folhas imparipenadas medindo de 20 a 40 cm de comprimento (Schmutterer 1995). As flores brancas são produzidas em inflorescências que dão origem a frutos elipsoides amarelos esverdeados do tipo drupa (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000). O fruto compreende uma polpa carnosa envolvendo um caroço que consiste em uma casca contendo uma, raramente duas e muito raramente três amêndoas alongadas (Schmutterer 1995), onde se encontra a maior concentração de compostos ativos (Brahmachari 2004). Todas as partes da planta, como frutas, sementes, folhas, flores, caule e raízes são, entretanto, produtoras de compostos secundários (Mordue (Luntz) 2004). Essa espécie possui mais de 100 compostos biológicos ativos, principalmente, triterpenoides (Campos et al. 2016), que apresentam propriedades inseticidas, repelência e deterrência. Os triterpenoides são caracterizados por apresentarem uma cadeia de 30 carbonos, geralmente conjugados com carboidratos e são altamente oxigenados (Isman 2002). O triterpenoide mais importante presente no óleo de nim é a azadiractina, que é um conjunto de sete compostos desde azadiractina A até azadiractina G (Verkerk & Wright 1993). Entretanto, outros compostos importantes também estão presentes, como o meliantriol, nimbina, nimbidina, nimbinina, nimbolide, salanina e ácidos graxos (oléico, esteárico e palmítico) (Campos et al. 2016).

Ermel (1995), coletando 256 amostras de nim em 22 países, registrou uma média de 46,7% (38,2–54,1%) de óleo extraído das amêndoas e uma proporção média de 3,6 (2,05–6,10) mg de azadiractina por grama de amêndoa. O mesmo autor ainda comentou que a combinação de altas temperaturas e alta umidade relativa do ar tem impacto negativo na qualidade das sementes (proporção de azadiractina) de nim. Além disso, o autor mencionou a possibilidade de condições edáficas e climáticas das distintas regiões, bem como dos genótipos das plantas, influenciarem na qualidade.

Por séculos o nim tem sido usado na medicina tradicional para tratamento de malária, úlceras, doenças cardiovasculares e problemas de pele (Campos et al. 2016), além de ser muito empregado na indústria dos cosméticos em loções, protetores solares, sabões e cremes dentais (Mathur & Kachhwah 2015). Uma série de aplicações do nim como anti-inflamatório, antitumor, imunoestimulante, bactericida, fungicida e nematocida foram apontadas por Kraus (1995). Biswas et al. (2002), em uma revisão das propriedades médicas do nim, listaram também a atividade hipoglicêmica, efeito esterilizante, antimalária, antiviral e antioxidante. Para os insetos, o nim apresenta repelência (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000), atividade inseticida, efeito de deterrência alimentar (Kraus 1995; Mordue (Luntz) & Nisbet 2000) e inibição de crescimento (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000). Chaudhary et al. (2017) relataram que o óleo de nim não é tóxico para mamíferos, aves e peixes e possui uma chance reduzida de causar resistência a insetos por apresentarem diferentes modos de ação nesses organismos.

Um dos problemas que se tem no uso do óleo de nim para o controle de insetos de importância econômica é a baixa persistência no ambiente, como foi registrado por Stokes & Redfern (1982), os quais observaram que após sete dias de exposição à luz solar, a concentração de azadiractina foi reduzida em mais de 50% em relação à inicial e completamente esgotada quando o composto foi exposto à luz por mais de 16 dias.

Riyajan & Sakdapipanich (2009) relataram que a azadiractina A é altamente fotolável, sendo isomerizada ou quebrada devido à luz solar. Estes autores também apontaram que a fotodegradação é um dos principais problemas que limita seu uso como inseticida, pois não persiste tempo suficiente no ambiente para causar a morte ou efeitos subletais nos insetos. Frente a esse problema, algumas alternativas foram sugeridas, como a cobertura de alginato de sódio e borracha natural (Riyajan & Sakdapipanich 2009) e o uso de nanoformulações (Giongo et al. 2016), ambos com resultados promissores.

Outro problema encontrado no uso do óleo de nim para o controle é que pode não ser seletivo para o inseto alvo, como registrado por Gonçalves-Gervásio & Vendramin (2004) ao avaliar a ação do extrato de nim sobre *T. pretiosum* se desenvolvendo em ovos de *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae). Os autores relataram que quando os ovos de *E. kuehniella* foram expostos ao extrato antes do parasitismo, o número de ovos parasitados por *T. pretiosum* e a sua subsequente emergência foram reduzidas. Além disso, mesmo quando o extrato foi aplicado depois do parasitismo, em qualquer fase de desenvolvimento do parasitoide, a emergência foi reduzida. Córdor-Golec (2007), revisando o efeito dos produtos de nim em parasitoides de insetos, relatou mortalidade ou efeito subletal em espécies como *Trichogramma minutum* Riley, 1871, *Trichogramma cacoeciae* Marchal, 1927 e *Trichogramma chilonis* Ishii, 1941 da família Trichogrammatidae (Hymenoptera), *Cotesia vestalis* (Haliday, 1834), *Bracon hebetor* (Say, 1836), *Diaretiella rapae* (M'Intosh, 1855) e *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson, 1880) da família Braconidae (Hymenoptera) e *Encarsia pergandiella* Howard, 1907 (Hymenoptera: Aphelinidae).

Também pode causar efeitos negativos aos polinizadores, cujo impacto da exposição ao óleo de nim em *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) foi relatado por Xavier et al. (2015). Os autores mencionaram que o óleo de nim causa mortalidade tanto

de larvas quanto de operárias de *A. mellifera*, muda o comportamento de forrageamento por serem repelentes para esses insetos e diminui a atividade de locomoção das operárias, sugerindo que esses compostos devem ser usados com cautela e não aplicados diretamente em plantas com flores.

1.3.1 Efeito do óleo de *A. indica* na fisiologia dos insetos

Schmutterer & Singh (1995), em uma revisão sobre os efeitos do nim em insetos, relataram 413 espécies/subespécies de insetos, distribuídas em 13 ordens, que foram sensíveis aos efeitos do nim quando testadas em laboratório, dentre estas, 136 (32,9%) pertencem à ordem Lepidoptera. Nesses trabalhos compilados pelos autores, o nim foi testado de diversas formas: desde pó de folhas ou sementes de nim, até extratos, óleos e compostos ativos. Os principais efeitos nos insetos mencionados nos trabalhos foram a atividade deterrente alimentar e os distúrbios hormonais, que juntos afetam indiretamente o crescimento, desenvolvimento, reprodução e ainda, o sistema imune.

Isman (2002) definiu o termo deterrente alimentar como sendo uma substância de alteração do comportamento que impede a alimentação através da ação direta nas sensilas periféricas (órgãos gustatórios) dos insetos. Os principais compostos presentes no óleo de nim que causam esse efeito são a azadiractina (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000), meliantriol e salanina (Campos et al. 2016). A azadiractina atua nos quimiorreceptores, bloqueando receptores que respondem a fagoestimulantes e/ou estimulando células deterrentes (Mordue (Luntz) & Blackwell 1993). Mordue (Luntz) (2004) relatou que a deterrência alimentar é dividida em dois tipos: a primária, que consiste na inabilidade de ingerir, resultante da percepção do composto a um nível sensorial; e a secundária, que consiste na redução do consumo alimentar como consequência da ingestão, aplicação ou injeção do composto. A autora complementou

que pela ação secundária, o inseto acaba ingerindo cada vez menos na próxima alimentação, até que a ingestão seja completamente suprimida. Mordue (Luntz) & Blackwell (1993) referiram que, de uma maneira geral, uma mortalidade significativa ocorre quando os efeitos da deterrência secundária começam a aparecer.

O efeito deterrente pelo óleo de nim já foi constatado em vários insetos como: *Schistocerca americana* (Drury, 1770) (Orthoptera: Acrididae) (Sandoval-Mojica & Capinera 2010), *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) (Pinheiro & Quintela 2010), *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) (Koul et al. 1997), *Macrosiphoniella sanborni* (Gillette, 1908) (Hemiptera: Aphididae) e *Macrosiphum rosae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) (Koul 1999), *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae) (Showler et al. 2004), *Microtheca punctigera* Archard, 1917 (Coleoptera: Chrysomelidae) (Mikami & Ventura 2008) e *Anopheles stephensi* Liston, 1901 (Diptera: Culicidae) (Lucantoni et al. 2006). Esse mesmo efeito também foi observado em lepidópteros das espécies: *Pieris brassicae* (L.) (Pieridae) (Hasan & Ansari 2011), *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée, 1854 (Crambidae) (Nathan et al. 2005), *Plutella xylostella* Linnaeus, 1767 (Plutellidae) (Liang et al. 2003), *Helicoverpa armigera* Hübner, 1827 (Noctuidae) (Ahmad et al. 2015) e *Mamestra brassicae* L. (Noctuidae) (Meadow & Seljåsen 2000). Senthil-Nathan (2013), em uma revisão sobre os efeitos de produtos oriundos de Meliaceae em diversas espécies de Lepidoptera, referiram que a deterrência alimentar foi registradas em 18 espécies de lepidópteros devido à exposição ao óleo de nim.

Apesar da maioria dos autores observarem a atividade deterrente alimentar do óleo de nim em insetos, Isman (2002) relatou que os registros desse efeito pela azadiractina são, sem dúvida, confundidos com a potente ação como regulador de crescimento que esse composto tem devido às alterações hormonais. Além da

deterrença alimentar, Hasan & Ansari (2011) mostraram que fêmeas de *P. brassicae* quando expostas, sem chance de escolha, a folhas de repolho aspergidas com produtos formulados de nim e a folhas que receberam apenas água, colocaram mais ovos no último grupo. Da mesma forma, quando lhes foram oferecidas, simultaneamente, folhas aspergidas e não aspergidas com nim, puseram mais ovos naquelas do grupo controle (somente com água) (Hasan & Ansari 2011). Bruce et al. (2004) mencionaram algo semelhante quando expuseram plantas tratadas e não tratadas com nim a duas espécies de lepidópteros: *Sesamia calamistis* Hampson, 1910 (Noctuidae) e *Eldana saccharina* Walker, 1865 (Pyrilidae), constatando um maior número de ovos nas plantas não tratadas.

Outro problema importante causado pelo óleo de nim são as alterações hormonais, que, segundo Verkerk & Wright (1993), são decorrentes principalmente da ação da azadiractina A. Mordue (Luntz) (2004) relatou que os efeitos causados pelo óleo de nim são desencadeados pelo bloqueio de rotas hormonais que interferem na liberação de dois hormônios importantes para o desenvolvimento do inseto: os ecdisteroides (20E) e o hormônio juvenil (HJ). A azadiractina bloqueia a liberação de peptídeos morfogenéticos do cérebro, como o hormônio protoracicotrópico (HPTT), alatropinas e alatotastinas; enquanto o HPTT é responsável por estimular as glândulas protorácicas a sintetizar 20E, as alatropinas e as alatotastinas são responsáveis, respectivamente, por estimular e inibir a liberação de HJ (Mordue (Luntz) 2004).

O efeito mais comumente avaliado em decorrência dessas alterações hormonais é a mortalidade. Vários autores, avaliando a exposição ao óleo ou extrato de nim, ou um de seus compostos, relataram a mortalidade de insetos de diversas ordens como: Orthoptera (Ghazawi et al. 2007), Hemiptera: Sternorrhyncha (Koul 1999) e Heteroptera (Zanuncio et al. 2016), Coleoptera (Mikami & Ventura 2008), Lepidoptera

(Gonçalves-Gervásio & Vendramim 2007), Hymenoptera (Xavier et al. 2015) e Diptera (Rashid & Ahmad 2013). Essa mortalidade também foi apontada ainda quando somente os ovos foram expostos ao composto, antes da eclosão do imaturo, inviabilizando a eclosão (Verkerk & Wright 1993; Hasan & Ansari 2011).

Caso o óleo de nim não cause a morte do inseto, diversos efeitos fisiológicos podem ser desencadeados durante seu desenvolvimento como aumento no período larval em *H. armigera* (Ahmad et al. 2015), *Spodoptera littoralis* Boisduval, 1833 (Lepidoptera: Noctuidae) (Martinez & Van Emden 2001) e *Bonagota salubricola* Meyrick, 1931 (Lepidoptera: Tortricidae) (Bernardi et al. 2011); aumento na duração da fase ninfal em *Dysdercus cingulatus* (Fabricius, 1775) (Hemiptera: Pyrrhocoridae) (Pandey & Tiwari 2011); redução do peso larval em *P. xylostella* (Verkerk & Wright 1993; Liang et al. 2003), *Spodoptera exempta* Walter, 1856 (Lepidoptera: Noctuidae) (Tanzubil & McCaffery 1990) e *E. saccharina* (Bruce et al. 2004); aumento do período pupal em *H. armigera* (Ahmad et al. 2015), *S. calamistis* e *E. saccharina* (Bruce et al. 2004); redução no peso pupal em *Danaus chrysippus* (L.) (Lepidoptera: Nymphalidae) (Pandey et al. 2008), *H. armigera* (Ahmad et al. 2015) e *S. exempta* (Tanzubil & McCaffery 1990); redução na viabilidade pupal em *D. chrysippus* (Pandey et al. 2008), *H. armigera* (Ahmad et al. 2015), *S. exempta* (Tanzubil & McCaffery 1990), *S. littoralis* (Martinez & Van Emden 2001) e *B. salubricola* (Bernardi et al. 2011); além de deformações larvais e pupais em *S. littoralis* (Martinez & Van Emden 2001).

Os adultos acabam sendo afetados, mesmo quando foram as larvas ou ninfas que ingeriram algum produto originado do nim, apresentando, por exemplo, deformação das asas verificado em *D. cingulatus* (Pandey & Tiwari 2011), *S. littoralis* (Martinez & Van Emden 2001) e *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae) (Schneider et al. 2017); redução da fecundidade em *D. cingulatus* (Pandey & Tiwari 2011), *D.*

saccharalis (Schneider et al. 2017), *S. littoralis* (Pineda et al. 2009), *B. salubricola* (Bernardi et al. 2011), *S. calamistis* e *E. saccharina* (Bruce et al. 2004); redução na fertilidade em *D. saccharalis* (Schneider et al. 2017), *S. littoralis* (Pineda et al. 2009), *S. calamistis* e *E. saccharina* (Bruce et al. 2004) e atraso na oogênese em *A. stephensi* (Lucantoni et al. 2006).

Em uma revisão sobre os efeitos da azadiractina, Mordue (Luntz) & Blackwell (1993) relataram que esse composto em fases imaturas nos insetos resulta em: (a) adultos com longevidade e fecundidade reduzida, (b) adultos ápteros ou com asas retorcidas, (c) ninfas ou larvas que morrem durante a ecdise incapazes de completá-la, (d) pupas com uma série de deformidades, (e) ninfas ou larvas que morrem imediatamente antes da ecdise, (f) insetos que permanecem por muito tempo em fase larval e (g) insetos que morrem em poucas horas após o tratamento. Esses autores descreveram esses fenômenos em insetos de várias ordens como Orthoptera, Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera. A azadiractina também pode ter outros modos de ação como inibir mitose, necrosar corpos gordurosos e agir sobre os músculos do vôo, do intestino e do movimento (Mordue (Luntz) & Blackwell 1993).

O óleo de *A. indica*, além de causar uma série de alterações biológicas nos insetos devido ao seu efeito deterrente alimentar e às alterações hormonais, também provoca impactos no sistema imune dos insetos, tais como a redução do número total de hemócitos, observada em *Spodoptera litura* Fabricius, 1775 (Lepidoptera: Noctuidae) (Sharma et al. 2003) e *D. cingulatus* (Pandey & Tiwari 2011); alterações na proporção dos diferentes tipos celulares constatada em *D. chrysippus* (Pandey et al. 2008); redução do número de nódulos verificada em *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) (Azambuja et al. 1991) e *G. mellonella* (Er et al. 2017); redução do volume da hemolinfa registrada em *S. litura* (Sharma et al. 2003), da atividade mitótica em *G.*

mellonella (Er et al. 2017), da atividade fagocítica (Figueiredo et al. 2006), da atividade lisozimática e da profenoloxidase em *R. prolixus* (Azambuja et al. 1991).

Em *S. frugiperda*, o óleo de nim causa, além da mortalidade de larvas (Lima et al. 2010; Roel et al. 2010; Campos & Boiça Jr. 2012) e de ovos (Tavares et al. 2010), deterrência alimentar e alterações histofisiológicas da matriz peritrófica (Roel et al. 2010) aumento da duração das fases larval e pupal, redução no peso da pupa (Lima et al. 2010; Roel et al. 2010), diminuição na viabilidade pupal, longevidade dos adultos e aparecimento de deformidades morfogenéticas em pupas e adultos (Lima et al. 2010) e alterações na proporção dos diferentes hemócitos (Correia et al. 2008).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito subletal do óleo de *A. indica* sobre a biologia e imunologia de *S. frugiperda*.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Investigar a ação por ingestão do óleo de *A. indica* sobre a sobrevivência de imaturos de *S. frugiperda*.
- Avaliar o efeito do óleo de nim na duração dos períodos larvais e pupais e sobre o peso e viabilidade de pupas de *S. frugiperda*.
- Mensurar o impacto do óleo de nim na fertilidade, fecundidade, longevidade e comprimento da asa de adultos de *S. frugiperda* quando se desenvolveram em uma dieta contendo óleo de *A. indica*.

- Avaliar o efeito do óleo sobre o número total de hemócitos e o seu potencial fagocítico em imaturos de *S. frugiperda* após ingerirem óleo de *A. indica*.
- Estimar o impacto da ingestão de óleo de *A. indica* na ação de enzimas tipo lisozima e sobre a atividade da fenoloxidase em larvas de *S. frugiperda*.

2 RESULTADOS GERAIS

Artigo I – Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) Oil on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae and Adults

- A sobrevivência de lagartas que se alimentaram da dieta contendo óleo de nim foi menor e reduziu conforme as concentrações do óleo aumentavam.
- A duração do período larval e pupal aumentaram quando os imaturos desta espécie se desenvolveram em dieta contendo óleo de *A. indica*.
- O peso pupal de *S. frugiperda* foi reduzido em aproximadamente 29% na dieta contendo a maior concentração de óleo em relação ao grupo controle.
- A porcentagem de adultos que emergiram com deformações nas asas foi maior quando as lagartas ingeriram óleo de *A. indica*.
- O tamanho da asa, a fecundidade média e a longevidade média foram reduzidas quando as larvas se desenvolveram em dieta contendo óleo de nim.

Artigo II – Efeito subletal do óleo de *Azadirachta indica* sobre o sistema imune de *Spodoptera frugiperda*

- As lagartas que se alimentaram do óleo de nim tiveram uma redução no número total de hemócitos em relação ao grupo controle.
- A atividade fagocítica das células de imaturos de *S. frugiperda* não foi influenciada pela ingestão de óleo de *A. indica*.
- Insetos que se desenvolveram em dieta contendo óleo de *A. indica* tiveram uma menor ação de enzimas tipo lisozima, através da avaliação pelo diâmetro do halo de lise celular.

- O óleo não influencia na atividade da fenoloxidase, pela avaliação da absorbância da hemolinfa, em imaturos de *S. frugiperda* quando ingerido juntamente com a dieta artificial.

3 REFERÊNCIAS¹

- AGROFIT. 2019. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brazil. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons (last accessed 30 Jun 2019).
- Ahmad S, Ansari MS, Muslim M. 2015. Toxic effects of neem based insecticides on the fitness of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Crop Protection* 68: 72–78.
- Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA, Warthen JD. 1991. Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. *Journal of Insect Physiology* 37: 771–777.
- Barros EM, Torres JB, Bueno AF. 2010. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Neotropical Entomology* 39: 996–1001.
- Bernardi D, Neto e Silva OAB, Bernardi O, da Silva A, da Cunha US, Garcia MS. 2011. Efficiency and sublethal effects of neem on *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae). *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 412–419.
- Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science* 82: 1336–1345.
- Brahmachari G. 2004. Neem – An omnipotent plant: a retrospection. *ChemBioChem* 5: 408–421.
- Bruce YA, Gounou S, Chabi-Olaye, Smith H, Schulthess F. 2004. The effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil on oviposition, development and reproductive

¹ Referências formatadas conforme as normas da revista Florida Entomologist (Anexo 1).

- potentials of *Sesamia calamistis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae) and *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Agricultural and Forest Entomology* 6:
- Busato GR, Grutzmacher AD, Garcia MS, Giolo FP, Martins AF. 2002. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. *Neotropical Entomology* 31: 525–529.
- Callewaert L, Michiels CW. 2010. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences* 35: 127–160.
- Campos AP, Boiça Jr AL. 2012. Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) submetidas a diferentes concentrações de óleo de nim. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 11: 137–144.
- Campos EVR, Oliveira JL, Pascoli M, Lima R, Fraceto LF. 2016. Neem oil and crop protection: from now to the future. *Frontiers in Plant Science* 7: 1–8.
- Capinera JL [ed.]. 2008. *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Casanova-Torres AM, Goodrich-Blair H. 2013. Immune signaling and antimicrobial peptide expression in Lepidoptera. *Insects* 4: 320–338.
- Cerqueira FB, Alves GB, Corrêa RFT, Martins ES, Barbosa LCB, Nascimento IR, Monnerat RG, Ribeiro BM, Aguiar RWS. 2016. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with a high insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioscience Journal* 32: 1522–1536.
- Chapman RF [ed.]. 2013. *The insects: structure and function*. Cambridge University Press, New York, The United States.

- Chaudhary S, Kanwar RK, Sehgal A, Cahill DM, Barrow CJ, Sehgal R, Kanwar JR. 2017. Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. *Frontiers in Plant Science* 8: 610.
- Chouvenc T, Su N, Robert A. 2009. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 234–241.
- Cisneros J, Pérez JÁ, Penados DI, Ruiz J, Goulson D, Caballero P, Cave RD, Williams T. 2002. Formulation of a Nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological Control* 23: 87–95.
- Cóndor-Golec AF. 2007. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) insecticides on parasitoids. *Revista Peruana de Biología* 14: 69–74.
- Correia AA, Wanderley-Teixeira V, Teixeira AAC, de Olivera JV, Torres JB. 2008. Dinâmica hemocitária em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). *Boletín de Sanidad Vegetal – Plagas* 34: 357–365.
- Cruz I. 1995. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. EMBRAPA, Sete Lagoas, Brazil. (Circular Técnica, 21).
- Cruz I. 2008. Milho: Cerco completo. *Revista Cultivar* 109: 23–27.
- Cruz I, Figueiredo MLC, Matoso MJ. 1999a. Controle Biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitoide de ovos *Trichogramma*. EMBRAPA, Sete Lagoas, Brazil. (Circular Técnica, 30).
- Cruz I, Figueiredo MLC, Silva RB, Del Sarto ML, Pentead-Dias AM. 2009. Monitoramento de parasitoides de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E.

- Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em municípios de Minas Gerais, Brasil. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Brasil.
- Cruz I, Figueiredo MLC, Oliveira AC, Vasconcelos CA. 1999b. Damages of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. *International Journal of Pest Management* 45: 293–296.
- Cunha FM. 2007. Aspectos imunológicos e morfologia do canal alimentar de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). Dissertation (Master in Entomologia Agrícola). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Da Rosa APA, Trecha CO, Alvez AC, Garcia L, Gonçalves VP. 2012. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em linhagens de milho. *Arquivos do Instituto Biológico* 79: 39–45.
- Da Silva CCA. 2002. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 24: 68–72.
- EPPO. 2019. EPPO Global Database. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). <https://gd.eppo.int> (last accessed 29 Oct 2019).
- Er A, Taşkiran D, Sak O. 2017. Azadirachtin-induced effects on various life history traits and cellular immune reactions of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Biological Sciences* 69: 335–344.
- Ermel K. 1995. Azadirachtin content of neem seed kernels from different regions of the world, pp. 89–92 *In* Schmutterer H [ed.] *The Neem Tree: Azadirachta indica A. Juss and other Meliaceae plants*. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

- Farias JR, Horikoshi RJ, Santos AC, Omoto C. 2014. Geographical and temporal variability in susceptibility to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. *Journal of Economic Entomology* 107: 2182–2189.
- Fernandes EG. 2010. Estudos dos parâmetros biológicos envolvendo fungos entomopatogênicos e *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): imunologia, interação patógenos-hospedeiro, fisiologia e controle biológico. Dissertation (Master in Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Figueiredo MB, Castro DP, Nogueira NFS, Garcia ES, Azambuja P. 2006. Cellular immune response in *Rhodnius prolixus*: role of ecdysone in hemocyte phagocytosis. *Journal of Insect Physiology* 52: 711–716.
- Figueiredo MLC, Della Lucia TMC, Cruz I. 2002. Effect of *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) density on control of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses upon release in a maize field. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 1: 12–19.
- Gardiner EMM, Strand MR. 2000. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 43: 147–164.
- Ghazawi NA, El-Shranoubi ED, El-Shazly MM, Rahman KMA. 2007. Effects of azadirachtin on mortality rate and reproductive system of the grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research* 16: 57–65.

- Gillespie JP, Burnett C, Charnley AK. 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Insect Physiology* 46: 429–437.
- Gillespie JP, Kanost MR. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42: 611–643.
- Giongo AMM, Vendramim JD, Forim MR. 2016. Evaluation of neem-based nanoformulations as alternative to control fall armyworm. *Ciência e Agrotecnologia* 40: 26–36.
- Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M. 2016. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *Plos One* 11: 1–9.
- Gonçalves-Gervásio RCR, Vendramim JD. 2004. Effect of Meliaceae extracts on the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotropical Entomology* 33: 607–612.
- Gonçalves-Gervásio RCR, Vendramim JD. 2007. Bioatividade do extrato aquoso de semente de nim sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em três formas de aplicação. *Ciência e Agrotecnologia* 31: 28–34.
- Gupta AP [ed.]. 2009. *Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques*. Cambridge University Press, Cambridge, The United Kingdom.
- Hasan F, Ansari MS. 2011. Toxic effects of neem-based insecticides on *Pieris brassicae* (Linn.). *Crop Protection* 30: 502–507.
- Isman MB. 2002. Antifeedants: insect antifeedants. *Pesticide Outlook* 13: 152–157.

- Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211: 213–236.
- Juárez ML, Murúa MG, García MG, Ontivero M, Vera MT, Vilardi JC, Groot AT, Castagnaro, AP, Gastaminza G, Willink E. 2012. Host association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and Rice strain in Argentina, Brazil, and Paraguay. *Journal of Economic Entomology* 105: 573–582.
- Klowden MJ. 2008. Circulatory systems, pp. 357–401 *In* Klowden MJ [ed.] *Physiological systems in insects*. Academic Press, San Diego, The United States.
- Koul O. 1999. Insect growth regulating and antifeedant effects of neem extracts and azadirachtin on two aphid species of ornamental plants. *Journal of Biosciences* 24: 85–90.
- Koul O, Shanker JS, Mehta N. 1997. Antifeedant activity of neem seed extracts and azadirachtin to cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.). *Indian Journal of Experimental Biology* 35: 994–997.
- Kraus W. 1995. Biologically active ingredients, pp. 35–88 *In* Schmutterer H [ed.] *The Neem Tree: Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceous plants. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- Lavine MD, Strand MR. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295–1309.
- Liang G, Chen W, Liu T. 2003. Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection* 22: 333–340.
- Lima JFM, Grützmaier DA, Cunha US, Porto PM, Martins SJF, Dalmaso OG. 2008. Ação de inseticidas naturais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith,

- 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho cultivado em agroecossistema de várzea. *Ciência Rural* 38: 607–613.
- Lima MPL, Oliveira JV, Gondim Jr MGC, Marques EJ, Correia AA. 2010. Bioatividade de formulações de NIM (*Azadirachta indica* A. Juss, 1797) e de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência e Agrotecnologia* 34: 1381–1389.
- Lucantoni L, Giusti F, Cristofaro M, Pasqualini L, Esposito F, Lupetti P, Habluetzel A. 2006. Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue and Cell* 38: 361–371.
- Luginbill P. 1928. The fall armyworm. US Department of Agriculture Technical Bulletin 34: 1–91.
- Luttrell RG, Mink JS. 1999. Damage to cotton fruiting structures by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Cotton Science* 3: 35–44.
- Martinelli S, Omoto C. 2006. Resistência de lepidópteros-praga a inseticidas na cultura do algodão no Brasil. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras* 10: 1167–1182.
- Martinez SS, Van Emden HF. 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Crop Protection* 30: 113–125.
- Mathur S, Kachhwaha S. 2015. Neem tree: amazing beauty component in skin and hair care. *Advances in Pharmacology and Toxicology* 16: 31–43.
- Meadow R, Seljåsen R. 2000. Neem seed extract against *Mamestra brassicae* in field grown cabbage. *Vegetable Crops Research Bulletin* 52: 63–67.

- Mikami AY, Ventura UM. 2008. Repellent, antifeedant and insecticidal effects of neem oil on *Microtheca punctigera*. Brazilian Archives of Biology and Technology 51: 1121–1126.
- Mills N. 2010. Egg parasitoids in biological control and integrated pest management, pp. 389–412 In Cònsoli FL, Parra JRP, Zucchi RA [eds.] Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Molina-Ochoa J, Carpenter JE, Heinrichs EA, Foster JE. 2003. Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean basin: na inventory. Florida Entomologist 86: 254–289.
- Mordue (Luntz) AJ. 2004. Present concepts of the mode of action of azadirachtin from neem, pp. 229–242 In Koul O, Wahab S [eds.], Neem: Today and in the New Millennium. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mordue (Luntz) AJ, Blackwell A. 1993. Azadirachtin: an update. Journal of Insect Physiology 39: 903–924.
- Mordue (Luntz) AJ, Nisbet AJ. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 29: 615–632.
- Moret Y, Siva-Jothy MT. 2003. Adaptative innate immunity? Responsive mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. Proceedings of the Royal Society 270: 2475–2480.
- Nagoshi RN. 2009. Can the amount of corn acreage predict fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation levels in nearby cotton? Journal of Economic Entomology 102: 210–218.

- Nakahara Y, Kanamori Y, Kiuchi M, Kamimura M. 2010. Two hemocyte lineages exist in silkworm larval hematopoietic organ. *Plos One* 5: 1–9.
- Nathan SS, Kalaivani K, Murugan K, Chung PG. 2005. Efficacy of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae) the rice leaf folder. *Crop Protection* 24: 760–763.
- Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP. 2016. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science* 72: 1727–1736.
- Pandey JP, Tiwari RK. 2011. Neem based insecticides interaction with development and fecundity of red cotton bug, *Dysdercus cingulatus* Fab. *International Journal of Agricultural Research* 6: 335–346
- Pandey JP, Tiwari RK, Kumar D. 2008. Reduction in haemocyte mediated immune response in *Danais chrysippus* following treatment with neem-based insecticides. *Journal of Entomology* 5: 200–206.
- Parra JRP, Botelho PSM, Correa-Ferreira BS, Bento JMS [eds.]. 2002. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Editora Manole, São Paulo, Brazil.
- Pech LL, Strand MR. 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science* 109: 2053–2060.
- Pineda S, Martínez A, Figueroa J, Schneider M, Del Estal P, Viñuela E, Gómez B, Smagghe G, Budia F. 2009. Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 102: 1490–1496.

- Pinheiro PV, Quintela ED. 2010. Neem oil antifeedant and insecticidal effects on *Oebalus poecilus* (Hemiptera: Pentatomidae) males and females. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 40: 394–400.
- Pogue GM. 2002. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Memoirs of the American Entomological Society* 43: 1–202.
- Rashid M, Ahmad A. 2013. The effect of neem (*Azadirachta indica*) leaves extract on the ecdysis and mortality of immature stages of common house mosquito *Culex pipiens fatigans*. *Biologia* 59: 213–219.
- Ratcliffe NA, Price CD. 1974. Correlation of light and electron microscopic hemocyte structure in the Dictyoptera. *Journal of Morphology* 144: 485–497.
- Ribeiro C, Brehélin M. 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that? *Journal of Insect Physiology* 52: 417–429.
- Riyajan S, Sakdapipanich JT. 2009. Development of a controlled release neem capsule with a sodium alginate matrix, crosslinked by glutaraldehyde and coated with natural rubber. *Polymer Bulletin* 63: 609–622.
- Roel AR, Dourado DM, Matias R, Porto KRA, Bednaski AV, Costa RB. 2010. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 54: 505–510.
- Rosales C. 2017. Cellular and molecular mechanisms of insect immunity, pp. 179–212 *In* Shields VDC [ed.] *Insect Physiology and Ecology*. IntechOpen, London, The United Kingdom.
- Sandoval-Mojica AF, Capinera JL. 2010. Antifeedant effect of commercial chemicals and plant extracts against *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae) and

- Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). Pest Management Science 67: 860–868.
- Sarmento RA, Aguiar RWS, Aguiar RASS, Vieira SMJ, Oliveira HG, Holtz AM. 2002. Revisão da biologia, ocorrência, e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. Bioscience Journal 18: 41–48.
- Schmutterer H. 1995. The tree and its characteristics, pp. 1–34 In Schmutterer H [ed.] The Neem Tree: *Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceous plants. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- Schmutterer H, Singh RP. 1995. Effects on viruses and organisms, pp. 326–366 In Schmutterer H [ed.] The Neem Tree: *Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceous plants. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- Schneider LCL, Silva CV, Conte H. 2017. Toxic effect of commercial formulations of neem oil, *Azadirachta indica* A. Juss., in pupae and adults of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). Arquivos do Instituto Biológico 84: 1–8.
- Senthil-Nathan S. 2013. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insect. Frontiers in Physiology 4: 1–17.
- Sharma PR, Sharma OP, Saxena BP. 2003. Effect of neem gold on haemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Current Science 84: 690–695.
- Showler AT, Greenberg SM, Arnason JT. 2004. Deterrent effects of four neem-based formulations on gravid female boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and oviposition on cotton squares. Journal of Economic Entomology 97: 414–421.

- Silva RB, Cruz I, Figueiredo MLC, Costa MA, Redoan ACM, Morato JB. 2011. Dinâmica populacional de parasitoides de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho (*Zea mays* L.) cultivado no sistema orgânico de produção. *Cadernos de Agroecologia* 6: 1–5.
- Sisay B, Simiyu J, Mendesil E, Likhayo P, Ayalew G, Mohamed S, Subramanian S, Tefera T. 2019. Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* infestations in East Africa: assessment of damage and parasitism. *Insects* 10: 195.
- Sombastsiri K, Ermel K, Schmutterer H, Ascher KRS, Zebitz CPW, Naqvi SNH. 1995. Other Meliaceae plants containing ingredients for Integrated Pest Management and further purposes, pp. 585–612 *In* Schmutterer H [ed.] *The Neem Tree: Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceae plants. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- Stokes JB, Redfern RE. 1982. Effect of sunlight on azadirachtin: antifeeding potency. *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 17: 57–65.
- Strand MR, Pech LL. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology* 40: 31–56.
- Tanzubil PB, McCaffery AR. 1990. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. *Crop Protection* 9: 383–386.
- Tavares WS, Cruz I, Fonseca FG, Gouveia NL, Serrão JE, Zanuncio JC. 2010. Deleterious activity of natural products on postures of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Zeitschrift für Naturforschung* 65: 412–418.

- Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS. 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology* 25: 289–294.
- Thomazoni D, Formentini MA, Alvez LFA. 2014. Patogenicity of entomopathogenic fungi to *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Arquivos do Instituto Biológico* 81: 126–133.
- Veloso VRS, Nakano O. 1983. Determinação do número de estruturas frutíferas do algodoeiro, danificadas por lagartas de *S. frugiperda* (J.E. Smith, 1797), (Lepidoptera, Noctuidae) em diferentes épocas de desenvolvimento da cultura. *Anais das Escolas de Agronomia e de Veterinária* 12/13: 117–126.
- Verkerk RHJ, Wright DJ. 1993. Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. *Pesticide Science* 37: 83–91.
- Viana PA, Prates HT. 2003. Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*. *Bragantia* 62: 69–74.
- Vilmos P, Kurucz E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* 62: 59–66.
- Waquil JM, Dourado PM, Carvalho RA, Oliveira WS, Berger GU, Head GP, Martinelli S. 2013. Management of lepidopteran pests in maize crop using the Bt pyramided event Cry1A.105 and Cry2Ab2. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 48: 1529–1537.
- Xavier VM, Message D, Picanço MC, Chediak M, Santana Jr PA, Ramos RS, Martins JC. 2015. Acute toxicity and sublethal effects of botanical insecticides to honey bees. *Journal of Insect Science* 15: 1–6.

Yu X, Zhu Y, Ma C, Fabrick JA, Kanost MR. 2002. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1287–1293.

Zanuncio JC, Mourão AS, Martínez LC, Wilcken CF, Ramalho FS, Plata-Rueda A, Soares MA, Serrão JE. 2016. Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Scientific Reports* 6: 1–8.

4 ARTIGO I

Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) Oil on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae and Adults²

² Artigo publicado em 2019 na revista Florida Entomologist.
Duarte JP, Redaelli LR, Jahnke SM, Trapp S. 2019. Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) Oil on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae and Adults. Florida Entomologist 102(2): 408–412. doi: 10.1653/024.102.0218.

5 ARTIGO II

Efeito do óleo de *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) no sistema imune de
Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae)³

³ Artigo será submetido para o periódico Journal of Insect Science (Anexo 2).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo que avalia o efeito do óleo de *A. indica* sobre adultos de *S. frugiperda* quando larvas foram mantidas em dieta artificial contendo este óleo e o primeiro que avalia o efeito deste óleo no número total de hemócitos, na atividade fagocítica, na ação de enzimas tipo lisozima e na atividade da fenoloxidase.

Conhecer o efeito subletal do óleo de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* é importante para saber o que pode acontecer com aquelas lagartas que sobrevivem depois de uma aplicação deste produto. Nosso trabalho sugere que, mesmo que o inseto não morra diretamente pelos efeitos tóxicos do nim, ele pode tornar os insetos mais suscetíveis a outros agentes de mortalidade, em função do impacto causado no desenvolvimento e no número de hemócitos.

A lagarta não morrendo de inanição devido ao efeito deterrente alimentar do óleo, pode ainda sofrer uma série de alterações hormonais e problemas relacionados à ecdise e morrer pela ação de parasitoides ou predadores, por estar mais vulnerável. Ademais, caso ela complete o desenvolvimento, existe ainda a probabilidade de gerar um adulto com deformações das asas e/ou com dificuldade de voar, em decorrência do tamanho reduzido destas. Esse adulto, além de estar vulnerável a inimigos naturais, pode ter dificuldade de encontrar parceiros para cópula, diminuir a quantidade de ovos depositados, bem como ter a longevidade reduzida. Assim, mesmo que o inseto atinja a fase adulta, existe uma grande chance de que a população da geração seguinte seja diminuída.

O sistema imune também é impactado com a ação do óleo, visto que o número de hemócitos é reduzido. Embora este não tenha interferido na atividade fagocítica e da fenoloxidase, a ação no número de hemócitos é relevante, uma vez que eles são os

principais meios de defesa imunológica que os insetos apresentam. Essa redução pode também aumentar a susceptibilidade a patógenos, parasitos e parasitoides. Além disso, o óleo causou uma redução na atividade de enzimas tipo lisozima, que também pode interferir na defesa do inseto frente a patógenos.

Todos esses efeitos foram observados em laboratório, onde o inseto ingeriu dieta artificial contendo óleo de nim. Entretanto, essas condições são diferentes das que ocorrem na natureza, onde os insetos têm chance de escolha e o efeito do óleo de nim é perdido com a exposição à luz solar, devido à fotodegradação das moléculas. Assim, são necessários estudos que avaliem em situações de campo.

Outro fator a ser considerado é que a composição dos óleos vegetais é muito variável, isto é, depende da planta de onde foram extraídos, da parte vegetal (folhas, frutos, sementes), do clima e do tipo de solo onde a mesma foi cultivada. Essas variáveis podem aumentar ou diminuir as concentrações dos diferentes compostos, logo, óleos extraídos de plantas distintas podem causar impactos diferentes numa mesma espécie de inseto. Sendo assim, a diferença da concentração de óleo utilizada nos dois artigos apresentados nesse trabalho se deve possivelmente aos distintos lotes adquiridos da mesma empresa.

Apesar da observação do potencial do óleo de nim para o controle de *S. frugiperda* em laboratório, é importante também ter o conhecimento de outros fatores como o efeito sobre o meio ambiente, polinizadores e inimigos naturais. Além disso, é preciso conhecer o impacto do produto na geração seguinte, bem como sobre o terceiro nível trófico (predadores e parasitoides) que se alimentaram dos insetos expostos ao óleo. Esses fatores precisam ser bem analisados para que não haja um desequilíbrio no ecossistema devido ao uso desse produto.