

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

Toxicidade e compatibilidade físico-química de misturas de inseticidas botânicos a base de limonoides e reguladores de crescimento de origem sintética a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Liliane Nachtigall Martins

Pelotas, 2021

Liliane Nachtigall Martins

Toxicidade e compatibilidade físico-química de misturas de inseticidas botânicos a base de limonoides e reguladores de crescimento de origem sintética a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Fitossanidade (Área de conhecimento: Entomologia).

Orientador: Prof. Dr. Daniel Bernardi
Coorientador: Dr. Leandro do Prado Ribeiro

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M379t Martins, Liliane Nachtigall

Toxicidade e compatibilidade físico-química de misturas de inseticidas botânicos a base de limonoides e reguladores de crescimento de origem sintética a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) / Liliane Nachtigall Martins ; Daniel Bernardi, orientador ; Leandro do Prado Ribeiro, coorientador. — Pelotas, 2021.

121 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Manejo integrado de pragas. 2. Lagarta-do-cartucho. 3. Manejo da resistência. 4. Azadiractina. 5. Benzoilureia. I. Bernardi, Daniel, orient. II. Ribeiro, Leandro do Prado, coorient. III. Título.

CDD : 595.7

Liliane Nachtigall Martins

Toxicidade e compatibilidade físico-química de misturas de inseticidas botânicos a base de limonoides e reguladores de crescimento de origem sintética a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Fitossanidade (área de conhecimento Entomologia), Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – FAEM, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 18/06/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Daniel Bernardi (Orientador)

Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

Dr. Dori Edson Nava

Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

Dr^a. Ana Paula Schneid Afonso da Rosa

Doutora em Agronomia pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rafael Antonio Pasini

Doutor em Fitossanidade Pelo Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas

Dr^a. Adrise Medeiros Nunes

Doutora em Fitossanidade Pelo Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas

Dedico este estudo ao meu avô materno, Gilberto Nachtigall, que dedicou anos de trabalho à UFPel.

Agradecimentos

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de Doutorado e a Universidade Federal de Pelotas assim como ao programa de Pós-graduação em Fitossanidade (PPG Fitossanidade) pela oportunidade de realização do curso e pelo espaço físico.

Aos professores, pesquisadores e colaboradores do PPG Fitossanidade pela atenção e ensinamentos, em especial ao meu orientador Professor Dr. Daniel Bernardi pelo incentivo, empatia, amizade ao longo desses quatro anos, obrigada por se importar e se tornar um dos melhores professores e orientadores que a FAEM possa ter.

Ao Dr. Leandro do Prado Ribeiro e ao Dylan Amandio que foram fundamentais neste estudo, dedicaram seu tempo para que este trabalho pudesse ser desenvolvido, sempre com muito profissionalismo, ética e responsabilidade. Obrigada por vocês terem confiado a mim a execução deste estudo fantástico.

Ao Prof. Edson Zefa, que sempre esteve disposto a conversar e se dispor a auxiliar em diversas fases deste ciclo. Assim como o professor Fábio Pereira Leivas Leite, o qual sempre depositou muita confiança no meu trabalho, me auxiliou sempre que necessário e me deu diversas oportunidades de aprender e ensinar, muito obrigada!

Agradeço também a equipe de terceirizados da UFPel sendo as recepcionistas, serviços gerais e seguranças que por muitas vezes compartilharam a nossa preocupação com os experimentos e assuntos gerais.

À minha família Luciara, Maicon, José, Mário, Tânia, Ivania, Maria Elisa, Anna Maria, Cláudio, Bianca, Joseane e ao meu marido Thiago, por acreditar no meu propósito e me fazerem perceber que todo o esforço valeu a pena.

À minha grande amiga Suzane, por compartilhar momentos de ansiedade, e por estar ao meu lado me desejando sempre o melhor. Aos meus grandes presentes da pós-graduação e de vida: Fernanda, Jutiane e Daniele (Mity). Sem elas eu não teria seguido em frente, foram e são meu porto seguro nessa jornada. E também ao Thiago Xavier que auxiliou muito em época de pandemia.

À todos aqueles que passaram na minha vida, seja pelo Labio ou pela Universidade, e que durante este ciclo eu pude ensinar um pouco do que aprendi e também aprender, muito obrigada!

Resumo

MARTINS, Liliane Nachtigall. **Toxicidade e compatibilidade físico-química de misturas de inseticidas botânicos a base de limonoides e reguladores de crescimento de origem sintética a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)** 2021. 120f. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, FAEM, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O Brasil é considerado um dos maiores produtores de milho (*Zea mays*) do mundo. Um dos principais desafios a cada safra esta relacionado com o manejo da *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797). Este fato tem aumentado nos últimos anos devido a rápida evolução da resistência da praga a diferentes inseticidas químicos e plantas *Bt*. Frente a isso, cada vez mais estão sendo estudadas e avaliadas novas alternativas ou produtos para tentar viabilizar o manejo da espécie a campo, dando ênfase a alternativa sustentáveis e de menor impacto ambiental. O presente estudo visou caracterizar o teor de azadiractina de diferentes formulações comerciais de inseticidas a base de nim (Azamax[®], Agroneem[®], Azact[®] e Fitoneem[®]) e avaliar a compatibilidade física e química e a toxicidade com inseticidas reguladores de crescimento (IRC's) (Certo[®], Intrepid[®], Mach[®] e Mimic[®]) quando utilizados em misturas sobre lagartas de *S. frugiperda* em laboratório e campo. Mediante bioensaios de ingestão em dieta artificial, todas as formulações de nim avaliadas ocasionaram significativa toxicidade letal sobre lagartas neonatas de *S. frugiperda*. O Azamax[®] e Agroneem[®] foram os produtos que proporcionaram as maiores mortalidades (mortalidade larval > 70%) após 168 horas de exposição. Porém, tais níveis de mortalidade foram inferiores ao observado (98,9%) no controle positivo (Inseticida Premio[®] - clorantropilprole 200 g.L⁻¹). Além do mais, todas as formulações comerciais de base de nim proporcionaram elevada inibição do desenvolvimento larval. De acordo com o perfil químico, foi verificado que o Azamax[®] foi o produto que apresentou o maior teor de azadiractina (3,94 g kg⁻¹) em relação às demais formulações. Ao avaliar os parâmetros biológicos de *S. frugiperda*, foi observado um efeito subletal significativo na duração e viabilidade da fase larval e período ovo-adulto, peso larval aos 7 dias, peso de pupas com 24 h de idade, duração dos períodos de pré-oviposição e oviposição e fecundidade total quando utilizado as concentrações letais (CL₂₅ ou CL₅₀) dos inseticidas IRC's e à base de limonoides incorporado a dieta. Fato que afetou diretamente os parâmetros da tabela de vida de fertilidade. Em bioensaios de misturas de inseticidas, todas as combinações dos quatro IRC's as quatro formulações à base de derivados de nim apresentaram uma redução significativa do pH da calda e um incremento significativo da condutividade elétrica. Porém, todas as combinações testadas apresentaram comportamento de estabilidade de calda semelhante quando foram preparadas somente com água, o que demonstra sua compatibilidade física. Além disso, em bioensaios de laboratório e campo, as misturas de IRC's com formulações

à base de limonoides apresentaram efeito de sinergismo no manejo de *S. frugiperda*. Frente os resultados alcançados, a utilização de IRCs e formulações à base de derivados de nim de forma isolada ou combinada apresentaram efeitos letais e subletais sobre *S. frugiperda*, constituindo-se em promissoras alternativas de manejo da praga, aliando eficácia de controle e aspectos importantes para os programas de manejo integrado.

Palavras-chave: Manejo Integrado de Pragas; Lagarta-do-cartucho; Manejo da Resistência; azadiractina, benzoilureia, diacilhidrazina

Abstract

MARTINS, Liliane Nachtigall. **Toxicity and physicochemical compatibility of mixtures of botanical insecticides based on limonoids and growth regulators of synthetic origin to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)** 2021. 120s. Thesis Postgraduate Program in Plant protection, FAEM, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

The Brazil is considered one of the largest corn (*Zea mays*) producers in the world. One of the main challenges for each crop is related to the management of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797). This fact has increased in recent years due to the rapid evolution of pest resistance to different chemical insecticides and *Bt* plants. Faced with this, new alternatives or products are increasingly being studied and evaluated to try to enable the management of the species in the field, emphasizing sustainable alternatives with less environmental impact. The present study aimed to characterize the azadirachtin content of different commercial formulations of neem-based insecticides (Azamax[®], Agroneem[®], Azact[®] and Fitoneem[®]) and evaluate the physical and chemical compatibility and toxicity with growth regulating insecticides (IRCs) (Certo[®], Intrepid[®], Mach[®] and Mimic[®]) when used in mixtures on *S. frugiperda* larvae in laboratory and field. Through bioassays of ingestion in artificial diet, all neem formulations evaluated caused significant lethal toxicity on *S. frugiperda* larvae. Azamax[®] and Agroneem[®] were the products that provided the highest mortality (larval mortality > 70%) after 168 hours of exposure. However, such mortality levels were lower than that observed (98.9%) in the positive control (Insecticide Premio[®] - chlorantraniliprole 200 g.L⁻¹). Furthermore, all commercial neem-based formulations provided high inhibition of larval development. According to the chemical profile, it was verified that Azamax[®] was the product that presented the highest azadirachtin content (3.94 g kg⁻¹) in relation to the other formulations. When evaluating the biological parameters of *S. frugiperda*, a significant sublethal effect was observed on the duration and viability of the larval stage and egg-adult period, larval weight at 7 days, weight of pupae until 24-hour, duration, oviposition period, and total fecundity when using lethal concentrations (LC₂₅ or LC₅₀) of IRC insecticides and limonoid-based incorporated into the diet. This fact that directly affected the parameters of the fertility life table. In bioassays of mixtures of insecticides, all combinations of the four IRCs and the four formulations based on neem derivatives showed a significant reduction in syrup pH and a significant increase in electrical conductivity. However, all tested combinations showed similar grout stability behavior when they were prepared with water only, which demonstrates their physical compatibility. Furthermore, in laboratory and field bioassays, mixtures of IRCs with formulations based on limonoids showed a synergistic effect in the management of *S. frugiperda*. In view of the results achieved, the use of IRCs and formulations based on neem derivatives, alone or in

combination, presented lethal and sublethal effects on *S. frugiperda*, constituting promising alternatives for the pest, combining control efficacy and selectivity, important aspects for integrated management programs.

Keywords: Integrated Pest Management; The fall armyworm; Resistance Management; azadiractina; benzoilureia; diacilhidrazin.

Lista de Figuras Artigo 1

Figura 1	Representação da curva analítica preparada em metanol (concentrações de 0,010-1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para o padrão de azadiractina.....	48
Figura 2	Cromatograma da amostra do produto Azamax [®] , analisado por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência	49
Figura 3	Cromatograma da amostra do produto Azact [®] , analisado por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência.....	50
Figura 4	Cromatograma da amostra do produto Agroneem [®] , analisado por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).....	51
Figura 5	Cromatograma da amostra do produto Fitoneem [®] , analisado por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).....	52
Figura 6	Espectros de massas da azadiractina em modo <i>scan</i>	53
Figura 7	Espectros de massas da azadiractina em modo Target MS/MS.....	53

Lista de Figuras Artigo 2

Figura 1	Duração (em dias) do período larval (A) e do ciclo biológico (ovo a adulto) (B) de <i>Spodoptera frugiperda</i> após alimentação em dieta artificial tratada com inseticidas reguladores de crescimento de origem natural e sintética.....	76
Figura 2	Porcentagem de viabilidade do período larval (A) e do ciclo biológico (ovo a adulto) (B) de <i>Spodoptera frugiperda</i> mantida durante a fase larval em dieta artificial tratada com diferentes inseticidas reguladores de crescimento de origem botânica e sintética.....	77
Figura 3	Peso larval (A) e pupal (B), em mg, de <i>Spodoptera frugiperda</i> mantida durante a fase larval em dieta artificial tratada com diferentes inseticidas reguladores de crescimento de origem botânica e sintética.	78
Figura 4	Fecundidade total de <i>Spodoptera frugiperda</i> mantida durante a fase larval em dieta artificial tratada com diferentes inseticidas reguladores de crescimento de origem botânica e sintética.....	79

Lista de Tabelas Artigo 1

Tabela 1	Inseticidas botânicos e sintéticos avaliados no presente frente a lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> em bioensaio de incorporação em dieta artificial.....	42
Tabela 2	Valores de exatidão obtidos para os padrões em três níveis de concentração.....	43
Tabela 3	Quantificação do teor de azadiractina em quatro formulações comerciais à base de limonoides registradas no Brasil.....	44
Tabela 4	Médias (\pm EP) da mortalidade (%) e peso larval (mg) de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> expostas a diferentes bioinseticidas comerciais à base de derivados de limonoides (nim) em condições de laboratório (bioensaio de ingestão), na concentração diagnóstica de 5000 mg kg^{-1}	45
Tabela 5	Estimativa das CL_{25} , CL_{50} e CL_{90} (mg/kg^{-1}) bem como o intervalo de confiança de diferentes inseticidas sintéticos e orgânicos sobre neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> em bioensaio de incorporação de inseticida em dieta artificial.....	46
Tabela 6	Concentração efetiva (CE) que inibe o desenvolvimento de neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> em bioensaio de incorporação de inseticidas em dieta artificial.....	47

Lista de Tabelas Artigo 2

Tabela 1	Inseticidas sintéticos e botânicos avaliados no presente estudo frente a <i>Spodoptera frugiperda</i>	74
Tabela 2	Tabela de vida de fertilidade de <i>Spodoptera frugiperda</i> mantida durante sua fase larval em dieta artificial tratada com concentrações subletais (CL_{25} e CL_{50}) de diferentes reguladores de crescimento de origem botânica e sintética.....	75

Lista de Tabelas Artigo 3

Tabela 1	Inseticidas sintéticos e orgânicos utilizados para avaliar a toxicidade e o desempenho biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i> em bioensaio de incorporação em dieta artificial.....	104
Tabela 2	Inseticidas sintéticos reguladores de crescimento (IRC) e inseticidas botânicos (IB) em mistura utilizados para avaliar a toxicidade letal para <i>Spodoptera frugiperda</i> em bioensaio de incorporação em dieta artificial, folha de milho e a campo.....	105
Tabela 3	Estimativa da CL ₂₅ (mg kg ⁻¹) de diferentes inseticidas sintéticos reguladores de crescimento e inseticidas botânicos sobre lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> em bioensaio de incorporação em dieta artificial, folha de milho e campo.....	106
Tabela 4	Médias (±EP) do pH e da condutividade elétrica (25 °C) de caldas preparadas a partir das misturas de quatro formulações de inseticidas botânicos à base de limonoides e inseticidas reguladores de crescimento.....	107
Tabela 5	Estabilidade de calda preparadas a partir das misturas de quatro formulações de inseticidas botânicos à base de limonoides e inseticidas reguladores de crescimento.....	108
Tabela 6	Médias (±EP) da mortalidade e peso larval (7 ^o dia) de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> expostas a misturas de quatro formulações de inseticidas botânicos à base de limonoides e inseticidas reguladores de crescimento, na CL ₂₅ previamente estimada, em bioensaio de ingestão sob duas formas de aplicação.....	109
Tabela 7	Médias (±EP) das notas de dano [escala de Davis et al. (1972) – (0-9)] causadas por lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (infestação natural) em cultivos de milho tratados com diferentes misturas de inseticidas botânicos à base de limonoides e inseticidas reguladores de crescimento (concentração CL ₂₅).....	110

Sumário

1 Introdução.....	16
Artigo 1 - Teor de Azadiractina e Toxicidade Comparada de Formulações Comerciais à Base de Limonoides sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) através de Parâmetros Toxicológicos	20
Artigo 2 - Parâmetros biológicos e tabela de vida de fertilidade de <i>Spodoptera frugiperda</i> sob influência de concentrações subletais de reguladores de crescimento de origem botânica e sintética.....	55
Artigo 3 - Associação de inseticidas reguladores de crescimento e formulações à base de limonoides: compatibilidade física e toxicidade frente a <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) em testes laboratoriais e de campo.....	81
2 Considerações finais.....	111
Referências.....	113

1 Introdução

Os agrotóxicos passaram a ser mais intensamente utilizados na agricultura na era denominada “Revolução Verde” na segunda metade do século XX, onde a produção de alimentos estava em expansão devido ao aumento da população mundial (ANDRADES; GANIMI, 2007). Logo, tornaram-se uma alternativa para conter a proliferação de insetos-praga, doenças e plantas daninhas nas lavouras (SERRA et al., 2016). Atualmente, o Brasil é considerado o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (VALADARES; ALVEZ; GALIZA, 2020).

Entretanto, com a expansão e exploração da prática agrícola em ambientes rurais os problemas fitossanitários, como as plantas daninhas, as doenças causadas por microorganismos e os insetos com *status* de praga, tornaram-se cada vez mais frequentes, logo, estima-se que somente os artrópodes considerados pragas causem perdas anuais de US\$ 12 bilhões para a economia brasileira (RANGEL, 2015). As potenciais perdas de produção pela ação de artrópodes-praga se tornam principalmente elevadas em culturas conduzidas sob condições climáticas tropicais e subtropicais, junto a diversos outros cultivos em esquema de sucessão ou rotação, em grande escala, aumentando a disponibilidade de alimentos para a sobrevivência das pragas (pontes-verdes) (OERKE, 2006; BUENO et al., 2012; FATORETTO et al., 2017), como é o caso do milho (*Zea mays* L.) no Brasil e nas Américas. Dentro deste cenário agrícola, destaca-se a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera:Noctuidae), considerada a espécie mais destrutiva da cultura do milho (CRUZ et al., 2012), mas que também ocasiona danos no algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (SANTOS et al., 2003), arroz (*Oryza sativa*) (BOTTON et al., 1998), sorgo (*Sorghum* spp.), (CORTEZ; WAQUIL, 1997), trigo (*Triticum* spp.) (TAKAHASHI; NAKANO; OSI, 1980) e soja (*Glycine max* L.) (BARROS et al., 2010).

Para o manejo da lagarta-do-cartucho, o controle químico é considerado a principal estratégia de manejo da praga no Brasil. Contudo, devido ao uso generalizado de inseticidas, por muitas vezes de forma indiscriminada (sem considerar o nível de dano da praga ou aplicados por calendário), contribuiu para a evolução da resistência de *S. frugiperda* aos principais inseticidas utilizados para seu controle, dificultando ainda mais o manejo desta praga no milho, de acordo com

o (Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), com mais de 20 ingredientes ativos apresentam relatos de resistência em *S. frugiperda* em todo mundo (ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE, 2021). No Brasil, foram reportados casos de resistência de *S. frugiperda* a lambda-cialotrina (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001), clorpirifós (CARVALHO et al., 2013), lufenuron (NASCIMENTO et al., 2016), espinosade (OKUMA et al., 2018) e diamidas (BOLZAN et al., 2019).

Para minimizar esse problema, o manejo por ataque múltiplo mediante a mistura de inseticidas em tanque pode ser uma alternativa promissora para o manejo da praga, desde que não ocorra a prevalência de resistência cruzada entre os inseticidas utilizados na mistura (GEORGHIOU, 1983). A mistura em tanque (MT) é definida como a associação de pesticidas, onde a calda formulada é homogeneizada e disponibilizada em sistemas de pulverização para o aplicador, comumente utilizada com fins de redução de custos de combustível, tempo de disponibilidade do aplicador, entradas na lavoura, compactação no solo e quantidade de água (GUIMARÃES, 2014; GAZZIERO, 2015). No entanto, um dos principais princípios da MT é a busca pela compatibilidade e a eficiência (toxicidade) dos produtos sobre o alvo de controle (REFFSTRUP et al., 2010; PETER et al., 2013). Esta prática agrícola não é uma exclusividade da agricultura brasileira, uma vez que é muito usada também em países como Alemanha, França, Holanda e EUA (SCHREINER et al., 2016). Embora estudos demonstrem resultados promissores no manejo de pragas a partir da aplicação de inseticidas em misturas em tanque, devido aos efeitos sinérgico ou aditivo sobre a praga alvo (QUEIROZ et al., 2008; REFFSTRUP et al., 2010; CLOYD, 2011; SIRVI et al., 2013; ZAHID et al., 2016), este procedimento também pode proporcionar efeitos antagônicos, diminuindo a eficiência dos produtos sobre os artrópodes (IKEDA, 2013; PETER et al., 2013; BHAN et al., 2015). Desta forma, conhecer aspectos da exposição conjunta de produtos sobre a praga alvo, assim como as concentrações das misturas dos produtos torna-se indispensável para obter o sucesso no manejo (KRAUSE, 2014; GANDINI et al., 2020).

Frente a isso, a busca por formulações ecologicamente mais seguras e sustentáveis, com potencial de menor toxicidade aos organismos não alvo, torna-se cada vez mais importante para a agricultura (PAVELA, 2007; DAYAN; CANTRELL; DUKE et al., 2009; HONG et al., 2013; ANBALAGAN et al., 2014.), principalmente,

visando produtos que apresentam modo de ação distintos dos inseticidas tradicionalmente usados no manejo de *S. frugiperda* (RAFFA; PRIESTER, 1985).

Para o manejo de *S. frugiperda*, os inseticidas reguladores de crescimento de Insetos (IRCs) são caracterizados de menor toxicidade sobre o *Telenomus remus* Nixon, 1937 (Hymenoptera: Platygasteridae), considerado o parasitoide de ovos mais promissor para o manejo da lagarta-do-cartucho a campo (POMARI et al., 2012; VIEIRA et al., 2017; POMARI-FERNANDES et al., 2018). Outra estratégia para programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) é a utilização de produtos derivados de neem (*Azadirachta indica* Juss), que possuem como os principais constituintes os triterpenos (limonóides), com destaque para a azadiractina que ocasiona efeito de controle em 90% das pragas (CAMPOS et al., 2016). Estudos têm demonstrado que a utilização de inseticidas a base de azadiractina pode ser uma alternativa para o manejo de *S. frugiperda* (VIANA; PRATES 2003; CABODEVILLA et al., 2011; CAMPOS; BOIÇA JR, 2012; LIMA et al., 2010; ROEL et al., 2010; DUARTE et al., 2019, 2020). Este composto além de proporcionar efeitos tóxico direto (mortalidade) sobre a praga, também pode ocasionar efeito indireto, como inibição da alimentação, distúrbios hormonais o que pode interromper os processos de muda nos estágios juvenis e promover alteração no desenvolvimento e reprodução na fase adulta (WILPS et al., 1992; MORDUE; BLACKWELL, 1993; BRAHMACHARI, 2004; QIAO et al., 2014). Além do mais, podem apresentar baixa toxicidade sobre inimigos naturais (OLIVEIRA; PRATISSOLI; BUENO, 2003; GONÇALVES-GERVÁSIO; VENDRAMIM, 2004, HOHMANN; SILVA; NOVAES, 2010), o que é um fator de suma importância para as estratégias do MIP.

Diante deste cenário a Instrução Normativa nº 40, de 11 de outubro de 2018, permite no Brasil a mistura em tanque recomendada por Engenheiros agrônomos desde que sejam especificados as recomendações oficiais, visando a elaboração da receita agrônômica em consonância com as boas práticas agrícolas e com as informações científicas disponíveis (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2018).

Com a possibilidade de misturas de inseticidas para o manejo de pragas, verificar a associação de inseticidas de origem botânica e inseticidas sintéticos para o manejo da lagarta-do-cartucho merece destaque especial. Sendo assim, o presente estudo visou caracterizar o teor de azadiractina de diferentes formulações comerciais de inseticidas a base de nim, avaliar a compatibilidade física e química e a toxicidade com inseticidas reguladores de crescimento quando utilizados em misturas sobre lagartas de *S. frugiperda* em laboratório e campo.

Artigo 1 - A ser submetido na revista Neotropical Entomology
(Versão em português)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

11
12

13
14
15

16
17
18

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

Martins *et al.*: Teor de Azadiractina e Toxicidade Comparada de Formulações Comerciais à Base de Limonoides sobre *Spodoptera frugiperda*

Daniel Bernardi
Universidade Federal de Pelotas
Laboratório de Biologia de Insetos
Departamento de Fitossanidade
Cx: 354, 96010970, Pelotas/RS, Brasil
E-mail: dbernardi2004@yahoo.com.br

Neotropical Entomology
Pest Management

Teor de Azadiractina e Toxicidade de Formulações Comerciais à Base de Limonoides sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

LN MARTINS¹, FCS GEISLER¹, DTT AMANDIO², M RAKES¹, MR FORIM³, LP RIBEIRO⁴, D BERNARDI¹

¹Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil
²Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil
³Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil
⁴Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar, Chapecó, SC, Brasil

44 **Resumo** - O uso de inseticidas botânicos constitui uma alternativa promissora para os
45 programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), sendo os derivados de nim (*Azadirachta*
46 *indica*) os mais difundidos e utilizados, com diferentes formulações comerciais disponíveis no
47 mercado brasileiro. No entanto, resultados inconsistentes têm sido observados em condições
48 de campo, que podem ser decorrentes de variações no perfil químico e nos níveis dos
49 compostos ativos majoritários das formulações. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o teor
50 de azadiractina (limonoide majoritário) em quatro formulações comerciais à base de
51 limonoides disponíveis no mercado brasileiro (Agroneem[®], Fitoneem[®], Azamax[®] e Azact[®]) e
52 comparar a toxicidade letal e subletal para lagartas de *Spodoptera frugiperda* por meio de
53 parâmetros toxicológicos. Na concentração de 5000 mg kg⁻¹, todas as formulações testadas
54 proporcionam significativa toxicidade letal, com destaque para os produtos Azamax[®] (75,3%)
55 e Agroneem[®] (70,8%), que ocasionaram os níveis mais elevados de mortalidade larval após
56 168 horas de exposição; porém, tais níveis de mortalidade foram inferiores ao observado
57 (98,9%) no controle positivo. Além disso, foi determinada a toxicidade letal CL₅₀ para
58 Agroneem[®] (1115,3 mg kg⁻¹), Fitoneem[®] (198,3 mg kg⁻¹), Azamax[®] (700,5 mg kg⁻¹) e
59 Azact[®](160,5 mg kg⁻¹). Assim como, elevada inibição do desenvolvimento larval, com uma
60 concentração efetiva (CE₅₀) de cada produto (285.4, 110.7, 275.1, 90.5 mg kg⁻¹),
61 respectivamente, foi observada para todas as formulações à base de limonoides testadas, sem
62 diferir significativamente entre elas, com base na comparação dos intervalos de confiança
63 ajustados. Porém, não foi verificada relação entre o teor de azadiractina em tais formulações e
64 o nível de toxicidade em lagartas de *S. frugiperda*. Desta forma, fica evidente que outros
65 compostos minoritários desempenham um importante papel na toxicidade global de tais
66 formulações.

67

68 **Palavras-chave:** Inseticidas botânicos, lagarta-do-cartucho, *Azadiractina*, perfil
69 cromatográfico.

70 **Introdução**

71 A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é
72 uma praga polífaga [ocorrência relatada em 353 plantas hospedeiras pertencentes a 76
73 famílias botânicas (Montezano *et al* 2018)] de importância econômica em diferentes sistemas
74 de produção. No Brasil, destaca-se como praga-chave da cultura do milho (*Zea mays* L.)
75 (Cruz *et al* 2012, Faretto *et al* 2017, Huang, 2020), embora surtos populacionais expressivos
76 também tenham sido observados em cultivos de soja (Moscardi *et al* 2012) e pastagens
77 (Ribeiro *et al* 2020), entre outras.

78 As principais estratégias de manejo de *S. frugiperda* compreendem a utilização de
79 inseticidas sintéticos (Nascimento *et al* 2016) e de eventos geneticamente modificados que
80 expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (ISAAA, 2016). Entretanto, o uso
81 generalizado de inseticidas, por muitas vezes de forma indiscriminada, apresenta riscos
82 ambientais e toxicológicos e contribuiu para a rápida seleção de populações resistentes. Neste
83 contexto, já foram descritas no Brasil populações de *S. frugiperda* resistentes a lambda-
84 cialotrina (Diez-Rodriguez & Omoto 2001), clorpirifós (Carvalho *et al* 2013), lufenurom
85 (Nascimento *et al* 2016), espinosade (Okuma *et al* 2018) e diamidas (Bolzan *et al* 2019).
86 Além disso, a contínua pressão de seleção condicionada pelos eventos *Bt* tem culminado na
87 rápida evolução de populações resistentes, tanto em eventos simples (Farias *et al* 2014)
88 quanto piramidados (Storer *et al* 2012, Bernardi *et al* 2015, Omoto *et al* 2016; Faretto *et al*
89 2017, Huang, 2020).

90 Como alternativa ambientalmente mais sustentável destacam-se os inseticidas
91 botânicos (Ansante *et al* 2015, Kamaraj *et al* 2018, Duarte *et al* 2019), especialmente
92 formulações à base de derivados de nim (*Azadirachta indica* A. Juss, Meliaceae). O
93 principal ingrediente ativo de produtos de nim é o tetranortriterpenoide azadiractina,
94 composto pertencente ao grupo dos limonoides C-secos (Champagne *et al* 1992). No
95 entanto, em óleos brutos ou extratos semi-purificados podem ocorrer mais de 100

96 compostos biologicamente ativos, que atuam, geralmente, de forma sinérgica (Campos *et*
97 *al* 2016).

98 O limonoide azadiractina é conhecido pelas suas propriedades fagoderrentes e
99 ação reguladora de crescimento sobre várias espécies de artrópodes (Viegas Jr 2003,
100 Chaudhary *et al* 2017, Duarte *et al* 2019). A ação fagoderrente decorre da ação nos
101 quimiorreceptores, acarretando em diminuição no ganho de biomassa devido a redução na
102 quantidade de alimento consumido e na eficiência de digestão e de conversão do alimento
103 ingerido (Duarte *et al* 2019). Além disso, esse composto promove a ativação de um sistema
104 de degradação dos metabólitos tóxicos, consumindo energia que seria destinada ao
105 crescimento corporal (Godfrey 1994, Campos *et al* 2016, Kamaraj *et al* 2018).

106 Vários estudos demonstraram que os produtos formulados à base de azadiractina
107 possuem elevada eficácia contra uma grande diversidade de insetos de importância
108 agrícola, médica e veterinária (Prates *et al* 2003; Reddy & Antwi 2016, Pavlova *et al*
109 2017), assim como pode proporcionar efeitos repelente (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000) e
110 fagoderrente (Kraus 1995, Mordue (Luntz) & Nisbet 2000). Tais efeitos subletais são
111 benéficos para diminuir a densidade populacional das pragas nas culturas a serem
112 protegidas e afetar negativamente os parâmetros biológicos dos insetos contaminados
113 (Campos *et al* 2016, Kamaraj *et al* 2018). Em adição, estudos anteriores verificaram que a
114 azadiractina tem proporcionado baixa toxicidade aos parasitoides de ovos *Trichogramma*
115 *pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Gonçalves-Gervásio & Vendramim
116 2004, Morandi Filho *et al* 2006, Lira *et al* 2011, Gladenucci *et al* 2020) e *Telenomus remus*
117 Nixon (Hymenoptera: Platygasteridae) (Silva *et al* 2016), o principal parasitoides de ovos de
118 *S. frugiperda* no Brasil (Pomari *et al* 2012). Dessa forma, inseticidas botânicos à base de
119 limonoides de nim podem desempenhar um papel importante no contexto do manejo
120 integrado de *S. frugiperda* em diferentes cultivos agrícolas, incluindo aqueles de base
121 orgânica ou ecológica.

122 Com a facilitação do registro de produtos fitossanitários para uso na agricultura
123 orgânica a partir da promulgação do Decreto 6.913, de 23 de julho de 2009 (Brasil 2009) e
124 da INC nº 1, de 24 de maio de 2011 (Brasil 2011), que trata do registro de produtos com
125 base em especificação de referência, várias formulações à base de nim estão sendo lançadas
126 no mercado brasileiro. No entanto, resultados inconsistentes têm sido observados em
127 condições de campo, que podem ser decorrentes de variações no perfil químico e nos níveis
128 dos compostos ativos majoritários e da qualidade das formulações, fato ainda não
129 profundamente investigado.

130 Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o teor de azadiractina em
131 quatro formulações comerciais à base de nim disponíveis no mercado brasileiro e a
132 toxicidade sobre *S. frugiperda* em condições controladas.

133

134 **Materiais e Métodos**

135

136 *Insetos testados*

137 Os espécimens utilizados no ensaio foram oriundos de uma população de *S. frugiperda*
138 coletada em milho não-*Bt* durante a safra 2012/2013 em Mogi Mirim, SP, Brasil (22°28'31"S
139 e 46°54'21" W). Em laboratório (25 ± 2°C, U.R. 60 ± 10% e fotoperíodo de 12L:12E h), as
140 lagartas foram mantidas por mais de 25 gerações em dieta artificial à base de feijão branco
141 (Yoki®), gérmen de trigo (Walmon®) e levedura (Biorigem®) (adaptada de Greene *et al*
142 1976). Para alimentação dos adultos, utilizou-se uma solução de mel a 10% (v/v).

143

144 *Formulações comerciais a base nim testadas*

145 Na tabela 1, encontram-se informações sobre as quatro formulações comerciais à base de nim
146 (Agroneem®, Fitoneem®, Azamax® e Azact CE®) utilizadas no presente estudo. Tais

147 formulações foram obtidas em agropecuárias e revendas da região Oeste de Santa Catarina,
148 Brasil, e apresentavam diferentes tempos de prateleira (< 8 meses após fabricação).

149

150 *Quantificação do teor de azadiractina nas diferentes formulações*

151 O teor de azadiractina nas quatro formulações comerciais à base de limonoides (Agroneem[®],
152 Fitoneem[®], Azamax[®] e Azact CE[®]) (Tabela 1) foi realizado no Laboratório de Produtos
153 Naturais, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em
154 São Carlos, SP, Brasil. Para isso, utilizaram-se os seguintes reagentes: Acetonitrila obtida da
155 VWR Chemicals (LC-MS, PA, USA), metanol (HPLC e LC-MS) e hexano (HPLC) obtidos
156 da Honeywell (NC, USA) água ultrapura (Milli-Q, Millipore) e ácido fórmico (LC-MS,
157 Fluka, MO, USA).

158 Solução padrão estoque na concentração de 60 µg mL⁻¹ foi preparada para o padrão de
159 azadiractina em metanol, armazenada à temperatura de 4 °C em frasco âmbar. A partir da
160 diluição da solução estoque, foi preparada solução de trabalho na concentração de 2 µg mL⁻¹,
161 no mesmo solvente. A partir da solução estoque, curvas de calibração em quintuplicata foram
162 preparadas em metanol nas concentrações de: 0,050; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 µg mL⁻¹.
163 Foram obtidas por regressão linear as equações das retas a partir da relação entre as áreas dos
164 analitos e as respectivas concentrações de calibração. Três níveis de controle de qualidade
165 foram utilizados (0,060; 0,80 e 1,6 µg mL⁻¹) e analisados em quintuplicatas. Para a
166 quantificação das amostras, 25 mg foram solubilizadas em hexano. As amostras foram
167 submetidas a uma etapa de *clean up* por extração em fase sólida. Assim, foram aplicadas em
168 cartuchos de cianopropil de 100 mg mL⁻¹ (Applied Separations) previamente lavados e
169 condicionados (1 mL de metanol seguido por 5 mL de hexano). Posteriormente, as amostras
170 foram lavadas com 4 mL de hexano e eluídas do cartucho em metanol (1 mL). Os extratos
171 foram filtrados em membrana de PTFE de 0,22 µm. Para cada amostra, 100 µL do extrato
172 foram diluídos em 900 µL de metanol para as amostras Azact CE[®], Agroneem[®] e Fitoneem[®].

173 Para as amostras de Azamax[®], foram utilizados 50 µL em 950 µL de metanol. A concentração
174 do analito nos extratos diluídos foi determinada a partir das curvas de calibrações e a
175 concentração inicial dos analitos nos extratos foi determinada utilizando-se a seguinte
176 equação: $C_{inicial} = C_{diluída} * 10$ e $C_{inicial} = C_{diluída} * 20$ para a amostra Azamax[®] para determinação
177 da concentração em µg mL⁻¹. Para a concentração em mg g⁻¹, os valores em µg mL⁻¹ foram
178 normalizadas em função da quantidade de massa de amostra inicial. Todas as análises foram
179 realizadas em triplicata.

180 Para a análise do teor de azadiractina nas referidas formulações utilizou-se um sistema
181 de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC, Agilent 1290, Agilent Technologies,
182 CA, USA) hifenado a um sistema do tipo quadrupolo-tempo de voo (Agilent 6545 Q-
183 TOF/MS) equipado com uma fonte de ionização *eletrrospray* (Dual AJS ESI). A coluna C18
184 Zorbax Eclipse Plus (21x50 mm, 1.8 µm, Agilent) foi utilizada como fase estacionária. A
185 temperatura do forno da coluna e do autoamostrador foram 45°C e 15°C, respectivamente.
186 Um gradiente de fluxo constante (0,35 mL min⁻¹) combinando o solvente A (ácido fórmico
187 0,1 %/água) e o solvente B (ácido fórmico 0,1%/ acetonitrila) foi utilizado nas seguintes
188 condições: 35-65% B (0-6 min), 65-100% B(6-6,10 mim) e 100% B(6,10-8 mim) com *post*
189 *run* de três minutos. O volume de injeção foi de 1 µL.

190 A detecção por espectrometria de massas (EM) foi realizada no modo de íon positivo e
191 tensão capilar de 3.5 kV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram de 320 e 350°C,
192 respectivamente. O fluxo do gás de dessolvatação foi de 11 L min⁻¹ e o fluxo de gás no cone
193 foi de 8 L min⁻¹, com *fragmentor* de 175V, voltagem do *skimmer* de 65V e *nozzle* de 1000V.
194 Uma rampa de energia de colisão foi utilizada (20 a 50 V) e os íons *m/z* 322,0481 e 922,0098
195 foram selecionados como massas de referência para ajuste automático do Q-TOF/MS. Os
196 dados foram adquiridos no modo *Targeted MS/MS* com íons de *m/z* 703,2650 (azadiractina) e
197 velocidade de aquisição foi de 2 *spectra/sec*.

198

199 **Bioensaios**

200

201 *Toxicidade comparada de formulações comerciais à base de nim sobre Spodoptera*
202 *frugiperda*

203 Para triagem inicial, foram testadas as quatro formulações comerciais de nim (Agroneem®,
204 Fitoneem®, Azamax® e Azact CE®) (Tabela 1) através de bioensaio de incorporação em dieta
205 artificial utilizando a concentração diagnóstica de 5.000 mg kg⁻¹. Como controle negativo,
206 utilizou-se a mesma proporção de água destilada utilizada na solubilização dos tratamentos,
207 enquanto que o controle positivo foi constituído pelo inseticida Premio® (clorantraniliprole
208 200 g L⁻¹) (Tabela 1) na dose recomenda para o manejo de *S. frugiperda* no Brasil. Após a
209 incorporação dos produtos na dieta (temperatura ~ 50°C), esta foi vertida em placas de ensaio
210 (Elisa) e mantidas por 12 horas em câmara de fluxo laminar, protegidas da luz, para
211 evaporação do excesso de umidade. Decorrido esse período, cada célula foi inoculada com
212 uma lagarta de primeiro instar, e as placas mantidas em câmara climática (25°C, U.R.:
213 60±10% e fotofase de 12 h). Para cada tratamento, utilizou-se 6 repetições e, em cada
214 repetição, foram expostas 16 lagartas ($n= 96$). As avaliações foram feitas diariamente até o
215 sétimo dia, e após esse período, as lagartas sobreviventes foram pesadas em balança analítica.

216

217 *Curvas de concentração-resposta de formulações comerciais à base de nim sobre Spodoptera*
218 *frugiperda*

219 Para estimar a CL₂₅, CL₅₀ e CL₉₀ (CL - concentração letal), ou seja, as concentrações
220 necessárias para matar 25, 50% e 90% das lagartas expostas, respectivamente, foram
221 utilizadas seis concentrações de cada produto (intervalo: 312.5 - 10.000 mg kg⁻¹) (1 ppm = 1
222 mg de produto por Kg de dieta artificial), definidas com base em testes preliminares. Como
223 controle negativo, utilizou-se a mesma proporção de água destilada utilizada na solubilização
224 dos tratamentos. Para cada produto e concentração, os tratamentos foram incorporados em

225 dieta artificial (temperatura $\sim 50^{\circ}\text{C}$), vertida em placas de acrílico de 16 células (5,5
226 centímetros de comprimento x 4,0 cm de profundidade x 3,0 centímetros de altura por poço)
227 [(Advento do Brasil, São Paulo, Brasil)] e mantidas por 12 h em câmara de fluxo laminar,
228 privadas de luz, facilitando a evaporação e excesso de umidade. Posteriormente, cada célula
229 foi inoculada com 5 lagartas de primeiro instar e as placas mantidas em sala climatizada
230 (25°C , U.R.: $60\pm 10\%$ e fotofase: 12 h).

231 A sobrevivência larval foi observada diariamente por 7 dias, e após esse período, as
232 lagartas sobreviventes foram pesadas em balança analítica. As lagartas que não ultrapassaram
233 o primeiro instar larval também foram consideradas mortas. Para cada concentração, foram
234 utilizadas 16 repetições, sendo cada repetição composta por 5 lagartas, totalizando 80 lagartas
235 expostas por tratamento ($n = 80$).

236

237 *Análise dos dados*

238 Para avaliação da linearidade da curva de calibração utilizada nas quantificações de
239 azadiractina, utilizou-se análise de regressão linear simples com verificação dos coeficientes
240 de determinação ajustados. Além disso foram calculados os valores de desvio padrão relativo
241 [DPR(%) = (desvio padrão/média) x 100%] e de exatidão [Exatidão = (medida da
242 concentração/concentração nominal) x 100%], com respectivos coeficientes de variação.

243 Em todos os bioensaios, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente
244 casualizado. Os dados de proporção de mortalidade foram analisados por meio de um modelo
245 linear generalizado (GLM) com distribuição do tipo quase-binomial (Nelder & Wedderburn
246 1972). A verificação da qualidade do ajuste dos dados aos modelos foi feita por meio do uso
247 do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (Hinde & Demétrio
248 1998). Havendo diferença significativa entre os tratamentos, foram realizadas comparações
249 múltiplas (teste *pos hoc* de Tukey, $p < 0,05$) por meio da função *glht* do pacote *multcomp* com

250 ajuste dos valores de p . As análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico “R”,
251 versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

252 Para estimativa dos valores de CL_{25} , CL_{50} e CL_{90} , utilizou-se análise de Probit (PROC
253 PROBIT, SAS Institute 2000). Um teste de razão de verossimilhança foi usado para testar a
254 hipótese de que os valores de CL_p (concentração letal na qual um percentual de mortalidade P
255 é atingido) eram iguais. Se a hipótese fosse rejeitada, comparações pareadas eram realizadas e
256 a significância era declarada se os intervalos de confiança (ICs) não se sobrepusessem (Savin
257 *et al* 1977).

258 Para os dados de peso médio das lagartas sobreviventes, foi realizada uma análise de
259 regressão não-linear para estimação da CE_{50} e CE_{90} (CE - Concentração Efetiva) e respectivos
260 intervalos de confiança (IC 95%) no software JMP SAS[®] (SAS Institute 2010). Os modelos
261 logísticos não-lineares utilizados para estimativas da CE_{50} e CE_{90} foram os seguintes: peso =
262 $Wo/[1 + (dose/CE_{50})^B]$ e peso = $Wo/[1 + (dose/CE_{50})^{[\ln^9/(\ln(CE_{50}/CE_{90}))]}]$, respectivamente.

263

264 **Resultados**

265

266 *Teores de azadiractina nas formulações comerciais testadas*

267 A linearidade do método empregado dentro da faixa de trabalho foi confirmada ao
268 avaliarem-se as curvas de calibração preparadas em solvente puro ($R^2 = 0,9931$, Figura 1). Os
269 valores de exatidão obtidos para a verificação da calibração (controles de qualidades) podem
270 ser observados na Tabela 2. Os cromatogramas das amostras e os espectros de massas obtidos
271 no modo *scan* e MS/MS estão apresentados nos anexos I e II.

272 Houve variação no teor de azadiractina entre as formulações testadas (Tabela 3).
273 Azamax[®] foi aquela que apresentou a maior quantidade de azadiractina (3,94 g kg⁻¹), porém
274 em valores inferiores aqueles informados em bula, o que indica uma degradação desse

275 limonoide durante o armazenamento. As demais formulações à base de óleo bruto de nim
276 (Agroneem[®], Azact[®] e Fitoneem[®]) apresentaram reduzidos teores de azadiractina, com
277 maiores níveis observados no Agroneem[®].

278

279 *Toxicidade das formulações sobre Spodoptera frugiperda*

280 Na triagem inicial na concentração diagnóstica de 5000 mg/kg⁻¹, todas as formulações à base
281 de nim apresentaram significativa bioatividade sobre *S. frugiperda*, causando mortalidade
282 larval e redução do peso das lagartas sobreviventes após 168 h de exposição (Tabela 4). Os
283 inseticidas botânicos comerciais que ocasionaram os maiores níveis de mortalidade larval de
284 *S. frugiperda* foram Azamax[®] (75,3%) e Agroneem[®] (70,8%) após 168h de exposição.
285 Entretanto, nenhum dos inseticidas à base de nim foi equitóxico em relação ao controle
286 positivo, constituído por uma formulação à base da diamida antranílica chlorantraniliprole
287 (Premio[®]), que ocasionou mortalidade de 98,9%, após 168 h de exposição. Além da
288 toxicidade letal, foi verificado elevada inibição do desenvolvimento larval (aproximadamente
289 97% de redução) para todas as formulações avaliadas.

290 Com base na sobreposição dos ICs, o inseticida botânico Azact CE[®] apresentou os
291 menores valores de CL₂₅, CL₅₀ e CL₉₀ (Tabela 5). Em contraste, os maiores valores de CL₂₅,
292 CL₅₀ e CL₉₀ foram verificados para o inseticida Agroneem[®] (Tabela 5). Por outro lado, o
293 inseticida à base de diamida antranílica (Premio[®]) proporcionou os menores valores de CL em
294 relação aos inseticidas botânicos avaliados (Tabela 5).

295 Em adição, com base nos valores de CE₅₀ e CE₉₀, o inseticida botânico Azact CE[®]
296 proporcionou os maiores efeitos na redução de desenvolvimento larval de *S. frugiperda*
297 (Tabela 6), quando comparado com os inseticidas Azamax[®] e Agroneem[®] (Tabela 6).
298 Entretanto, todos os inseticidas botânicos avaliados apresentaram valores significativamente
299 maiores de CE₅₀ e CE₉₀ em relação ao controle positivo (Premio[®]) (Tabela 6).

300

301 **Discussão**

302

303 Os resultados obtidos no presente estudo indicam grandes variações entre as formulações
304 avaliadas em relação ao teor de azadiractina, limonoide majoritário presente em formulações
305 de nim. Tais resultados confirmam aqueles obtidos por Forim *et al* (2010), que mostraram
306 grandes variações nos teores de azadiractina, sendo que, normalmente, os produtos nacionais
307 apresentam menor quantidade do composto ativo do que os produtos importados e,
308 conseqüentemente, menor tempo de prateleira. No entanto, não se verificou relação entre o
309 teor de azadiractina em tais formulações e o nível de toxicidade letal e subletal frente a
310 lagartas de *S. frugiperda*. Assim, outros compostos minoritários desempenham um importante
311 papel na toxicidade global de tais formulações. Apesar de possuírem teores bastante inferiores
312 de azadiractina, as formulações produzidas à base do óleo bruto de nim (Azact CE[®],
313 Agroneem[®] e Fitoneem[®]) apresentam um nível de atividade comparável ou superior àquela
314 produzida com base nos limonoides purificados (Azadiractina A + 3-tigloilazadiractol,
315 Azamax[®]) em virtude de possuir em sua composição uma série de limonoides minoritários
316 que atuam sinergisticamente.

317 O efeito de derivados de nim sobre o desenvolvimento das lagartas está relacionado
318 com o modo de ação da azadiractina, que age nos quimiorreceptores e bloqueia impulsos
319 fagoestimulantes, ocasionando uma diminuição no ganho de biomassa devido a uma
320 redução na quantidade de alimento consumido e na eficiência de digestão (Duarte *et al*
321 2019). Além disso, esse composto promove a ativação de um sistema de degradação dos
322 metabólitos tóxicos, consumindo energia que seria destinada ao crescimento corporal
323 (Kamaraj *et al* 2018).

324 Os efeitos depreciativos na fisiologia do desenvolvimento das lagartas podem
325 provocar um atraso em seu crescimento e anomalias em sua metamorfose, sendo comum
326 observar indivíduos que não conseguiram trocar de instar, morrendo durante o processo de

327 ecdise sem eliminar completamente a exúvia ou a cápsula cefálica, o qual é decorrente da
328 diminuição na síntese e liberação de ecdisteroides na hemolinfa (Duarte *et al* 2019). Os
329 efeitos tóxicos em *S. frugiperda* provenientes da alimentação com extratos de nim garantem
330 um bom controle desta praga em diversas concentrações, desde que seja por via oral, já que
331 aplicações tópicas não apresentam efeitos pronunciados (Campos *et al* 2016).

332 Além das implicações deletérias ocasionadas pelos compostos presentes no óleo de
333 nim, alguns efeitos subletais também contribuem para a permanência das populações da
334 praga abaixo do nível de dano (Roel *et al* 2010). Neste estudo, foi observado um menor
335 peso de lagartas para indivíduos expostos aos limonoides através da alimentação. Sendo
336 esta, mais uma consequência da atividade antialimentar, que faz com que a lagarta tenha
337 um menor aproveitamento nutricional e não ganhe peso antes que a concentração de
338 hormônio juvenil na hemolinfa decaia e as de ecdiesteroides aumentem, proporcionando
339 pupas menores (Duarte *et al* 2019). Jones (2014) demonstrou que pupas menores estão
340 associadas a indivíduos com asas pequenas, e que estes indivíduos tem uma reduzida
341 capacidade de dispersão no ambiente. Sendo assim, os indivíduos provenientes de pupas
342 menores, podem ser prejudicados na busca por parceiros sexuais, além de terem sua
343 fecundidade prejudicada (Rodríguez & Vendramim 1996, Specht *et al* 2015, Duarte *et al*
344 2019).

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

353 alatostinas são responsáveis, respectivamente, por estimular e inibir a liberação de HJ
354 (Mordue (Luntz) 2004).

355 Efeitos tóxicos sobre a biologia de *S. frugiperda* alimentadas com derivados de nim
356 foram reportados por diversos autores, dentre eles, Roel *et al* (2010) observaram 100% de
357 mortalidade utilizando uma dose de 4.000 ppm de óleo de *A. indica*. Lima *et al* (2010) assim
358 como Campos & Boiça Jr (2012) reportaram cerca de 83% de mortalidade com óleo de nim a
359 352,85 ppm de azadiractina A e Duarte *et al* (2019) reportou cerca 83% de mortalidade das
360 lagartas em 5.000 mg kg⁻¹. Nossos resultados apontam 75,3% de mortalidade em 7 dias de
361 exposição das lagartas a dieta com Azamax[®] na mesma concentração diagnóstica.

362 As formulações comerciais de biopesticida à base de nim apresentam distintas
363 quantidades de azadiractinas, que variam de 1000 a 4000 mg kg⁻¹. Este fato pode explicar os
364 diferentes níveis de mortalidades observados nas CL's dos produtos avaliados (Benelli *et al*
365 2015; Nicoletti *et al* 2016b). A azadiractina presente nos formulados à base de nim promove a
366 ativação de um sistema de degradação dos metabólitos tóxicos os quais seriam utilizados para
367 o crescimento corporal destes insetos (Kamaraj *et al* 2018). Além disso, também ocasiona
368 danos a fisiologia e desenvolvimento das lagartas, provocando um atraso no crescimento e
369 favorecendo o aparecimento de anomalias, principalmente durante a ecdise, onde o inseto não
370 consegue eliminar completamente a exúvia ou a cápsula cefálica, o qual é decorrente da
371 diminuição na síntese e liberação de ecdisteroides na hemolinfa (Nijhout *et al* 2014; Campos
372 *et al* 2016; Duarte *et al* 2019).

373 As lagartas que não se alimentam devido a compostos presentes em derivados de nim
374 tem seu peso crítico reduzido, contudo o peso das pupas também reduz devido a má
375 alimentação durante a fase imatura dos insetos (Nijhout *et al* 2014). Estes fatores contribuem
376 para acarretar em efeitos negativos nos parâmetros biológicos da população ao longo do
377 tempo e prejudicam os crescimentos populacionais da espécie. Mordue & Blackwell (1993)
378 reportaram que o efeito da azadiractina é de acordo com a dose utilizada e o tempo de

379 exposição dos insetos a esses compostos, o que corrobora com o observado neste estudo nos
380 valores de CL₅₀ e CL₉₀ um aumento na mortalidade de acordo com a maior concentração de
381 produto.

382 O presente estudo ajuda a entender a composição química de formulações a base de
383 nim. Contudo, ficou evidente a ocorrência maior de compostos majoritários nas formulações
384 comerciais de nim o que proporciona a maior toxicidade sobre os insetos. Porém ficou claro
385 que outros compostos minoritários também desempenham um importante papel na promoção
386 da toxicidade sobre a espécie alvo. Embora o estudo tenha sido realizado em laboratório,
387 produtos a base de azadiractina podem contribuir significativamente para o manejo de *S.*
388 *frugiperda*, principalmente, em programas de manejo da resistência da praga, visto que, são
389 produtos que apresentam modo de ação distinto em relação aos inseticidas registrados para o
390 manejo da lagarta-do-cartucho. Assim como, podem ser preconizados em maior escala em
391 programas de agricultura sustentável e orgânica, onde a utilização de produtos sintéticos é
392 restrito ou não são permitidos para o uso.

393

394 **Agradecimentos**

395 Os autores agradecem a Universidade Federal de São Carlos e a Universidade
396 Federal de Pelotas por disponibilizar a infraestrutura e equipamentos necessários para a
397 realização deste estudo. Além disso, agradecem o a Coordenação de Aperfeiçoamento de
398 Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa à primeira autora e ao Conselho
399 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de
400 produtividade em pesquisa (Processos 305377/2019-1 e 304018/2019-8) para os dois últimos
401 autores, respectivamente.

402

403

404

405 **Referências**

- 406 Ansante TF, Ribeiro LP, Bicalho KU, Fernandes JB, Silva MFGF, Vieira PC, Vendramim JD
407 (2015) Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: screening, bioguided
408 fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:
409 Noctuidae). *Industrial Crops Products* 74: 969-976
- 410 Benelli G, Bedini S, Cosci F, Toniolo C, Conti B, Nicoletti M. (2015a) Larvicidal and
411 ovideterrent properties of neem oil and fractions against the filariasis vector *Aedes*
412 *albopictus* (Diptera: Culicidae): a bioactivity survey across production sites.
413 *Parasitology Research*. 114: 227–236.
- 414 Bernardi D, Salmeron E, Horikoshi RJ, Bernardi O, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S,
415 Head GP, Omoto C (2015) Cross-Resistance between Cry1 Proteins in Fall Armyworm
416 (*Spodoptera frugiperda*) May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maize
417 Hybrids in Brazil. *Plos One* 10: e0140-130.
- 418 Bolzan A, Padovez FEO, Nascimento ARB, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FSA, Kanno HK,
419 Malaquias JB, Omoto C (2019) Selection and characterization of the inheritance of
420 resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and
421 cross-resistance to other diamide insecticides. *Pest Management Science* 10: 53-76
- 422 Brasil. 2009. Decreto N^o 6.913, de 23 de julho de 2009. Acresce dispositivos ao Decreto
423 N^o 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei N^o 7.802, de 11 de julho de
424 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e
425 rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial,
426 a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o
427 registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus
428 componentes e afins. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder
429 Executivo, Brasília, DF, 24 jul. 2009. Disponível em:

- 430 <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6913.htm>.
- 431 Acesso em: 03 jun. 2021.
- 432 Brasil. 2011. Instrução Normativa Conjunta Nº 1, de 24 de maio de 2011. Estabelece os
433 procedimentos para o registro de Produtos Fitossanitários com Uso Aprovado para a
434 Agricultura Orgânica, na forma dos Anexos I e II à presente Instrução Normativa.
435 Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 25
436 mai. 2011. Disponível em:
437 <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/conjurnormas/index.php/INSTRU%C3%87%C3%83O_NORMATIVA_CONJUNTA_N%C2%BA_1,_DE_24_DE_MAIO_DE_2011>.
438 Acesso em: 03 jun. 2021.
- 440 Campos AP, Boiça Jr AL (2012) Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)
441 (Lepidoptera: Noctuidae) submetidas a diferentes concentrações de óleo de nim. Revista
442 Brasileira de Milho e Sorgo 11: 137–144.
- 443 Campos EVR, Oliveira JL, Pascoli M, Lima R, Fraceto LF (2016) Neem oil and crop
444 protection: from now to the future. *Frontiers in Plant Science* 7: 1–8.
- 445 Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bas C (2013) Investigating the molecular
446 mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm,
447 *Spodoptera frugiperda*. *Plos One* 8: 0062268
- 448 Champagne DE, Koul O, Isman MB, Scudder GGE, Towers GHN (1992) Biological activity
449 of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry* 31: 377-394.
- 450 Chaudhary S, Kanwar RK, Sehgal A, Cahill DM Bar-row CJ, Sehgal R, Kanwar JR (2017)
451 Pró-Gress em *Azadirachta indica* biopesticidas baseados em substituindo os pesticidas
452 tóxicos sintéticos. *Frontiers in Plant Science*, 8, 610.
- 453 Cruz I, Figueiredo MLC, Silva RB, Silva IF, Paula CS, Foster JE (2012) Using sex
454 pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall

- 455 armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in maize.
456 International Journal of Pest Management 58:83-90
- 457 Diez-Rodriguez GI, Omoto C (2001) Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E.
458 Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. Neotropical Entomology 30: 311-
459 316
- 460 Duarte JP, Redaelli LR, Jahnke SM, Trapp S (2019) Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales:
461 Meliaceae) oil on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and adults.
462 Florida Entomologist 102: 408–412
- 463 Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Dos Santos AC, Omoto C (2014)
464 Resistência desenvolvida em campo ao milho Cry1F por *Spodoptera*
465 *frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Crop Protection 64: 150-158
- 466 Fatoreto JC, Michel AP, Silva Filho MC, Silva N (2017) Adaptive potential of fall
467 armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. Journal of
468 Integrate Pest Management 8:1-10.
- 469 Forim MR, Matos AP, Silva MFGF, Cass QB, Vieira PC, Fernandes JB (2010) Uso de
470 CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: Reprodutibilidade da
471 ação inseticida. Química Nova 33: 1082-1087
- 472 Gladenucci J, Marasca I, Permanbuco Filho JCA, Bonfim FPG, Bueno RCOF (2020)
473 Selectivity and sublethal effects of botanical extracts to pupae of *Trichogramma*
474 *pretiosum* Riley 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Journal of Experimental
475 Agriculture International 42:136-146
- 476 Godfrey CRA (1994) Agrochemical from Natural Products, Marcel Dekker Inc., New York.
- 477 Gonçalves-Gervásio RCR, Vendramim JD (2004) Modo de ação de extratos de meliáceas
478 sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). Arquivos do Instituto
479 Biológico 71: 215-220

- 480 Greene GL, Lepla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and
481 artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69: 488-497
- 482 Huang, F (2020) Resistance of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to transgenic
483 *Bacillus thuringiensis* Cry1F corn in the America: lessons and implications for Bt corn
484 IRM in China. *Journal of Insect Science*, no prelo, doi:10.1111/1744- 7917.12826
- 485 ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (2018) Global
486 Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech crops continue to help
487 meet the challenges of increased population and climate change. ISAAA Brief No. 54,
488 Executive Summary. ISAAA: Ithaca, NY.
- 489 Jones HBC (2014) Quantifying dispersal in British noctuid moths. D.Phil. Thesis. University
490 of York, York, United Kingdom.
- 491 Kamaraj C, Gandhi PR, Elango G, Karthi S, Chung IM, Rajakumar G (2018) Novel and
492 environmental friendly approach; Impact of Neem (*Azadirachta indica*) gum nano
493 formulation (NGNF) on *Helicoverpa armigera* (Hub.) and *Spodoptera litura*
494 (Fab.).*International Journal of Biological Macromolecules* 107: 59-69
- 495 Kraus W (1995) Biologically active ingredients. In: Schmutterer H (Ed.). *The neem tree:*
496 *source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry*
497 *and other purposes.* Weinheim: VCH:35-88
- 498 Lima MPL, Oliveira JV, Gondim Jr MGC, Marques EJ, Correia AA (2010) Bioatividade de
499 formulações de NIM (*Azadirachta indica* A. Juss, 1797) e de *Bacillus thuringiensis*
500 subsp. *aizawai* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera:
501 Noctuidae). *Ciência e Agrotecnologia* 34: 1381–1389
- 502 Lira ACS, Nascimento ARB, Silveira AAC, Almeida RP (2011) Parasitismo de
503 *Trichogramma pretiosum* em ovos do curuquerê-do-algodoeiro previamente tratados
504 com nim. 8º Congresso Brasileiro de Algodão & I Cotton Expo São Paulo, SP

- 505 Montezano DG, Specht A, Sosa Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Moraess
506 PSV, Peterson JÁ, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:
507 Noctuidae) in the Americas. *African Entomology* 26:286-300
- 508 Mordue (Luntz) AJ, Blackwell A (1993) Azadirachtin: an update. *Journal of Insect*
509 *Physiology* 39: 903–924
- 510 Mordue (Luntz) AJ, Nisbet AJ (2000) Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its
511 action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29: 615–632.
- 512 Morandi Filho WJ, Botton M, Grützmacher AD, Giolo FP, Manzoni CG (2006) Ação de
513 produtos naturais sobre a sobrevivência de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick)
514 (Lepidoptera: Tortricidae) e seletividade de inseticidas utilizados na produção orgânica
515 de videira sobre *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae).
516 *Ciência Rural* 36: 1072-1078
- 517 Mordue (Luntz) AJ (2004) Present concepts of the mode of action of azadirachtin from neem.
518 *New Millennium*: 229–242
- 519 Moscardi F, Bueno AF, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffmann-campo CB, Pomari AF, Corso
520 IC, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-campo
521 CB, Corrêa-ferreira BS, Moscardi F(Eds.). *Soja: manejo integrado de insetos e outros*
522 *artrópodes-praga*. Brasília: Embrapa :213-334.
- 523 Nascimento ARB, Farias JR, Bernardi D, Horikoshi R, Omoto C (2016) Genetic basis of
524 *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis
525 inhibitor lufenuron. *Pest Management Science* 72: 810–815
- 526 Nelder JA, Wedderburn RWM (1972) Generalized Linear Models. *Journal of the Royal*
527 *Statistical Society Series A (General)*, 135: 370-384.
- 528 Nicoletti M, Murugan K, Canale A, Benelli G (2016) Neem-borne molecules as eco-friendly
529 control tools against mosquito vectors of economic importance. *Current Organic*
530 *Chemistry* 20: 2681-2689

- 531 Nijhout HF, Riddiford LM, Mirth C, Shingleton AW, Suzuki Y, Callier V (2014) The
532 developmental control of size in insects. *WIREs Developmental Biology* 3:113–134.
- 533 Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA,
534 Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by
535 *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science* 72:1727-1736.
- 536 Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C (2018) Inheritance
537 and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to
538 spinosad in Brazil. *Pest Management Science* 74: 1441-1448
- 539 Pavlova AK, Dahlmann M, Hauck M, Reineke A (2017) Laboratory bioassays with tree
540 different substrates to test the efficacy of insecticides against various stages of
541 *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Insect Science* 17:8
- 542 Prates HT, Viana PA, Waquil JM (2003) Atividade de extrato aquoso de Nim (*Azadirachta*
543 *indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 8:437-439
- 544 Pomari AF, Bueno ADF, Bueno RCOF, Menezes ADO (2012) Biological characteristics and
545 thermal requirements of the biological control agent *Telenomus remus* (Hymenoptera:
546 Platygasteridae) reared on eggs of different species of the genus *Spodoptera*
547 (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America* 105: 72–81
- 548 R Development Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical
549 Computing. Vienna: R foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>
- 550 Reddy GVP, Antwi FB (2016) Toxicidade de inseticidas naturais em larvas de lagarta do
551 cartucho, *Dargida diffusa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Toxicology*
552 *Pharmacology* 42: 156-62
- 553 Ribeiro LP, Klock ALS, Nesi CN, Luczkiewicz FRG, Travi MRL, Rech AF (2020)
554 Adaptability and Comparative Biology of Fall Armyworm on Maize and Perennial
555 Forage Species and Relation with Chemical-Bromatological Composition. *Neotropical*
556 *Entomology* 49: 758-767

- 557 Rodríguez HC, Vendramin JD (1996) Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae
558 en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Manejo Integrado de Plagas, 42:
559 14-22
- 560 SAS Institute INC (2000) Statistical analysis system: getting started with the SAS learning.
561 SAS Institute, Cary, NC.
- 562 Silva DM, Bueno AF, Andrade K, Stecca CS, Neves PMOJ, Moscardi F (2016) Selectivity of
563 organic compounds to the egg parasitoid *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera:
564 Platygastridae). Ciências Agrárias 37: 55-66
- 565 Specht A, Montezano DG, Sosa-Gómez DR, Moraes PSV, Roque-Specht VF, Barros NM
566 (2015) Reproductive potential of *Spodoptera eridania* (Stoll) (Lepidoptera:Noctuidae)
567 in the laboratory: Effect of multiple couples and the size. Brazilian Journal of Biology
568 76: 526-230
- 569 Storer NP, Thompson GD, Head GP (2012) Application of pyramided traits in insect
570 resistance management for Bt crops. GM Crops & Food 3:154-162
- 571 Verkerk RHJ, Wright DJ (1993) Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic
572 azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. Pesticide Science 37: 83–91.
- 573 Viegas Jr C (2003) Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle
574 químico de insetos. Química Nova 26: 390-400.
- 575
- 576
- 577
- 578
- 579

580 **Tabela 1.** Inseticidas botânicos e sintéticos avaliados sobre a lagartas de *Spodoptera frugiperda* em bioensaio de incorporação em dieta
 581 artificial.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Dose ^a (p.c.)	Grupo químico	Fabricante
Azadiractina	Azamax [®]	12 g/L	Tetranortriterpenóide	Adaptar
Azadiractina	Azact CE [®]	2,4 g/L	Tetranortriterpenóide	Lacsa Company
Azadiractina	Fitoneem [®]	0,85g/L	Tetranortriterpenóide	Dalneem
Azadiractina	Agroneem [®]	0,85g/L	Tetranortriterpenóide	Agrovant
Clorraniliprole	Premio [®]	200 g/L	Diamidas antranílicas	FMC Química do Brasil

582 ^aDose: g ou mL of p.c. (produto comercial) 100 L⁻¹ de água.

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594 **Tabela 2.** Valores de exatidão obtidos para os padrões em três níveis de
595 concentração.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão (%)	
	Média ^a	CV
0,060	111,00	4,34
0,80	85,20	11,80
1,6	82,90	16,30

596 CV = coeficiente de variação em porcentagem;
597 ^a = média de cinco repetições.

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617 **Tabela 3.** Quantificação do teor de azadiractina em quatro formulações comerciais à base de
 618 limonoides registradas no Brasil.

Amostras	Concentração (média ± CV)	
	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(g kg^{-1})
Azamax [®]	99,00 ± 10,70	3,94 ± 9,86
Azact CE [®]	2,50 ± 3,46	0,0976 ± 5,93
Agroneem [®]	9,29 ± 11,10	0,358 ± 9,19
Fitoneem [®]	6,50 ± 4,41	0,254 ± 1,92

619 CV = coeficiente de variação em porcentagem;

620 ^a = média de três repetições.

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642 **Tabela 4.** Médias (\pm EP) da mortalidade (%) e peso larval (mg) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* no grupo controle e expostas a diferentes
 643 bioinseticidas comerciais à base de derivados de limonoides (nim) em condições de laboratório (bioensaio de ingestão), na concentração diagnóstica de
 644 5000 mg kg⁻¹.

Tratamentos	Tempo de exposição (h) ¹							Peso larval (mg) ²
	24	48	72	96	120	144	168	
Controle (água)	1,04 \pm 1,04 b	1,04 \pm 1,04 c	1,04 \pm 1,04 d	2,08 \pm 1,32 d	3,12 \pm 2,13 d	4,17 \pm 2,63 d	7,29 \pm 1,92 c	39,38 \pm 4,20 a
Premio [®]	35,42 \pm 8,64 a	56,25 \pm 10,21 a	65,62 \pm 9,78 a	77,08 \pm 5,27 a	91,67 \pm 3,09 a	95,83 \pm 2,63 a	98,96 \pm 1,04 a	0,6 (1)*
Agroneem [®]	7,51 \pm 4,94 ab	17,81 \pm 5,60 bc	29,99 \pm 5,83 bc	45,77 \pm 6,27 bc	52,65 \pm 5,82 bc	58,13 \pm 7,41 bc	70,80 \pm 6,23 b	0,94 \pm 0,06 b
Fitoneem [®]	7,80 \pm 3,13 ab	18,28 \pm 5,75 bc	24,68 \pm 6,03 cd	31,15 \pm 4,43 c	35,73 \pm 6,14 c	41,34 \pm 6,11 c	47,81 \pm 5,48 c	0,68 \pm 0,07 b
Azamax [®]	6,78 \pm 2,75 b	30,05 \pm 5,87 ab	53,04 \pm 6,27 ab	63,63 \pm 7,32 ab	73,22 \pm 6,73 ab	73,22 \pm 6,73 b	75,30 \pm 5,74 b	1,15 \pm 0,18 b
Azact CE [®]	5,28 \pm 4,09 b	25,56 \pm 3,49 abc	33,68 \pm 3,54 bc	37,92 \pm 4,04 bc	45,00 \pm 5,07 c	51,04 \pm 7,07 bc	58,19 \pm 6,26 bc	1,06 \pm 0,09 b
F	5,5242	9,2482	13,948	25,922	31,478	26,233	37,56	83,397
gl	5, 30	5, 30	5, 30	5, 30	5, 30	5, 30	5, 30	4, 25
Valor de p	0,0010	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

645 ¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc*
 646 de Tukey, $p < 0,05$);

647 ¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição Gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey,
 648 $p < 0,05$);

649 * Dado não analisado devido a pequena unidade amostral. O valor entre parêntesis indica o número de lagartas sobreviventes.

650

651

652

653 **Tabela 5.** Estimativa das CL₂₅, CL₅₀ e CL₉₀ (mg kg⁻¹) bem como o intervalo de confiança de diferentes inseticidas sintéticos e orgânicos sobre neonatas
654 de *Spodoptera frugiperda* em bioensaio de incorporação de inseticida em dieta artificial.

Tratamentos	Coefficiente angular ± EP	CL ₂₅ (IC 95%) ^a	CL ₅₀ (IC 95%) ^a	CL ₉₀ (IC 95%) ^b	χ ^{2c}	g.l ^d
Azamax [®]	3,82 ± 0,81	271,3 (245,8 – 290,9) c	700,5 (654,3 – 847,8) c	2410,4 (2376,5 – 2539,4) c	7,5	6
Azact CE [®]	4,12 ± 0,25	102,4 (95,3 – 112,4) b	160,5 (138,4 – 172,9) b	610,3 (576,4 – 640,7) b	5,3	6
Fitoneem [®]	3,14 ± 0,79	125,2 (117,6 – 132,5) c	198,3 (175,3 – 211,9) b	678,4 (664,3 – 710,4) b	2,4	6
Agroneem [®]	3,97 ± 0,98	653,7 (612,4 – 693,2) d	1115,3 (1100,2 – 1170,3) d	4885,9 (4711,3 – 5035,3) d	6,7	6
Premio [®]	4,10 ± 0,24	11,2 (9,2 – 14,3) a	18,4 (16,7 – 21,3) a	210,3 (198,7 – 211,4) a	3,1	6

655

^{a,b} CL₂₅, CL₅₀, CL₅₀ e CL₉₀: Concentrações de inseticida (mg kg⁻¹) necessárias para matar 25, 50 ou 90% de lagartas de *S. frugiperda*, respectivamente (IC: intervalo de confiança com 95% de probabilidade de erro);

656

^cχ²: valor do qui-quadrado de Pearson;

657

^cP > 0.05 in goodness of fit.

658

^dg.l: graus de liberdade.

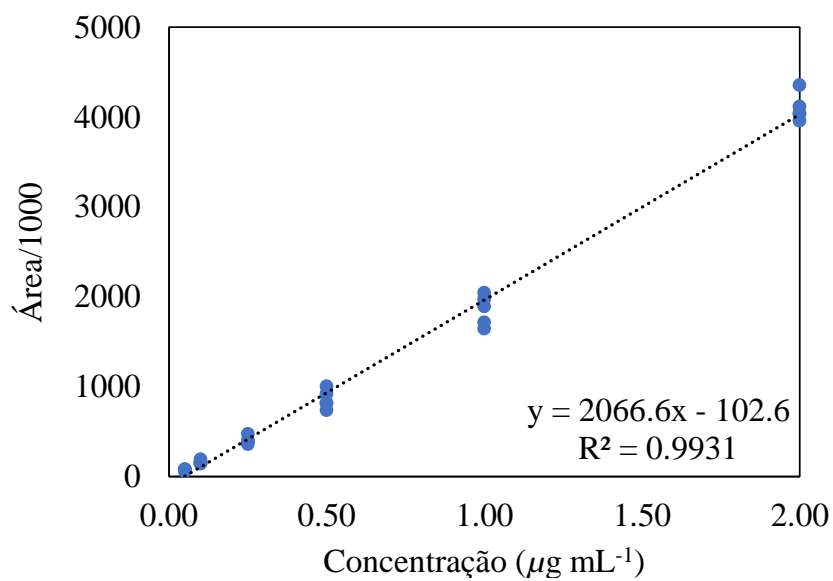
659

660 **Tabela 6.** Concentração efetiva (CE) que inibe o desenvolvimento de neonatas de *Spodoptera*
 661 *frugiperda* em bioensaio de incorporação de inseticidas em dieta artificial.

Tratamentos	CE ₅₀ (IC 95%) ⁽¹⁾	CE ₉₀ (IC 95%) ⁽²⁾
Azamax [®]	275,1 (250,2 – 309,6)	1225,0 (1007,0 – 1315,7)
Azact CE [®]	90,5 (82,4 – 97,9)	276,9 (244,3 – 290,5)
Agroneem [®]	285,4 (270,8 – 301,3)	1105,3 (911,8 – 1174,3)
Fitoneem [®]	110,7 (92,9 – 134,8)	306,3 (300,5 – 315,9)
Premio [®]	5,6 (4,2 – 7,1)	72,3 (67,5 – 78,2)

662 ⁽¹⁾CE₅₀: concentração efetiva de produto (mg kg⁻¹) ou (ng/cm² de dieta) que causa 50% de inibição de
 663 desenvolvimento larval no período de observação de 7 dias. Similarmente,

664 ⁽²⁾CE₉₀ é a concentração efetiva de produto requerida para inibir 90% do desenvolvimento larval;
 665
 666
 667
 668
 669
 670
 671
 672
 673
 674
 675
 676
 677
 678
 679
 680
 681
 682
 683
 684
 685
 686
 687
 688
 689
 690
 691
 692
 693
 694
 695
 696
 697
 698
 699
 700
 701
 702
 703
 704
 705
 706
 707



708
709 **Figura 1.** Representação da curva analítica preparada em metanol (concentrações de 0,010-
710 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para o padrão de azadiractina.

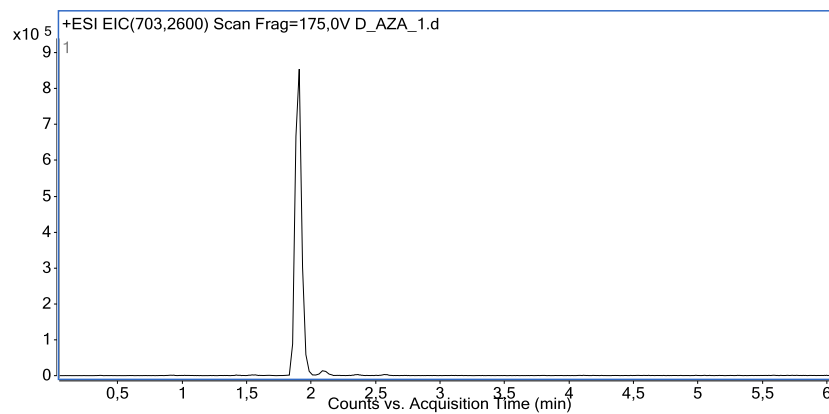
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748

749 **Anexo I:**

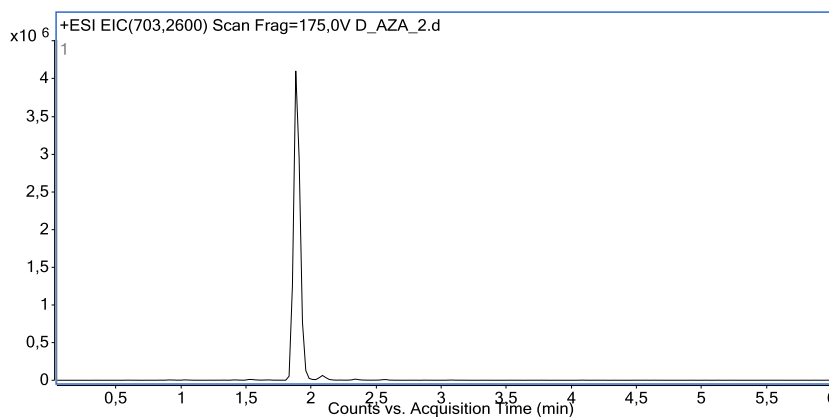
750

751 **SM – Figura 2.** Cromatograma da amostra do produto Azamax[®], analisado por meio de
752 cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).

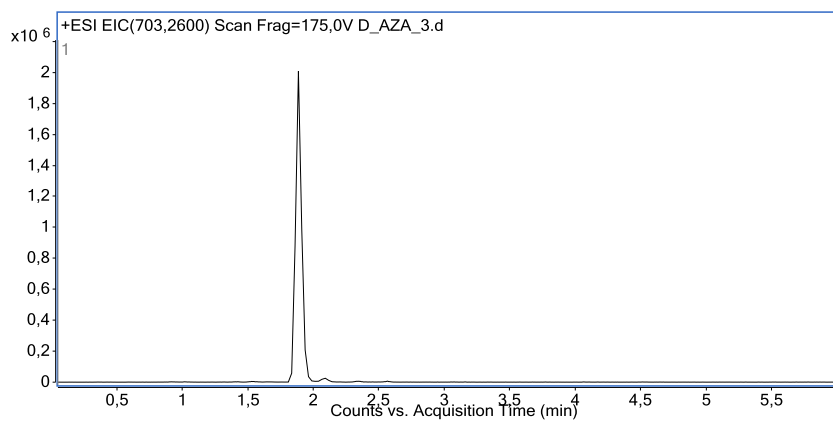
Réplica 1



Réplica 2



Réplica 3



753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

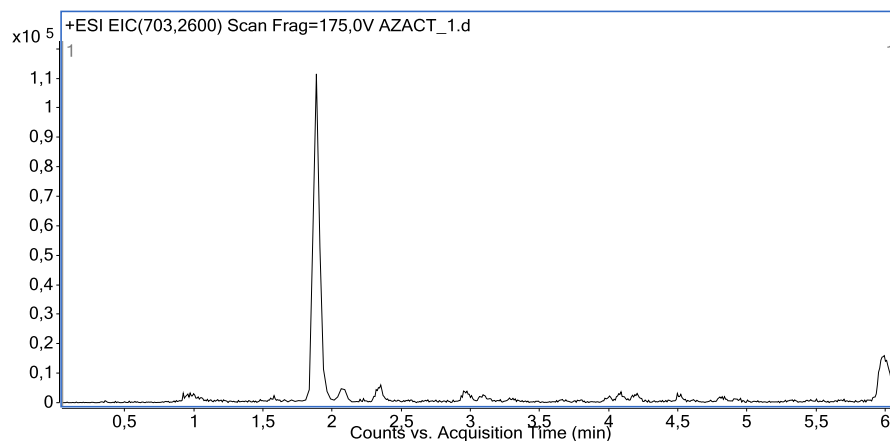
763

764

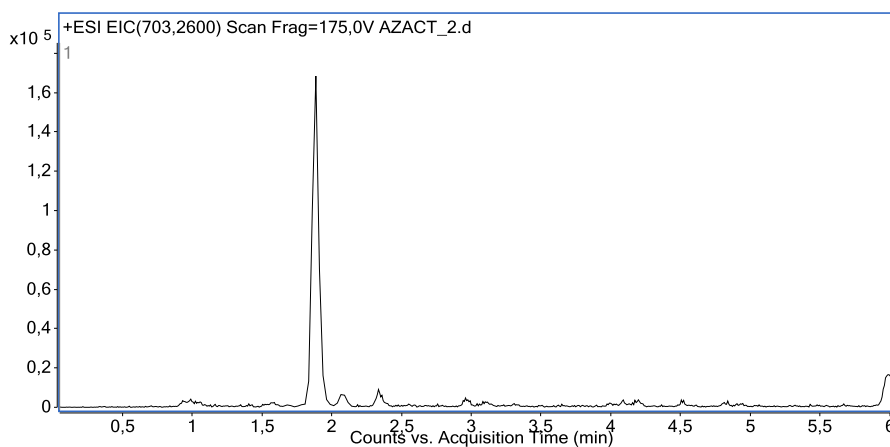
765

766 **SM – Figura 3.** Cromatograma da amostra do produto Azact[®], analisado por meio de
767 cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).

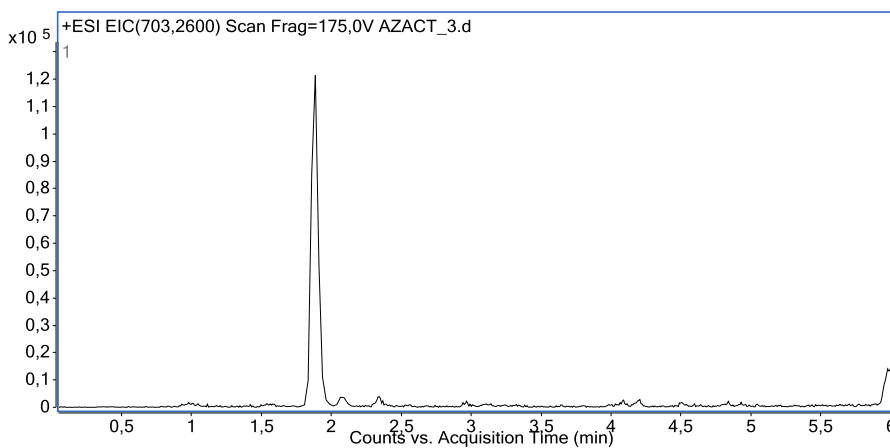
Réplica 1



Réplica 2



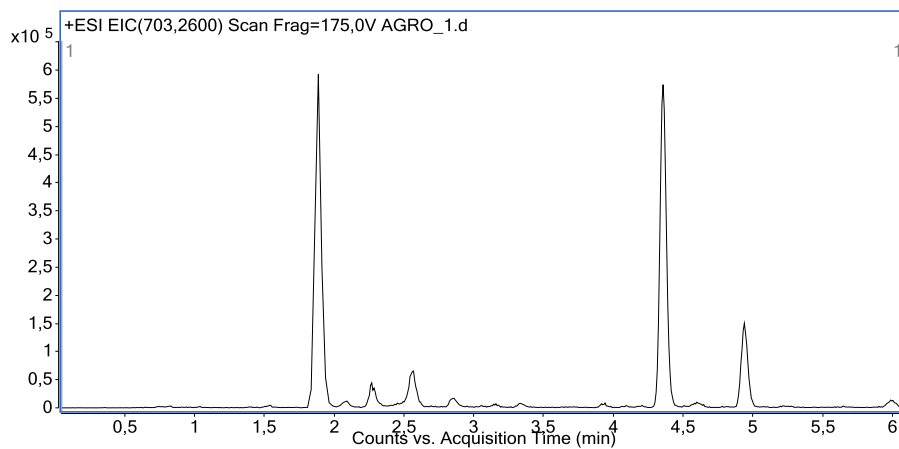
Réplica 3



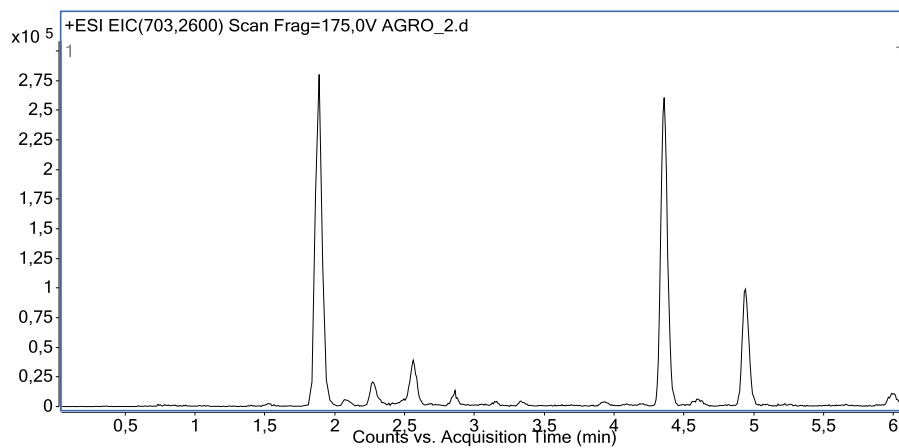
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779

780 **SM – Figura 4.** Cromatograma da amostra do produto Agroneem[®], analisado por meio de
781 cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).

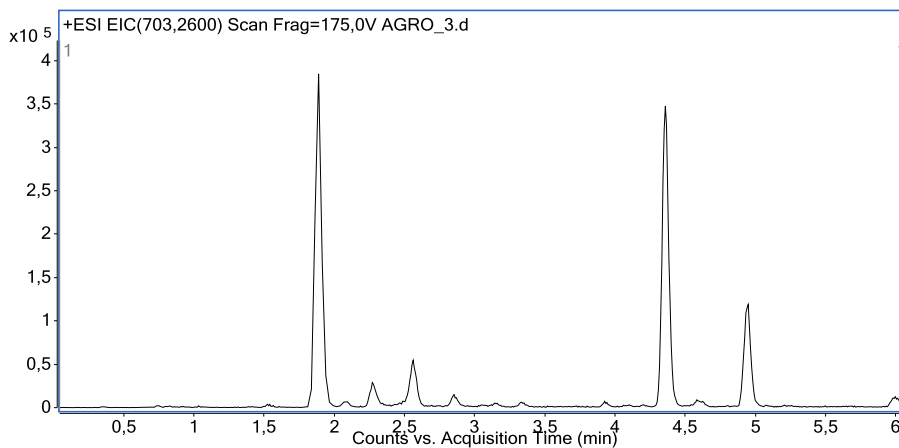
Réplica 1



Réplica 2



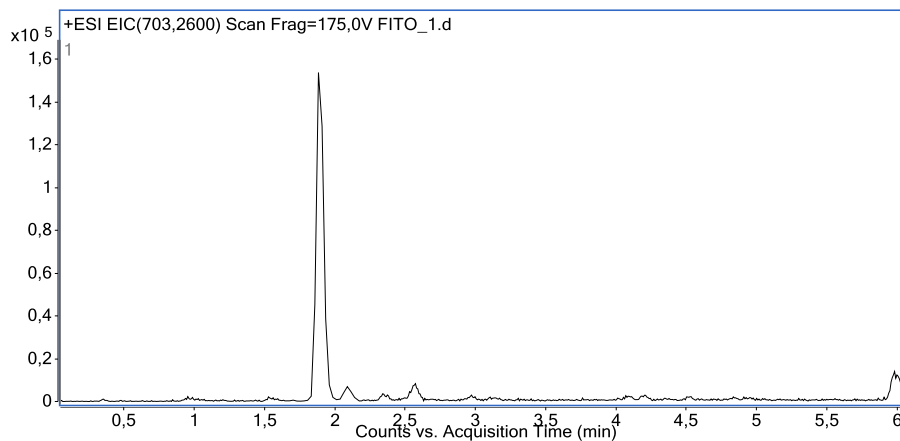
Réplica 3



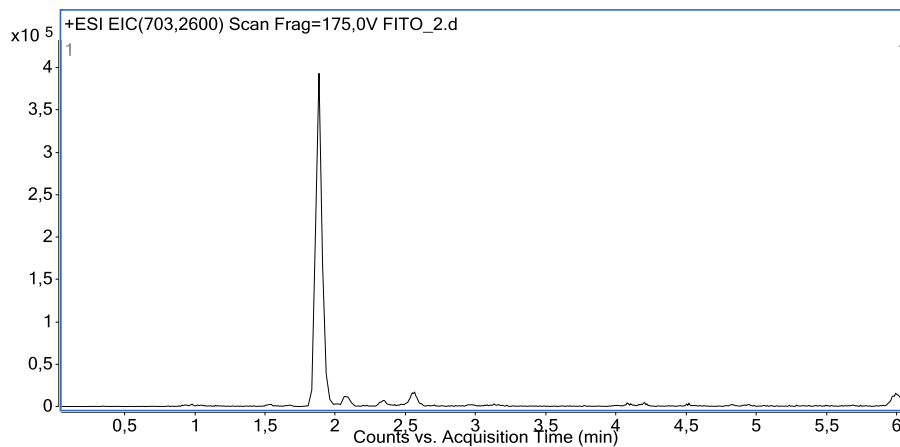
782
783
784
785
786
787
788
789

790 **SM – Figura 5.** Cromatograma da amostra do produto Fitoneem[®], analisado por meio de
791 cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).
792

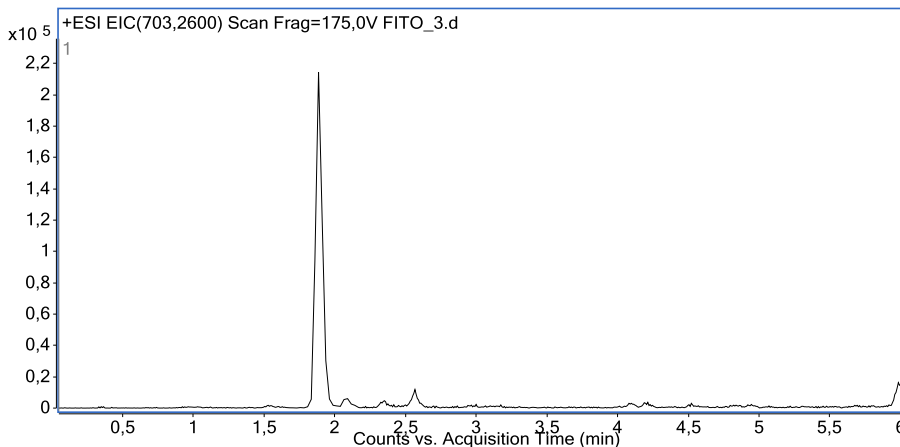
Réplica 1



Réplica 2



Réplica 3



793

794

795

796

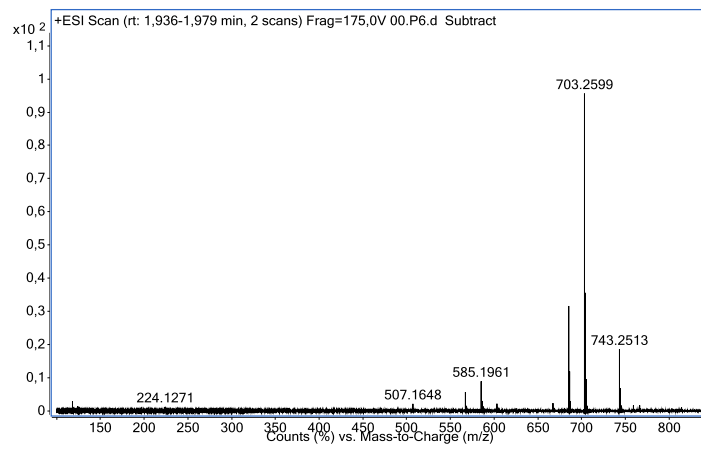
797

798

799 Anexo II

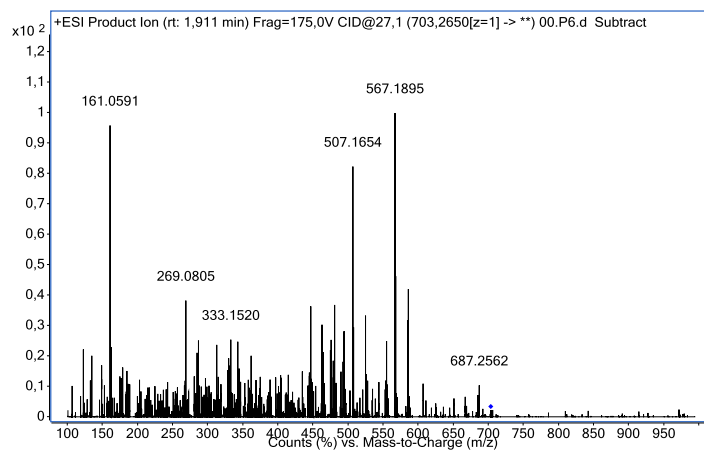
800 SM – Figura 6. Espectros de massas da azadiractina em modo *scan*.

801
802

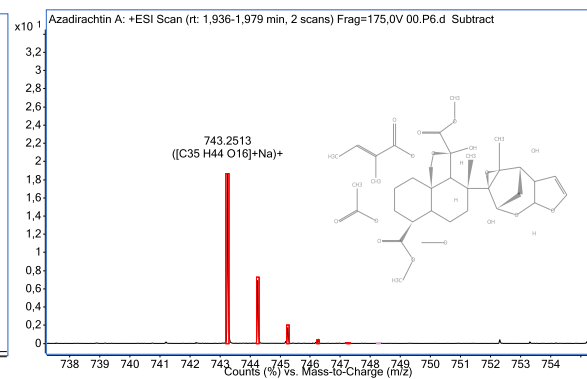
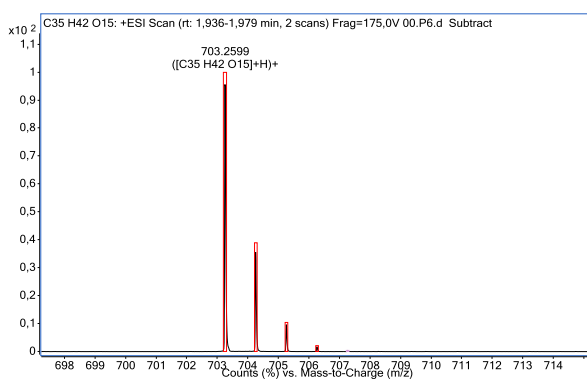


803

SM – Figura 7. Espectros de massas da azadiractina em modo *Target MS/MS*.



$[(M - H_2O) + H]^+$ com erro de -0.01 ppm.



$[M + Na]^+$ com erro de 1.59 ppm.

Artigo 2 - A ser submetido na revista Phytoparasitica
(Versão em português)

804 **Parâmetros biológicos e tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* sob**
805 **influência de concentrações subletais de reguladores de crescimento de origem botânica**
806 **e sintética**

807
808 L. N. Martins¹, F. C. S. Geisler¹, M. Rakes¹, M. B. Araújo¹, D. T. T. Amandio², L. P.
809 Ribeiro³, D. Bernardi^{1*}

810
811 ¹Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio
812 Grande do Sul, Brasil

813 ²Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (UFSC), Florianópolis,
814 Santa Catarina, Brasil

815 ³Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI),
816 Chapecó, Santa Catarina, Brasil

817

818 *Autor correspondente: CEP 96010-900, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, E-mail:
819 dbernardi2004@yahoo.com.br

820

821 **Contribuição dos autores**

822 LNM, FCSG, DTTA, LPR e DB planejaram e projetaram pesquisas, LNM E FCSG
823 conduziram experimentos, DB, MR, MBA e LPR conduziram as análises estatísticas. LNM,
824 DTTA, LPR e DB escreveram o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o
825 manuscrito.

826

827 **Agradecimentos**

828 Os autores agradecem a Universidade Federal de Pelotas por disponibilizar a infraestrutura e
829 equipamentos necessários para a realização deste estudo. Além disso, agradecem o a
830 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de

831 bolsa à primeira autora e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
832 (CNPq) pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa (Processos 305377/2019-1 e
833 304018/2019-8) para os dois últimos autores, respectivamente.

834

835 **Resumo** – A rápida evolução da resistência de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E.
836 Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) as principais táticas de controle e os desequilíbrios
837 ambientais advindos da utilização de inseticidas de amplo espectro tem motivado novos
838 estudos e novas abordagens. Dentro deste contexto, estratégias que visam o restabelecimento
839 do equilíbrio dos agroecossistemas são cada vez mais investigados. Diante disso, os
840 inseticidas reguladores de crescimento de insetos (IRCs) podem desempenhar um papel
841 importante no manejo de *S. frugiperda*, tanto aqueles de origem sintética como natural.
842 Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de concentrações subletais de
843 reguladores de crescimento de origem botânica e sintética sobre parâmetros biológicos e sobre
844 a tabela de vida de fertilidade de *S. frugiperda*, em dieta artificial. Em bioensaio de
845 incorporação em dieta artificial, todos os inseticidas à base de nim (Azamax[®], Agroneem[®],
846 Azact[®] e Fitoneem[®]) e de inseticidas reguladores de crescimento (Certero[®], Intrepid[®], Mach[®]
847 e Mimic[®]) na CL₂₅ ou CL₅₀ afetaram significativamente todos os parâmetros biológicos
848 avaliados na fase imatura e adulta de *S. frugiperda*. Ademais, dieta artificial com a CL₅₀ dos
849 produtos proporcionaram os maiores efeitos negativos no desenvolvimento da fase imatura em
850 relação a dieta contaminada com CL₂₅. Este fato, proporcionou para todos um menor peso
851 larval (mg), peso pupal (mg) e fecundidade total (número de ovos por fêmea) em insetos
852 alimentados em dieta artificial contendo CL₅₀. Os efeitos negativos ocasionados na fase larval
853 e adulta de *S. frugiperda* em dieta com CL₂₅ e CL₅₀ afetaram diretamente todos os parâmetros
854 da tabela de vida de fertilidade (T, R₀ e R_m) avaliados, prejudicando o crescimento
855 populacional da espécie. Frente aos resultados encontrados, fica evidente que os produtos
856 derivados de nim assim como os inseticidas reguladores de crescimento de origem sintética

857 ocasionam efeitos subletais em *S. frugiperda*. Este fato pode contribuir para as estratégias de
858 manejo integrado que visem manter as populações de *S. frugiperda* abaixo do nível de dano.

859

860 **Palavra-chave:** Lagarta-do-cartucho, azadiractina, benzoilureia, diacilhidrazina, efeitos
861 subletais.

862

863 1. Introdução

864 Atualmente, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797)
865 (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma das mais importantes pragas agrícolas nas
866 principais regiões produtoras de *commodities* do mundo (Bateman et al., 2018; Goergen et al.,
867 2016; Sun et al., 2021). Na paisagem agrícola brasileira, *S. frugiperda* destaca-se pelo seu
868 enorme potencial biótico, gerando aproximadamente oito gerações por ano, além da elevada
869 capacidade de dispersão e migração e polifagia, o que favorece sua ocorrência em diferentes
870 plantas hospedeiras de importância econômica (Chen et al., 2020).

871 No Brasil, as principais estratégias utilizadas para o manejo de *S. frugiperda* são a
872 aplicação de inseticidas químicos de diferentes grupos (p. ex.: piretroides, diamidas,
873 espinosinas, carbamatos e organofosforados, entre outros) (Burtet et al., 2017; Carvalho et al.,
874 2013) e plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus*
875 *thuringiensis* Berliner (*Bt*) (Bernardi et al., 2012; Marques et al., 2017; Yano et al., 2015). No
876 entanto, o uso inadequado dessas tecnologias tem contribuído para a rápida evolução da
877 resistência de *S. frugiperda*, resultando em falhas de controle consideráveis no campo, tanto
878 para os inseticidas sintéticos (Bolzan et al., 2019; Carvalho et al., 2013; Diez-Rodríguez &
879 Omoto, 2001; Nascimento et al., 2016; Okuma et al., 2018) quanto para os eventos *Bt*
880 (Bernardi et al., 2014b, 2016; Horikoshi et al., 2016a; Huang et al., 2014; Storer et al., 2012;
881 Vélez et al., 2013). Tal cenário tem motivado novos estudos visando o desenvolvimento de

882 novas abordagens e métodos alternativos para o manejo dessa espécie-praga em diferentes
883 sistemas de produção agrícola.

884 A utilização de produtos que apresentem baixa toxicidade a insetos benéficos e
885 organismos não alvo e de reduzido impacto ambiental tornam-se importantes estratégias a
886 serem incorporadas em um programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Dhadialla et al.,
887 1998; Lira et al., 2020; Tavares et al., 2010). Diante desse contexto, os inseticidas reguladores
888 de crescimento de insetos (IRCs) podem desempenhar um papel importante no manejo de *S.*
889 *frugiperda* (Toscano et al., 2012), tanto aqueles de origem sintética como natural.

890 Dentre os produtos de origem natural, os inseticidas botânicos tiveram seu mercado
891 expandido significativamente nos últimos anos (Isman & Seffrin, 2014), embora ainda
892 pequeno em comparação ao dos inseticidas sintéticos. Os inseticidas botânicos são produzidos
893 a partir de substâncias do metabolismo secundário vegetal (aleloquímicos), e apresentam, em
894 geral, um amplo espectro de ação sobre artrópodes-praga, podendo causar toxicidade letal ou
895 alterações comportamentais, como repelência e deterrência de alimentação e oviposição
896 (Bernardi et al., 2017; Geisler et al., 2019; Koul et al., 2008; Ribeiro et al., 2016; Tak &
897 Isman, 2017). Em adição, a rápida degradação desses compostos no ambiente
898 (fotodegradáveis) faz com que esses produtos sejam facilmente aceitos pela comunidade
899 como mais seguros e sustentáveis, passando a integrar cada vez mais os programas de MIP de
900 diferentes cultivos sob distintos sistemas agrícolas (Amoabeng et al., 2014; Isman, 2017),
901 incluído aqueles de base orgânica ou ecológica.

902 Entre os inseticidas botânicos mais conhecidos e difundidos destacam-se aqueles
903 produzidos à base de *Azadirachta indica* (Juss) (Meliaceae) que possuem como principal
904 ingrediente ativo o limonoide azadiractina (Amoabeng et al., 2019; Campos et al., 2016;
905 Isman, 2017). A azadiractina pode exercer ação antialimentar (atuando sobre os
906 quimiorreceptores do inseto) e repelente, além de interferir no desenvolvimento das glândulas
907 endócrinas que controlam a metamorfose dos insetos, comprometendo o processo da ecdise

908 (Mordue (Luntz) & Blackwell, 1993). Estudos de relação estrutura-atividade indicaram que a
909 porção acetal dihidrofurano é a principal parte da molécula da azadiractina responsável por
910 seu efeito antialimentar, enquanto que, a fração decalina é a responsável pela regulação do
911 crescimento dos insetos (Aldhous, 1992). Estudos têm demonstrado a toxicidade aguda letal
912 deste composto sobre artrópodes-praga de diferentes hábitos alimentares, como minadores
913 (larvas de moscas e de mariposas), sugadores (ácaros, tripes, pulgões e percevejos) e
914 mastigadores (lagartas e escarabeídeos) (Adhikari et al., 2020), inclusive sobre larvas e
915 adultos de *S. frugiperda* (Duarte et al., 2019). Porém, pouco se conhece em relação a
916 influência de diferentes formulações disponíveis no mercado brasileiro.

917 Além dos efeitos letais, os inseticidas à base de nim e os reguladores de crescimento
918 de origem sintética podem produzir efeitos subletais em determinadas concentrações, como o
919 aumento do período larval e pupal, redução do peso e viabilidade de pupas e aumento da
920 porcentagem de adultos com malformações (Duarte et al., 2019; Lima et al., 2010; Roel et al.,
921 2010). Esses efeitos podem influenciar diretamente a dinâmica populacional dos insetos nas
922 gerações futuras e favorecer as estratégias de manejo (Cabodevilla et al., 2011). Partindo
923 desse pressuposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de concentrações subletais
924 de reguladores de crescimento de origem botânica e sintética sobre parâmetros biológicos e
925 sobre a tabela de vida de fertilidade de *S. frugiperda*, sob condições laboratoriais controladas.

926

927 **2. Materiais e Métodos**

928 **2.1 Insetos testados**

929 Os espécimens utilizados nos ensaios foram oriundos de uma população de *S.*
930 *frugiperda* coletada em milho convencional (não-*Bt*) durante a safra 2012/2013 em Mogi
931 Mirim, São Paulo, Brasil (22°28'31"S e 46°54'21" W). Em laboratório, as lagartas foram
932 mantidas por mais de 25 gerações em dieta artificial à base de feijão branco (Yoki[®]), gérmen
933 de trigo (Walnon[®]) e levedura de cerveja (Biorigem[®]) (adaptado de Greene et al., 1976). Para

934 alimentação dos adultos, utilizou-se uma solução de mel a 10% (v/v) e os mesmos foram
935 acondicionadas em gaiolas cilíndricas de PVC (24,0 cm altura × 14,5 cm de diâmetro),
936 revestidas internamente com papel jornal para possibilitar a oviposição e fechadas na parte
937 superior com tecido voile.

938

939 **2.2 Produtos avaliados**

940 Informações sobre os produtos avaliados encontram-se descritos na Tabela 1. As
941 concentrações utilizadas foram às respectivas CL₂₅ e CL₅₀ (concentrações necessárias
942 para matar 25 e 50% das lagartas expostas, respectivamente) estimadas a partir das curvas
943 de concentração-resposta em bioensaios prévios.

944

945 **2.3 Bioensaios**

946 Para avaliação do efeito das concentrações subletais dos produtos sobre *S.*
947 *frugiperda*, utilizou-se bioensaio de incorporação em dieta artificial (*dietary exposure*
948 *bioassay*). Para isso, as concentrações previamente definidas foram adicionadas em dieta
949 artificial (Greene et al., 1976) quando a temperatura da dieta atingiu 45-50°C. A
950 incorporação foi realizada por um agitador de tubos do tipo Vortex por 30 segundos. Em
951 seguida, a dieta contendo os produtos incorporados foi distribuída em recipientes de vidro
952 (8,0 cm de altura × 2,4 cm de diâmetro, com área superficial de 64,84 cm²) contendo (4
953 mL de dieta/tubo) com auxílio de uma pipeta de dosificação repetida. Após a geleificação
954 e esfriamento da dieta, com auxílio de um pincel fino foi inoculado uma lagarta neonata
955 (< 24 h de idade) de *S. frugiperda* em cada tubo. Posteriormente, os tubos foram vedados
956 com algodão hidrofílico permitindo as trocas gasosas com o ambiente externo e mantidos
957 em sala climatizada (temperatura 25 ± 1°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotoperíodo
958 14:10 h luz:escuro). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 160
959 repetições por concentração, sendo 1 lagarta considerada 1 repetição) (*n* = 160).

960 Os parâmetros avaliados foram a duração e viabilidade da fase larval e período
961 ovo-adulto, peso larval aos 7 dias, peso de pupas com 24 h de idade, duração do período
962 de pré-oviposição, oviposição e fecundidade total. A duração e a viabilidade da fase
963 larval e do período ovo-adulto foram determinadas em observações diárias. A
964 fecundidade total foi avaliada a partir da formação de 20 casais de *S. frugiperda* por
965 tratamento, individualizados em gaiolas de PVC (23 cm altura × 10 cm de diâmetro),
966 revestidas internamente com papel jornal como substrato de oviposição. Diariamente,
967 contabilizou-se o número de ovos e registrou-se a mortalidade dos adultos. Para
968 determinação do período embrionário e viabilidade foram coletados os ovos da segunda
969 postura de cada casal, os quais foram acondicionados em placa de Petri (12 cm de
970 diâmetro × 1,5 cm de altura) com um disco de papel filtro umedecido com água destilada,
971 sendo fechados na parte lateral com filme plástico. As posturas foram observadas
972 diariamente, registrando-se o número de lagartas eclodidas.

973

974 **2.4 Análise estatística**

975 Os dados de duração e viabilidade da fase larval e do ciclo biológico (ovo a adulto),
976 do peso larval e pupal, do período de oviposição e da fecundidade total foram submetidos ao
977 teste de normalidade de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) e teste de homocedasticidade
978 de Hartley e Bartlett (Bartlett, 1937) para avaliação das pressuposições do modelo com
979 distribuição normal. Posteriormente, as médias foram submetidas à análise de variância
980 (ANOVA) e, quando houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste F ($P \leq$
981 0,05), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Todas essas análises foram
982 realizadas utilizando-se o pacote SAS GLM (SAS Institute, 2000). Os parâmetros da tabela
983 de vida de fertilidade, tais como o intervalo entre gerações (T), a taxa líquida de reprodução
984 (R_0) e a taxa intrínseca de crescimento (r_m) foram estimados pelo método Jackknife usando o
985 software Lifetable.SAS (Maia et al., 2000), sendo as médias comparadas pelo teste t bilateral

986 (P ≤ 0,05) com o software SAS[®] (SAS Institute, 2000). As diferenças entre os tratamentos
987 foram avaliadas a um nível de significância de $\alpha = 5\%$.

988

989 **3. Resultados**

990 A incorporação de concentrações subletais correspondente a CL₂₅ ou CL₅₀ dos
991 inseticidas à base de nim e de inseticidas reguladores de crescimento de origem sintética em
992 dieta artificial acarretou em um aumento significativo na duração da fase larval e do ciclo
993 biológico (ovo a adultos) de *S. frugiperda* em comparação ao controle negativo (somente
994 dieta) (Figura 1 A e B). O inseticida botânico Azamax[®] proporcionou a maior duração do
995 período larval e do ciclo biológico (ovo a adulto) em relação a todos os demais tratamentos,
996 independentemente da concentração empregada (CL₂₅ ou CL₅₀) (Figura 1A). Entretanto, os
997 inseticidas à base de óleo bruto de nim (Agroneem[®], Azact[®] e Fitoneem[®]) apresentaram um
998 menor período de desenvolvimento larval (~ 24 dias) e do ciclo biológico (ovo a adulto) (≈ 46
999 dias) em relação as lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contaminadas
1000 com inseticidas reguladores de crescimento de origem sintética (Certero[®], Intrepid[®], Mach[®] e
1001 Mimic[®]), que apresentaram uma duração larval de ~ 29 dias e ciclo biológico de 51 dias
1002 (Figura 1A). Por sua vez, lagartas alimentadas em dieta sem inseticida (tratamento controle)
1003 apresentaram um período de desenvolvimento de 14 dias e de ciclo biológico de 31 dias
1004 (Figura 1A). Ao avaliar as concentrações (CL₂₅ e CL₅₀) para cada inseticida, foi verificado
1005 pelo teste t que houve um aumento significativo no período de desenvolvimento larval (Figura
1006 1A) e do ciclo biológico (ovo a adulto) (Figura 1B) de *S. frugiperda* quando alimentadas em
1007 dieta artificial contaminadas com inseticidas na CL₅₀ em relação aos inseticidas.

1008 Todos os inseticidas reguladores de crescimento, tanto de origem botânica quanto
1009 sintética afetaram significativamente a viabilidade larval e a viabilidade do período ovo-
1010 adulto (Figura 2A e B) As menores viabilidades foram observadas em dieta artificial
1011 contaminadas com inseticidas reguladores de crescimento de origem sintética (Figura 2 A e

1012 B). Com base no teste t dentro de cada inseticida nas concentrações CL₂₅ e CL₅₀, lagartas
1013 alimentadas com dieta contendo a CL₂₅ dos produtos apresentaram uma maior viabilidade
1014 larval e do ciclo biológico em relação a lagartas alimentadas com dieta contendo CL₅₀.

1015 O peso de lagarta também foi significativamente afetado pela presença de produtos à
1016 base de nim ou reguladores de crescimento de origem sintética adicionados na dieta artificial,
1017 sendo os menores pesos larvais observados nos tratamentos constituídos pelos produtos de
1018 origem sintética, sem haver diferença significativa entre eles (Figura 3A). Além disso, o peso
1019 de pupas também foi significativamente afetado por todos os tratamentos testados sem,
1020 contudo, haver diferença entre eles (Figura 3B). Com base no teste t, lagartas de *S. frugiperda*
1021 e, conseqüentemente, as pupas provenientes de dieta artificial contendo inseticidas na CL₂₅
1022 foram significativamente mais pesadas em relação a lagartas expostas a dieta artificial
1023 contaminadas com a CL₅₀ dos respectivos produtos (Figura 3 A e 3B). Estes fatores
1024 desencadearam uma menor fecundidade total de fêmeas de *S. frugiperda* provenientes de dieta
1025 artificial contaminadas com produtos à base de nim e reguladores de crescimento de origem
1026 sintética, independentemente da concentração utilizada (CL₂₅ ou CL₅₀) (Figura 4).

1027 Todas as lagartas mantidas em dieta artificial contendo inseticidas botânicos ou
1028 reguladores de crescimento de origem sintética tiveram os parâmetros da tabela de vida de
1029 fertilidade significativamente afetadas em relação a lagartas alimentadas em dieta artificial
1030 sem a presença de inseticidas (Tabela 2). O Azamax[®] na CL₂₅ aumentou consideravelmente a
1031 duração da geração, no entanto, o mesmo foi o que apresentou uma menor razão de aumento
1032 da população, o mesmo ocorreu na CL₅₀. Já os produtos Mimic[®] e o Certero[®] na CL₂₅ foram
1033 os produtos que apresentaram significativa redução no valor de R_o em relação aos demais
1034 tratamentos, logo, na CL₅₀ podemos destacar o Certero[®] e o Intrepid[®] (Tabela 2) com uma
1035 menor taxa líquida de reprodução.

1036

1037 **4. Discussão**

1038 Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram os potenciais efeitos de
1039 inseticidas reguladores de crescimento de origem botânica e sintética sobre *S. frugiperda*,
1040 incluindo a redução da viabilidade das fases de desenvolvimento e alongando o ciclo
1041 biológico (ovo-adulto). Em hipótese, as lagartas do grupo controle seguiram sua alimentação
1042 continua sem interferência dos compostos químicos tóxicos, concluindo seu ciclo
1043 naturalmente. No entanto, as lagartas expostas aos produtos tiveram influência da azadiractina
1044 presente nos derivados de nim e interferindo na síntese de quitina (lufenuron) (Mulder &
1045 Gijswijt, 1973) ou como agonistas de receptores de ecdisteroides (methoxifenoazida) (Palli &
1046 Retnakaran et al., 2001) nos inseticidas reguladores de crescimento. Segundo Chapman
1047 (2013), a qualidade e a quantidade de dieta consumida pelo inseto afeta diretamente a duração
1048 do seu ciclo e pode afetar seu desenvolvimento, reprodução e longevidade.

1049 Quanto aos efeitos múltiplos, os produtos derivados de nim possuem múltiplas
1050 capacidades de ocasionar a morte nos insetos, dentre elas os compostos que atuam
1051 diretamente na produção e liberação de ecdisteroides na hemolinfa, causando um atraso na
1052 ecdise e anomalias no processo, aumentando a mortalidade, bloqueando as células
1053 fagoestimulantes, o que leva a inibição da alimentação, retardando o desenvolvimento (Duarte
1054 et al., 2019; Mordue (Luntz), 2004). Já os efeitos causados pelos inseticidas reguladores de
1055 crescimento de origem sintética são múltiplos, alguns baseiam-se na interrupção da formação
1056 de estruturas compostas por quitina, que por consequência, corrobora com uma deposição
1057 endocuticular anormal e processo de muda abortiva (Mulder & Gijswijt, 1973). Dentre eles, o
1058 lufenuron atua especificamente na cutícula do inseto (Merzendorfer, 2006), já outros como a
1059 metoxifenoazida atua como agonista de receptores de ecdisteroides (Carlson et al., 2001) e o
1060 triflumuron é um inibidor da síntese de quitina (Who, 2006).

1061 Com relação ao inseticida Azamax[®], o mesmo se sobressaiu aos demais produtos
1062 derivados de nim, pois apresenta dois limonoides purificados em sua composição
1063 (azadiractina e 3-tigloilazadiractol) e maior teor do composto ativo majoritário. Já os demais

1064 produtos de nim utilizados, apresentam uma riqueza grande de compostos minoritários, que
1065 podem atuar sinergisticamente.

1066 A partir da incorporação dos produtos na dieta foi possível observar uma redução no
1067 peso de larvas e pupas em todos os produtos testados (Campos et al., 2016) e ao
1068 diflubenzuron e methoprene que afetam o desenvolvimento do inseto. A redução da
1069 alimentação afeta diretamente o peso crítico dos organismos expostos (Nijhout et al., 2014).
1070 Fato este reportado nos estudos de Duarte et al. (2019) e que corroboram os resultados
1071 encontrados também no presente estudo. Roel et al. (2010) reporta que durante o processo de
1072 metamorfose, o inseto não tem aproveitamento por completo dos nutrientes oriundos da dieta,
1073 logo a lagarta não ganha peso antes que os hormônios juvenis se esgotem e os níveis de
1074 ecdisteroides aumentem e, por consequência, obtêm-se pupas menores. No entanto, Lima et
1075 al. (2010) não observaram uma redução no peso das pupas, fato este que deve estar
1076 relacionado ao menor tempo de exposição (48 h) das lagartas aos derivados de nim no
1077 referido estudo.

1078 As reservas nutricionais em níveis baixos aumentam a duração do período pupal,
1079 visto que os nutrientes dão subsídios para que a metamorfose ocorra de forma satisfatória,
1080 influenciando diretamente na reprodução e sobrevivência dos indivíduos (Merkey et al.,
1081 2011). Tavares et al. (2010) reportam um aumento da mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*
1082 expostas ao nim e ao lufenuron em comparação a extratos pirolenhoso. A assimilação dos
1083 nutrientes durante o período larval afeta diretamente a fecundidade (Arrese & Soulages,
1084 2010). No presente estudo, foi observado uma redução da fecundidade total significativa ao
1085 comparar o grupo controle com os demais tratamentos. Pesquisas envolvendo o gênero
1086 *Spodoptera* encontram associação entre pupas de tamanho reduzido os índices de fecundidade
1087 (Duarte et al., 2019; Spech et al., 2015), reduzindo a longevidade (Lima et al., 2010; Pineda et
1088 al., 2009) podendo ter um impacto significativo no campo na redução do tempo de
1089 acasalamento (Duarte et al., 2019). No nosso estudo, observamos que a duração de cada

1090 geração de todos os inseticidas foi maior que em comparação ao grupo controle. No entanto,
1091 ressaltamos que a taxa líquida de reprodução foi menor, ocasionando assim, uma prole menor.

1092 Lagartas de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com
1093 metoxifenoazida e lufenuron tiveram uma redução no peso larval e pupal, um prolongamento
1094 do desenvolvimento larval e pupal e uma redução significativa na fertilidade, corroborando
1095 com os resultados obtidos também no presente estudo (Chein et al., 2019). Da mesma forma,
1096 diversos autores reportam a redução do peso pupal e aumento do tempo de desenvolvimento
1097 larval e pupal para lepidópteros expostas a hexaflumuron, diflubenzuron e flufenoxuron (El-
1098 Ghar et al., 2010; Mahmoudvand et al., 2011; Zhu et al., 2012). Tais resultados demonstram
1099 que lagartas de *S. frugiperda* expostas aos inseticidas à base de nim ou reguladores de
1100 crescimento de origem sintética apresentam uma elevada supressão populacional da praga ao
1101 longo do tempo.

1102 Os resultados indicam que os produtos derivados de nim assim como os inseticidas
1103 reguladores de crescimento de origem sintética ocasionam efeitos subletais em *S. frugiperda*,
1104 reduzindo sua capacidade de reprodução, contribuindo para as estratégias de manejo integrado
1105 que visem manter as populações abaixo do nível de dano.

1106

1107 **Conflito de interesse:** os autores declaram que o trabalho não tem conflito de interesse

1108

1109 **Referências**

1110

- 1111 Adhikari, K., Bhandari, S., Niraula, D., & Shrestha, J (2020). Use of neem (*Azadirachta*
1112 *indica* A. Juss) as a biopesticide in agriculture: A review. *Journal of Agriculture and*
1113 *Applied Biology* 2, 100-117
- 1114 Aldhous, P (1992). Neem chemical: The pieces fall in place. *Science* 258, 893-893.

- 1115 Amoabeng, BW., Gurr, GM., Gitau, CW., & Stevenson, PC (2014). Cost:benefit analysis of
1116 botanical insecticide use in cabbage: Implications for smallholder farmers in developing
1117 countries. *Crop Protection* 57, 71–76.
- 1118 Arrese, EL., & Soulages, JL (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation.
1119 *Annual Review of Entomology* 5, 207–225.
- 1120 Bartlett, MS (1937). Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal*
1121 *Society of London - Series A*, 160, 268-282.
- 1122 Bateman, ML., Day, RK., Luke, B., Edgington, S.; Kuhlmann, U., & Cock, MJW (2018).
1123 Assessment of potential biopesticide options for managing fall armyworm (*Spodoptera*
1124 *frugiperda*) in Africa. *Journal of Applied Entomology*, 142, 805–819.
- 1125 Bernardi, O., Malvestiti, GS., Dourado, PM., Oliveira, WS., Martinelli, S., Berger, GU.,
1126 Head, GP., & Omoto, C (2012). Assessment of the high-dose concept and level of control
1127 provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and
1128 *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Management Science*, 68,
1129 1083-1091
- 1130 Bernardi, O., Sorgatto, RJ., Barbosa, AD., Domingues, FA., Dourado, PM., Carvalho, RA.,
1131 Martinelli, S., Head, GP., & Omoto, C (2014b). Low susceptibility of *Spodoptera*
1132 *cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to
1133 genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. *Crop Protection*, 58, 33-40.
- 1134 Bernardi, O., Bernardi, D., Horikoshi, RJ., Okuma, DM., Miraldo, LL., Faretto, J.,
1135 Medeiros, FCL., Burdc, T., & Omoto, C (2016). Selection and characterization of
1136 resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*.
1137 *Pest Management Science*, 72, 1794-1802.
- 1138 Bernardi, D., Bernardi, O., Horikoshi, RJ., Salmeron, E., Okuma, DM., Farias, JR.,
1139 Nascimento, ARB., & Omoto, C (2017). Selection and characterization of *Spodoptera*

- 1140 *frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to MON 89034× TC1507× NK603 maize
1141 technology. *Crop Protection* 94, 64-68.
- 1142 Bolzan, A., Padovez, FEO., Nascimento, ARB., Kaiser, IS., Lira, EC., Amaral, FSA., Kanno,
1143 HK., Malaquias, JB.,& Omoto C (2019). Seleção e caracterização da herança da resistência
1144 de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) ao clorraniliprole e resistência
1145 cruzada a outros inseticidas diamidas: resistência de *Spodoptera frugiperda* aos inseticidas
1146 diamidas. *Pest Management Science* 10, 53-76
- 1147 Burtet, LM., Bernardi, O., Melo, AA., Pes, MP., Strahl, TT., & Guedes, JVC (2017).
1148 Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize
1149 and insecticides in southern Brazil. *Pest Management Science*, 73, 2569- 2577.
- 1150 Cabodevilla, O., Ibañez, I., Simón, O., Murillo, R., Caballero, P.,& Williams, T (2011).
1151 Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission
1152 strategy in a nucleo polyhedrovirus. *Biological Control*, 5, 184-192.
- 1153 Campos, EVR., Oliveira, JL., Pascoli, M., Lima, R., & Fraceto, LF (2016). Neem oil and crop
1154 protection: from now to the future. *Frontiers in Plant Science* 7, 1–8.
- 1155 Chapman, RF (2013). *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, New
1156 York, USA.
- 1157 Chen, WB., Li, YY., Wang, MQ., Liu, CX., Mao, JJ., Chen, HY.,& Zhang, LS (2019).
1158 Entomopathogen resources of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, and their application
1159 status. *Plant Protection*, 45, 1–9.
- 1160 Chen, H., Wu, MF., Liu, J., Chen, AD., Jiang, YY.,& Hu, G (2020) Migratory routes and
1161 occurrence divisions of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in China. *Journal of*
1162 *Plant Protection*, 47, 747–757.
- 1163 Carlson, GR., Dhadialla, TS., Hunter, R., Jansson, RK., Jany, CS., Lidert, Z., & Slawecki, RA
1164 (2001). The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal
1165 ecdysteroid agonist. *Pest Management Science* 57, 115–119.

- 1166 Carvalho, RA., Omoto, C., Field, LM., Williamson, MS., & Bass, C (2013). Investigating the
1167 molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm
1168 *Spodoptera frugiperda*. *Plos One*, 8, e62268.
- 1169 Diez-Rodrigues, GI., & Omoto, C (2001). Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in
1170 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*,
1171 30, 311–316.
- 1172 Dhadialla, S., Carlson, R., & Le, P (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile
1173 hormone activity. *Annual Review of Entomology* 43, 545-569.
- 1174 Duarte, JP., Redaelli, LR., Jahnke, SM., & Trapp, S (2019). Effect of *Azadirachta indica*
1175 (Sapindales: Meliaceae) oil on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae
1176 and adults. *Florida Entomologist* 102, 408-412.
- 1177 El-Ghar, GESA., Radwan, HSA., El-Bermawy., ZA., & Zidan, LTM (2010). Sublethal effects
1178 of avermectin b1, β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* and diflubenzuron against cotton
1179 leafworm (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology* 119, 309-313.
- 1180 Geisler, FCS., Martins, LN., Treptow, RCB., Baronio, CA., Stupp, P., Ribeiro, LP., Garcia,
1181 FRM., & Bernardi, D (2019). Laboratory and field assessments of lethal and sublethal
1182 toxicities of acetogenin-based bioinsecticides against *Zaprionus indianus* (Diptera:
1183 Drosophilidae). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 79.
- 1184 Greene, GL., Leppla, NC., & Dickerson, WA (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing
1185 procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69, 487-488.
- 1186 Goergen, G., Kumar, PL., Sankung, SB., Togola, A., & Tamò, M (2016). First report of
1187 outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera,
1188 Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *Plos One*, 11, e0165632.
- 1189 Horikoshi, RJ., Bernardi, D., Bernardi, O., Malaquias, JB., Okuma, DM., Miraldo, LL.,
1190 Amaral, FSA., & Omoto, C. (2016a). Effective dominance of *Spodoptera frugiperda*

- 1191 resistance to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management.
1192 *Scientific Reports*, 6, 34864.
- 1193 Huang, F., Qureshi, JA., Meagher Jr, RL., Reising, DD., Head, GH., Andow, DA., Ni, X.,
1194 Kerns, D., Buntin, GD., Niu, Y., Yang, F., & Dangal, V (2014). Cry1F resistance in fall
1195 armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. *Plos One*, 9,
1196 e112958.
- 1197 Isman, MB., & Seffrin, R (2014). Natural insecticides from the Annonaceae: a unique
1198 example for developing biopesticides. *Advances in Plant Biopesticides*. P.21-33.
- 1199 Lima, MPL., Oliveira, JV., Gondim Jr, MGC., Marques, EJ., & Correia, AA (2010).
1200 Bioatividade de formulações de NIM (*Azadirachta indica* A. Juss, 1797) e de *Bacillus*
1201 *thuringiensis* subsp. *aizawai* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)
1202 (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência e Agrotecnologia* 34, 1381–1389.
- 1203 Lira, ACS., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, AAC., Cunha, FM., Cruz, GS., & Neto, CJCL
1204 (2020). Physiological and behavioral interactions of a predator with its prey under indirect
1205 exposure to the insect growth regulator lufenuron. *Crop Protection*, 137, 105289.
- 1206 Mahmoudvand, M., Abbasipour, H., Garjan, AS., & Bandani, AR (2011). Sublethal effects
1207 of hexaflumuron on development and reproduction of the diamondback moth, *Plutella*
1208 *xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Insect Science* 18, 689-696.
- 1209 Maia, HNM.; Luiz, AJB.; & Campanhola, C (2000). Statistical inference on associated
1210 fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. *Journal of*
1211 *Economic Entomology*, 93, 511-518.
- 1212 Marques, LH., Santos, AC., Castro, BA., Moscardini, V F., Rossetto, J., Silva, OAN.,
1213 Zobiolo, LHS., Valverde-Garcia, P., Babcock, JM., Storer, NP., Rule, DM., & Fernandes,
1214 OA (2017). Field evaluation of soybean transgenic event DAS-81419-2 expressing Cry1F
1215 and Cry1Ac proteins for the control of secondary Lepidoptera in pests in Brazil. *Crop*
1216 *Protection* 96, 109-115.

- 1217 Merkey, AB., Wong, CK., Hoshizaki, DK., & Gibbs, AG (2011). Energetics of
1218 metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 57, 1437–1445.
- 1219 Merzendorfer, H (2006). Sintases de quitina de insetos: uma revisão. *Journal of comparative*
1220 *physiology b-biochemical systems and environmental physiology* 176, 1 – 15.
- 1221 Mordue (Luntz), AJ., & Blackwell, A (1993). Azadirachtin: An update. *Journal of Insect*
1222 *Physiology* 39, 903-924.
- 1223 Mordue (Luntz), AJ (2004). Present concepts of the mode of action of azadirachtin from
1224 neem, pp. 229–242 In Koul O, Wahab S [eds.], *Neem: Today and in the New Millennium*.
1225 *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*.
- 1226 Mulder, K. & Gijswijt, MJ (1973). The laboratory evaluation of two promising new
1227 insecticides which interfere with cuticle deposition. *Journal of Pesticide Science* 4, 737-
1228 745
- 1229 Nascimento, ARBD., Farias, JR., Bernardi, D., Horikoshi, RJ., & Omoto, C (2016). Genetic
1230 basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis
1231 inhibitor lufenuron. *Pest Management Science* 72, 810–815.
- 1232 Nijhout, HF., Riddiford, LM., Mirth, C., Shingleton, AW., Suzuki, Y., & Callier, V (2014)
1233 The developmental control of size in insects. *WIREs Developmental Biology* 3, 113–134.
- 1234 Okuma, DM., Bernardi, D., Horikoshi, RJ., Bernardi, O., Silva, AP., & Omoto, C (2018).
1235 Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance
1236 to spinosad in Brazil. *Pest Management Science* 74, 1441-1448.
- 1237 Palli, R., & Retnakaran, A (2001). Ecdysteroid and juvenile hormone receptors: properties
1238 and importance in developing novel insecticides, p.107-132. In Ishaaya I (ed) *Biochemical*
1239 *sites of insecticides action and resistance*. Berlin, Springer, 343p.
- 1240 Pineda, S., Martínez, A., Figueroa, J., Schneider, M., Del Estal, P., Viñuela, E., Gómez, B.,
1241 Smaghe, G., & Budia, F (2009). Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life

- 1242 parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic*
1243 *Entomology* 102, 1490–1496.
- 1244 Ribeiro, LP., Vendramim, JD., Gonçalves, GLP., Ansante, TF., Gloria, E., Lopes, J., Mello-
1245 Silva, R.; & Fernandes, JB (2016). Searching for promising sources of grain protectors in
1246 extracts from Neotropical Annonaceae. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de*
1247 *Plantas Medicinales y Aromaticas* 15, 215-232.
- 1248 Roel, AR., Dourado, DM., Matias, R., Porto, KRA., Bednaski, AV., & Costa, RB (2010). The
1249 effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of
1250 *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 54,
1251 505–510.
- 1252 SAS Institute INC (2000). Statistical analysis system: getting started with the SAS learning.
1253 SAS Institute, Cary, NC.
- 1254 Shapiro, SS., & Wilk, MB (1965). An analysis of variance test for normality (complete
1255 samples). *Biometrika*, 52, 591-611.
- 1256 Specht, A., Montezano, DG., Sosa-Gómez, DR., Paula-Moraes, SV., Roque-Specht, VF., &
1257 Barros, NM (2015). Reproductive potential of *Spodoptera eridania* (Stoll) (Lepidoptera:
1258 Noctuidae) in the laboratory: effect of multiple couples and the size. *Brazilian Journal of*
1259 *Biology* 76, 526–230.
- 1260 Storer, NP., Thompson, GD., & Head GP (2012). Application of pyramided traits in insect
1261 resistance management for Bt crops. *GM Crops & Food* 3, 154-162.
- 1262 Sun, XX., Hu, CX., Jia, HR., Wu, QL., Shen, XJ., Zhao, SY., Jiang, YY., & Wu KM (2021).
1263 Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading
1264 into China. *Journal of Integrative Agriculture*, 20, 664–672.
- 1265 Tak, JH., & Isman, MB (2017) Acaricidal and repellent activity of plant essential oil-derived
1266 terpenes and the effect of binary mixtures against *Tetranychus urticae* Koch (Acari:
1267 Tetranychidae). *Industrial Crops and Products*, 108, 786–792.

- 1268 Tavares, WS., Costa, MA., Cruz, I., Silveira, RD.; Serrão, JE., & Zanuncio, JC (2010).
1269 Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and
1270 Agricultural Wastes *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45, 557–561.
- 1271 Toscano, LC., Calado Filho, GC., Cardoso, AM., Marayama, WI., & Tomquelski, GV (2012).
1272 Impacto de inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) e seus
1273 inimigos naturais em milho safrinha cultivado em Cassilândia e Chapadão do Sul, MS.
1274 *Arquivos Instituto Biológico* 79, 223-231.
- 1275 Tsai, CL.; Chu, IH.,Chou, MH.; Chareonviriyaphap, T.,Chiang, MY., Lin, PA., Hui, K., &
1276 Binyeh, W (2020). Rapid identification of the invasive fall armyworm *Spodoptera*
1277 *frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) using species-specific primers in multiplex PCR.
1278 *Scientific Reports* 10, 16508.
- 1279 Vélez, AM., Spencer, TA., Alves, AP., Moellenbeck, D., Meagher, RL., Chirakkal, H., &
1280 Siegfried, BD (2013). Inheritance of Cry1F resistance, cross resistance and frequency of
1281 resistant alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of*
1282 *Entomological Research*, 103, 700-713.
- 1283 Who - World Health Organization (2006). Pesticides and their application: for the control of
1284 vectors and pests of public health importance, 6th ed., Geneva, 1406p.
- 1285 Yano, SAC., Specht, A., Moscardi, F., Carvalho, RA., Dourado, PM., Martinelli, S., Head,
1286 GP., & Sosa-Gómez, DR (2015). High susceptibility and low resistance allele frequency of
1287 *Chrysodeixis includes* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to Cry1Ac in Brazil. *Pest*
1288 *Management Science*, DOI: 10.1002/ps.4191
- 1289 Zhu, Q., He, Y., Yao, J.; Liu, Y.; Tao, L.; & Huang, Q (2012). Effects of sublethal
1290 concentrations of the chitin synthesis inhibitor, hexaflumuron, on the development and
1291 hemolymph physiology of the cutworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Science* 12, 1-
1292 13.
- 1293

1294 **Tabela 1.** Inseticidas sintéticos e botânicos avaliados no presente estudo frente a

1295 *Spodoptera frugiperda*.

Ingrediente ativo	Nome comercial	^a CL ₂₅	^a CL ₅₀	Grupo químico	Fabricante
Limonoídes purificados (azadiractina + 3-tigloil-azadiractol)	Azamax [®]	0,0813	0,2100	Tetranortriterpenoide	UPL Brasil
Óleo bruto de nim	Azact CE [®]	0,0306	0,0630	Tetranortriterpenoide	Lacsa Company
Óleo bruto de nim	Fitoneem [®]	0,0375	0,0594	Tetranortriterpenoide	Dalneem
Óleo bruto de nim	Agroneem [®]	0,1962	0,3345	Tetranortriterpenoide	Agrovant
Lufenuron	Match [®]	0,0267	0,0525	Benzoilureia	Syngenta
Metoxifenoizida	Intrepid [®]	0,0201	0,0405	Diacilhidrazina	Corteva
Triflumurom	Certero [®]	0,0114	0,0207	Benzoilureia	Bayer
Tebufenozida	Mimic [®]	0,0129	0,0222	Diacilhidrazina	Iharabras

1296 ^aDose: g ou mL of p.c. (produto comercial) 100 L⁻¹ de água.

1297 **Tabela 2.** Tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* mantida durante sua fase
 1298 larval em dieta artificial tratada com concentrações subletais (CL₂₅ e CL₅₀) de diferentes
 1299 reguladores de crescimento de origem botânica e sintética.

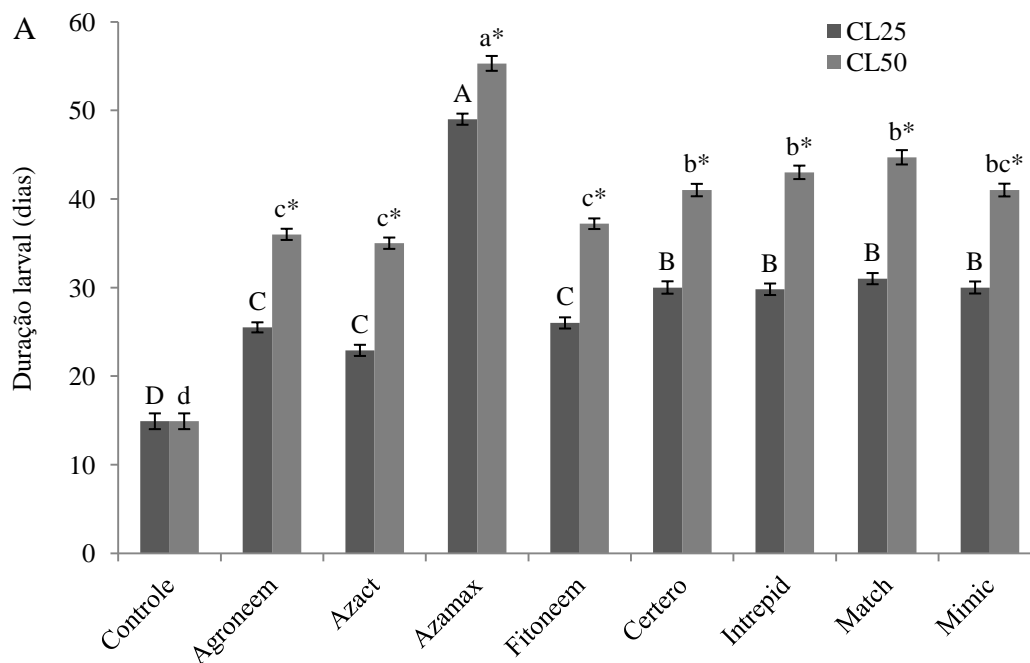
Tratamento	Parâmetros da tabela de vida de fertilidade ^{a,b}		
	<i>T</i> (dias)	<i>R</i> _o (♀/♀)	<i>r</i> _m (♀/♀*dia)
CL ₂₅ previamente estimada para cada produto			
Controle	36,6±0,46 e	253,5±5,44 a	0,151±0,002 a
Agroneem [®]	51,2±0,39 c	124,6±4,11 d	0,094±0,003 c
Azact [®]	44,6±0,39 d	110,6±6,10 e	0,108±0,002 b
Azamax [®]	75,2±1,28 a	114,8±3,12 e	0,063±0,001 e
Fitoneem [®]	52,9±0,53 c	150,1±2,10 b	0,094±0,005 c
Certero [®]	47,7±0,33 d	58,0±1,17 f	0,085±0,003 c
Intrepid [®]	56,3±0,32 c	128,7±3,89 d	0,086±0,003 c
Match [®]	66,0±0,47 b	139,8±4,24 c	0,075±0,001 d
Mimic [®]	51,0±0,46 c	53,8±1,80 f	0,078±0,002 d
CL ₅₀ previamente estimada para cada produto			
Agroneem [®]	61,8±0,59 c	91,1±2,10 b	0,073±0,003 b
Azact [®]	60,3±0,51 c	84,9±3,11 b	0,071±0,003 b
Azamax [®]	74,9±0,44 a	65,4±3,12 d	0,055±0,005 d
Fitoneem [®]	59,5±0,54 c	59,2±2,67 d	0,068±0,002bc
Certero [®]	55,0±0,93 d	41,4±3,14 e	0,067±0,002bc
Intrepid [®]	62,4±0,46 c	44,7±2,80 e	0,061±0,001 c
Match [®]	67,4±0,39 b	74,3±2,90 c	0,064±0,006 c
Mimic [®]	51,8±1,04 e	56,3±2,10 d	0,078±0,004 b

1300 ^a*T* = duração de cada geração (dias); *R*_o = taxa líquida de reprodução e *r*_m = razão infinitesimal de
 1301 aumento (por dia).

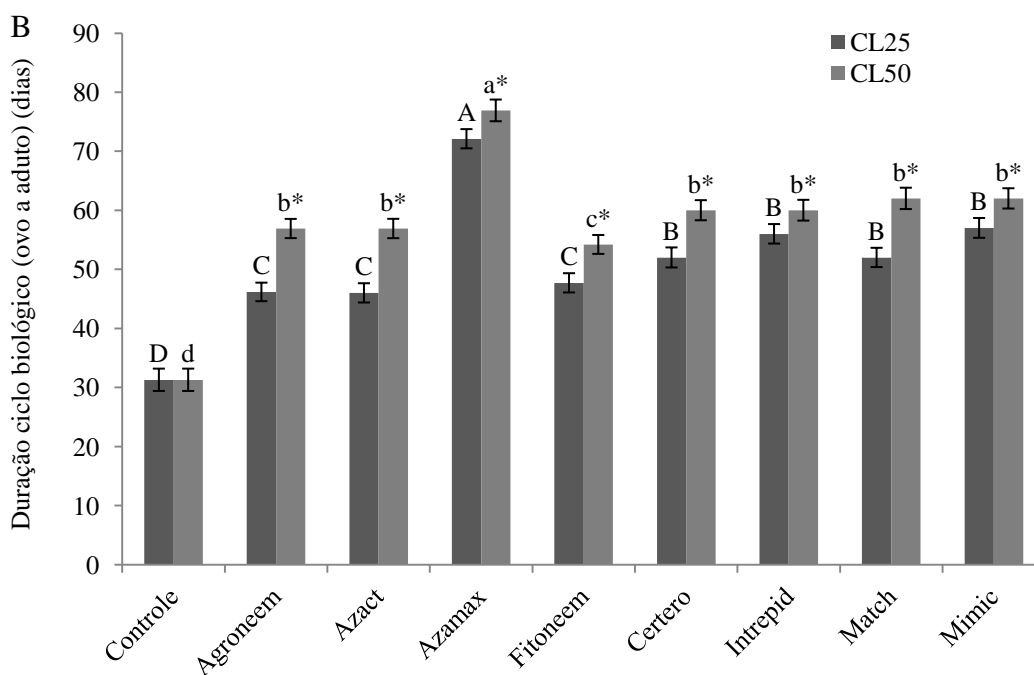
1302 ^bMédias seguidas de mesma letra, em cada coluna dentro de cada concentração, não são
 1303 significativamente diferentes (teste t para comparações de grupos aos pares, P > 0,05).

1304

1305



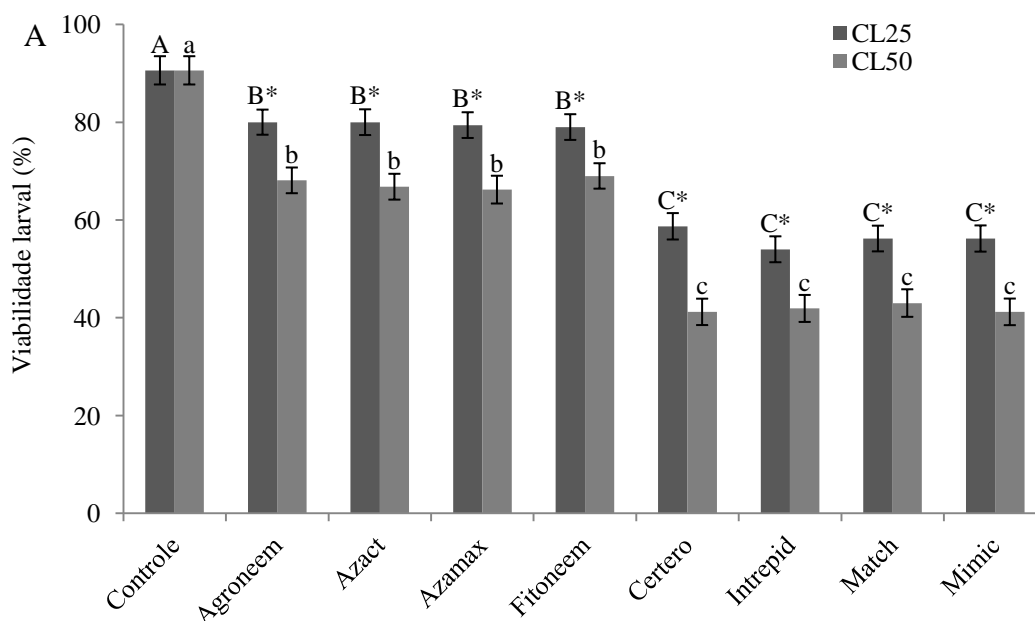
1306



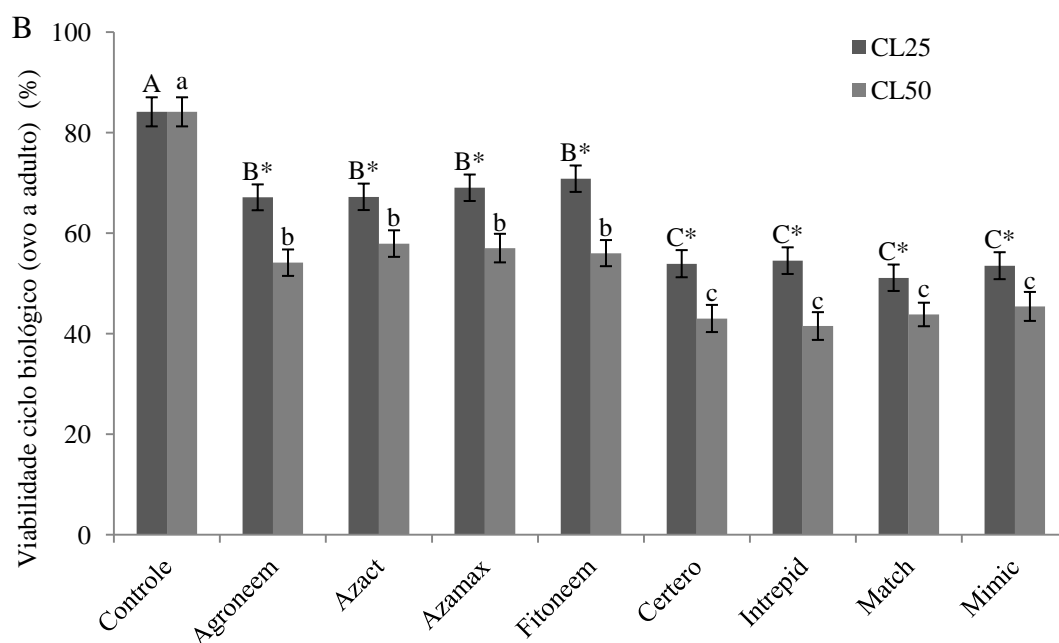
1307

1308 **Figura 1.** Duração (em dias) do período larval (A) e do ciclo biológico (ovo a adulto) (B) de *Spodoptera*
 1309 *frugiperda* após alimentação em dieta artificial tratada com inseticidas reguladores de crescimento de origem
 1310 natural e sintética.

1311 Médias seguidas de mesma letra maiúscula (CL₅₀) ou minúscula (CL₂₅) não são significativamente diferentes
 1312 (LSMEANS seguido pelo teste Tukey; $P > 0,05$). *significativo pelo teste t dentro do mesmo tratamento ($P <$
 1313 $0,05$).



1314

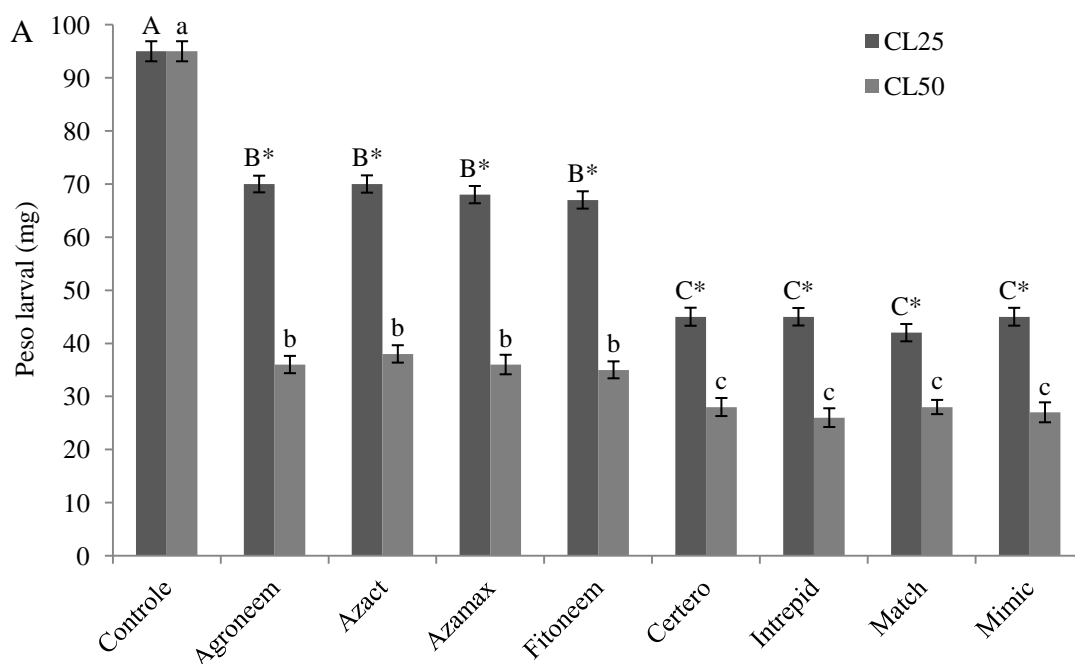


1315

1316 **Figura 2.** Porcentagem de viabilidade do período larval (A) e do ciclo biológico (ovo a adulto) (B) de
 1317 *Spodoptera frugiperda* mantida durante a fase larval em dieta artificial tratada com diferentes inseticidas
 1318 reguladores de crescimento de origem botânica e sintética.

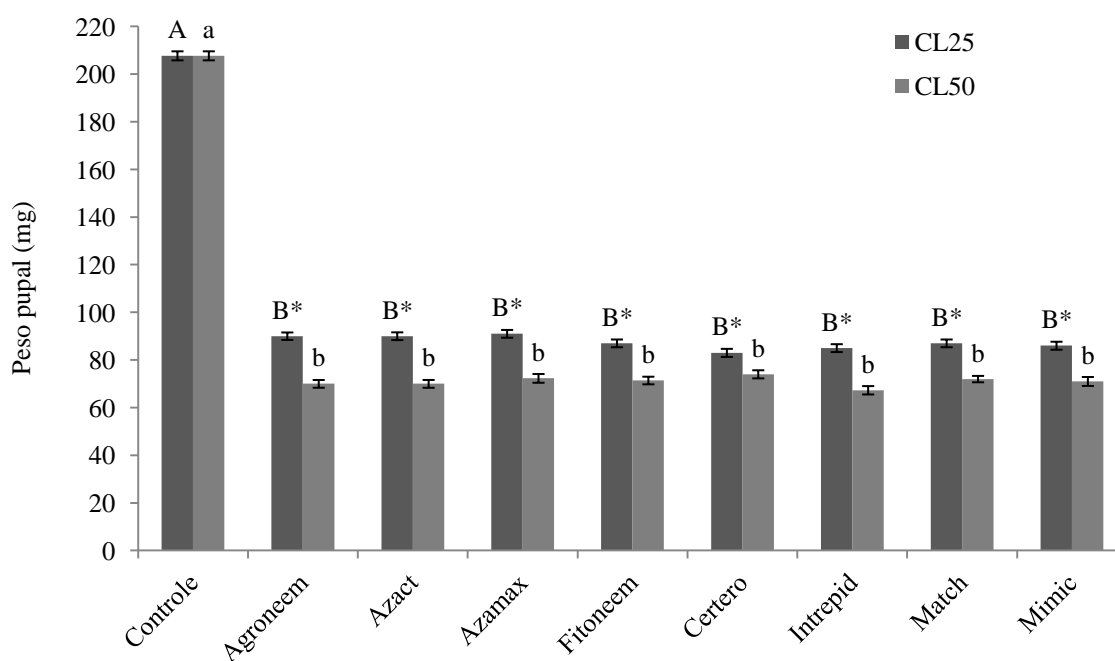
1319 Médias seguidas de mesma letra maiúscula (CL₅₀) ou minúscula (CL₂₅) não são significativamente diferentes
 1320 (LSMEANS seguido pelo teste Tukey; $P > 0,05$). *significativo pelo teste t dentro do mesmo tratamento ($P <$
 1321 $0,05$).

1322



1323

1324



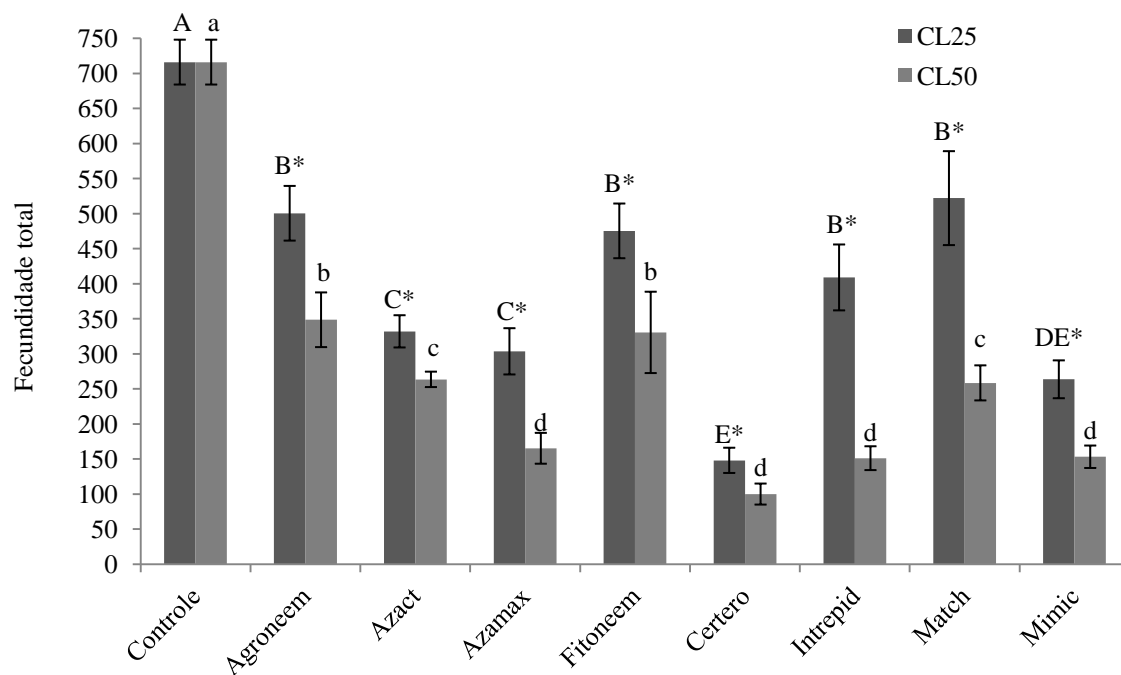
1325

1326 **Figura 3.** Peso larval (A) e pupal (B), em mg, de *Spodoptera frugiperda* mantida durante a fase larval em dieta

1327 artificial tratada com diferentes inseticidas reguladores de crescimento de origem botânica e sintética .

1328 Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (CL₅₀) ou minúscula (CL₂₅) não são significativamente diferentes1329 (LSMEANS seguido pelo teste Tukey; $P > 0,05$). *significativo pelo teste t dentro do mesmo tratamento ($P <$

1330 0,05).



1331
 1332 **Figura 4.** Fecundidade total de *Spodoptera frugiperda* mantida durante a fase larval em dieta
 1333 artificial tratada com diferentes inseticidas reguladores de crescimento de origem botânica e
 1334 sintética.
 1335 Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (CL₅₀) ou minúscula (CL₂₅) não são significativamente diferentes
 1336 (LSMEANS seguido pelo teste Tukey; $P > 0,05$). *significativo pelo teste t dentro do mesmo tratamento ($P <$
 1337 0,05).

1338
 1339
 1340
 1341
 1342
 1343
 1344
 1345
 1346
 1347
 1348
 1349
 1350

Artigo 3 - A ser submetido na revista Crop Protection
(Versão em português)

1351 **Associação de inseticidas reguladores de crescimento e formulações à base de**
1352 **limonoides: compatibilidade física e toxicidade frente a *Spodoptera frugiperda***
1353 **(Lepidoptera: Noctuidae) em testes laboratoriais e de campo**

1354

1355 Liliane Nachtigall Martins^a, Fernanda Carla dos Santos Geisler^a, Dylan Thomas Telles
1356 Amandio^b, Matheus Rakes^a, Rafael Antonio Pasini^c, Leandro Prado Ribeiro^d, Daniel
1357 Bernardi^{a,*}

1358

1359 ^aDepartamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010900, Pelotas,
1360 Rio Grande do Sul, Brasil

1361

1362 ^bPrograma de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa
1363 Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

1364

1365 ^cCESURG, Centro de Ensino Superior Riograndense, Sarandi, Rio Grande do Sul, Brasil.

1366

1367 ^dEmpresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Centro de Pesquisa
1368 para Agricultura Familiar, Chapecó, Santa Catarina, Brasil

1369

1370 *Correspondence to: Daniel Bernardi, E-mail: dbernardi2004@yahoo.com.br

1371

1372 **RESUMO**

1373 Objetivou-se avaliar a compatibilidade física de misturas de inseticidas reguladores de
1374 crescimento de origem sintética e formulações de inseticidas botânicos à base de limonoides e
1375 a toxicidade dessas associações no manejo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)
1376 (Lepidoptera: Noctuidae), em testes conduzidos sob condições laboratoriais e de campo. Para
1377 isso, foram testados as associações de quatro inseticidas botânicos comerciais à base de nim
1378 registrados no Brasil (Azamax[®], Agroneem[®], Azact[®] e Fitoneem[®]) com inseticidas sintéticos

1379 reguladores de crescimento - IRC [dois representantes do grupo das benzoilureia (Certero[®] e
1380 Match[®]) e dois representantes do grupo das diacilhidrazinas (Intrepid[®] e Mimic[®])]. Quando
1381 em mistura, todas as combinações dos quatro IRCs as quatro formulações à base de derivados
1382 de nim apresentaram uma redução significativa do pH da calda e um incremento significativo
1383 da condutividade elétrica. Entre as combinações testadas, aquelas contendo a mistura de
1384 Agroneem[®] com as quatro formulações de inseticidas reguladores de crescimento se
1385 destacaram pela maior redução do pH e maior incremento da condutividade elétrica da calda
1386 de pulverização. Porém todas as combinações testadas apresentaram comportamento de
1387 estabilidade de calda semelhante quando foram preparadas somente com água, o que
1388 demonstra sua compatibilidade física. Além disso, em bioensaios de laboratório e campo, as
1389 misturas de IRCs com formulações à base de limonoides apresentaram efeito de sinergismo
1390 no manejo de *S. frugiperda*. Assim, tais combinações podem proporcionar a redução do uso
1391 de ingredientes ativos sintéticos, uma vez que vários compostos ativos podem estar
1392 envolvidos, retardando o surgimento de populações resistentes, além da redução dos impactos
1393 ambientais advindos da aplicação de compostos xenobióticos e dos custos de controle. Dessa
1394 forma, constituem-se em promissoras alternativas de manejo de *S. frugiperda*, aliando eficácia
1395 de controle e seletividade, aspectos importantes para os programas de manejo integrado.

1396

1397 *Palavra chave:* Lagarta-do-cartucho, azadiractina, benzoilureia, diacilhidrazina, Manejo
1398 Integrado de Pragas.

1399

1400

1401

1402

1403

1404 1. Introdução

1405

1406 No Brasil, a cultura do milho apresenta significativa expressão econômica, com uma
1407 uma produção de 106,4 milhões na safra 2020/2021, em duas épocas preferenciais de cultivo
1408 (“safra” e “safrinha”), em uma área em torno de 14 milhões de hectares (Conab, 2021). No
1409 entanto, o ataque de insetos-praga tem impossibilitado a obtenção de maiores produtividades,
1410 especialmente a incidência de lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797),
1411 considerada a espécie mais destrutiva do milho (*Zea mays* L.) (Cruz et al., 2012; Martinelli et
1412 al., 2006).

1413 Para o manejo da lagarta-do-cartucho, o controle químico por meio de inseticidas
1414 sintéticos e o uso de eventos que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*
1415 Berliner (*Bt*) têm sido as principais estratégias de manejo utilizadas no Brasil (Carvalho et al.,
1416 2013; Okumura et al., 2013; Waquil et al., 2013; Bernardi et al., 2015; Sorgatto et al., 2015).
1417 Contudo, o uso generalizado de inseticidas, por muitas vezes de forma indiscriminada (sem
1418 considerar o nível de dano da praga ou mesmo aplicações calendarizadas), tem contribuído
1419 para a evolução da resistência de *S. frugiperda* aos principais inseticidas utilizados (Diez-
1420 Rodríguez; Omoto, 2001; Carvalho et al., 2013; Nascimento et al., 2016; Okuma et al., 2018;
1421 Bolzan et al., 2019).

1422 De acordo com a literatura, mais de 20 ingredientes ativos apresentam relatos de
1423 resistência da *S. frugiperda* em todo mundo (Arthropod Pesticide Resistance Database, 2016 -
1424 <https://www.iraac-online.org/publishers/arthropod-pesticide-resistance-database/>). No Brasil,
1425 foram reportados casos de resistência de *S. frugiperda* a lambda-cialotrina (Diez-Rodríguez;
1426 Omoto, 2001), clorpirifós (Carvalho et al., 2013), lufenurom (Nascimento et al., 2016),
1427 espinosade (Okuma et al., 2018) e diamidas (Bolzan et al., 2019). Além disso, a resistência
1428 também tem sido documentada para eventos que expressam as proteínas Cry1F e Cry1Ab e

1429 (Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016), Cry1A.105/Cry2Ab2 (Bernardi, D. et al., 2015),
1430 Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F (Bernardi et al., 2015; Horikoshi et al., 2016) e
1431 Vip3Aa20/Cry1Ab (Bernardi et al., 2016). Frente a isso, a busca por formulações
1432 ecologicamente mais seguras e sustentáveis, especialmente com menor toxicidade aos
1433 organismos não alvo, torna-se cada vez mais importante para o contexto do manejo integrado
1434 de *S. frugiperda* e de outras pragas-chave da agricultura (Pavela, 2007; Dayan et al., 2009;
1435 Hong et al., 2013; Anbalagan et al., 2014). Além disso, produtos ou misturas que apresentam
1436 modo de ação distintos dos inseticidas tradicionalmente usados no manejo de *S. frugiperda*
1437 são importantes para o manejo de populações resistentes por meio dos princípios de rotação
1438 ou ataque múltiplo (Georghiou, 1983).

1439 Dentro deste contexto, os inseticidas reguladores de crescimento de insetos (IRCs) e
1440 produtos derivados de nim (*Azadirachta indica* A. Juss), que possui como ingrediente ativo
1441 majoritário o triterpenoide azadiractina, merecem destaque (Campos et al., 2016; Duarte et
1442 al., 2020). Tais produtos, além de proporcionarem efeitos tóxicos diretos (mortalidade) sobre
1443 a praga, também podem ocasionar efeitos indiretos, como inibição da alimentação, distúrbios
1444 hormonais (o que pode interromper os processos de muda nos estágios juvenis) e alterações
1445 no desenvolvimento larval e reprodução (Brahmachari, 2004; Qiao et al., 2014). Em adição,
1446 são considerados os produtos de menor toxicidade sobre *Telenomus remus* (Nixon, 1937)
1447 (Hymenoptera: Platygasteridae), considerado o parasitoide de ovos mais promissor para o
1448 manejo biológico aplicado de *S. frugiperda* no campo (Pomari et al., 2013; Vieira et al., 2017;
1449 Pomari-Fernandes et al., 2018).

1450 Outro fator que pode colaborar com o manejo de populações resistentes de *S.*
1451 *frugiperda* a inseticidas é a utilização de produtos em misturas, a partir do princípio do ataque
1452 múltiplo, desde que não ocorra a prevalência de resistência cruzada entre os inseticidas
1453 utilizados na mistura (Georghiou, 1983). Entretanto, um dos princípios da utilização de

1454 inseticidas em misturas em tanque é a busca pela compatibilidade e a eficiência (toxicidade)
1455 devido aos efeitos sinérgicos ou aditivos dos produtos sobre o alvo de controle (Reffstrup et
1456 al., 2010; Peter et al., 2013). Entretanto, estudos têm demonstrado que este procedimento
1457 também pode proporcionar efeitos antagônicos, diminuindo a eficiência dos produtos sobre a
1458 praga (Ikeda, 2013; Willmott et al., 2013; Peter et al., 2013; Bhan et al., 2015). Desta forma,
1459 conhecer aspectos da exposição conjunta de produtos sobre a praga-alvo, assim como as
1460 incompatibilidades físicas em misturas em tanque são fundamentais (Krause, 2014; Gandini et
1461 al., 2020).

1462 Nesse contexto, o presente estudo visou avaliar a compatibilidade física de misturas
1463 de inseticidas reguladores de crescimento de origem sintética e formulações de inseticidas
1464 botânicos à base de limonoides e a toxicidade dessas associações no manejo de *S. frugiperda*,
1465 em testes conduzidos sob condições laboratoriais e de campo.

1466

1467 **2. Material e métodos**

1468

1469 *2.1 Compatibilidade física de misturas de inseticidas reguladores de crescimento de origem* 1470 *sintética e produtos formulados à base de limonoides*

1471

1472 Visando avaliar a compatibilidade física de misturas de inseticidas reguladores de
1473 crescimento de origem sintética e formulações à base de limonoides, assim como a alteração
1474 do pH e da condutividade elétrica de caldas condicionada pelos produtos testados tanto
1475 isoladamente quanto em misturas, foram preparadas soluções em béquer de 250 mL,
1476 simulando uma calda em condição de campo de 200 L ha⁻¹. A ordem de mistura foi: primeiro
1477 os inseticidas reguladores de crescimento seguido das formulações à base de limonoides

1478 (óleos ou concentrados emulsionáveis). Como controle negativo, utilizou-se água destilada.
1479 Para cada tratamento, utilizou-se 4 repetições, sendo cada repetição composta por um béquer.
1480 Para a determinação do pH utilizou-se o pHmetro (Digimed phmetro DM20), enquanto
1481 que a condutividade elétrica foi determinada em um condutivímetro (modelo Orion 5star –
1482 Thermo scientific corporation). Além disso, a estabilidade das diferentes misturas foram
1483 avaliadas em 1, 5, 10 e 30 minutos após a preparação das caldas. As interações foram
1484 observadas a partir da ocorrência de sobrenadante, precipitação, floculação ou mistura
1485 homogênea, e em seguida, atribuiu-se notas em uma escala variando de 1 a 5 (Petter et al.,
1486 2013), em que 1 significa separação imediata dos compostos; 2 significa separação depois de
1487 1 minuto de preparação; 3 significa separação depois de 5 minutos de preparação; 4 significa
1488 separação depois de 10 minutos de preparação; e 5 significava estabilidade perfeita das
1489 misturas.

1490

1491 *2.2 Suscetibilidade de lagartas de S. frugiperda expostas a misturas de quatro formulações de*
1492 *inseticidas botânicos à base de limonoides e inseticidas reguladores de crescimento em dieta*
1493 *artificial*

1494

1495 As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas nos bioensaios foram provenientes de uma
1496 população coletada em milho não-*Bt* durante a safra 2012/2013 em Mogi Mirim, SP, Brasil
1497 (22°28'31"S e 46°54'21" W). Em laboratório (25 ± 2°C, U.R. 60 ± 10% e fotoperíodo de
1498 12L:12E h), as lagartas foram mantidas por mais de 25 gerações em dieta artificial à base de
1499 feijão branco (Yoki[®]), gérmen de trigo (Walnon[®]) e levedura (Biorigem[®]) (adaptada de
1500 Greene et al., 1976). Para alimentação dos adultos, utilizou-se uma solução de mel a 10%
1501 (v/v).

1502 Os tratamentos utilizados corresponderam aos inseticidas botânicos (IB) comerciais à
1503 base de nim registrados no Brasil (Azamax[®], Agroneem[®], Azact[®] e Fitoneem[®]) (Tabela 1),
1504 enquanto que os inseticidas sintéticos reguladores de crescimento (IRCs) foram constituídos
1505 por dois representantes do grupo das benzoilureia (Certero[®] e Match[®]) e dois representantes
1506 do grupo das diacilhidrazinas (Intrepid[®] e Mimic[®]) (Tabela 1) disponíveis no mercado
1507 nacional. A determinação das misturas dos produtos pode ser observada na Tabela 2 e as
1508 concentrações na Tabela 3.

1509 As misturas foram realizadas utilizando as CL₂₅ dos produtos (Tabela 3), estimadas
1510 em bioensaios prévios por meio da incorporação em dieta artificial. Como controle negativo,
1511 utilizou-se a mesma proporção de água destilada utilizada na solubilização dos tratamentos (5
1512 mL). Para cada produto e concentração, os tratamentos foram incorporados em dieta artificial
1513 (temperatura ~50°C), vertida em placas de acrílico de 16 células (5,5 centímetros de
1514 comprimento × 4,0 cm de profundidade × 3,0 centímetros de altura por poço) [(Advento do
1515 Brasil, São Paulo, Brasil)] e mantidas por 12 h em câmara de fluxo laminar, privadas de luz,
1516 facilitando a evaporação e excesso de umidade. Posteriormente, cada célula foi infestada com
1517 5 lagartas de primeiro instar e as placas mantidas em sala climatizada (25°C, U.R.: 60±10% e
1518 fotofase: 12 h). A sobrevivência larval foi observada diariamente por 7 dias, e após esse
1519 período, as lagartas sobreviventes foram pesadas em balança analítica. As lagartas que não
1520 ultrapassaram o primeiro instar larval também foram consideradas mortas. O delineamento
1521 utilizado foi inteiramente causalizado com 32 repetições, com 5 neonatas (< 24 horas de
1522 idade) de *S. frugiperda* por repetição (n=160), para cada tratamento. O bioensaio foi mantido
1523 em sala climatizada (temperatura 27±1°C, umidade relativa 60±10% e fotofase 14 horas).

1524

1525 *2.3 Suscetibilidade de lagartas de S. frugiperda expostas a misturas de quatro formulações de*
1526 *inseticidas botânicos à base de limonoides e inseticidas reguladores de crescimento em folha*
1527 *de milho*

1528
1529 Sementes de milho cultivar não *Bt* (BMX 3051) foram semeadas em vasos (10L
1530 contendo terra vegetal na densidade de 5 sementes/vasos. No estágio V6, em laboratório,
1531 foram cortados pedaços de 4cm de folha, as quais foram imersas durante 10 segundos em
1532 misturas de inseticidas botânicos e sintéticos de acordo com a Tabela 2 e Tabela 3. As folhas
1533 que foram imersas nas misturas ficaram em repouso em papel filtro até que ocorresse a
1534 secagem por completo das mesmas; após esse período, as folhas foram colocadas com o
1535 auxílio de uma pinça de ponta fina e acondicionados sobre uma mistura não geleificada de
1536 ágar-água a 2,5% em placas de bioensaio com 16 células (5,5 centímetros de comprimento ×
1537 4,0 cm de profundidade × 3,0 centímetros de altura por poço) [(Advento do Brasil, São Paulo,
1538 Brasil)]. A sobrevivência larval foi observada diariamente por 7 dias, e após esse período, as
1539 lagartas sobreviventes foram pesadas em balança analítica. As lagartas que não ultrapassaram
1540 o primeiro instar larval também foram consideradas mortas. Quando houve necessidade as
1541 folhas foram substituídas por folhas de milho sem tratamento. O bioensaio foi mantido em
1542 sala climatizada (temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase: 12 h), com
1543 delineamento inteiramente casualizado com 32 repetições para cada tratamento, com 5
1544 lagartas expostas por repetição ($n=160$).

1545
1546 *2.4 Eficiência de controle de diferentes misturas de inseticidas botânicos à base de*
1547 *limonoides e inseticidas reguladores de crescimento sobre lagartas de S. frugiperda a campo*
1548

1549 O experimento foi realizado no município de Arroio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil (32°
1550 14' 19" S; 53° 5' 27" O) durante a safra agrícola 2020/2021. O delineamento experimental foi
1551 em blocos inteiramente casualizado, com 4 repetições (parcelas) por tratamento. As parcelas
1552 foram constituídas de 3 linhas de milho com 4,0 m de comprimento e espaçamento entre
1553 linhas de 0,80 m. Sementes de milho não *Bt* da cultivar BRS 3042 foram semeadas
1554 mecanicamente na densidade de 4 sementes/metro linear. A área na qual foi instalado o
1555 experimento era caracterizada pelo recorrente histórico de infestação natural de *S. frugiperda*
1556 durante as últimas safras agrícolas. Os danos causados por infestações naturais de *S.*
1557 *frugiperda* foram avaliados a cada 5 dias após a emergência das plantas de milho, analisando
1558 as folhas de 10 plantas consecutivas por parcela (linha central). A pulverização dos
1559 tratamentos foi realizada quando 10% das plantas quantificadas em cada amostragem
1560 apresentarem nota de danos ≥ 3 (estágio fenológico v4), segundo a escala de Davis et al.
1561 (1992). O número de plantas com classificação de dano ≥ 3 é sugerido como critério para o
1562 uso de inseticidas contra *S. frugiperda* no Brasil (IRAC, 2016). Os inseticidas (Tabela 1)
1563 foram aplicados utilizando um pulverizador costal pressurizado com CO₂, barra de 2 m e
1564 espaçamento entre bicos de 0,5 m (pontas tipo leque XR 110.02), com volume de calda de
1565 200 L ha⁻¹. Como tratamento testemunha, foi utilizado parcelas experimentais sem a aplicação
1566 de inseticidas. Aos 0 (ants da aplicação; pré-contagem), 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28 dias após a
1567 aplicação (DAAT) foi atribuído uma nota de dano para cada planta (10 plantas por parcela) de
1568 acordo com a escala de Davis (0 = nenhum dano a 9 = dano severo) (Davis et al., 1992).

1569

1570 2.5 Analise estatística

1571

1572 Modelos lineares generalizados (GLM) (Nelder e Wedderburn, 1972) pertencentes à família
1573 exponencial de distribuições foram utilizados para a análise dos dados obtidos. Em todos os

1574 casos, um gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (Hinde e
1575 Demétrio, 1998) foi utilizado para verificar a qualidade do ajuste ao modelo. Quando ocorreu
1576 diferença significativa entre os tratamentos, comparações múltiplas (teste *post hoc* de Tukey,
1577 $p < 0,05$) foram realizadas usando a função `glht` do pacote `multcomp` com ajuste dos valores
1578 de p . As análises foram realizadas por meio do software “R”, versão 2.15.1 (R Core Team,
1579 2012).

1580

1581 3. Resultados

1582

1583 3.1 Compatibilidade física de misturas de inseticidas reguladores de crescimento de origem 1584 sintética e produtos formulados à base de nim

1585

1586 Nas concentrações recomendadas, todas as formulações à base de nim ocasionaram uma
1587 redução significativa do pH da calda de pulverização ($F = 78,986$, $gl = 4, 15$, $p = < 0,0001$),
1588 seguindo a seguinte tendência de redução: Agroneem[®] > Azamax[®] > Azact[®] > Fitoneem[®] (Tabela
1589 4). Por outro lado, todos os produtos à base de nim ocasionaram um aumento da
1590 condutividade elétrica ($F = 83810$, $gl = 4, 15$, $p = < 0,000$), sendo que o produto Agroneem[®]
1591 foi aquele que apresentou o maior aumento, seguido de Azamax[®], Fitoneem[®] e Azact[®]
1592 (Tabela 4). Considerando os produtos reguladores de crescimento de origem sintética testados
1593 isoladamente, Certero[®] e Intrepid[®] ocasionaram um aumento do pH da calda, enquanto que
1594 redução do pH foi verificada com os produtos Match[®] e Mimic[®] (Tabela 4). Por sua vez,
1595 todos os quatro produtos testados propiciaram um aumento da condutividade elétrica da calda
1596 de pulverização (Tabela 4).

1597 Quanto em mistura, todas as combinações dos quatro inseticidas reguladores de crescimento
1598 de origem sintética com as quatro formulações à base de derivados de nim apresentaram uma

1599 redução significativa do pH da calda e um incremento significativo da condutividade elétrica
1600 (Tabela 4). Entre as combinações testadas, aquelas contendo a mistura de Agroneem[®] com as
1601 quatro formulações de inseticidas reguladores de crescimento se destacaram pela maior
1602 redução do pH e maior incremento da condutividade elétrica da calda de pulverização (Tabela
1603 4).

1604 Todas as combinações dos quatro inseticidas reguladores de crescimento de origem sintética
1605 com as quatro formulações à base de derivados de nim apresentaram comportamento de
1606 estabilidade de calda semelhante quando foram preparadas somente com água (Tabela 5).
1607 Assim, todas as misturas preparadas não apresentaram incompatibilidade física, observada
1608 pelo grau 5 na escala da CBB independentemente dos tempos de avaliação (Tabela 5), que
1609 constitui-se na estabilidade perfeita da mistura. Nas misturas contendo Agroneem[®] com as
1610 duas diacilhidrazinas testadas (Intrepid[®] e Mimic[®]) verificou-se a formação de
1611 sobrenadamento (pequenas gotículas de óleo na superfície), porém sem comprometer a
1612 estabilidade física das referidas misturas.

1613

1614 *3.2 Associação de inseticidas reguladores de crescimento de origem sintética e produtos*
1615 *formulados à base de nim no controle de Spodoptera frugiperda*

1616

1617 *3.2.1 Testes laboratoriais*

1618 Independentemente da modalidade de bioensaio empregado (aplicação em dieta
1619 artificial ou folhas de milho), as misturas (CL₂₅ + CL₂₅) da diacilhidrazina Intrepid[®] com as
1620 quatro formulações à base de nim, assim como a mistura de Mimic[®] com Azamax[®] (ensaio em
1621 dieta artificial), ocasionaram a mortalidade total das lagartas expostas após o sétimo dia de
1622 exposição, sendo, assim, equitóxicos ao controle positivo (Premio[®], controle positivo) testado
1623 na CL₉₀ previamente estimada (Tabela 6). Além disso, as demais combinações testadas

1624 (misturas da CL₂₅ de reguladores de crescimento + CL₂₅ de produtos à base de nim)
1625 ocasionaram níveis de mortalidade superiores a 75% e significativa redução do peso das
1626 lagartas sobreviventes (Tabela 6), o que indica efeito de sinergismo entre tais associações.

1627

1628 3.2.2 Testes de campo

1629

1630 Em condições de campo, a mistura das concentrações equivalentes às CL₂₅ dos inseticidas
1631 reguladores de crescimento do grupo das diacilhidrazinas (Intrepid[®] e Mimic[®]) com às CL₂₅
1632 dos inseticidas botânicos Azamax[®] e Azact[®], assim como o inseticida Certero[®] (benzoilureia)
1633 com Azact[®], nas mesmas concentrações, foram os tratamentos que apresentaram os menores
1634 níveis de dano de *S. frugiperda* (Tabela 7), mensurados pela Escala de Davis et al. (1972).

1635 Tais diferenças entre os tratamentos foram significativas após os 3 DAT (dias após o
1636 tratamento), permanecendo a mesma tendência ao longo de todas as datas de avaliação.

1637

1638 4. Discussão

1639

1640 Os resultados obtidos no presente estudo sob condições laboratoriais e de campo
1641 indicaram a compatibilidade física de misturas de inseticidas reguladores de crescimento de
1642 origem sintética com inseticidas botânicos à base de nim (limonoides) e o efeito de
1643 sinergismo dessas misturas no manejo de *S. frugiperda*. Assim, tais combinações podem
1644 proporcionar a redução do uso de ingredientes ativos sintéticos, uma vez que vários
1645 compostos ativos podem estar envolvidos, retardando o surgimento de populações resistentes,
1646 além da redução dos impactos ambientais advindos da aplicação de compostos xenobióticos e
1647 dos custos de controle (Morales González et al., 2009). Dessa forma, constituem-se em

1648 promissoras alternativas de manejo de *S. frugiperda*, aliando eficácia de controle e
1649 seletividade, aspectos importantes para os programas de manejo integrado.

1650 Vários estudos demonstraram efeitos sinérgicos de misturas de inseticidas sintéticos e
1651 botânicos sobre espécies-praga. Ali et al. (2017) avaliaram opções de controle da lagarta
1652 *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae), considerada uma das pragas-chave de
1653 Brassicaceae (Hasan e Ansari, 2010). Os pesquisadores avaliaram a mortalidade, crescimento
1654 e consumo alimentar de lagartas submetidas a diferentes inseticidas sintéticos (tiametoxam
1655 25% SP, acetamiprido 20% SP e piriproxifem 10,8% EC), extratos etanólicos de nim
1656 [*Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae)] (5 e 7%) e combinações de inseticidas sintéticos e
1657 botânicos em comparação com água (controle negativo). O estudo demonstrou que os extratos
1658 de nim isolados ou em combinação com os inseticidas sintéticos podem ser usados para o
1659 controle de *P. brassicae*, com efeitos significativos sobre a mortalidade, crescimento e
1660 comportamento alimentar das lagartas. A combinação do inseticida piriproxifem com o
1661 extrato a 7% causou menor mortalidade em comparação com a aplicação do extrato
1662 isoladamente. Esse efeito antagônico foi atribuído pelos autores a possíveis mecanismos de
1663 destoxificação que levam à inativação de alguns metabólitos. Nesse contexto, é possível que a
1664 toxicidade da mistura entre piriproxifem e extrato tenha sido reduzida a partir da degradação
1665 de um ou mais constituintes da mistura (Yi et al., 2012).

1666 Um dos princípios da mistura de inseticidas é a busca pela compatibilidade e a
1667 eficiência (toxicidade) dos produtos sobre o alvo de controle (Reffstrup et al., 2010; Peter et
1668 al., 2013). Na agricultura, as misturas de tanque de produtos fitossanitários são realizadas com
1669 o intuito de reduzir os custos das aplicações (Houghton, 1982). Contudo, a mistura de
1670 inseticidas pode alterar substancialmente o efeito sobre a praga-alvo, devido principalmente
1671 às alterações provocadas no pH da calda (Baur et al., 1971; Moxness; Lym, 1989; Matuo;

1672 Matuo, 1995) e na condutividade elétrica (Ell-Attal et al., 1984; Farghalay et al., 2009), bem
1673 como pela possível incompatibilidade entre os produtos (Houghton, 1982).

1674 Internacionalmente, a preocupação dos pesquisadores e técnicos sobre os efeitos
1675 causados pelas misturas de tanque é relativamente antiga (Schenck; Adlerz, 1962; Prado et al.,
1676 2011). Em 1980, na Philadelfia (Estados Unidos), foi realizada a primeira conferência sobre
1677 aplicações de produtos fitossanitários com mistura de tanque, nos quais diversos
1678 pesquisadores se reuniram para discutir sobre os principais efeitos das misturas, devido às
1679 maiores alterações das características físico-químicas ocorridas na calda (Wright et al., 1982).
1680 Assim, a qualidade química da água, em relação ao pH, sais e íons dissolvidos, é um fator a
1681 ser considerado no tratamento fitossanitário (Houghton, 1982; Prado et al., 2011).

1682 Conforme demonstrado no presente estudo, interações sinérgicas ou aditivas entre
1683 inseticidas botânicos e inseticidas sintéticos podem possibilitar o registro de novos produtos,
1684 propiciar o aumento de eficácia dos produtos em função de diferentes modos de ação dos
1685 componentes envolvidos na mistura, a redução na pressão de seleção e na evolução de
1686 resistência por parte dos insetos-alvo e o aumento do tempo de uso de alguns produtos
1687 sintéticos já disponíveis no mercado, caso dos inseticidas reguladores de crescimento
1688 empregados no presente estudo. Assim, o presente estudo abre oportunidades para o
1689 desenvolvimento de novos produtos ou estratégias para o manejo de *S. frugiperda*. Todavia,
1690 faz-se necessário uma avaliação criteriosa dos possíveis impactos sobre organismos não alvos
1691 e o comportamento de tais misturas no ambiente antes de sua recomendação.

1692

1693 **Agradecimentos**

1694

1695 Os autores agradecem a Universidade Federal de Pelotas por disponibilizar a
1696 infraestrutura e equipamentos necessários para a realização deste estudo. Além disso,

1697 agradecem o a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela
1698 concessão de bolsa à primeira autora e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
1699 e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa (Processos
1700 305377/2019-1 e 304018/2019-8) para os dois últimos autores, respectivamente.

1701

1702 **Referências**

1703

1704 Anbalagan, S.K., Kathirvelu, B., Ajith, J., Savarior, V, 2014. Geographic variation in
1705 cypermethrin insecticide resistance and morphometry in *Spodoptera litura* (Fab.)
1706 (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Coastal Life Medicine. 2, 225-229.

1707

1708 Arthropod Pesticide Resistance Database, 2021. Disponível em:

1709 <https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=200>, Acesso em: 06
1710 de junho de 2021 às 19:27.

1711

1712 Bernardi, D., Salmeron, E., Horikoshi, R.J., Bernardi, O., Dourado, P.M., Carvalho, R.A.,
1713 Martinelli, S., Head, G.P., Omoto, C., 2015. A resistência cruzada entre as proteínas Cry1
1714 na lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) pode afetar a durabilidade dos atuais
1715 híbridos de milho Bt piramidados no Brasil. PLoS ONE 10: e0140-130.

1716

1717 Bernardi, O., Bernardi, D., Horikoshi, R.J., Okuma, D.M., Miraldo, L.L., Fatoretto, J.,
1718 Medeiros, F.C.L., Burdc, T., Omoto, C., 2016. Selection and characterization of resistance
1719 to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. Pest
1720 Management Science, 72, 1794-1802.

1721

- 1722 Baur, J.R., Bovey, R.W., Baker, R.D., Riley, I., 1971. Absorption and penetration of picloram
1723 and 2,4,5-T into detached live oak leaves. *Weed Science*, Champaign. 19,138-141.
1724
- 1725 Bhan, S., Mohan, L., Srivastava, C.N., (2015). Efficacy of *Cuscuta reflexa* extract and its
1726 synergistic activity with temephos against mosquito larvae. *International Journal of*
1727 *Mosquito Research*. 2, 34-41.
1728
- 1729 Bolzan, A., Padovez, F.E.O., Nascimento, A.R.B., Kaiser, I.S., Lira, E.C., Amaral, F.S.A.,
1730 Kanno, H.K., Malaquias, J.B., Omoto, C., 2019. Seleção e caracterização da herança da
1731 resistência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) ao clorantraniliprole e
1732 resistência cruzada a outros inseticidas diamidas. *Pest Manag Sci*. 10, 53-76.
1733
- 1734 Brahmachari, G., 2004. Neem – an omnipotent plant: a retrospection. *Chembiochem*. 5, 408-
1735 421.
1736
- 1737 Campos, E.V.R., Oliveira, J.L., Pascoli, M., Lima, R., Fraceto, L.F., 2016. Neem oil and crop
1738 protection: from now to the future. *Frontiers in Plant Science*. 7, 1–8.
1739
- 1740 Carvalho, R.A., Omoto, C., Field, L.M., Williamson, M.S., Bas, C., 2013. Investigating the
1741 molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall
1742 armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *PlosOne*, 8, 0062268.
1743
- 1744 Conab, 2021. Disponível em: [https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos)
1745 [safra-de-graos](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos), Acesso em: 09 de junho de 2021 às 14:04.
1746

- 1747 Cruz, I.; Figueiredo, M. L. C.; Silva, R. B.; Silva, I. F.; Paula, C. S.; Foster, J. E., 2012. Using
1748 sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall
1749 armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in maize.
1750 International Journal of Pest Management, 83-90.
1751
- 1752 Davis, F.M., NG, S.S., Williams, W.P., 1992. Visual rating scales for screening whorl-stage
1753 corn for resistance to fall armyworm. Mississippi: Agricultural and Forest Experiment 9p.
1754 (Agricultural and Forest Experiment Station. Technical bulletin, 186).
1755
- 1756 Dayan, F.E.; Cantrell, C.L.; Duke, S.O., 2009. Natural products in crop protection. Bioorganic
1757 and Medical Chemistry, 17, 4022-4034.
1758
- 1759 Diez-Rodriguez, G.I., Omoto, C., 2001. Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in
1760 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotropical Entomology,
1761 30, 311–316.
1762
- 1763 Duarte, J.P.; Redaelli, L.R.; Silva, C.E.; Jahnke, S.M., 2020. Effect of *Azadirachta indica*
1764 (Sapindales: Meliaceae) Oil on the Immune System of *Spodoptera frugiperda*
1765 (Lepidoptera: Noctuidae) Immatures. Journal of Insect Science, 20.
1766
- 1767 El-Attal, Z.M., Moustafa, O.K., Diab, S.A., 1984. Influence of foliar fertilizers on the toxicity
1768 and tolerance to some insecticides in the cotton leafworm. The Journal of Agricultural
1769 Science, 102, 111-114.
1770

- 1771 Farghaly, S.F., Torkey, H.M., Abouyousef, H.M., 2009. Natural extracts and their chemical
1772 constituents in relation to toxicity against whitefly (*Bemisia tabaci*) and Aphid (*Aphis*
1773 *craccivora*). Australian Journal of Basic and Applied Sciences, Austrália, 3, 3217-3223.
1774
- 1775 Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Fresia, P., Dos Santos, A.C.,
1776 Omoto, C., 2014. Resistência desenvolvida em campo ao milho Cry1F por *Spodoptera*
1777 *frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Crop protection, 64, 150-158.
1778
- 1779 Gandini, E. M. M., Costa, E. S. P., Santos, J.B., Soares, M. A., Barroso, G. M., Corrêa, J. M.,
1780 Carvalho, A. M., Zanuncio, J. C., 2020. Compatibility of pesticides and/or fertilizers in
1781 tank mixtures. Journal of Cleaner Production, 268, 122-152.
1782
- 1783 Georghiou, G.P., 1983. Management of resistance in arthropods. In: Georghiou, G.P., Saito,
1784 T., ed. Pest resistance to pesticides: challenges and prospects. New York: Plenum Press,
1785 769-792.
1786
- 1787 Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing
1788 procedure and artificial medium. Journal of Economic Entomology, 69, 487-488.
1789
- 1790 Hasan, F., Ansari, M.S., 2010. Effects of different brassicaceous host plants on the fitness of
1791 *Pieris brassicae* (L.). Crop Protection, 30, 854-862.
1792
- 1793 Hinde, J., Demétrio, C.G.B., 1998. Overdispersion: models and estimation. Comput Stat Data
1794 Anal 27, 151-170.
1795

- 1796 Horikoshi, R.J., Bernardi, D., Bernardi, O., Malaquias, J.B., Okuma, D.M., Miraldo, L.L.,
1797 Amaral, F.S.A., Omoto, C., 2016^a. Effective dominance of *Spodoptera frugiperda*
1798 resistance to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management.
1799 Scientific Reports, 6: 34864.
- 1800
- 1801 Hong, T., QI, S., Zhou, X., Bai, L., 2013. Field resistance of *Spodoptera litura* (Lepidoptera:
1802 Noctuidae) to organophosphates, pyrethroids, carbamates and four newer chemistry
1803 insecticides in Hunan, China. Journal of Pest Science, 86, 599-609.
- 1804
- 1805 Houghton, R.D., 1982. Pesticide compatibility: an overview from technical services. ASTM
1806 Special Technical Publication, Philadelphia. 764, 3- 10.
- 1807
- 1808 Ikeda, F. S., 2013. Resistência de plantas daninhas em soja resistente ao glifosato. Informe
1809 Agropecuário. 34, 58-65.
- 1810
- 1811 IRAC-BR. Comitê de Ação a Resistência a Inseticidas. Programas de manejo da resistência
1812 de pragas a pesticidas no Brasil. 2016. Disponível em: < [http://www.irac-br.org/#!/modo-](http://www.irac-br.org/#!/modo-de-ao-de-inseticidas-e-acaricidas/c10s0)
1813 [de-ao-de-inseticidas-e-acaricidas/c10s0](http://www.irac-br.org/#!/modo-de-ao-de-inseticidas-e-acaricidas/c10s0)> Acesso em 9 junho de 2021.
- 1814
- 1815 Krause, N.D., 2014. Necessidades tecnológicas relacionadas a novos ingredientes ativos,
1816 formulações e da prática da realização de misturas de agrotóxicos. In: Congresso Brasileiro
1817 da ciência das plantas daninhas.
- 1818
- 1819 Matuo, T.K., Matuo, T., 1995. Efeito da pressurização com CO₂ sobre o pH da água. Planta
1820 Daninha, Botucatu. 13.

- 1821 Martinelli, S., Montrazi, R.B., Zucchi, M.I., Silva-Filho, M.C., Omoto, C., 2006. Molecular
1822 variability of *Spodoptera frugiperda* populations associated to maize and to cotton in
1823 Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 99, 516–526.
- 1824
- 1825 Morales González, J.A., Fernández Sánchez, A.M., Bautista Ávila, M., Vargas Mendoza, N.,
1826 Santillán, E.O.M., 2009. Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas.
1827 UAEH, Pachuca, México.
- 1828
- 1829 Moxness, K.D., Lym, R.G., 1989. Environment and spray additive effects on picloram
1830 absorption and translocation in leafy spurge (*Euphorbia esula*). *Weed Science*,
1831 Champaign, 37, 181-186.
- 1832
- 1833 Nascimento, A.R.B.D., Farias, J.R., Bernardi, D., Horikoshi, R.J., Omoto, C., 2016. Genetic
1834 basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis
1835 inhibitor lufenuron. *Pest Manag. Sci.* 72, 810–815.
- 1836
- 1837 Nelder, J.A., Wedderburn, R.W.M., 1972. Generalized linear models. *J. R. Stat. Soc.* 135, 370
1838 - 384.
- 1839
- 1840 Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R.J., Dourado, P.M., Crivellari, A.,
1841 Carvalho, R.A., Willse, A., Martinelli, S., Head, G.P., 2016. Field-evolved resistance to
1842 Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, 72, 1727-
1843 1736.
- 1844

- 1845 Okuma, D.M., Bernardi, D., Horikoshi, R.J., Bernardi, O., Silva, A.P., & Omoto., 2018.
1846 Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance
1847 to spinosad in Brazil. *Pest Management Science*, 74, 1441-1448.
1848
- 1849 Okumura, R.S., Mariano, D. de C., Dallacort, R., Zorzenoni, T.O., Zaccheo, P.V.C., Oliveira
1850 Neto, C.F. de Conceicao., H.E.O. da, Lobato, A.K. da S., 2013. Agronomic efficiency
1851 of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize hybrids in pests control on Lucas do Rio Verde city,
1852 State of Mato Grosso, Brazil. *African Journal of Agricultural Research*, 8, 2232-2239.
1853
- 1854 Pavela, R., 2007. Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. *Pest*
1855 *Technology*. v.1, 47-52.
1856
- 1857 Petter, F. A., Segate, D., Almeida, F. A., Alcântara Neto, F., Pacheco, L. P., 2013.
1858 Incompatibilidade física de misturas entre inseticidas e fungicidas. *Comunicata Scientiae*.
1859 4, 129-138.
1860
- 1861 Pomari, A.F., Bueno, A.F., Bueno, R.C.O.F., Menezes Junior, A.O., Biological
1862 characteristics and thermal requirements of the biological control agent *Telenomus remus*
1863 (Hymenoptera: Platygasteridae) reared on eggs of different species of the genus *Spodoptera*
1864 (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*, 105, 72-81.
1865
- 1866 Pomari-Fernandes, A.A., Bueno, A.F., Bortoli, S.A., Favettid, B.M., 2018. Dispersal capacity
1867 of the egg parasitoid *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Platygasteridae) in maize and
1868 soybean crops. *Biological Control*.126, 158–168.
1869

- 1870 Prado, E.P., Araújo, D., Raetano, C.G., Dal Pogetto, M.H.F.A., Aguiar-Júnior, H.O.,
1871 Christovam, R.S., 2011. Influência da dureza e potencial hidrogeniônico da calda de
1872 pulverização sobre o controle do ácaro-da-leprose em frutos de laranja doce. *Bragantia*,
1873 Campinas, 70.389- 396.
- 1874
- 1875 Qiao, J., Zou, X., Lai, D., Yan, Y., Wang, Q., Li, W., et al., 2014. Azadirachtin blocks the
1876 calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central
1877 nervous system of *Drosophila*. *Pest Manag. Sci.* 70, 1041–1047.
- 1878
- 1879 R Core Team, 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation
1880 for Statistical Computing, Vienna, Austria
- 1881
- 1882 Reffstrup, T.K., Larsen, J.C., Meyer, O., 2010. Risk assessment of mixtures of pesticides.
1883 Current approaches and future strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56,
1884 174-192.
- 1885
- 1886 Sas Institute Inc. Statistical analysis system: getting started with the SAS learning. SAS
1887 Institute, Cary, NC. 2011.
- 1888
- 1889 Schenck, N.C., Adlerz, W.C., 1962. Compatibility of insecticides, fungicides, and foliar
1890 fertilizers on watermelon. Flórida: Florida Agricultural Experiment Station, p.209-212.
1891 (Circular)
- 1892
- 1893 Sorgatto, R. J., Bernardi, O., Omoto, C., 2015. Survival and development of *Spodoptera*
1894 *frugiperda* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt cotton and

- 1895 implications for resistance management strategies in Brazil. *Environmental Entomology*,
1896 44, 186-192.
- 1897
- 1898 Vieira, N. F., Pomari-Fernandes, A., Lemes, A. A., Vacari, A. M., DE Bortoli, S. A., DE
1899 Freitas Bueno, A., 2017. Cost of production of *Telenomus remus* (Hymenoptera:
1900 Platygasteridae) grown in natural and alternative hosts. *Journal of Economic Entomology*,
1901 110, 2724–2726.
- 1902
- 1903 Waquil, J. M., Dourado, P.M., Carvalho, R.A.D., Oliveira, W.S., Berger, G.U., Head, G.P.,
1904 Martinelli, S., 2013. Management of Lepidopteran pests in maize crop using the Bt
1905 pyramided event Cry1A. 105 and Cry2Ab2. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Rio de
1906 Janeiro, 48, 1529-1537.
- 1907
- 1908 Willmott, A. L., Cloyd, R. A., Zhu, K., 2013. Efficacy of pesticides mixtures against the
1909 western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) under laboratory and greenhouse
1910 conditions. *Journal of Economic Entomology*, 106, 247-256.
- 1911
- 1912 Wright, J.F., Lindsay, A.D., Sawyer, E., 1982. Pesticide tank mix applications: first
1913 Conference. Philadelphia: ASTM.
- 1914
- 1915 Yi, F., Zou, C., Hu, Q., Hu, M., 2012. The joint action of destruxins and botanical insecticides
1916 (rotenone, azadirachtin and paeonolum) against the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover.
1917 *Molecules* 17: 7533-7542.
- 1918
- 1919

1920 **Tabela 1.** Inseticidas sintéticos e orgânicos utilizados para avaliar a toxicidade e o
 1921 desempenho biológico de *Spodoptera frugiperda* em bioensaio de incorporação em
 1922 dieta artificial.

1923

Ingrediente ativo	Nome comercial	CL ₂₅	Grupo químico
Limonoides purificados (azadiractina + 3-tigloil-azadiractol)	Azamax [®]	0.0813	Tetranortriterpenoide
Óleo bruto de nim	Azact CE [®]	0.0306	Tetranortriterpenoide
Óleo bruto de nim	Fitoneem [®]	0.0375	Tetranortriterpenoide
Óleo bruto de nim	Agroneem [®]	0.1962	Tetranortriterpenoide
Lufenuron	Match [®]	0.0267	Benzoilureia
Metoxifenoizida	Intrepid [®]	0.0201	Diacilhidrazina
Triflumurom	Certero [®]	0.0114	Benzoilureia
Tebufenozida	Mimic [®]	0.0129	Diacilhidrazina

1924 ^aDose: g ou mL of p.c. (produto comercial) 100 L⁻¹ de água

1925

1926

1927

1928

1929

1930

1931 **Tabela 2.** Inseticidas sintéticos reguladores de crescimento (IRC) e inseticidas botânicos (IB)
 1932 em mistura utilizados para avaliar a toxicidade letal para *Spodoptera frugiperda* em bioensaio
 1933 de incorporação em dieta artificial, folha de milho e a campo.

1934

Tratamentos	IB	IB	IB	IB
IRC	Azamax [®] /Mimic [®]	Azamax [®] /Certero [®]	Azamax [®] /Match [®]	Azamax [®] /Intrepid [®]
IRC	Agroneem/Mimic [®]	Agroneem [®] /Certero [®]	Agroneem [®] /Match [®]	Agroneem [®] /Intrepid [®]
IRC	Azact [®] /Mimic [®]	Azact [®] Ce/Certero [®]	Azact [®] /Match [®]	Azact [®] / Intrepid
IRC	Fitoneem [®] /Mimic [®]	Fitonee [®] /Certero [®]	Fitoneem [®] /Match [®]	Fitonee [®] /Intrepid [®]

1935

1936

1937

1938

1939

1940

1941

1942

1943

1944

1945

1946

1947

1948

1949

1950

1951

1952

1953

1954 **Tabela 3.** Estimativa da CL_{25} (mg kg^{-1}) de diferentes inseticidas sintéticos reguladores de
 1955 crescimento e inseticidas botânicos sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* em bioensaio de
 1956 incorporação em dieta artificial, folha de milho e campo.

Ingrediente ativo	Nome comercial	CL_{25} (mg kg^{-1})
Azadiractina + 3-tigloil-azadiractol	Azamax [®]	0,0813
Azadiractina (óleo bruto)	Azact CE [®]	0,0306
Azadiractina (óleo bruto)	Fitoneem [®]	0,0375
Azadiractina (óleo bruto)	Agroneem [®]	0,1962
Lufenuron	Match [®]	0,0267
Metoxifenoazida	Intrepid [®]	0,0201
Triflumurom	Certero [®]	0,0114
Tebufenozida	Mimic [®]	0,0129

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

1965

1966

1967

1968

1969

1970

1971

1972

1973

1974 **Tabela 4.** Médias (\pm EP) do pH e da condutividade elétrica (25 °C) de caldas preparadas a
 1975 partir das misturas de quatro formulações de inseticidas botânicos à base de limonoides e
 1976 inseticidas reguladores de crescimento.

Misturas	pH	Condutividade elétrica(μ S/cm)
Controle negativo (água destilada)	5,765 \pm 0,0388 a	1,7675 \pm 0,0025 e
Agroneem [®] (isolado)	4,89 \pm 0,01291 e	10,7475 \pm 0,0125 a
Fitoneem [®] (isolado)	5,5875 \pm 0,0165b	4,895 \pm 0,0171 c
Azact [®] (isolado)	5,405 \pm 0,01554 c	3,7675 \pm 0,0085 d
Azamax [®] (isolado)	5,225 \pm 0,07089 d	6,25 \pm 0,01225 b
F	78,986	83810
gl	4, 15	4, 15
Valor de <i>p</i>	<0,0001	<0,0001
Controle negativo (água destilada)	5,765 \pm 0,0388 a	1,7675 \pm 0,0025 f
Match [®] (isolado)	5,145 \pm 0,002 c	10,420 \pm 0,005 d
Match [®] + Agroneem [®]	4,822 \pm 0,006 e	15,155 \pm 0,005 a
Match [®] + Fitoneem [®]	5,195 \pm 0,007 c	8,862 \pm 0,0009 e
Match [®] + Azact [®]	5,287 \pm 0,007 b	10,462 \pm 0,0009 c
Match [®] + Azamax [®]	4,902 \pm 0,004 d	12,155 \pm 0,001 b
F	236,23	326873
gl	5, 18	5, 18
Valor de <i>p</i>	<0,0001	<0,0001
Controle negativo (água destilada)	5,765 \pm 0,0388 b	1,7675 \pm 0,0025 f
Certero [®] (isolado)	5,957 \pm 0,010 a	7,885 \pm 0,001 e
Certero [®] + Agroneem [®]	4,907 \pm 0,004 f	16,257 \pm 0,003 a
Certero [®] + Fitoneem [®]	5,435 \pm 0,005 d	9,635 \pm 0,002 d
Certero [®] + Azact [®]	5,587 \pm 0,010 c	11,197 \pm 0,002 c
Certero [®] + Azamax [®]	5,205 \pm 0,010 e	11,765 \pm 0,001 b
F	208,60	659918
gl	5, 18	5, 18
Valor de <i>p</i>	<0,0001	<0,0001
Controle negativo (água destilada)	5,765 \pm 0,0388 b	1,7675 \pm 0,0025 f
Intrepid [®] (isolado)	6,340 \pm 0,026 a	21,192 \pm 0,004 e
Intrepid [®] + Agroneem [®]	5,255 \pm 0,015 c	26,992 \pm 0,005 a
Intrepid [®] + Fitoneem [®]	5,630 \pm 0,015 b	22,022 \pm 0,004 d
Intrepid [®] + Azact [®]	5,777 \pm 0,005 b	23,982 \pm 0,008 b
Intrepid [®] + Azamax [®]	5,752 \pm 0,016 b	23,570 \pm 0,006 c
F	54,777	461022
gl	5, 18	5, 18
Valor de <i>p</i>	<0,0001	<0,0001
Controle negativo (água destilada)	5,765 \pm 0,0388 a	1,7675 \pm 0,0025 f
Mimic [®] (isolado)	5,525 \pm 0,011 b	17,057 \pm 0,004 e
Mimic [®] + Agroneem [®]	4,907 \pm 0,009 e	25,145 \pm 0,004 a
Mimic [®] + Fitoneem [®]	5,267 \pm 0,004 c	18,512 \pm 0,004 d
Mimic [®] + Azact [®]	5,365 \pm 0,013 c	19,962 \pm 0,004 b
Mimic [®] + Azamax [®]	5,142 \pm 0,008 d	19,732 \pm 0,004 c
F	110,5	551461
gl	5, 18	5, 18
Valor de <i>p</i>	<0,0001	<0,0001

1977 ¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada grupo, indicam diferenças significativas entre
 1978 tratamentos (GLM com distribuição Gaussiana seguida por teste *post hoc* de Tukey, *p* < 0,05),
 1979
 1980

1981 **Tabela 5.** Estabilidade de calda preparadas a partir das misturas de quatro formulações de
 1982 inseticidas botânicos à base de limonoides e inseticidas reguladores de crescimento,

Misturas	Estabilidade de calda – tempo (minutos) ¹				
	0	1	5	10	30
Match [®] (isolado)	5	5	5	5	5
Match [®] + Agroneem [®]	5	5	5	5	5
Match [®] + Fitoneem [®]	5	5	5	5	5
Match [®] + Azact [®]	5	5	5	5	5
Match [®] + Azamax [®]	5	5	5	5	5
Certero [®] (isolado)	5	5	5	5	5
Certero [®] + Agroneem [®]	5	5	5	5	5
Certero [®] + Fitoneem [®]	5	5	5	5	5
Certero [®] + Azact [®]	5	5	5	5	5
Certero [®] + Azamax [®]	5	5	5	5	5
Intrepid [®] (isolado)	5	5	5	5	5
Intrepid [®] + Agroneem [®]	5	5*	5*	5*	5*
Intrepid [®] + Fitoneem [®]	5	5	5	5	5
Intrepid [®] + Azact [®]	5	5	5	5	5
Intrepid [®] + Azamax [®]	5	5	5	5	5
Mimic [®] (isolado)	5	5	5	5	5
Mimic [®] + Agroneem [®]	5	5*	5*	5*	5*
Mimic [®] + Fitoneem [®]	5	5	5	5	5
Mimic [®] + Azact [®]	5	5	5	5	5
Mimic [®] + Azamax [®]	5	5	5	5	5

1983 ¹Os valores correspondem aos graus de incompatibilidades conforme CBB, sendo * a formação de sobrenadante
 1984 (pequenas gotículas de óleo na superfície),
 1985

Tabela 6. Médias (\pm EP) da mortalidade e peso larval (7º dia) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* expostas a misturas de quatro formulações de inseticidas botânicos à base de limonoides e inseticidas reguladores de crescimento, na CL₂₅ previamente estimada, em bioensaio de ingestão sob duas formas de aplicação.

Misturas	Concentração	Aplicação em dieta artificial		Aplicação em folhas de milho	
		Mortalidade (%)	Peso larval (mg)	Mortalidade (%)	Peso larval (mg)
Controle negativo	--	5,00 \pm 1,79 c	19,70 \pm 0,58	10,00 \pm 2,54 d	23,51 \pm 0,59
Controle positivo (Premio)	CL ₉₀	100,00 \pm 0,00*	--	100,00 \pm 0,00*	--
Azamax [®] + Certero [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	95,62 \pm 1,74 a	6,5 (7)**	86,87 \pm 3,19 abc	3,29 (21)**
Azamax [®] + Intrepid [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	100,00 \pm 0,00*	--	100,00 \pm 0,00*	--
Azamax [®] + Match [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	87,50 \pm 2,50 ab	3,72 (20)**	81,25 \pm 3,10 bc	2,58 (30)**
Azamax [®] + Mimic [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	100,00 \pm 0,00*	--	91,25 \pm 2,19 a	2,29 (14)**
Azact [®] + Certero [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	95,62 \pm 1,48 a	2,57 (7)**	90,62 \pm 2,20 ab	2,08 (15)**
Azact [®] + Intrepid [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	100,00 \pm 0,00*	--	100,00 \pm 0,00*	--
Azact [®] + Match [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	86,25 \pm 2,76 ab	4,22 (22)**	84,37 \pm 2,50 abc	2,65 (24)**
Azact [®] + Mimic [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	88,75 \pm 2,53 ab	2,39 (18)**	78,75 \pm 2,53 bc	2,72 (34)**
Fitoneem [®] + Certero [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	88,12 \pm 2,67 ab	3,07 (19)**	83,75 \pm 2,76 abc	2,32 (26)**
Fitoneem [®] + Intrepid [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	100,00 \pm 0,00*	--	100,00 \pm 0,00*	--
Fitoneem [®] + Match [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	81,75 \pm 3,52 b	2,28 (29)**	75,00 \pm 4,02 c	2,85(40)**
Fitoneem [®] + Mimic [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	88,12 \pm 2,95 ab	2,12 (19)**	83,12 \pm 2,56 abc	1,90 (27)**
Agroneem [®] + Certero [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	88,75 \pm 2,53 ab	2,62 (14)**	88,12 \pm 1,76 abc	2,53 (19)**
Agroneem [®] + Intrepid [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	100,00 \pm 0,00*	--	100,00 \pm 0,00*	--
Agroneem [®] + Match [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	90,62 \pm 2,53 ab	3,27 (15)**	76,87 \pm 3,25 bc	2,42 (37)**
Agroneem [®] + Mimic [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	86,87 \pm 3,31 ab	2,19 (21)**	77,50 \pm 4,09 bc	1,86 (36)**
F		45,116	--	34,599	--
gl		11,372	--	12,403	--
Valor de p		<0,0001	--	<0,0001	--

¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre tratamentos (GLM com distribuição quasibinomial seguida por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

* Não incluído na análise (variância nula);

** Dados não analisados devido a pequena unidade amostral [valores entre parêntesis indicam o número de lagartas sobreviventes (n = 160)];

Tabela 7. Médias (\pm EP) das notas de dano [escala de Davis et al (1972) – (0-9)] causadas por lagartas de *Spodoptera frugiperda* (infestação natural) em cultivos de milho tratados com diferentes misturas de inseticidas botânicos à base de limonoides e inseticidas reguladores de crescimento (concentração CL₂₅).

Tratamentos	Concentração	0 DAT ^b	1 DAT ^b	3 DAT ^a	7 DAT ^b	10 DAT ^b	14 DAT ^b	21 DAT ^b	28 DAT ^b	35 DAT ^a
Controle negativo(água destilada)	--	3,10 \pm 0,20	3,10 \pm 0,20	3,95 \pm 0,15a	5,35 \pm 0,19a	5,82 \pm 0,15a	6,6 \pm 0,19 a	6,90 \pm 0,19 a	7,25 \pm 0,19 a	7,40 \pm 0,19 a
Intrepid [®] + Azamax [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	2,50 \pm 0,21	2,50 \pm 0,21	2,3 \pm 0,20 bc	1,62 \pm 0,18 b	1,00 \pm 0,12 d	0,87 \pm 0,11 c	1,60 \pm 0,12 c	1,50 \pm 0,12 c	1,97 \pm 0,14 c
Intrepid [®] + Azact [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	2,40 \pm 0,23	2,40 \pm 0,23	2,02 \pm 0,22 c	1,22 \pm 0,20 b	1,12 \pm 0,17 d	1,00 \pm 0,17 c	1,77 \pm 0,19 c	1,77 \pm 0,19 c	2,67 \pm 0,19 c
Intrepid [®] + Agroneem [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	2,70 \pm 0,20	2,70 \pm 0,20	3,72 \pm 0,14 a	4,22 \pm 0,16 a	4,65 \pm 0,17 b	4,82 \pm 0,18 b	5,17 \pm 0,17 b	5,32 \pm 0,16 b	5,40 \pm 0,16 b
Intrepid [®] + Fitoneem [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	2,90 \pm 0,18	2,90 \pm 0,18	3,52 \pm 0,13 ab	4,42 \pm 0,21 a	5,30 \pm 0,24 ab	5,45 \pm 0,21 b	5,92 \pm 0,23 a	6,05 \pm 0,21 b	6,12 \pm 0,21 b
Mimic [®] + Azamax [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	2,67 \pm 0,19	2,67 \pm 0,19	2,12 \pm 0,13 c	1,45 \pm 0,14 b	2,10 \pm 0,18 c	2,62 \pm 0,19 c	2,67 \pm 0,18 c	2,77 \pm 0,20 c	3,07 \pm 0,19 c
Certero [®] + Azact [®]	CL ₂₅ + CL ₂₅	2,67 \pm 0,19	2,67 \pm 0,19	2,82 \pm 0,17 abc	2,00 \pm 0,22 b	2,00 \pm 0,22 c	2,00 \pm 0,21 c	2,45 \pm 0,20 c	2,75 \pm 0,24 c	3,00 \pm 0,25 c
F	--	0,8134 ^{ns}	0,8134 ^{ns}	7,2174	37,594	85,862	79,673	71,542	72,871	47,247
gl	--	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21
Valor de p	--	0,5714	0,5714	0,00027	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre tratamentos (GLM com distribuição Gaussiana seguida por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$),

^{ns} = Não significativo,

2 Considerações Finais

A agricultura enfrenta muitos desafios, incluindo mudanças climáticas, perda de biodiversidade e demanda cada vez maior por alimentos mais saudáveis e seguros. Em resposta a esses desafios, um volume crescente de informações está sendo gerado para fornecer aos sistemas agrícolas a possibilidade de produção de produtos diferenciados e em compatibilidade com os ecossistemas. Atualmente, um dos grandes desafios da agricultura, está relacionado ao manejo de *S. frugiperda*, considerada o inseto-praga de maior importância agrícola do País, principalmente, para os cultivos de milho, soja e algodão. Este fato está relacionado principalmente a evolução da resistência da praga a diferentes inseticidas sintéticos e plantas *Bt*.

Sendo assim, a busca por alternativas de manejo está cada vez mais frequentes. No presente estudo, ficou evidente que inseticidas reguladores de crescimento de insetos (IRCs) de origem sintética ou natural podem desempenhar um papel importante no manejo de *S. frugiperda*, principalmente, porque apresentam um modo de ação diferente dos inseticidas tradicionalmente utilizados no campo. Este ponto favorecerá o manejo de populações resistentes da praga a campo.

Aliado a isso, avaliando-se diferentes formulações de produtos a base de nim, foi observado que o composto azadiractina e 3-tigloilazadiractol é o componente majoritário de maior expressão em formulações comerciais de nim. Este composto, associado com elementos minoritários das formulações proporcionou elevada toxicidade sobre lagartas de *S. frugiperda*, quando utilizado de forma isolada ou associado com inseticidas sintéticos pertencentes aos reguladores de crescimento. Este efeito sinérgico e/ou aditivo ocorreu devido a compatibilidade física e química dos produtos quando utilizados em mistura nas preparações das caldas. Fato que elevou a toxicidade sobre lagartas de *S. frugiperda* em bioensaios de laboratório e campo. Além do mais, a utilização de concentrações menores dos produtos em mistura (valores com base na CL_{25}), acarretou em elevado efeito subletal em lagartas de *S. frugiperda* após a ingestão, proporcionando efeitos negativos no crescimento populacional da espécie na geração avaliada. Dentro deste contexto, inseticidas reguladores de crescimento de insetos tanto de origem

sintética quanto de origem natural podem desempenhar um papel importante no manejo de *S. frugiperda*, tornando-se uma alternativa sustentável e ecologicamente correta.

Referências

ANBALAGAN, S.K.; KATHIRVELU, B.; AJITH, J.; SAVARIOR, V. Geographic variation in cypermethrin insecticide resistance and morphometry in *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Coastal Life Medicine**, v.2, p. 225-229, 2014.

ANDRADES, T. O.; GANIMI, R. N. Revolução Verde e a apropriação capitalista, **CES Revista**, v. 21, p. 43-56, 2007.

ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE 2021. Disponível em: <https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=200>. Acesso em: 06 de junho de 2021 às 19:27.

BARROS, E.M.; TORRES, J.B.;BUENO, A.F. Oviposition, development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J, E, Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different hosts of economic importance, **Neotropical Entomology**. Londrina, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010.

BHAN, S.; MOHAN, L.; SRIVASTAVA, C.N. Efficacy of *Cuscuta reflexa* extract and its synergistic activity with temephos against mosquito larvae. **International Journal of Mosquito Research**, v.2, p. 34-41, 2015.

BOLZAN, A.; PADOVEZ, F.E.O.; NASCIMENTO, A.R.B.; KAISER, I.S.; LIRA, E.C.; AMARAL, F.S.A.; KANNO, H.K.; MALAQUIAS, J.B.; OMOTO, C. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, v. 10, n.1002, p. 53-76, 2019.

BOTTOM, M.; CARBONARI, J. J.; GARCIA, M. S.; MARTINS, J. F. da S. Preferência alimentar e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 207-212, 1998.

BRAHMACHARI, G. Neem – an omnipotent plant: a retrospection. **ChemBiochem**. V. 5, p. 408-421, 2004.

BUENO, A. F.; PANIZZI, A. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; GAZZONI, D.L.; HIROSE, E.; MOSCADI, F.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L.J.; ROGGIA, S. Histórico e evolução do manejo integrado de pragas da soja no Brasil. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Embrapa, Brasília. 859 p. 2012.

CABODEVILLA, O.; IBAÑEZ, I.; SIMÓN, O.; MURILLO, R.; CABALLERO, P.; WILLIAMS, T. Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleo polyhedrovirus. **Biological Control**, v.5, p.184-192, 2011.

CAMPOS, A.P.; BOIÇA JÚNIOR, A.L. Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) submetidas a diferentes concentrações de óleo de nim. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n.2, p.137-144, 2012.

CAMPOS, E.V.R.; OLIVEIRA, J.L.; PASCOLI, M.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Neem oil and crop protection: from now to the future. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.1–8, 2016.

CARVALHO, R. A. OMOTO, C.; FIELD, L. M.; WILLIAMSON, M. S.; BAS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Plos One**, v. 8, p. 0062268, 2013.

CORTEZ, M.G.R.; WAQUIL J. M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* no rendimento do sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. Londrina, v. 26, n. 2, p. 407-410, 1998.

CLOYD, R.A. Pesticide Mixtures. In: Stoytcheva M (Ed.) Pesticides - Formulations, Effects, Fate. **Rijeka: IntechOpen**, p. 69-80, 2011.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; SILVA, R. B.; SILVA, I. F.; PAULA, C. S.; FOSTER, J. E. Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in maize. **International Journal of Pest Management**, p. 83-90, 2012.

DAYAN, F.E.; CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O. Natural products in crop protection. **Bioorganic and Medical Chemistry**, v.17, p. 4022-4034, 2009.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/45173700/DiarioOficialdaUniao. Acesso em: 07 de julho de 2021, às 19:54.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, v.30, n.2, p.311-316, 2001.

DUARTE, J.P.; REDAELLI, L.R.; JAHNKE, S.M.; TRAPP, S. Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) oil on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and adults. **Florida Entomologist**, v.102, p. 408-412, 2019.

DUARTE, J.P.; REDAELLI, L.R.; SILVA, C.E.; JAHNKE, S.M. Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) Oil on the Immune System of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Immatures. **Journal of Insect Science**, v.20, n. 3, 2020.

FATORETTO, J. C.; MICHEL, A.P.; SILVA FILHO, M. C.; SILVA, N. Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrate Pest Management**, v. 8, p.1-10, 2017.

GANDINI, E. M. M.; COSTA, E. S. P.; SANTOS, J.B.; SOARES, M. A.; BARROSO, G. M.; CORRÊA, J. M.; CARVALHO, A. M.; ZANUNCIO, J. C. Compatibility of pesticides and or fertilizers in tank mixtures. **Journal of Cleaner Production**, v. 268, p.122-152, 2020.

GAZZIERO, D. L. P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil, **Planta Daninha**, v.33, p.83-92, 2015.

GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods, In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. ed: **Pest resistance to pesticides**: challenges and prospects. New York: Plenum Press, p. 769-792, 1983.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R.C.R.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de Extratos de Meliáceas Sobre o Parasitóide de Ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 607-610, 2004.

GUIMARÃES, G. L. Principais fatores comerciais condicionantes da disponibilidade de produtos isolados e em misturas. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS**, 29. Gramado. A ciência das plantas daninhas em clima de mudança, 2014.

HOHMANN, C.L.; SILVA, F.A.C.; NOVAES, T.G. Selectivity of Neem to *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogrammatoidea annulata* De Santis (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v.39 p.985-990, 2010.

HONG, T.; QI, S.; ZHOU, X.; BAI, L. Field resistance of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to organophosphates, pyrethroids, carbamates and four newer chemistry insecticides in Hunan, China. **Journal of Pest Science**, v.86, p. 599-609, 2013.

KRAUSE, N.D. Necessidades tecnológicas relacionadas a novos ingredientes ativos, formulações e da prática da realização de misturas de agrotóxicos, In: **CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS**, 2014.

LIMA, M.P.L.; OLIVEIRA, J.V.; GONDIM, J.R.M.G.C.; MARQUES, E.J.; CORREIA, A.A. 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** v.34, p.1381-1389, 2010.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: An update. **Journal of Insect Physiology** v. 39, p.903-924, 1993.

NASCIMENTO, A.R.B.; 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.

OLIVEIRA, R.C.; PRATISSOLI, D.; BUENO, A.F. Efeito de *Azadirachata indica* (NIM) sobre o parasitismo de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Revista Ecosystema**, v. 28, p.75-78, 2003.

RAFFA, K.F.; PRIESTER, T.M. Synergists as research tools and control agents in agriculture. **Journal of Agricultural Entomology**, v.2, p. 27-45, 1985.

RANGEL, L.E.P. Defesa agropecuária perdas e danos para o agronegócio. **Agroanalysis**, 2015.

REFSTRUP, T.K.; LARSEN, J.C.; MEYER, O. Risk assessment of mixtures of pesticides, Current approaches and future strategies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.56, p.174-192, 2010.

- ROEL, A.R.; DOURADO, D.M.; MATIAS, R.; PORTO, K.R.A.; BEDNASKI, A.V.; COSTA, R.B. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.54, p. 505-510, 2010.
- SANTOS, W.J.; SANTOS, K.B.; SANTOS, R.B. Ocorrência, descrição e hábitos de *Spodoptera* spp. em algodoeiro no Brasil. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO**, p.5, 2003.
- SERRA, L. S.; MENDES, M. R. F.; SOARES, M. V. A.; MONTEIRO, I. P. Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. **Revista Científica do Centro de Estudos em Desenvolvimento Sustentável da UNDB**, v. 1, n.4, 2016.
- SCHREINER, V. C.; SZÖCS, E.; BHOWMIK, A. K.; VIJVER, M. G.; RALF, B.; SCHÄFER, R.B. Pesticide mixtures in streams of several European countries and the USA. **Science of the Total Environment**, v. 573, p.680-689, 2016.
- SIRVI, S.L.; JAT, A.L.; CHOUDHARY, H.R.; JAT, N.; TIWARI, V.K.; SINGH, N. Compatibility of bioagents with chemical pesticides: an innovative approach in insect-pest management. **Popular Kheti**, v.1, p.62-67, 2013.
- PAVELA, R. Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. **Pest Technology** v.1, p. 47-52, 2007.
- PETTER, F. A.; SEGATE, D.; ALMEIDA, F. A.; ALCÂNTARA NETO, F.; PACHECO, L. P. Incompatibilidade física de misturas entre inseticidas e fungicidas, **Comunicata Scientiae**, v.4, p.129-138, 2013.
- POMARI, A.F.; BUENO, A.F.; BUENO, R.C.O.F.; MENEZES JUNIOR, A.O. Biological characteristics and thermal requirements of the biological control agent *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae) reared on eggs of different species of the genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of Entomological Society of America**, v. 105, n.1, p.72-81, 2012.

QIAO, J.; ZOU, X.; LAI, D.; YAN, Y.; WANG, Q.; LI, W. Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*. **Pest Management Science** v. 70, p. 1041–1047, 2014.

QUEIROZ, A.A.; MARTINS, J. A. S.; CUNHA, J. P. A. R. Adjuvantes e qualidade da água na aplicação de agrotóxicos, **Bioscience Journal**, v. 24, n. 4, p. 8-19, 2008.

TAKAHASHI, M.K.; NAKANO, O.; OSI, J.R. Avaliação de danos causados por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultura de trigo. **Solo**, v. 72, p. 43-44, 1980.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v.144, p.31-43, 2006.

OKUMA, D. M.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; SILVA, A. P.; OMOTO, C. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, v. 74, p. 1441-1448, 2018.

POMARI-FERNANDES, A. A.; BUENOB, A.F.; BORTOLIC, S.A.; FAVETTID, B.M. Dispersal capacity of the egg parasitoid *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Platygasteridae) in maize and soybean crops. **Biological Control** v.126, p.158-168, 2018.

VALADARES, A.; ALVES, F.; GALIZA, M. O crescimento do uso de agrotóxicos: uma análise descritiva dos resultados do censo agropecuário 2017. **IPEA instituto de pesquisa econômica aplicada**, n.65, 2020.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T. Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*. **Bragantia**, v. 62, p. 69-74, 2003.

VIEIRA, N. F.; POMARI-FERNANDES, A.; LEMES, A. A.; VACARI, A. M.; DE BORTOLI, S. A.; DE FREITAS BUENO, A. Cost of production of *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae) grown in natural and alternative hosts, **Journal of Economic Entomology**, v.110, n.6, p. 2724-2726, 2017.