



MANEJO DA RESISTÊNCIA DE LAGARTAS A BENZOILFENILURÉIAS UTILIZANDO SINERGISTA VEGETAL

MANAGING OF CATERPILLAR RESISTANCE TO BENZOYLPHENYLUREAS USING VEGETABLE SYNERGIST

Murilo Fazolin¹, André Fábio Medeiros Monteiro¹, Joelma Lima Vidal Estrela¹, Maria Samylla de Farias Silva², Iriana Maria da Silva².

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa- Acre)

²União Educacional do Norte (UNINORTE)

Autor correspondente: Murilo Fazolin. E-mail: murilo.fazolin@embrapa.br

Resumo

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797), é uma espécie polifágica que se alimenta de plantas cultivadas em várias áreas do continente americano. Os inseticidas lufenuron e triflumuron controlam com eficácia esta praga. O uso intensivo desses produtos causa a evolução da resistência. O óleo rico em dilapiol (OEPA) é uma opção para produzir sinérgistas que podem minimizar este problema. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito sinérgico do OEPA em combinação com os dois inseticidas. Foram realizados bioensaios toxicológicos por contato tópico e por ingestão e determinadas as doses letais (DL₅₀) e tempos letais (TL₅₀) das combinações sinérgicas. Por contato tópico, ocorreu sinergia significativa apenas para o inseticida lufenuron combinado com o OEPA (Fator de sinergismo = 9,4 e 3,8, respectivamente). A ingestão de dieta artificial contendo triflumuron (1% e 0,001% v.v⁻¹) e lufenuron (3% e 0,03% v.v⁻¹), combinados com o OEPA, reduziram o TL₅₀ das larvas em até 22 e 29 horas, respectivamente. Conclui-se pelo presente estudo, a alta eficácia sinérgica do OEPA para inseticidas lufenuron e triflumuron.

Palavras-chave: lufenuron, triflumuron, dilapiol, óleo essencial.

Abstract

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) is a polyphagous species that feeds cultivated plants throughout in many areas of the American continent. The intensive use of these products causes the evolution of resistance. Dillapiole rich oil (OEPA) is an option to produce synergists that can minimize this problem. The objective of this work was to evaluate the synergistic effect of OEPA in combination with the two insecticides. Topical contact and ingestion toxicological bioassays were performed to determine lethal doses (LD₅₀) and lethal times (TL₅₀) of the synergistic combinations. By topical contact, significant synergy occurred only for the insecticide lufenuron combined with OEPA (Synergism Factor = 9.4 and 3.8, respectively). The ingestion of an artificial diet containing triflumuron (1% and 0.001% v.v⁻¹) and lufenuron (3% and 0.03% v.v⁻¹), combined with the OEPA, reduced the LT₅₀ of the larvae in up to 22 and 29 hours, respectively. The present study has demonstrated the high efficacy of synergism the OEPA for lufenuron and triflumuron insecticides.

Keywords: lufenuron, triflumuron, dillapiole, essential oil.



INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é endêmica das regiões tropical-subtropicais do Continente americano [1, 2]; mais recentemente foi detectada na África Ocidental e Central [3] e Índia [4]. Alimenta-se de pelo menos 186 plantas hospedeiras e é uma das principais pragas de culturas economicamente importantes, como milho, sorgo e arroz [5]. Se não controlada, a lagarta-do-cartucho tem o potencial de causar 45% redução de rendimento de milho [6], mas nas regiões tropicais os danos podem chegar a 100% [7]. A frequente utilização de inseticidas sintéticos para o manejo de *S. frugiperda*, desencadeou uma pressão de seleção da população desta praga para indivíduos resistentes.

No Brasil há relatos de evolução da resistência de *S. frugiperda* para os principais grupos químicos de ingredientes ativos tais como: organofosforados, piretróides sintéticos, *Bacillus thuringiensis* e benzoilfeniluréas [8].

Uma alternativa para mitigar a pressão de seleção para a resistência foi a introdução de cultivos de milho geneticamente modificados. A falta de manejo adequado, relacionadas principalmente as áreas de refúgio, tecnicamente e inadequadamente dimensionadas para a manutenção de indivíduos susceptíveis, propiciou a evolução de resistência para os materiais transgênicos provenientes de várias proteínas Bt tais como: Cry1F, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ab [9,10,11,12]. No Brasil a resistência foi constatada para as proteínas Cry1F e Cry1Ab [13,14, 15].

A evolução de populações resistentes à Bt trouxe novamente a necessidade de pulverizações com inseticidas sintéticos para manejar esta praga, incluindo aqueles presentes em áreas de refúgio.

Inseticidas seletivos como os inibidores de biossíntese de quitina, particularmente as benzoilfeniluréas, são opções de interesse aos produtores, pois mesmo apresentando ação lenta quando comparado a inseticidas neurotóxicos, atuam principalmente na cutícula do inseto, exercendo ação tóxica sobre as formas imaturas, especialmente durante a ecdise, quando as anomalias sobre a deposição de quitina podem acarretar dificuldades para liberação da exúvia o que causa a morte do inseto [16]. Da mesma, podem também interferir negativamente na formação da membrana peritrófica que recobre o intestino médio dos insetos [17].

Estes compostos desempenham papel importante no manejo integrado de pragas, devido à baixa toxicidade para parasitoides, predadores e outros inimigos naturais [18,19, 20, 21]. Para o controle de larvas de *S. frugiperda* na cultura do milho, aproximadamente 35% dos inseticidas a base de benzoilfeniluréas são formulados com triflumuron e lufenuron [22], considerados geração mais moderna deste grupo químico.

No entanto, devido ao uso frequente, e muitas vezes inadequado, destes compostos a evolução da resistência dos insetos é uma consequência inevitável. Para as benzoilfeniluréas, a publicação das evidências científicas da evolução da resistência para *S. frugiperda* no Brasil foi



realizada apenas para o princípio ativo lufenuron [23]. No México e Porto Rico foi constatada a resistência desta espécie ao triflumuron [24].

No Brasil foi também constatado resistência aos inseticidas comerciais a base de lufenuron para a espécie *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) no ano de 2011 e após quatro anos do seu registro foi relatado casos de resistência também para *S. frugiperda* [8].

De forma semelhante a resistência de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) ao triflumuron, cujo registro havia sido realizado em 2010, foi relatada em 2011 [8].

Como a resistência aos inseticidas reguladores de crescimento está, via de regra relacionada, dentre outros fatores, a resistência a outros grupos químicos de princípios ativos [25], é esperada a curto prazo a evolução da resistência de *S. frugiperda* também ao triflumuron no Brasil.

Podem ser apontados vários aspectos negativos da evolução da resistência de insetos para o produtor rural, meio ambiente e principalmente para a indústria de agroquímicos, uma vez que para o desenvolvimento de um produto fitossanitário, atualmente são necessários de 10 a 12 anos, entre a descoberta de um composto químico e o início de sua produção em escala comercial, apresentando um custo para seu desenvolvimento ao redor de U\$ 150 milhões [26]. Adicionalmente, durante a vigência da proteção patentária (12 anos), muitas vezes o agroquímico perde parte de sua eficácia devido à evolução da resistência dos organismos alvo destes produtos, diminuindo sua vida útil, interferindo assim diretamente, de forma negativa na sua comercialização [26].

Dentre as estratégias que podem ser adotadas para o manejo da resistência de insetos, a saturação utiliza compostos sinérgicos para bloquear processos metabólicos relacionados a ela [27].

Há evidências de que o óleo essencial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) (OEPA), sinergiza inseticidas dos grupos químicos dos carbamatos, fosforados e piretróides, além de inseticidas naturais como Neem, Toosendanin, Tenulin, Rotenona, Piretrum e óleo de Tansy [28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44]. Quimiotipos amazônicos desta planta, apresentam como composto majoritário o dilapiol, apontado como um dos principais responsáveis por esta interferência biológica [33, 34].

Este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito sinérgico do OEPA para os inseticidas a base de lufenuron e triflumuron para disponibilizar uma nova ferramenta para o manejo da resistência de *S. frugiperda* na cultura do milho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a avaliação toxicológica das combinações sinérgicas entre do OEPA com os inseticidas do grupo químico das benzoilfenilureias, foi necessário produzir inicialmente, o óleo essencial em quantidade dentro de um controle de qualidade monitorada por cromatografia gasosa. A partir daí, foram realizados bioensaios preliminares com a finalidade de determinar os protocolos experimentais, que serviram de referência para o desenvolvimento dos bioensaios toxicológicos



definitivos, quando as diferentes combinações sinérgicas foram avaliadas por contato tópico e por ingestão de dieta contaminada.

OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. aduncum* (OEPA) E INSETICIDAS A SEREM AVALIADOS

Plantas adultas de *P. aduncum* (SISGEN nº 02000.002056/2014-38) foram coletadas em uma área de produção localizada na Embrapa Acre (10,0226°S, 67,7088°W), em março de 2019. Após o corte das plantas a 0,4 m do solo, folhas foram submetidas à secagem em estufa, até 30% de umidade. O óleo essencial foi obtido em um extrator por arraste de vapor utilizando sistema de caldeira aquecida a diesel [45].

A análise cromatográfica do óleo foi efetuada em cromatógrafo a gás (CG) HP5890, equipado com coluna de sílica fundida Agilent HP5 (30m x 0,32mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme) tendo hélio como gás de arraste a 1 mL min⁻¹, além disso foi acoplada à CG a espectrometria de massa (CG-EM). Os constituintes voláteis foram identificados por comparação dos espectros de massas e índices de retenção contidos na base de dados. A composição do óleo apresentou como componente majoritário dilapiol (79,7%) (Tabela 1).

Os inseticidas comerciais do grupo benzoilfeniluréias avaliados foram Triflumuron 480g/L (Certero®) e Lufenuron 50 g/L (Match®), adquiridos em casas de comercialização de agrotóxicos. O butóxido de piperonila (PBO), sinérgico mais utilizado em formulações comerciais considerado como controle positivo, foi de grau técnico de 90% da Sigma Aldrich®.

AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS POR CONTATO TÓPICO

OBTENÇÃO DE LARVAS DE *S. frugiperda*

Os insetos foram obtidos por meio de criação artificial em laboratório em dieta artificial a base de feijão [46]. Larvas de terceiro instar foram utilizadas em todas as etapas experimentais.

BIOENSAIOS PRELIMINARES

Inicialmente foram obtidas faixas de resposta para a o inseto teste [47]. A partir daí, foram estabelecidas entre cinco a sete concentrações, além de um controle (solvente acetona). Foram determinadas as doses com probabilidade de causar 50% de mortalidade (DL₅₀) para cada inseticida e OEPA de forma isolada e combinação destes entre si.

BIOENSAIOS DEFINITIVOS

As larvas de *S. frugiperda* foram confinadas isoladamente em placas de Petri (5,0cm x 1,5 cm) e mantidas em câmara climatizada à temperatura de 25 °C ± 2°C, umidade relativa de 70 ± 5% e fotofase de 12h, até o momento da avaliação da mortalidade dos indivíduos (no mínimo de 24h) considerando-se a mortalidade cumulativa no período.



Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Piper aduncum* L.

Pico	IR calculado	IR literatura*	Identificação dos compostos	Área (%)
1	932	932	α -pineno	0,7
2	976		β -pineno	1,2
3	1005		α -phellandreno	0,4
4	1022	1020	p-cymeno	-
5	1026		limoneno	-
6	1035		(Z)- β -ocimeno	-
7	1046		(E)- β -ocimeno	0,5
8	1345		α -cubebeno	-
9	1362		cyclosativeno	-
10	1374		α -copaeno	1,0
11	1389		β -elemeno	-
12	1404		α -gurjuneno	-
13	1415		(E)-caryophylleno	8,0
14	1423		β -copaeno	-
15	1433		aromadendreno	-
16	1448		α -humuleno	1,0
17	1455		β -santaleno	-
18	1472		γ -muuroleno	-
19	1479		germacreno D	0,9
20	1486		β -selineno	-
21	1490		(E)-(14)muurola-4,5-dieno	-
22	1494		bicyclogermacreno	1,0
23	1497		pentadecano	1,7
24	1506	1511	δ -amorpheno	0,5
25	1515		cubebol	0,8
26	1519		myristicina	2,4
27	1528		(E)-cadina-1,4-dieno	-
28	1538		α -calacoreno	-
29	1556		elemicina	-
30	1561		(E)-nerolidol	-
31	1573		spathulenol	-
32	1578		oxido de caryophylleno	1,0
33	1586		viridiflorol	0,8
34	1604		humuleno epoxide II	-
35	1619		dilapiol	78,0
36	1677		apiol	-
			Total:	99,9
			Monoterpenos:	2,8
			Monoterpenóides oxigenados:	0,0
			Sesquiterpenos:	13,2
			Sesquiterpenóides oxigenados	1,8
			Arilpropanóides:	80,4
			Outros	1,7

*IR lit: Adams, 2007 [71]



AVALIAÇÃO DO EFEITO POR CONTATO TÓPICO

Para avaliação do contato tópico os bioensaios consistiram na aplicação dorsal no pronoto das larvas de 0,5µl das concentrações dos compostos e combinações com OEPA avaliadas com auxílio de uma microseringa graduada Hamilton de 10µL. Foram determinadas desta forma, as doses letais (DL₅₀) para as larvas submetidas ao tratamento com o OEPA, assim como para cada inseticida comercial considerado de forma isolada. Em todos os bioensaios foi utilizada como testemunha a aplicação de acetona, solvente de todos os compostos avaliados.

AVALIAÇÃO SINÉRGICA DAS COMBINAÇÕES DOS INSETICIDAS A BASE DE TRIFLUMURON E LUFENURON COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *P. aduncum*

Para avaliação do efeito sinérgico, foram realizadas combinações das concentrações e doses e subletais do OEPA (metade e um quarto da sua DL₅₀) com as doses subletais dos inseticidas comerciais (DL₄₀).

Os mesmos procedimentos experimentais para as avaliações por contato tópico descritos anteriormente foram adotados para as avaliações sinérgicas das combinações do óleo com os inseticidas do grupo das benzoilfeniluréias.

As combinações sinérgicas dos inseticidas com o Butóxido de Piperonila (PBO) foram de 10:1 (PBO: Inseticida) [48].

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS DADOS

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições contendo 10 larvas em cada uma.

Para todos os bioensaios os dados de mortalidade de concentração-resposta foram submetidos a análise de Probit, utilizando-se o programa de análises estatísticas SAS [49]. Os valores de mortalidade dos tratamentos foram corrigidos pela mortalidade da testemunha [50].

As eficácias sinérgicas das combinações foram avaliadas por meio do cálculo do Fator de Sinergismo (FS) ($FS = DL_{50} \text{ do inseticida} / DL_{50} \text{ do Inseticida} + OEPA \text{ ou PBO}$) [51].

Foram considerados significativos os valores de FS das combinações dos inseticidas com o OEPA, com seus respectivos Intervalos de confianças (IC $p < 0,05\%$), maiores que os valores obtidos com a combinação dos inseticidas com PBO, demonstrando maior eficácia sinérgica [52].

AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS POR INGESTÃO

Larvas de *S. frugiperda* terceiro instar, foram obtidas da criação artificial em laboratório alimentadas com dieta a base de feijão [46]. Esta mesma dieta foi produzida adicionando-se os diferentes tratamentos durante a sua confecção.



CONCENTRAÇÕES DOS INSETICIDAS AVALIADOS

Os inseticidas foram diluídos em acetona nas seguintes concentrações: Certero® (Triflumuron): 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001% e 0,0001% v.v⁻¹; Match® (Lufenuron): 3%; 0,3%; 0,03%; 0,003% e 0,0003% v.v⁻¹ que compuseram os tratamentos para avaliação inseticida de forma isolada. Posteriormente, uma nova série de concentrações foram obtidas, adicionando-se a cada uma destas concentrações dos dois inseticidas 0,0422% v.v⁻¹ do OEPA (equivalente a ½ da DL₅₀ que é de $4,9 \times 10^{-4} \mu\text{L mg inseto}^{-1}$, correspondendo a uma concentração de 0,0843% v.v⁻¹) que compuseram os tratamentos de combinações sinérgicas [41].

Além disso, um tratamento testemunha foi avaliado, onde somente acetona foi adicionada a dieta e um tratamento testemunha positiva, que consistiu das concentrações de 1% v.v⁻¹ do inseticida Certero® e 3% v.v⁻¹ do inseticida Match® combinados por adição de 10% v.v⁻¹ e 30% v.v⁻¹ de PBO, respectivamente (equivalente a 10 vezes a concentração de cada um deles) [41].

PREPARO DA DIETA CONTAMINADA

No preparo dos tratamentos de ingestão para as larvas de *S. frugiperda*, foram tomados 75g de dieta líquida e aquecida em Becker com capacidade de 100mL, adicionando-se 1mL de cada uma das concentrações dos tratamentos descritos anteriormente, misturando-se os conteúdos por 20 seg. ininterruptos. Por meio de termômetro de mercúrio, monitorou-se a dieta até que atingisse 45°C quando ocorreu a adição de cada uma das soluções. As misturas foram acondicionadas em caixas tipo Gerbox até a solidificação da massa da dieta, quando então, por meio da aplicação de cortes utilizando-se uma espátula obteve-se pequenos cubos de $6,4\text{g} \pm 1\text{g}$ cada um, para todos os 13 tratamentos avaliados nesta experimentação [53].

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS DADOS

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 repetições, contendo cada uma delas 10 lagartas de *S. frugiperda*, individualizadas em copos plásticos descartáveis com capacidade para 50 mL e aprisionadas por uma tampa de acrílico. Desta forma foi caracterizada uma parcela experimental.

Diariamente foi avaliada a mortalidade das lagartas, caracterizada pela ausência completa de movimentos.

Curvas de sobrevivência foram utilizadas para analisar as diferenças entre a mortalidade dos insetos submetidos a cada inseticida e suas combinações sinérgicas. Utilizou-se o procedimento PROC LIFETEST, que proporcionou as estimativas de tempo médio de sobrevivência e consequentemente o tempo letal (TL₅₀) para os insetos sujeitos a cada tratamento [49]. Os valores de mortalidade dos tratamentos foram corrigidos pela mortalidade da testemunha [50]. Foram considerados como significativos os valores das TL₅₀ obtidos para as combinações dos inseticidas SAJ Basic Educ Tech Technol | Rio Branco | v. 9, n.1, p.242-261, jan-abr. (2022).



com o OEPA, com seus respectivos Intervalos de confianças (IC $p < 0,05\%$), menores que os valores obtidos com a combinação dos inseticidas com PBO (testemunha positiva) demonstrando maior toxicidade sinérgica. Os valores das TL_{50} dos inseticidas tomados de forma isolada, e seus respectivos Intervalos de confianças (IC $p < 0,05\%$), foram utilizados para comparação com suas respectivas combinações sinérgicas com OEPA, utilizando o critério de diferenciação significativa conforme descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS POR CONTATO TÓPICO

Por contato tópico, todos os inseticidas em combinações com o OEPA, apresentaram toxicidade às lagartas de *S. frugiperda* (Tabela 2). Para a combinação das subdoses do OEPA com os inseticidas considerou-se o valor da DL_{50} do OEPA de $4,9 \times 10^{-4} \mu\text{L mg inseto}^{-1}$, equivalente a uma concentração de 0,843% v.v⁻¹. Portanto, $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ desta dose letal correspondeu às concentrações de 0,422% v.v⁻¹ e 0,211% v.v⁻¹, respectivamente.

Observou-se que os valores dos fatores de sinergismo foram significativamente superior nas combinações do inseticida lufenuron com as subdoses da DL_{50} OEPA $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ de sua DL_{50} (FS = 9,4 e 3,8, respectivamente). Não foram observadas significâncias nos valores FS para as combinações do triflumuron com nenhuma das duas subdoses da DL_{50} do OEPA.

Deve-se ressaltar que neste caso o valor do FS do PBO, tomado como referência para a mensuração de sinergia, foi extremamente elevado (37,7) o que fez com que os valores do FS das subdoses equivalentes a $\frac{1}{2}$ e a $\frac{1}{4}$ da DL_{50} do OEPA combinadas com o inseticida triflumuron, mesmo sendo elevados (6,5 e 6,5, respectivamente), não fossem considerados significativos pelo critério adotado.

Por contato tópico, a toxicidade do lufenuron e triflumuron utilizados na experimentação mostraram alta eficácia toxicológica. Quando aplicados de forma isolada apresentaram valores de DL_{50} ($3,4 \times 10^{-4}$ e $2,0 \times 10^{-2} \mu\text{L mg inseto}^{-1}$) em concentrações muito abaixo (0,00058% e 0,03359% v.v⁻¹, respectivamente) da concentração recomendada para aplicação no campo 0,15% e 0,10% v.v⁻¹, respectivamente para lufenuron e triflumuron [22].

Nos bioensaios para avaliação das combinações sinérgicas do lufenuron com subdoses letais de OEPA, os fatores de sinergismo (FS) foram significativos quando comparados aos valores de FS das combinações do inseticida com PBO. Tal resultado permite inferir que hipoteticamente há uma predominância do envolvimento de enzimas detoxificativas do complexo P450 para a biodegradação do lufenuron, uma vez que o PBO inibe tais enzimas [58].



Tabela 2. Toxicidade das combinações de inseticidas do grupo químico das benzoilfeniluréias com o óleo essencial de *Piper aduncum* L. para lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) por contato tópico (n= 210 a 290).

Combinações inseticidas	DL ₅₀ (IC 95%) (µL mg inseto ⁻¹)	FS (IC 95%)	χ ²	GL	Prob.	Coefficiente Angular ± EPM
OEPA	4,9 x 10 ⁻⁴ (2,7 x 10 ⁻⁴ – 7,1 x 10 ⁻⁴)	-	33,9	26	0,14	0,33 ± 0,04
lufenuron	3,4 x 10 ⁻⁴ (2,8 x 10 ⁻⁴ – 4,7 x 10 ⁻⁴)	-	19,05	22	0,16	0,82 ± 0,09
lufenuron +1/2 OEPA	3,7 x 10 ⁻⁵ (2,9 x 10 ⁻⁵ – 4,5 x 10 ⁻⁵)	9,4 (9,0 – 10,5)*	24,52	34	0,88	0,56 ± 0,03
lufenuron +1/4 OEPA	9,0 x 10 ⁻⁵ (7,2 x 10 ⁻⁵ – 1,1 x 10 ⁻⁴)	3,8 (3,8 – 4,3)*	6,83	22	0,99	0,70 ± 0,04
lufenuron +BPO	1,3 x 10 ⁻⁴ (1,1 x 10 ⁻⁴ – 1,4 x 10 ⁻⁴)	2,7 (2,5 – 3,4)	22,20	30	0,84	0,98 ± 0,05
Triflumuron	2,0 x 10 ⁻² (8,2 x 10 ⁻³ – 5,4 x 10 ⁻²)	-	33,97	30	0,28	0,13 ± 0,01
triflumuron +1/2 OEPA	3,0 x 10 ⁻³ (1,2 x 10 ⁻³ – 9,0 x 10 ⁻³)	6,5 (6,0 – 6,8)	20,28	22	0,56	0,16 ± 0,02
triflumuron +1/4 OEPA	3,0 x 10 ⁻³ (1,6 x 10 ⁻³ – 5,9 x 10 ⁻³)	6,5 (5,0 – 9,1)	8,12	22	0,99	0,23 ± 0,01
triflumuron +BPO	5,2 x 10 ⁻⁴ (1,9 x 10 ⁻⁴ – 1,3 x 10 ⁻³)	37,7 (35,8 – 40,8)	28,11	22	0,17	0,16 ± 0,02

n = número total de insetos submetidos ao ensaio, OEPA= óleo essencial de *P. aduncum*; ½ e ¼ OEPA= metade e um quarto da dose letal do óleo de *P. aduncum*; PBO= Butóxido de piperonila; DL₅₀ = Doses Letais que causam 50% de mortalidade dos insetos; IC 95% = Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade; FS (DL₅₀) = Fatores de Sinergismo calculados em função das Doses Letais; (*) Indica diferença significativa em relação ao FS da combinação com BPO; χ² = Qui-quadrado; GL= Graus de liberdade, Prob.= probabilidade e EPM= Erro padrão da média.

No entanto, com base nessas evidências indiretas, não podemos deixar de considerar a existência de diferentes formas de citocromo P450 que podem ser ativadas como a finalidade de eliminar xenobióticos. Tal reação foi observada em larvas de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) que produziram rapidamente formas de citocromo P450 para detoxificar teflubenzurom, indicando que o sistema monooxigenases deste inseto é muito ativo e versátil.

Resultado inverso ocorreu com o inseticida triflumuron quando combinado com subdoses letais de OEPA, cujos valores de FS não apresentaram significância quando comparados os valores do FS das combinações do inseticida com PBO. Neste caso, pode-se inferir que para o triflumuron a inibição detoxificativa enzimática predominante pode não estar relacionada à monooxigenases P450.

Deve ser ressaltado, no entanto a magnitude dos valores de FS para as combinações do triflumuron com as subdoses letais do OEPA, embora significativamente inferiores às combinações com PBO, podem indicar a ação de outras enzimas detoxificativas no processo de eliminação deste xenobiótico.

Considerando-se válida esta hipótese, podem ser apontados outros grupos de enzimas detoxificativas como esterases e glutatona S-transferases, como envolvidos na degradação do triflumuron à semelhança do que ocorreu com diflubenzurom, pertencente a este mesmo grupo químico, quando aplicado em larvas de *Platynota stultana* Walsingham, 1884 (Lepidoptera: Tortricidae) [59].

Alguns resultados para a compreensão dos mecanismos envolvidos no aumento da penetração celular favorecida pelo sinergista [60] trouxeram importantes contribuições. Ficou demonstrado, que interferências na redução da tensão superficial, aumento da solubilidade e



interação entre o sinergista e a camada lipídica da cutícula do inseto são fundamentais para a expressão do efeito sinérgico. Estão envolvidos neste processo combinações de terpenos que podem promover um aumento substancial da penetração do produto na cutícula de insetos [60].

Em relação a esta propriedade, o OEPA utilizado nas combinações sinérgicas com lufenuron e triflumuron, possui em sua composição 15,8% de terpenos, não se podendo afirmar que tal quantidade seja suficiente para auferir aumento da penetração do óleo combinado com o inseticida. Porém parece ser uma hipótese aceitável.

Além de favorecer a penetração, o OEPA pode estar associado também à inibição da barreira bioquímica, localizado logo abaixo da cutícula, promovida pelas enzimas destoxicativas presentes nos oenócitos, células associadas ao corpo gorduroso parietal das larvas de *S. frugiperda* [62].

A taxa de absorção através da cutícula do inseto é importante na toxicidade para inseticidas reguladores de crescimento. Isso indica que esses produtos possuem uma toxicidade dérmica e que sua seletividade pode ser regida pela taxa de absorção através da cutícula. Em vista disso, sugere-se que a cinética de absorção é um fator importante para o funcionamento deste grupo de inseticidas [63].

O óleo essencial de *P. aduncum*, por possuir como composto majoritário o dilapiol, inibe além das monooxigenases P450 também as enzimas dos grupos das esterases e glutathionas-S transferases [28, 29, 30, 32, 33, 34, 35 e 37], conferindo assim um amplo espectro sinérgico para o inseticida lufenuron e em menor magnitude também ao inseticida triflumuron, ambos por contato tópico.

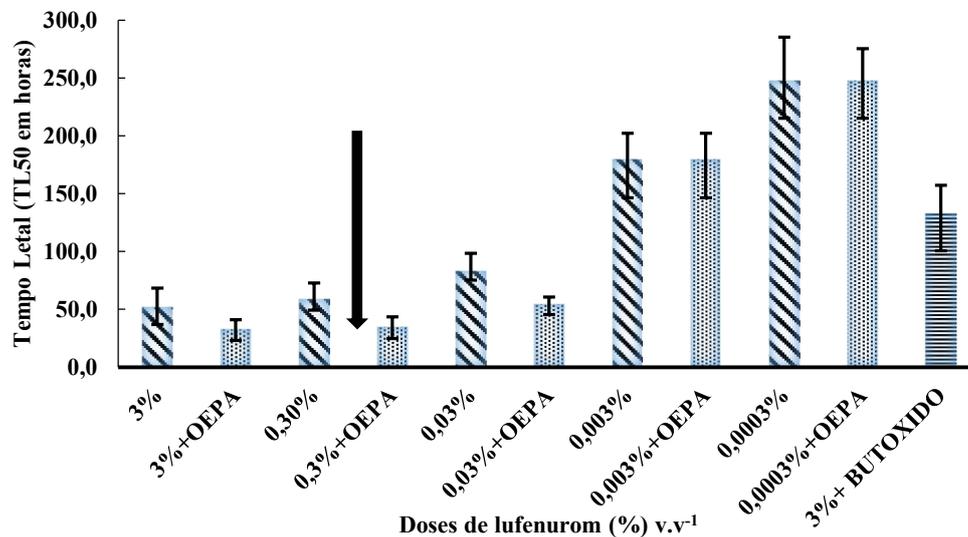
AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS POR INGESTÃO

Os valores do TL_{50} para larvas de *S. frugiperda* (TL_{50}) alimentadas com a dieta contaminada com o inseticida lufenuron, foram significativamente menores no intervalo de concentrações entre 3% a 0,03 a v.v⁻¹, quando comparadas ao PBO (132,8 horas) independentemente de estarem combinadas ou não ao OEPA. (Figura 1). Neste intervalo de concentrações, os valores da TL_{50} variaram entre 51,7 horas e 83,4 horas, respectivamente, para o inseticida tomado isoladamente. Já para a combinações deste inseticida com o OEPA a 0,0422% v.v⁻¹ ($\frac{1}{2}$ da DL_{50}) o intervalo da TL_{50} foi de 32,2 a 53,8 horas, respectivamente. Estes resultados apontam a significância do efeito sinérgico das combinações do lufenuron com o OEPA, uma vez que, concomitantemente a diferença dos valores do tratamento PBO, ocorreu uma redução significativa dos TL_{50} em todas as combinações deste óleo com o inseticida considerado de forma isolada (Figura 1).

As demais concentrações de lufenuron (0,003% e 0,0003%) consideradas de forma isolada ou em combinação ao OEPA, não apresentaram significância no tempo letal de mortalidade quando comparadas à combinação com o PBO.

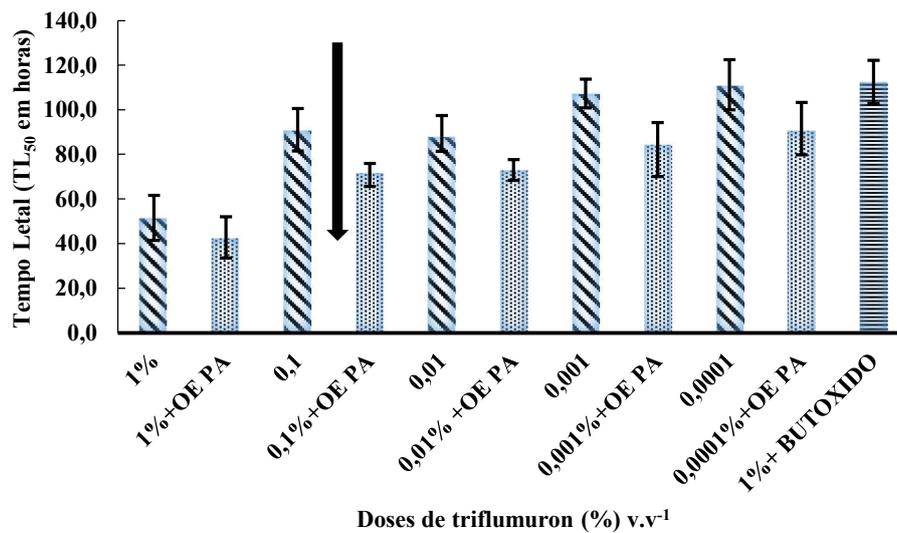


Para o inseticida triflumuron, sua adição à dieta de alimentação, proporcionou valores do TL₅₀ para larva de *S. frugiperda* significativamente menores para a maioria das concentrações no intervalo de 1% a 0,001% v.v⁻¹, independentemente de estarem combinadas ou não ao OEPA (0,0422% v.v⁻¹) quando comparados ao PBO (Figura 2). Exceção feita a concentração 0,001% v.v⁻¹ considerada de forma isolada cujo valor do TL₅₀ foi de 107 horas apresentando sobreposição com o IC do tratamento com PBO (112,3 horas).



- BUTÓXIDO = Butóxido de Piperonila
- OEPA= Subdose letal do óleo essencial de *P. aduncum*.
- ↓ = Concentração de lufenuron equivalente à dose comercial recomendada.

Figura 1. Tempo Letal (TL₅₀) do inseticida lufenuron combinado com a subdose letal do óleo essencial de *Piper aduncum* L. adicionado à dieta alimentar de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797).



- BUTÓXIDO = Butóxido de Piperonila
- OEPA= Subdose letal do óleo essencial de *P. aduncum*.
- ↓ = Concentração triflumuron equivalente à dose comercial recomendada.

Figura 2. Tempo Letal (TL₅₀) do inseticida triflumuron combinado com a subdose letal do óleo essencial de *Piper aduncum* L. adicionado à dieta alimentar de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797).

Considerando-se as concentrações de triflumuron 1% e 0,01% v.v⁻¹ tomado de forma isolada, os valores significativos dos TL₅₀ variaram entre 51,3 horas a 87,6 horas, respectivamente. Este intervalo de tempo diminuiu significativamente, passando a variar entre 42,5 horas e 84,3 horas, para as concentrações de triflumuron entre 1% e 0,001% v.v⁻¹ combinadas com a subdose do OEPA.

Estes resultados apontam a significância do efeito sinérgico das combinações do triflumuron com o OEPA, no intervalo de concentrações entre 1% e 0,001% v.v⁻¹ utilizando o critério de comparação com o PBO. No entanto, na comparação entre estas mesmas concentrações do inseticida com suas respectivas combinações com o OEPA, ocorreram reduções significativas do TL₅₀ somente no intervalo de concentrações entre 0,1 e 0,001 v.v⁻¹ (Figura 2).

A concentração de triflumuron de 0,0001% v.v⁻¹, considerada de forma isolada ou em combinação ao OEPA, não apresentou redução significativa no tempo letal de mortalidade quando comparadas a combinação com o PBO.

A contaminação por ingestão de inseticidas do grupo químico das benzoilfeniluréias obedece uma estratégia diferente da contaminação por contato tóxico, e sua eficácia depende do tipo de inseticida avaliado.

O inseticida diflubenzurom, quando ingerido por larvas de *Choristoneura occidentalis* (Walsingham, 1891) (Lepidoptera: Tortricidae) e *Orgyia pseudotsugata* (McDunnough, 1921) (Lepidoptera: Noctuidade), foi eliminado em 90% e 86% do total ingerido, sem que ele fosse absorvido por estes insetos [64]



Tanto o inseticida triflumuron como o lufenuron combinados com OEPA utilizados na experimentação mostraram alta eficácia toxicológica quando ingeridos junto a dieta alimentar, uma vez considerados de forma isolada apresentaram, via de regra valores de TL₅₀ significativamente superiores nas concentrações abaixo da concentração recomendada para aplicação no campo de 0,15% e 0,10% v.v⁻¹, respectivamente [23].

O triflumuron combinado com subdose do OEPA e ingerido no intervalo de concentrações entre 1% e 0,001% v.v⁻¹, próximas a concentração recomendada para uso no campo, apresentaram uma redução do tempo de vida das larvas de *S. frugiperda* na ordem de 8:48 horas e 22:18 horas, respectivamente.

Da mesma forma o inseticida lufenuron com subdose do OEPA e ingerido no intervalo de concentrações entre 3% e 0,03% v.v⁻¹, próximas a concentração recomendada para uso no campo, apresentaram uma redução do tempo de vida das larvas de *S. frugiperda* na ordem de 19:30 horas e 29:36 horas, respectivamente, demonstrando que as formulações sinérgicas deste inseticida com OEPA são mais eficazes que o triflumuron. Apesar disso, foi observado um maior número de concentrações avaliadas de triflumuron que combinadas com OEPA apresentaram significativa redução do TL₅₀ em relação ao PBO (4 de 5 concentrações avaliadas) quando comparado ao lufenuron (3 das 5 concentrações avaliadas).

A diferença de eficácia pode ser explicada pela provável diferença do tempo de retenção do inseticida no corpo das larvas [65], embora esta variável não tenha sido mensurada. Outra hipótese que poderia ser levantada está relacionada à velocidade do transporte do xenobiótico do intestino ao local de ação ou sua estabilidade dentro do inseto [79, 80]. Por exemplo, reações de conjugação (realizadas por enzimas do grupo glutathione-S transferases) são geralmente precedidas por hidrólise e/ou oxidação do inseticida (realizada principalmente por monooxigenases P450), o que significa que a inibição do mecanismo de defesa do inseto nos primeiros passos no processo de desintoxicação, pode exercer influência na retenção e toxicidade do inseticida devido ao maior tempo de permanência no corpo do inseto [66].

A distribuição das enzimas detoxificativas no intestino dos insetos ainda é motivo de discussão científica, sugerindo que é no intestino médio onde ocorre a maior concentração dessas enzimas em vários grupos de insetos avaliados [67,68].

A membrana peritrófica, que protege o intestino médio dos insetos, é constituída de tecido epitelial que ao envolver os alimentos ingeridos atua como uma barreira física e química para a entrada de xenobióticos, permitindo, entretanto, a passagem de enzimas digestivas no lúmen e a absorção dos produtos da digestão. Significativas alterações das células da membrana peritrófica em larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), foram observadas quando alimentadas com sesquiterpenos e diterpenos, causando a mortalidade dos insetos avaliados [69].

Isto sugere que o OEPA, rico em dilapiol, pode ter além de uma ação sinérgica por inibir as enzimas detoxificativas de todas as famílias relacionada à resistência de *S. frugiperda*, uma ação



aditiva por facilitar a penetração dos inseticidas avaliados devido às alterações proporcionadas pelos sesquiterpenos presentes na sua composição. O dano celular no intestino dos insetos está diretamente relacionado à desregulação das enzimas digestivas e desintoxicantes [70].

Por último observou-se uma diferença nos fatores de sinergismo por contato tópico, do inseticida lufenuron quando aplicado em combinações com $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ das doses letais do OEPA, apontando a subdose $\frac{1}{2}$ da DL_{50} como a que promoveu maior efeito sinérgico para este inseticida. Já para o inseticida triflumuron esta diferença não foi observada. Tais resultados são atribuídos às respostas das diferentes proporcionalidades das combinações dos inseticidas com as subdoses letais do OEPA, que obedecem ao índice de equivalência que classifica as combinações como aditivas, sinérgicas ou antagônicas [71].

As vias de contaminação por contato tópico e por ingestão utilizadas para avaliação dos inseticidas triflumuron e lufenuron podem ser consideradas como adequadas para tal finalidade, uma vez que os inseticidas a base de benzoilfeniluréias, são inibidores da síntese de quitina que revestem o exoesqueleto das larvas e o trato intestinal, particularmente a membrana peritrófica do intestino médio, estrutura que funciona como uma barreira de permeabilidade entre o alimento ingerido e o epitélio intestinal [52].

Desta forma podem ser esperados como efeito inseticida sobre larvas de várias espécies de insetos, alterações na ecdise causando anomalias sobre a deposição de quitina que acarretam em dificuldades para liberação da exuvia, causando assim a morte dos indivíduos contaminados [17]. Pode ocorrer também redução no desenvolvimento de larvas e deformidades no aparelho bucal que impedem a sua alimentação [54].

A importância da utilização de duas vias de contaminação prende-se ao fato de que a penetração do inseticida por contato tópico pode ser dificultada por mecanismos de resistência dos insetos a agroquímicos. Esse mecanismo é geralmente considerado de menor importância, mas pode tornar-se fundamental quando atua em conjunto com outros mecanismos tais como: mudança de comportamento, modificação do sítio-alvo e metabolização dos inseticidas, trazendo como consequência um aumento da evolução da resistência dos insetos [55].

Tais modos distintos de contaminação podem definir a eficácia de um inseticida regulador de crescimento (IGR) a semelhança do clorfluazurom que apresentou um acréscimo de mais de cem vezes em sua toxicidade em função do tempo de retenção no corpo de larvas quando comparado com outro IGR, diflubenzurom [56]. Como exemplo, no tratamento tópico de larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) e *S. exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) com diflubenzurom foi observada uma resposta toxicológica semelhante para as duas espécies. Por outro lado, quando submetidas à alimentação oral foram necessárias maiores concentrações deste inseticida para revelar o mesmo efeito letal para *S. exigua* na comparação com *S. littoralis*, revelando desta forma um nível tolerância 20 vezes maior para aquela espécie por esta via de contaminação [57].



CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Piper aduncum* L. apresenta efeito sinérgico significativo, quando utilizado em subdoses letais de 0,24 e 0,12 x10⁻⁴ µL mg inseto⁻¹ combinadas ao inseticida lufenuron por contato tópico.

O óleo essencial de *Piper aduncum* L. apresenta efeito sinérgico significativo para os inseticidas lufenuron e triflumuron por ingestão de dieta contaminada.

Concentrações entre 1% e 0,001% v.v⁻¹ do inseticida triflumuron, combinadas com a subdose letal do OEPA de 0,24 x10⁻⁴ µL mg inseto⁻¹, apresentaram uma redução do tempo de vida das larvas de *S. frugiperda* entre 8:48 horas e 22:18 horas.

Concentrações entre 3% e 0,03% v.v⁻¹ do inseticida lufenuron, combinadas com a subdose letal do OEPA de 0,24 x10⁻⁴ µL mg inseto⁻¹, apresentaram uma redução do tempo de vida das larvas de *S. frugiperda* entre 19:30 horas e 29:36 horas.

Conclui-se pelo presente estudo, a alta eficácia sinérgica do OEPA para inseticidas lufenuron e triflumuron.

AGRADECIMENTOS

Aos assistentes de pesquisa Valdemir de Souza e Silva, Pedro Pereira da Silva; analistas John Lennon Mesquita Catão, Charles Rodrigues da Costa pelos serviços laboratoriais e de campo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

[1] PITRE, H. N. Relationship of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida, Honduras, Jamaica, and Mississippi: susceptibility to insecticides with reference to migration. *Florida Entomologist*, v.71, p. 56–61, 1988.

[2] CAPINERA, J. L. Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *EDIS*, v. 2002, n. 7, 2002.

[3] GOERGEN, G.; KUMAR, P. L.; SANKUNG, S. B.; TOGOLA, A.; TAMÒ, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PLoS one*, v.11, n.10, e0165632.

[4] CABI- CENTRE FOR AGRICULTURE AND BIOSCIENCE INTERNATIONAL. CABI warns of rapid spread of crop-devastating fall armyworm across Asia. Disponível em: <https://www.cabi.org/news-and-media/2018/cabi-warns-of-rapid-spread-of-crop-devastating-fall-armyworm-across-asia/> Acesso em: 29 set. 2019.

[5] CASMUZ, A.; JUÁREZ, M. L.; SOCÍAS, M. G.; MURÚA, M. G.; PRIETO, S.; MEDINA, S.; GASTAMINZA, G. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, v. 69, p. 209–231, 2010.

[6] HRUSKA, A. J.; GLADSTONE, S. M. Effect of period and level of infestation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, on irrigated maize yield. *Florida Entomologist*, v.7, p. 249–254, 1988.



- [7] BLANCO, C. A.; CHIARAVALLE, W.; DALLA-RIZZA, M.; FARIAS, J. R.; GARCÍA-DEGANO, M. F.; GASTAMINZA, G.; RODRÍGUEZ, J. Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. *Current Opinion in Insect Science*, v.15, p. 131-138. 2016.
- [8] OLIVEIRA, I.M. *Resistência de artrópodes de importância agrícola ao controle químico*. Dissertação (Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2017.
- [9] BLANCO, C. A.; PORTILLA, M.; JURAT-FUENTES, J. L.; SÁNCHEZ, J. F.; VITERI, D.; VEGA-AQUINO, P.; ZHU, Y. C. Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*, v.35, n.3, p. 409-415, 2010.
- [10] STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, v.103, n.4, p.1031-1038, 2010.
- [11] HUANG, F.; QURESHI, J. A.; MEAGHER JR. R. L.; REISIG, D. D.; HEAD, G. P.; ANDOW, D. A.; YANG, F. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. *PloS one*, v. 9, n.11, e112958, 2014.
- [12] LI, G., REISIG, D.; MIAO, J.; GOULD, F.; HUANG, F.; FENG, H. Frequency of Cry1F non-recessive resistance alleles in North Carolina field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *PloS one*, v.11, n.4, e0154492, 2016.
- [13] BERNARDI, O.; SORGATTO, R. J.; BARBOSA, A. D.; DOMINGUES, F. A.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; OMOTO, C. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. *Crop Protection*, v. 58, p.33-40, 2014.
- [14] FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; DOS SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, v.64, p.150-158, 2014.
- [15] OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M.; CRIVELLARI, A.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, v.72, n.9, p.1727-1736, 2016.
- [16] BEEMAN, R.W. Recent advances in mode of action of insecticides. *Annual Review of Entomology*, v. 27, p. 253-281, 1982.
- [17] CLARKE, L.; TEMPLE, G. H. R.; VINCENT, J. F. V. The effects of a chitin inhibitor—Dimilin—on the production of peritrophic membrane in the locust, *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, v. 23, n. 2, p. 241-246, 1977.
- [18] COHEN, E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Management Science*, v. 57, p. 946-950, 2001.
- [19] ISHAAYA, I. Benzoylphenyl ureas and other selective control agents: mechanism and application, p. 365–376. In: CASIDA, J.E. *Pesticides and Alternatives*. Amsterdam: Elsevier, 1990.
- [20] COHEN, E. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. *Annual Review of Entomology*, v. 32, p. 71-93, 1987.
- [21] MERZENDORFER, H. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Science*, v. 20, p. 121-138, 2013.



- [22] AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. Controle químico de *Spodoptera frugiperda*. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.> Acesso em: 15 mar. 2020.
- [23] NASCIMENTO, A. R. B. D.; FARIAS, J. R.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Management Science*, v.72, n.4, p.810-815, 2016.
- [24] GUTIÉRREZ-MORENO, R.; MOTA-SANCHEZ, D.; BLANCO, C. A.; WHALON, M. E.; TERÁN-SANTOFIMIO, H.; RODRIGUEZ-MACIEL, J. C.; DIFONZO, C. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *Journal of Economic Entomology*, v.112, n.2, p. 792-802, 2019.
- [25] CUTLER, G. C.; SCOTT-DUPREE, C. D. Novaluron: prospects and limitations in insect pest management. *Pest Technology*, v.1, n.1, p. 38-46, 2007.
- [26] ZAMBOLIN, L.; da CONCEIÇÃO M.Z.; SANTIAGO, T. O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. 3 ed, Viçosa: UFV/DFP, 2008.
- [27] GEORGHIOU, G. P. *Management of resistance in arthropods*, p.769-792. In: Pest resistance to pesticides. Springer, Boston, MA. 1983.
- [28] SHANKARGANESH, K.; SUBAHMANYAM, B.; WALIAAND S.; DHINGRA, S. Dillapiole mediated esterase inhibition in insecticide resistant *Spodoptera litura* (Fabricius). *Pesticide Research Journal*, v.21, n.2, p.143-147, 2009.
- [29] LICHTENSTEIN, E.P.; LIANG, T.T.; SCHULZ, K.R.; SCHNOES, H.K.; CARTER, G.T. Insecticidal and Synergistic Components Isolated from Dill Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 22, n. 4, 23-28, 1974.
- [30] HANDA S. K.; DEWAN, R. S. Evaluation of dillapiole and dihydrodillapiole as synergists for pyrethrins in dust formulations. *Pyrethrum Post*, v.13, p. 45-46, 1974.
- [31] MUKERJEE, P. *Solubilization in aqueous micellar systems*, p. 153-174. In: Solution chemistry of surfactants. Springer, Boston, MA. 1979.
- [32] PARMAR, B. S.; TOMAR, S. S. Review of research on insecticide synergists in India-retrospect and prospect. *International Journal of the Tropical Agriculture*, v. 1, n. 1, p. 7-17, 1983.
- [33] BERNARD, C.; PHILOGENE, B. J. R. Inseticides synergists: role, importance, and perspectives. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v.38, 199-233, 1993.
- [34] BERNARD, C.B.; ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; LAM, J.; WADDEL, T. In vivo effect of mixtures of allelochemicals in the life cycle of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 57, p.17-22, 1990.
- [35] BERTRAND, M.C. Etudes toxicocinetiques et synergiques de l'azadirachtine dihydrogénée chez la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*. Ottawa: Université d'Ottawa, 1992.
- [36] LAROCQUE, N; VINCENT, C.; BELANGER, A.; BOURASSA J.P. Effects of tansy essential oil from *Tanacetum vulgare* on biology of oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 25, n. 6, p.1319-1330, 1999.
- [37] BHUIYAN, M. N. I., BEGUM, J.; AKTER, F. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston). *African Journal of Plant Science*, v. 4, n.11, p.451-454, 2010.



- [38] LIU, S. Q.; SCOTT, I. M.; PELLETIER, Y.; KRAMP, K.; DURST, T. ; SIMS, S. R. ; ARNASON, J. T. Dillapiol: a pyrethrum synergist for control of the colorado potato beetle. *Journal of Economic Entomology*, v.107, n. 2, p. 797-805, 2014.
- [39] LIMA, V.S.; PINTO, A.C.; RAFAEL, M.S. Effect of isodillapiole on the expression of the insecticide resistance genes GSTE7 and CYP6N12 in *Aedes aegypti* from central Amazonia. *Genetics and Molecular Research*, v.14, n.4, p. 16728-16735, 2015.
- [40] FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; MEDEIROS, A.F.M; GOMES, L.P.; SILVA da I.M.; SILVA, M.S de F. Sinérgico alternativo para o manejo da resistência da lagarta do cartucho do milho a piretroides. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.14, n.3, p. 316-325, 2015.
- [41] FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. V. E.; MONTEIRO, A. F. M.; SILVA, I. M. da; GOMES, L. P.; SILVA, M. S. de F. Combining the essential oil of *Piper aduncum* L. with commercial insecticides. *Semina Ciências Agrárias*, v.37, n. 6, p. 3903-3914, 2016.
- [42] FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; MEDEIROS, A.F.M; SILVA da I.M.; GOMES, L.P.; SILVA, M.S de F. Synergistic potential of dillapiole-rich essential oil with synthetic pyrethroid insecticides against fall armyworm. *Ciência Rural*, v.46, n.3, p.382-388, 2016.
- [43] FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; MEDEIROS, A. F. M., GOMES, L. P.; DA SILVA, I. M.; DE FARIAS SILVA, M. S. Potencial sinérgico do óleo de *Piper aduncum* para inseticidas formulados com misturas de princípios ativos. *Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, v. 59, n.4, p. 362-369, 2016.
- [44] FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; MONTEIRO, A. F. M.; SILVA, I. M.; GOMES, L. P. Sinérgico alternativo para inseticidas inibidores de acetilcolinesterase. *Revista Agro@mbiente*, v. 11, n.3, p. 232-240, 2017.
- [45] PIMENTEL, F.A.; SILVA, M.R. *Recomendações sobre processo de destilação comercial de biomassa triturada de pimenta longa (Piper hispidinervum)*. Rio Branco: 2003. (Embrapa Acre. Comunicado Técnico, 123).
- [46] SHMIDT, F. V.; MONNERAT, R.G.; BORGES, M.; CARVALHO, R.S. da Metodologia de criação para avaliação de agentes entomopatogênicos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2001. (Embrapa Recursos Genéticos. Circular Técnica, 11).
- [47] FINNEY, D. J. Probit analysis. London: Cambridge University, 1971.
- [48] STEWART, D. The evaluation of synergistic action in the laboratory and field, p. 173-198. In: JONES, D.G. (Ed.): *Piperonyl Butoxide: the insecticide synergist*. Academic Press, London, 1998.
- [49] SAS Institute. User's Guide: Statistics, Version 8.2, 6th Edition. SAS Institute, Cary, NC. 2001.
- [50] ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v. 18, p. 265-267, 1925.
- [51] GUEDES, R.N.; PICANÇO, M.C. GUEDES, N.M.P.; MADEIRA, N.R. Sinérgismo do óleo mineral sobre a toxicidade de inseticidas para *Scrobipalpula absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.30, p. 313-318, 1995.
- [52] TERRA W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, v. 47, n. 2, p. 47-61, 2001.
- [53] Zarate, N.; Diaz, O.; Martínez, A. M.; Figueroa, J. I.; Schneider, M. I.; Smagghe, G.; Pineda, S. Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide on the development, survival and reproduction of the fall



armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, v.40, n.1, p.129-137, 2011.

[54] PARWEEN, S. Symptoms of triflumuron intoxication in larvae of *Tribolium castaenum* (Herbst)(Coleoptera: Tenobridae). *Tribolium Information Bulletin*, v. 38, p. 268-270, 1998.

[55] PLAPP, F.W. JR. Genetics and biochemistry of insecticide resistance in arthropods: prospects for the future, p.74-86. In *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, National Academy Press, Washington, D.C., 1986.

[56] NEUMANN, R.; GUYER, W. Biochemical and toxicological differences in the modes of action of the benzoylureas. *Pesticide Science*, v. 20, n. 2, p. 147-156, 1987

[57] SMAGGHE, G.; AUDA, M.; VAN LAECKE, K.; DEGHEELE, D. Significance of penetration and metabolism on topical toxicity of diflubenzuron in *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera exigua*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.82, n.3, p. 255-260. 1997.

[58] PIMPRIKAR, G. D.; GEORGHIOU, G. P. Mechanisms of resistance to diflubenzuron in the house fly, *Musca domestica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 12, n. 1, p. 10-22, 1979.

[59] GRANETT, J.; HEJAZI, M. J. Synergism of two benzoylphenyl urea insect growth regulators. *Journal of Economic Entomology*, v. 76, n. 3, p. 403-406, 1983.

[60] TAK, J.H.; ISMAN, M.B. Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. *Scientific Reports*, v.5, p. 12690, 2015.

[61] ROMA, G.C.; MATHIAS, M.I. ; BUENO, O.C. Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection. *Micron*, v.37, p. 234-242, 2006.

[62] CHEBIRA, S.; SOLTANI, N.; MUYLLE, S.; SMAGGHE, G. Uptake and distribution of three insect growth regulators—diflubenzuron, flucyclozuron and halofenozide—in pupae and adults of *Tenebrio molitor*. *Phytoparasitica*, v.34, n.2, p. 187-196, 2006.

[63]- GRANETT, J.; ROBERTSON, J.; RETNAKARAN, A. Metabolic basis of differential susceptibility of two forest lepidopterans to diflubenzuron. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. v. 28, n. 3, p. 295-300, 1980.

[64] NEUMANN, R.; GUYER, W. A new chitin synthesis inhibitor CGA 112'913: its biochemical mode of action as compared to diflubenzuron. *Proc. 10th Int. Congr. Plant Protection*, Brighton, UK, vol. 1, p. 445-451, 1983.

[65] DAUTERMAN, W. C.; HODGSON, E. Detoxification mechanisms in insects, in "Biochemistry of Insects". ROCKSTEIN, M. (Ed.), p.541-577. Academic Press, New York/San Francisco/London, 1978.

[66] HODGSON, E. Microsomal Mono-oxygenases. In: Kerkut, G.A.; Gilbert L.I., eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon, Oxford I, v. 985, p. 225-321, 1985.

[67] DAVID, J. P.; BOYER, S.; MESNEAU, A.; BALL, A.; RANSON, H.; DAUPHIN-VILLEMANT, C. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v. 36, n.5, p. 410-420, 2006.

[68] CORZO, F. L.; GILABERT, M.; ALCAIDE, M. F.; BARDÓN, A. Toxicity of Porella chilensis sesqui- and diterpenoids against larvae of the corn pest *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, v. 41, n.5, p. 414-419, 2012.



[69] SENTHIL-NATHAN, S.; HISHAM, A.; JAYAKUMAR, G. Larvicidal and growth inhibition of the malaria vector *Anopheles stephensi* by triterpens from *Dysoxylum* spp. (Meliaceae). *Fitoterapia*, v. 76, p.106–111, 2008.

[70] RAMAKRISHNAN, R.; JUSKO, W. J. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. *International Immunopharmacology*, v.1, p. 2035–2042, 2001.

[71] ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, v.456. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2007.