

Avaliação do desenvolvimento e reservas energéticas de larvas de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera:Curculionidae) em diferentes dietas

Camilla C. Santana¹, Josiel S. Nascimento¹, Mariana de M. Costa¹,
Antônio T. da Silva¹, Camila B. Dornelas¹ & Luciano A. M. Grillo¹

¹ Universidade Federal de Alagoas, Escola de Enfermagem e Farmácia, Campus A C Simões, Av Lourival de Melo Mota, Tabuleiro do Martins, CEP 57072-970, Maceió-AL, Brasil. E-mail: millacamerino@gmail.com; josielsantos32@gmail.com; maricosta90@hotmail.com; antonio_thomas.al@hotmail.com; dornelascb@yahoo.com.br; lucianomeirelesgrillo@gmail.com

RESUMO

A cultura das palmáceas é de grande importância, uma vez que faz parte do ecossistema agrícola produtivo, fornecendo produtos e subprodutos, como óleo, gorduras, minerais, vitaminas essenciais e frutos frescos gerando rendas para as populações. O *Rhynchophorus palmarum* é uma das principais pragas das culturas sendo vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus*, agente causal da doença do Anel vermelho. Não existem métodos eficientes e ecologicamente viáveis que possam reduzir significativamente os danos e a grande dificuldade na captura das larvas em campo leva à necessidade de criação de larvas em massa, em laboratório, para a realização de bioensaios. O objetivo deste trabalho foi determinar a influência de dieta artificial no desenvolvimento de larvas do *R. palmarum* em laboratório, avaliando taxa de mortalidade, ganho de peso e diferenças no acúmulo de lipídios e carboidratos em comparação com a dieta natural. Os resultados mostram que em dieta artificial o índice de mortalidade é inferior ao da dieta natural, com rápido e pronunciado ganho de peso refletido na variação das reservas energéticas nos adipócitos. A criação de larvas em dieta artificial apresentou parâmetros fisiológicos e de viabilidade significantes para sua utilização no desenvolvimento de bioensaios, o que pode auxiliar futuros estudos para o controle desse inseto.

Palavras-chave: coleobroca, dieta artificial, glicogênio, lipídios

Evaluation of the development and energetic reserves of Rhynchophorus palmarum (Coleoptera:Curculionidae) larvae on different diets

ABSTRACT

The cultivation of palm trees is of great importance, since it is part of the productive agricultural ecosystem, providing products such as oil, fats, minerals, essential vitamins and fresh fruit for generating income for the population. The *Rhynchophorus palmarum* is one of the important crop pests and vector nematode *Bursaphelenchus cocophilus*, causal agent of Red Ring. There are no efficient and ecologically viable methods that can significantly reduce the damage and the great difficulty in capturing larvae in the field leads to the need of rearing larvae in laboratory for performing bioassays. The aim of this study was to determine the influence of artificial diet on the development of larvae of *R. palmarum*, assessing mortality, weight and differences in the accumulation of lipids and carbohydrates compared to natural diet. The results showed that in artificial diet the mortality rate is lower than the natural diet, with rapid and pronounced weight gain, reflected in the variation of energy reserves in adipocytes. The rearing of larvae in artificial diet showed significant physiological parameters and viability for use in the development of bioassays, which may help in future studies of control of this insect.

Key words: borers, artificial diet, glycogen, lipids

Introdução

A cultura das palmáceas se destaca em muitos países pelos aspectos econômicos, sociais e ambientais. Apresentam extensa gama de produtos tornando-a um importante recurso vegetal; seu avanço vem ocorrendo, no Brasil, pela evolução em patamares produtivos e condiciona o país um lugar de destaque entre os maiores produtores mundiais de produtos derivados dessas culturas (Santos, 2008). Dentre os quais, se destacam óleos, gorduras, minerais, vitaminas essenciais, frutos frescos, sendo utilizados na produção de óleo de mesa, margarina, glicerol, cosméticos, detergentes sintéticos, sabão, velas e até fluidos para freio de avião (Luvielmo et al., 2004). No entanto, um dos maiores problemas se refere ao controle fitossanitário com os insetos-praga limitando ainda mais sua exploração visto que são os principais responsáveis pela baixa produtividade das culturas (Duarte et al., 2008).

O inseto *Rhynchophorus palmarum* é uma das pragas mais importantes, sendo vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus*, agente causal da doença do Anel vermelho, responsável por número significativo de perdas na cultura levando a planta, em geral, à morte (Magalhães et al., 2008). Pertencente à maior ordem de animais existente (Ordem: Coleoptera; Família: Curculionidae), o *R. palmarum* é um besouro cujo macho é responsável pela liberação do feromônio de agregação durante a fase reprodutiva. O ciclo de vida dura em torno de 120 dias, sendo de 3 a 5 na fase de ovo, 70 na fase larval e cerca de 40 dias na fase de adulto. Os adultos e as larvas de *R. palmarum* fazem galerias no meristema apical das palmáceas e os odores emanados dos tecidos atacados atraem outros indivíduos machos e fêmeas da espécie (Giblin-Davis, 2001). Os métodos de controle incluem estratégias mecânicas e químicas, utilizando-se armadilhas com feromônios sexuais sintéticos para captura dos insetos adultos (Navarro et al., 2002; Duarte et al., 2003). Ainda não existem métodos eficientes e ecologicamente viáveis que possam reduzir significativamente os danos e a grande dificuldade na captura das larvas em campo leva à necessidade de alternativas para a sua criação massal em laboratório, em busca da realização de bioensaios que possam auxiliar no controle da população do inseto.

Apesar da importância desse inseto, pouquíssimos trabalhos na literatura dão ênfase à sua biologia e comportamento e as informações são preliminares concentrando-se mais nos aspectos relacionados aos seus danos. Desta forma, o estudo da sua fisiologia pode levar a possíveis alvos para controle larval com impacto direto nos insetos adultos ou, ainda, ser associado a estratégias de controle da praga. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar o desenvolvimento e alguns aspectos do acúmulo de reservas energéticas por larvas do *R. palmarum* utilizando-se duas dietas visando à produção em larga escala e com grande viabilidade para desenvolvimento de bioensaios em laboratório.

Material e Métodos

Dois dietas foram realizadas com vista à criação de larvas de *R. palmarum*, sendo uma artificial e outra com mesocarpo de coco.

As larvas de *R. palmarum* foram obtidas de colônia do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos da Universidade Federal de Alagoas; as larvas foram mantidas a 28 °C com umidade relativa entre 70 e 80% alimentadas *ad libitum*. Grupos de 20 larvas, três dias após a eclosão foram submetidos à dieta artificial (Tabela 1), adaptada de Sarro et al. (2005) e outro grupo de 20 larvas foi submetido à dieta natural composta tão somente de mesocarpo de coco, em quantidades equivalentes. O desenvolvimento larval (viabilidade e ganho de peso) e demais parâmetros, foram acompanhados durante 15, 30, 45 e 60 dias.

Tabela 1. Componentes da dieta artificial para larvas de *R. palmarum*

Componentes	Quantidades
Ácido propiônico (mL)	0,37
Açúcar refinado (g)	5,5
Ágar-ágar (g)	10
Água destilada (mL)	100
Aveia em flocos (g)	17
Farinha de milho fina (fubá) (g)	32,5
Fibra de cana (g)	26
Solução vitamínica (mL)	10

Em referência à avaliação dos níveis de glicose e trealose, a hemolinfa das larvas foi coletada em solução salina contendo feniltiourea (3-13 mg mL⁻¹) (Sigma Aldrich), mantida em gelo, centrifugadas (5 min – 13.000 g) e o sobrenadante utilizado. A concentração de glicose foi determinada por incubação durante 30 min a 37 °C utilizando kit comercial, conforme as instruções do fabricante (glucox® Kit enzimático para dosagem de glicose; Doles, Inc.). Para determinação de trealose as amostras foram incubadas com trealose (0,1 U Sigma Aldrich) em tampão fosfato 40 mM, pH 5,5 durante 4 h a 40 °C (Mariano et al., 2009). Após a incubação a quantidade de glicose derivada da hidrólise da trealose foi determinada como descrito acima.

Na avaliação do teor de glicogênio as larvas foram dissecadas e os corpos gordurosos retirados para análise. Os tecidos homogeneizados em solução tampão contendo acetato de sódio 10 mM, pH 4,8 foram submetidos a centrifugação a 10.000 g por 10 min. Aliquotas do sobrenadante foram incubadas com 1 unidade de amilglicosidase (Sigma-Aldrich) por 4 h, a 40 °C, e a concentração de glicose foi determinada a partir do glicogênio, por incubação, durante 30 min, a 37 °C.

O ensaio com vanilina foi utilizado para medida de lipídios no corpo gorduroso (Williams et al., 2011). Aos tubos com os tecidos homogeneizados foi adicionado ácido sulfúrico e, em seguida, levados para incubação a 95 °C por 10 min. Aliquotas de 5 mL de vanilina foram adicionadas e as amostras mantidas no escuro por 45 min com consequente leitura no espectrofotômetro, a 530 nm. O cálculo da concentração de lipídios nas amostras foi realizado utilizando-se uma curva padrão de trioleína.

Todos os dados são expressos como média ± média do erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (two-way ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Os níveis de significância foram 0,05 e os valores de *p* são indicados nas legendas das figuras.

Resultados e Discussão

Observou-se que larvas submetidas à dieta artificial tiveram porcentagem de mortalidade bem inferior em comparação com as larvas em dieta natural, diferença que aumenta nos dias 15, 30, 45 e 60, quando em dieta natural a mortalidade é em torno de 50% já nos primeiros 15 dias, enquanto que em dieta artificial este valor é em torno de 28% (Figura 1A). O ganho de peso em dieta natural foi menor e mais tardio comparado a um ganho de peso rápido em dieta artificial, sendo expressivo com 15 dias e aumentando até 60 dias (Figura 1B). A dieta artificial supriu a necessidade fisiológica do inseto refletindo em um

padrão melhor de qualidade para os ensaios em laboratório. O nível de nutrientes estocados é fundamental, sobretudo no ciclo de vida de insetos holometábolos, visto que, durante a alimentação na fase larval, as reservas energéticas acumuladas, além de usadas nos processos de metamorfose irão prover a reserva de nutrientes para o inseto adulto (Mirth & Riddiford, 2007).

Quanto aos níveis de glicose e trealose na hemolinfa, observou-se aumento de ambos ao longo dos dias, sobretudo em dieta artificial (Figura 2A e 2B).

Esses aumentos refletem nas reservas de glicogênio no corpo gorduroso das larvas. O nível dos insetos alimentados das duas dietas aumenta ao longo dos dias sugerindo que os

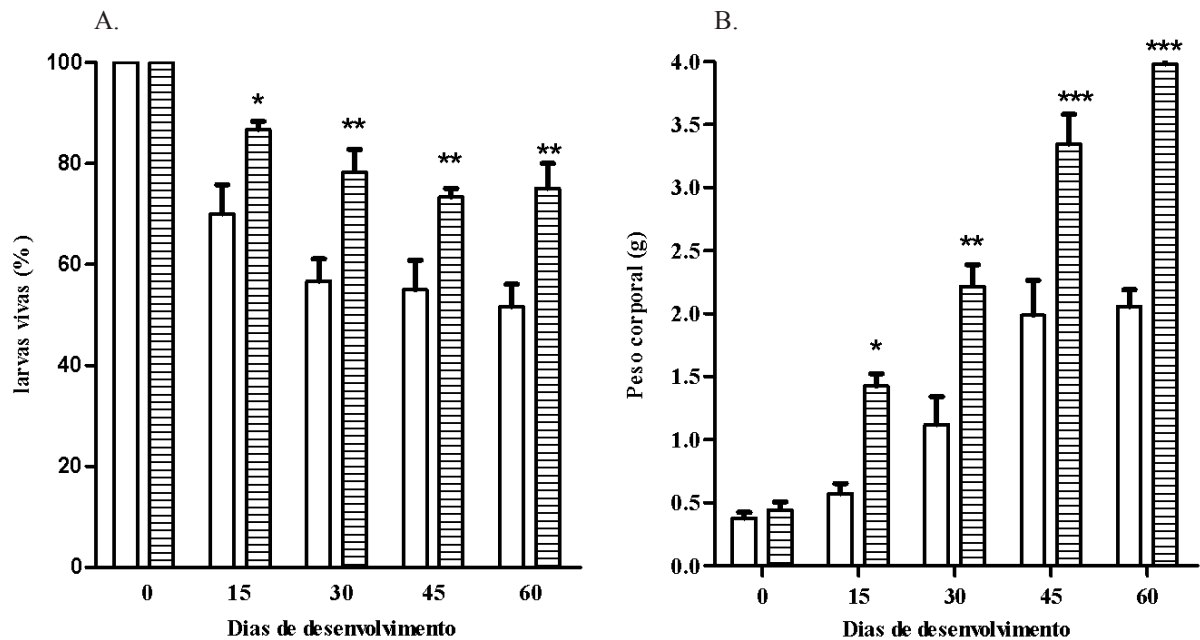


Figura 1. Medida de viabilidade e peso de larvas de *Rhynchophorus palmarum* submetidas a duas dietas (barras abertas dieta normal; barras tracejadas dieta artificial). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,001$)

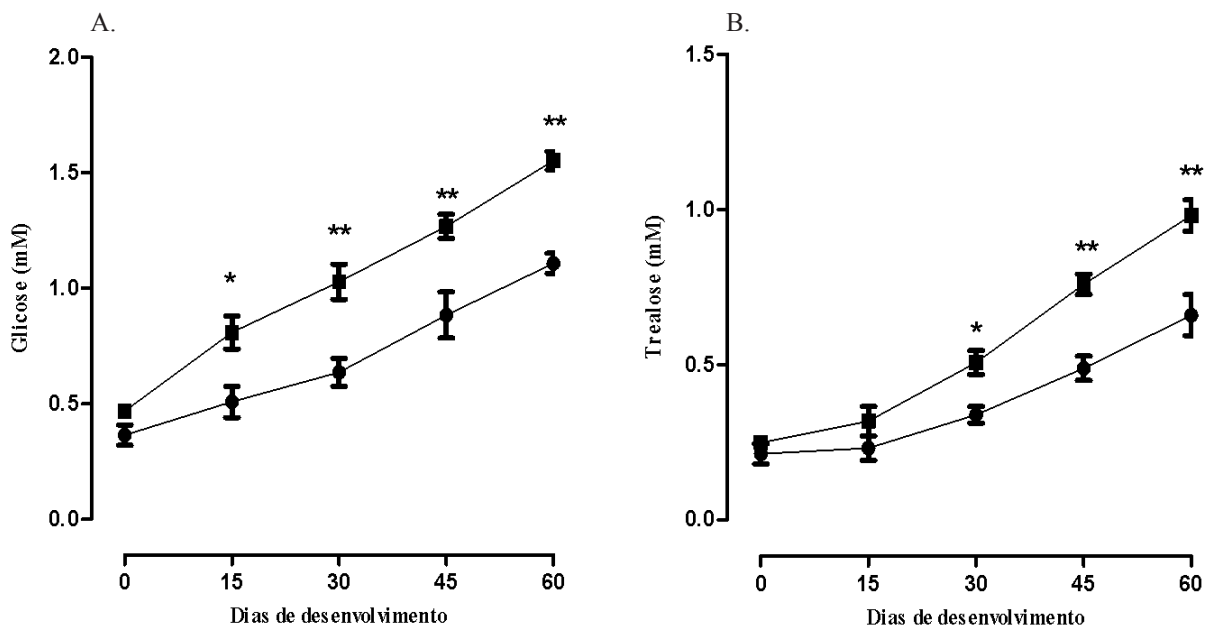


Figura 2. Teor de glicose e trealose na hemolinfa de larvas de *Rhynchophorus palmarum* submetidas a duas dietas (círculos dieta normal; quadrados dieta artificial). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,001$)

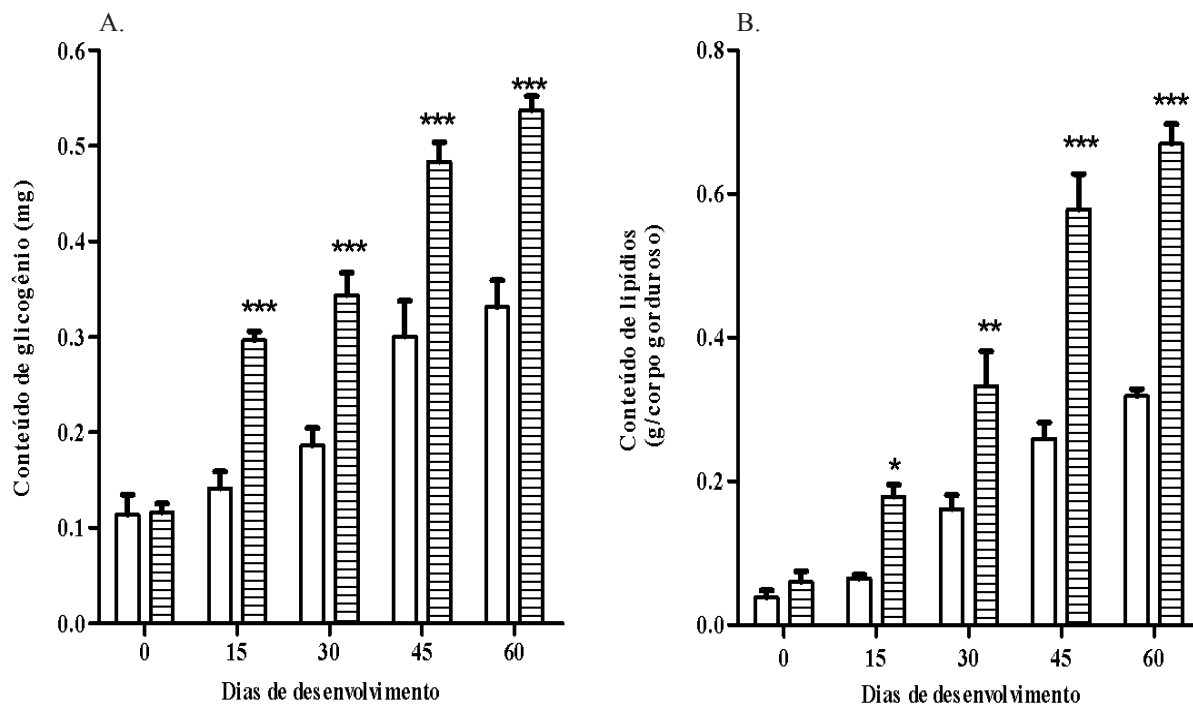


Figura 3. Teor de glicogênio e triglicerídeos do corpo gorduroso de larvas de *Rhynchophorus palmarum* submetidas a duas dietas (barras abertas dieta normal; barras tracejadas dieta artificial). As barras verticais representam a média do erro padrão em 3 determinações diferentes (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,001$; *** = $P < 0,0001$)

carboidratos digeridos no intestino estão sendo armazenados na forma de glicogênio no corpo gorduroso; 15 dias depois, este aumento já é significativo com ingestão da dieta artificial (Figura 3A). Esses dados são consistentes com a literatura já que a glicose é estocada na forma de glicogênio o qual é rapidamente mobilizado para uso nos tecidos na forma de trealose (Thompson, 2003). Os carboidratos são utilizados para manutenção do metabolismo energético durante o período de jejum, síntese de quitina, sendo importante ainda no processo de voo nos insetos (Kaufmann & Brown, 2008). Estudos com vários insetos têm mostrado que a aclimação ao frio leva ao aumento no conteúdo de glicose e trealose e essas mudanças são suportadas pela rápida mobilização de glicogênio (Overgaard et al., 2007; Vanin et al., 2008). Esses fatores podem estar relacionados à menor mortalidade de larvas submetidas à dieta artificial.

Os adipócitos de insetos estocam grande quantidade de lipídios, essenciais para crescimento e reprodução e ainda proveem energia necessária durante os longos períodos sem alimentação (Hahn & Denlinger, 2007). Este perfil de estocagem de lipídios na fase larval é encontrado ao longo dos dias, com aumento gradativo de lipídios nos grupos alimentados com as duas dietas testadas. Tal como no peso das larvas e no conteúdo de glicogênio, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, mostrando a alta taxa de acúmulo de lipídios pela larva (Figura 3B).

Essas considerações têm impacto direto no metabolismo energético do inseto favorecendo sua utilização em bioensaios no laboratório, sobretudo a respeito do metabolismo de lipídios e carboidratos. As reservas lipídicas são as mais importantes utilizadas pelo inseto, visto a alta demanda energética para os processos de metamorfose (Hahn & Denlinger, 2007),

desenvolvimento do embrião e períodos prolongados de voo (Ziegler & Van Antwerpen, 2006) e representam, em alguns insetos, mais de 50% do seu peso seco, a maior parte desses lipídios estocada na forma de triglicerídeos, normalmente sintetizados a partir de carboidratos da dieta. Observaram-se parâmetros bioquímicos e de viabilidade para criação em dieta artificial de larvas de *R. palmarum* visando à utilização em bioensaios, o que pode auxiliar em estudos da biologia deste vetor e propor novas alternativas para controle do inseto. O acúmulo gradativo de reservas energéticas pode vir a ser objeto de estudos mais aprofundados visto que os adipócitos dos insetos têm papel majoritário no metabolismo. A função de estocagem de nutrientes é essencial para o ciclo de vida de insetos, sobretudo holometábolos, que devem acumular uma quantidade mínima de nutrientes durante os instares larvais para sobreviver durante os períodos de jejum e metamorfose (Hahn & Denlinger, 2007).

Conclusões

Os dados mostram que larvas de *R. palmarum* alimentadas com dieta artificial têm aumento pronunciado dos níveis de glicogênio e lipídios, com cerca de 75% de viabilidade em 60 dias, mostrando-se adequada para desenvolvimento de bioensaios.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido a este trabalho pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL).

Literatura Citada

- Duarte, A. G.; Lima, I. S.; Araújo Júnior, J. V.; Duarte, A. G.; Albuquerque, A. L. S.; Cruz, M. M. Disposição do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, em coqueiros portadores da doença anel-vermelho. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, n.3, p.622-627, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452008000300010>>.
- Duarte, A. G.; Lima, I. S.; Navarro, D. M. A. F.; Sant'ana, A. E. G. Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) em armadilhas iscadas com o feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.25, n.1, p.81-84, 2003. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452003000100024>>.
- Giblin-Davis, R. M. Borers of palms. In: Howard, F. W.; Moore, D.; Giblin-Davis, R. M.; Abad, R. G. (Eds.). *Insects on palms*. London: CABI Publishing, 2001. p. 267-304.
- Hahn, D. A.; Denlinger, D. L. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *Journal Insect Physiology*, v.53, n.8, p.760-773, 2007. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.03.018>>.
- Kaufmann, C.; Brown, M. R. Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal Insect Physiology*, v.54, n.2, p.367-377, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.10.007>>.
- Luvielmo, M. M.; Vasconcelos, M. A. M.; Marques, G. R.; Silva, R. P. G.; Damásio, M. H. Influência do processamento nas características sensoriais da água-de-coco. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v.22, n.2, p.25-270, 2004. <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs-2.2.4/index.php/alimentos/article/view/1193/994>>. 30 Dez. 2013.
- Magalhães, J. A. S.; Moraes Neto, A. H. A.; Miguens, F. C. Nematodes of *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae), vector of the Red Ring disease in coconut plantations from the north of the Rio de Janeiro State. *Parasitology Research*, v.102, n.6, p.1281-1287, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-008-0906-7>>.
- Mariano, A. C.; Santos R.; Feder, D.; Machado, E. A.; Pascarelli, B.; Gondim, K. C. Synthesis and mobilization of glycogen and trehalose in adult male *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v.72, n.1, p.1-15, 2009. <<http://dx.doi.org/10.1002/arch.20319>>.
- Mirth, C. K.; Riddiford, L. M. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bioessays*, v.29, n.4, p.344-55, 2007. <<http://dx.doi.org/10.1002/bies.20552>>.
- Navarro, D. M. A. F.; Murta, M. M.; Duarte, A. G.; Lima, I. S.; Nascimento, R. R.; Sant'ana, A. E. G. Aspectos práticos relacionados ao uso do Rincoforol, o feromônio de agregação da Broca do olho do coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. *Análise de sua eficiência em campo*. *Química Nova*, v.25, n.1, p.32-36, 2002. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000100007>>.
- Overgaard, J.; Mandelman, A.; Sorensen, J. G.; Bundy, J. G.; Loeschcke, V.; Nielsen, N. C.; Holmstrup, M. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. *Journal Insect Physiology*, v.53, n.12, p.1218-32, 2007. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.06.012>>.
- Santos, A. M. Análise do potencial do biodiesel de dendê para geração de energia elétrica em sistemas isolados da Amazônia. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008. 224p. Dissertação Mestrado.
- Sarro, F. B.; Crocomo, W. B.; Ferreira, J. M. S.; Araújo, R. P. C.; Labinas, A. M. Feeding substrates to black coconut bunch weevil, *Homalinotus coriaceus* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae), rearing in laboratory. *Neotropical Entomology*, v.34, n.3, p.451-457, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000300014>>.
- Thompson, S. N. Trehalose: the insect 'blood' sugar. *Advances in Insect Physiology*, v.31, p. 205-285, 2003. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2806\(03\)31004-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2806(03)31004-5)>.
- Vanin, S.; Bubacco, L.; Beltramini, M. Seasonal variation of trehalose and glycerol concentrations in winter snow-active insects. *Cryoletters*, v.29, n.6, p.485-91, 2008. <<http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2008/00000029/00000006/art00004?crawler=true>>. 10 Out. 2013.
- Williams, C. M.; Thomas, R. H.; MacMillan, H. A.; Marshall, K.; Sinclair, B. J. Triacylglyceride measurements in small quantities of homogenised insect tissue: comparison and caveats. *Journal of Insect Physiology*, v.57, n.12, p.1602-1613, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.08.008>>.
- Ziegler, R.; van Antwerpen, R. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.36, n.4, p.264-272, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.014>>.