

ROSEMARY SEGISTAN CORDOVA

**AÇÃO DO DIFLUOROBENZON NO POTENCIAL REPRODUTIVO E NO  
PROCESSO DA MUDA LARVAL DE *Spdoptera frugiperda*  
(Smith & Abbot, 1797) (Lep., Noctuidae).**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Entomologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

CURITIBA

1983

AÇÃO DO DIFLUOROBENZON NO POTENCIAL REPRODUTIVO E  
NO PROCESSO DA MUDA LARVAL DE SPODOPTERA FRUGIPERDA •  
(SMITH & ABBOT, 1797) (LEP., NOCTUIDAE)

por

*Rosemary S. Segistân Cordova*

Rosemary Segistân Cordova

*Curitiba 10 mar/83.*

Tese apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Entomologia, da Univer-  
sidade Federal do Paraná, para obten-  
ção do grau de Doutor em Ciências.

CURITIBA

1983

Ao meu Pai e irmãos,  
com todo o meu carinho.

Quanto mais alguém se recolher em si mesmo, e se tornar simples de coração, tanto mais e maiores coisas entenderã sem esforço, porque do alto recebe a luz da inteligência.

R. Segistã

## ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	...	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	...	8
2.1	Ação letal do difluorobenzon e sua influência sobre o potencial reprodutivo dos insetos	...	8
2.2	Muda larval	...	9
2.3	Ação do difluorobenzon e seus análogos sobre a muda larval	...	11
2.3.1	Larvas de <i>Spodoptera</i> spp.	...	11
2.3.2	Ação letal do difluorobenzon em outros insetos	...	12
2.3.3	Ação inibidora do difluorobenzon	...	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	...	16
3.1	Criação massal de <i>Spodoptera frugiperda</i>	...	16
3.2	Caracterização do difluorobenzon	...	17
3.3	Sobrevivência durante o desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> e avaliação do seu potencial de reprodução	...	17
3.4	Microscopia óptica	...	18
3.5	Microscopia eletrônica	...	19
3.6	Análise estatística	...	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	...	21
4.1	Sobrevivência durante o desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i>	...	21
4.2	Avaliação do potencial reprodutivo de <i>Spodoptera frugiperda</i>	...	22
4.3	Microscopia óptica	...	25
4.4	Microscopia eletrônica	...	26
4.4.1	Muda da larva normal	...	26
4.4.2	Muda da larva tratada	...	32
	CONCLUSÕES	...	39
	RESUMO	...	40
	SUMMARY	...	41
	AGRADECIMENTOS	...	42
	BIBLIOGRAFIA	...	43
	APÊNDICES	...	47

## 1 INTRODUÇÃO

Na Tese de Mestrado apresentada pela Autora, foi constatado que o difluorobenzon adicionado à dieta das larvas de *Spodoptera frugiperda*, em vários instares e a diferentes concentrações, provocava distúrbios nos processos das mudas larvais, na passagem do estado de larva para o de pupa e do de pupa para o adulto. Estes processos não se completavam numa determinada porcentagem de indivíduos, sobrevivendo sua morte, podendo observar-se nas Figs. 1-4 todas as anomalias verificadas na muda larval e nas metamorfoses de larva para pupa e de pupa para adulto, como consequência dos tratamentos realizados no estado de larva. As alterações morfológicas constatadas nos diferentes estágios do seu desenvolvimento foram:

- Larvas com muda parcialmente completa, porém a cápsula cefálica velha ou a pele dos segmentos abdominais continuavam aderentes;
- Produção de pupas e de adultos anormais.

Estes resultados incentivaram a Autora a investigar a ação letal do difluorobenzon sobre as larvas de *S. frugiperda* tratadas em várias idades, a influência desse tratamento sobre o potencial reprodutivo dos adultos resultantes e as alterações que ocorrem no tegumento das larvas, utilizando para tanto a microscopia óptica e a eletrônica, pesquisa essa que constitui a sua Tese de Doutorado.

15 x

Fig. 1. Larva tratada de *Spodoptera frugiperda* no 5º instar (11 dias de idade), logo após a morte, durante a muda para o 6º instar.

10 x

Fig. 2. Aspecto da larva tratada de *Spodoptera frugiperda*, na muda do 5º para o 6º instar, mas cujo processo se realizou só até o 2º segmento torácico.

15 x

Fig. 3. Anomalias verificadas na passagem de pupa para adulto, podendo observar-se a existência de olhos compostos, aparelho bucal, 1º par anterior de patas e as antenas, quando as larvas foram tratadas no 6º instar.

10 x

Fig. 4. Adulto anormal de *Spodoptera frugiperda*. Vista ventral, para mostrar a não formação das asas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AÇÃO LETAL DO DIFLUOROBENZON E SUA INFLUÊNCIA SOBRE O POTENCIAL REPRODUTIVO DOS INSETOS

Analisando a bibliografia, pode observar-se que o difluorobenzon tem mostrado boas características como esterilizante, especialmente para coleópteros e dípteros, porém no que se refere a lepidópteros, as referências bibliográficas são escassas.

Moore & Taft (1975); Taft & Hopkins (1975); McLaughlin (1976), Ganyard *et al.* (1977); Lloyd *et al.* (1977); Oliver *et al.* (1977); Villavaso *et al.* (1977) e Earle *et al.* (1979), trabalhando com *Anthonomus grandis* (Col., Curculionidae), constataram que a viabilidade dos ovos foi reduzida quando se acasalaram fêmeas normais com machos tratados com difluorobenzon, pois estes apresentaram incoordenação de movimentos, que se refletiam numa penetração parcial do edeago, provocando uma menor transferência de esperma.

Schroeder *et al.* (1976) testaram o efeito ovicida do difluorobenzon nos ovos de *Diaprepes abbreviatus* (Col., Curculionidae), tendo havido uma redução na porcentagem de ovos férteis de 71 para 15%. Schroeder & Sutton (1978), trabalhando com a mesma espécie, constataram que o tratamento com difluorobenzon, 25% PM, reduziu o potencial de reprodução desta espécie durante quatro semanas após o tratamento.

Por outro lado, Calkins *et al.* (1977) trabalharam com *Conotrachelus nenuphar* (Col., Curculionidae) e constataram que a ingestão do produto não impede o acasalamento e a oviposição, mas reduz o número de larvas que atingem o último instar, em todos os tratamentos, durante os primeiros seis dias de oviposição. A razão de sexos determinada foi de 1:1, a qual indica que o produto afeta ambos os sexos de igual modo.

Wright & Harris (1976); Kunz *et al.* (1977); Pickens & De Milo (1977) e Ivie & Wright (1978) testaram o difluorobenzon nas espécies *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*, *Musca autumnalis* e *Musca domestica*, respectivamente, tendo observado que o produto afeta a eclosão e o desenvolvimento das larvas, não se verificando, praticamente, a emergência de adultos durante quatro semanas após o tratamento; a porcentagem

de ovos estereis variou entre 60 e 100%, quando o difluorobenzon foi adicionado à dieta.

Quanto às espécies da ordem Lepidoptera, Robbins *et al.* (1968), trabalhando com espécies como a *Manduca sexta* e a *Bombyx mori*, verificaram que as ecdisonas sintéticas inibem o desenvolvimento do ovário e a produção de ovos, sugerindo que têm um efeito antagônico à atividade gonadotrófica.

Nowock (1973), estudando os processos morfogenéticos pelos quais passam os testis de *Ephestia kuhniella*, encontrou que a ecdisona é um estímulo necessário para o início do processo de fusão do par de testis na larva do 6º instar e de torsão, sendo também responsável pela diferenciação imaginal dos vasos eferentes e deferentes. Em comparação com a fusão, o desenvolvimento do ducto seminal requer uma exposição prolongada à ecdisona.

Chippendale & Alexander (1973) estudaram a espermatogênese em *Diatraea grandiosella* (Lep., Pyralidae) e encontraram que os folículos continham células em todas as etapas de diferenciação espermiogênética antes de a larva se transformar em pupa.

Milo *et al.* (1978) testaram 26 análogos do difluorobenzon utilizando a espécie *S. frugiperda*, tendo verificado que os produtos mais eficazes foram N-5-cloro-2-piridinil amino carbonil-2,6-difluorobenzamida e N-5-bromo-2-piridinil amino carbonil-2,6-difluorobenzamida, ambos com ação comparável à do difluorobenzon.

No trabalho de Segistân (1980) foi constatado que o difluorobenzon administrado a larvas de *S. frugiperda*, através da dieta, provocava a morte dos indivíduos tratados nos estados larval e pupal, como consequência da dose utilizada e da quantidade de alimento ingerido; o potencial reprodutivo dos adultos emergentes foi afetado, em maior ou menor grau, de acordo com a idade da larva e a quantidade de difluorobenzon ingerido no período de alimentação.

## 2.2 MUDA LARVAL

O desenvolvimento do inseto, que é devido à ocorrência das mudas larvais (substituição da cutícula) e das metamorfoses (larva-pupa e pupa-adulto), é regulado pela presença ou ausência de determinadas secreções internas, conhecidas por hormônios, que são a ecdisiotropina, a ecdisona e o hormônio juvenil (Fig. 5).

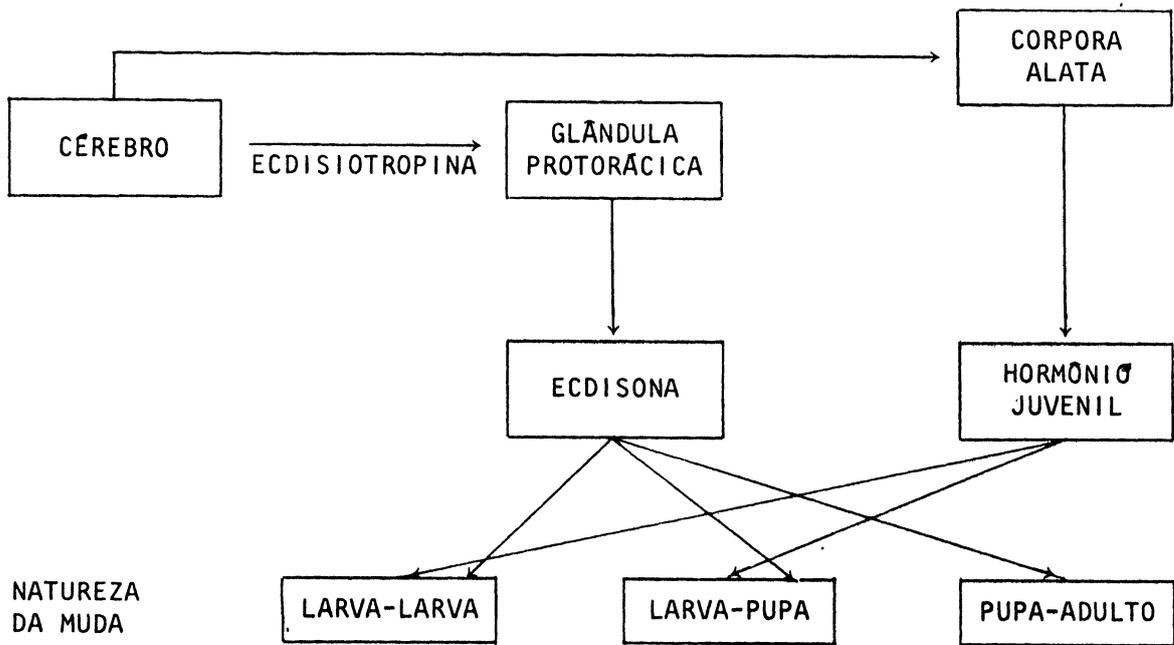


Fig. 5. Esquema clássico da interação da ecdisiotropina, ecdisona e o hormônio juvenil na regulação da muda nos insetos (Richards, 1981).

A substituição da cutícula faz-se por meio de dois processos distintos, os quais estão amplamente separados no tempo. O primeiro processo é a apólise, que consiste na separação da cutícula velha das células epidermais subjacentes; o segundo processo, a ecdise, promove a liberação da cutícula velha remanescente (Jenkin & Hinton, 1966).

Kuhn & Piepho (1938)<sup>1</sup> constataram que esse processo não ocorre simultaneamente em todo o corpo, iniciando-se a partir da região cefálica para a região posterior.

Segundo Way (1950), não é possível registrar todos os processos que ocorrem nesse mecanismo, devido à sua rapidez, principalmente nas 12 horas que precedem a muda. O primeiro sinal visível da muda ocorre cerca de 6-12 horas depois de ter cessado a alimentação, quando a divisão celular se inicia na epiderme, aparentemente ao acaso. Durante esse período, as células epidermais tornam-se alongadas, não têm tamanho definido e a parede celular começa a ter dificuldades de ser evidenciada.

<sup>1</sup> Citados por Way (1950).

A subcutícula produz o fluido da muda com suas enzimas, para a digestão da velha cutícula e reabsorção desse mesmo fluido (Taylor & Richards, 1965).

O retículo endoplasmático granular está distribuído nas células epidermais, e algumas vesículas secretoras, com conteúdo denso, estão associadas com o complexo de Golgi (Locke, 1969).

A formação de cuticulina e de proteína epicuticular ocorre 12 horas antes da ecdise em *Calpodes ethlius* (Locke, 1969).

A membrana plasmática apical torna-se mais rica em microvilos, tomando finalmente a forma típica para a deposição da cutícula lamelar. O espaço que fica entre a membrana plasmática e a epicutícula é parcialmente ocupado por microfibras que surgem desde o denso ápice dos microvilos. Pouco depois, as fibras se ordenam paralelamente, originando a endocutícula lamelar; durante esse período já não se observam as vesículas secretoras (Locke, 1969).

## 2.3 AÇÃO DO DIFLUOROBENZON E SEUS ANÁLOGOS SOBRE A MUDA LARVAL

### 2.3.1 Larvas de *Spodoptera* spp.

Ascher & Nemny (1976) demonstraram a atividade inibidora do difluorobenzon e do PH 6038<sup>1</sup> na síntese de quitina das larvas de *Spodoptera littoralis*, por ingestão de alfafa tratada ou por injeção nas larvas. O difluorobenzon foi mais eficaz do que o PH 6038, por ingestão, mas era necessário que as larvas se alimentassem pelo menos durante dois dias sobre a alfafa, para que ocorresse a formação de pupas anormais e a não emergência de adultos.

Estes mesmos autores testaram o difluorobenzon, a várias concentrações e com diferentes tempos de exposição, em larvas de *S. littoralis* com diferentes pesos, e constataram que a morte, durante o desenvolvimento, se processava tanto mais cedo quanto menor era o peso das larvas, na altura do tratamento.

Segistân (1980) realizou experimentos, no laboratório, para avaliação da ação do difluorobenzon no desenvolvimento larval de *S. frugiperda*, em que foram utilizadas larvas neonatas (0-24 horas de idade), do

<sup>1</sup>PH 6038: 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-diclorobenzoil) urea.

3º instar (5 dias de idade), do 5º instar (10 e 11 dias de idade) e do 6º instar (12 dias de idade), utilizando as concentrações de 2 ppm, 1 ppm, 0,5 ppm, 0,25 ppm, 0,125 ppm e 0,0625 ppm, as primeiras cinco para o 5º e o 6º instares e as últimas cinco para o 1º e o 3º instares. Os resultados obtidos mostraram que, para as mesmas concentrações de difluorobenzon, o 5º instar foi o mais susceptível; esta maior susceptibilidade deverá ser uma consequência da maior voracidade das larvas neste instar.

### 2.3.2 Ação letal do difluorobenzon em outros insetos

Mulder & Gijswijt (1973) avaliaram a atividade do PH 6038 e do PH 6040, utilizando suspensões de 10.000 e 1.000 ppm, respectivamente, para tratar larvas do 3º instar de *Pieris brassicae* e de *Leptinotarsa decemlineata*, e, também, adultos da segunda espécie. No caso das larvas de *P. brassicae*, estas pareciam não ter sido afetadas até o momento em que se iniciava a muda, mas na altura do processo as larvas não perdiam a pele, começando a perder fluido, escureciam gradualmente e, finalmente, morriam. Quando a morte ocorria nos últimos instares das larvas de *P. brassicae*, estas apresentavam sintomas similares aos dos outros instares, mas nas concentrações mais elevadas não havia formação de pupas, ou estas possuíam características larvais.

O PH 6038 provocou 100% de mortalidade nas larvas do 3º instar na concentração de 10 ppm.

Wellington *et al.* (1973) estudaram a ação do composto 1-(2,6-difluorobenzoil)-3-fenil urea sobre larvas de *P. brassicae*, de *Aedes aegypti* e de *Leptinotarsa decemlineata*, tendo usado este produto nas concentrações de 0,03 ppm a 100 ppm.

Granett & Dunbar (1975) trataram larvas do 3º instar de *Portheria dispar* (Lep., Lymantriidae) com difluorobenzon, tendo observado, durante o seu desenvolvimento, larvas com muda completa e capazes de se alimentar e larvas que apresentavam muda completa mas eram incapazes de se alimentar; larvas com muda parcial, porém a cápsula cefálica antiga ou a pele dos últimos segmentos abdominais ficavam aderentes; e outras larvas que iniciavam a muda por um fraccionamento ou ruptura da cutícula, particularmente no tórax ou nos primeiros segmentos abdominais, mas morriam antes de se completar a muda.

A partir destas observações, concluíram que o difluorobenzon foi altamente eficaz contra *P. dispar*, recomendando o seu uso em programas de controle contra esta espécie.

Campbell & Wright (1976) provaram a eficácia do difluorobenzon no controle de *Stomoxys calcitrans* (Dip., Muscidae), em áreas de criação.

Segundo Mulla *et al.* (1976), não se verificou a emergência dos adultos de *Chironomus* sp., de *Tanytarsus* sp. e de *Procladius* sp. (Dip., Chironomidae) quando se aplicaram 110 g de princípio ativo/hectare.

Neisses *et al.* (1976) encontraram reduções significativas na população larval de *Orgyia pseudotsugata* (Lep., Lymantriidae), aplicando 280 gramas de princípio ativo por hectare.

Flint & Smith (1977), trabalhando com larvas do 5º instar de *Pectinophora gossypiella* (Lep., Gelechiidae) e usando várias concentrações de difluorobenzon, constataram que a porcentagem de emergência de adultos ia aumentando quando a concentração de difluorobenzon ia diminuindo. Estes resultados demonstraram que o difluorobenzon provocava uma diminuição da população de *P. gossypiella* quando era administrado na dieta larval a uma concentração de 1 ppm.

Wolfenbarger *et al.* (1977) utilizaram larvas de 10, 11 e 12 dias de idade de *Heliothis virescens* (Lep., Noctuidae) e submeteram-nas à ação de diferentes concentrações de difluorobenzon. As larvas de 10 e de 11 dias de idade, submetidas a uma concentração de 100 ppm de difluorobenzon, apresentaram uma mortalidade larval de 86 a 100%, sem emergência de adultos; as larvas de 12 dias de idade foram expostas à mesma concentração de difluorobenzon, tendo-se verificado uma mortalidade de apenas 10 a 17%, mas a porcentagem de pupas e de adultos obtidos foi semelhante à da testemunha.

Anderson & Elliott (1982) usaram o difluorobenzon a uma concentração de 187 ppm, logrando controlar as larvas de *Laspeyresia pomonella* (Lep., Olethreutidae).

### 2.3.3 Ação inibidora do difluorobenzon

Post *et al.* (1974) investigaram o modo de ação de 1-(2,6-dicloro benzoil)-3-fenil urea, estudando a microauto-radiografia da incorporação da glicose, da tirosina e da prolina na endocutícula da larva do 5º instar de *P. brassicae*. Esse trabalho indicou que esse composto bloqueia a síntese da quitina cuticular.

Yu & Terriere (1975), alimentando *Musca domestica* com uma dieta que continha 1,7 e 16,7 ppm de difluorobenzon e de PH 6038, respectivamente, durante dois dias, estudaram o efeito das enzimas que metabolizam a  $\beta$  ecdisona. Nenhum dos indivíduos tratados foi capaz de completar a mu-

da quando foi alimentado com a dieta contendo a concentração maior (16,7 ppm); verificaram uma aceleração na transferência de quitinsintetase, desde as células epidermais até à endocutícula, devido ao fato de que o difluorobenzon e seus análogos causam uma acumulação de  $\beta$  ecdisona, na larva tratada.

Ker (1977), utilizando a espécie *Schistocerca gregaria* (Orthop., Gryllidae), verificou, entre as alterações causadas pelo difluorobenzon, a redução quantitativa e qualitativa da quitina, produzindo um efeito secundário na estrutura endocuticular, pois este produto é inibidor competitivo da quitinsintetase.

Mitlin *et al.* (1977) estudaram a inibição da síntese do DNA (ácido deoxirribonucléico) em *Anthonomus grandis*, quando tratados com difluorobenzon, tendo constatado, em ambos os sexos, a diminuição da incorporação de timidina radioativa dentro da fração de ácido nucléico, indicando que esta substância inibe a síntese do mesmo porque a timidina é especificamente um precursor do DNA.

Yu & Terriere (1977), trabalhando com o difluorobenzon em *Musca domestica*, *Sarcophaga bullata* e *Phormia regina*, encontraram uma correlação entre a inibição no metabolismo da ecdisona e a redução na metamorfose de pupa para adulto.

Deul *et al.* (1978), trabalhando com larvas do 5º instar de *P. brassicae*, observaram que os indivíduos que constituem a testemunha podem incorporar glucose radioativa dentro da quitina cuticular quando a atividade da enzima quitinase aumenta consideravelmente, mas nas larvas tratadas com difluorobenzon, ou outro análogo, constata-se quase uma completa inibição desta incorporação, devido à inatividade da enzima (Fig. 6).

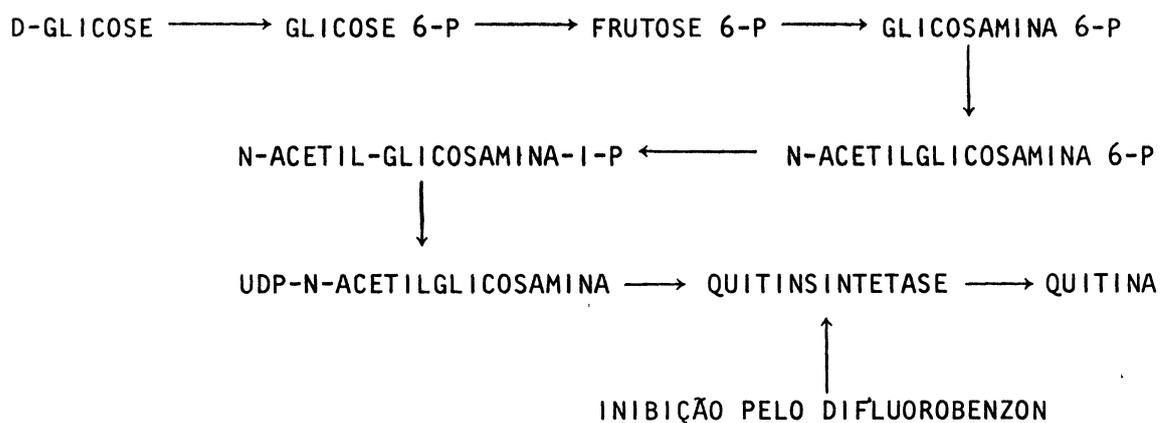


Fig. 6. Síntese da quitina a partir da D-glicose (Deul *et al.*, 1978).

Estes mesmos autores, estudando um dos análogos do difluorobenzon, o DU 19111,<sup>1</sup> em larvas de *Pieris brassicae*, demonstraram que a morte larval na muda, após o tratamento, resulta na inibição aparente do ciclo da pentose.

Hajjar & Casida (1978) constataram que o difluorobenzon também causa uma deficiência do hormônio juvenil e estimula a formação prematura das enzimas DOPA decarboxilasa e a fenoloxidasa, que posteriormente produziram o escurecimento prematuro da pele da larva tratada. (Fig. 2)

<sup>1</sup>DU 19111: 1-(2,6-diclorobenzoil)-3-(3,4-diclorofenil) urea.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CRIAÇÃO MASSAL DE *Spodoptera frugiperda*

Para poder realizar esta pesquisa foi necessário fazer uma criação massal de *Spodoptera frugiperda*, a qual foi iniciada com larvas enviadas pelo Prof. Doutor José Roberto Postalí Parra, do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, SP. As larvas foram mantidas, nos mesmos tubos de ensaio, com dieta artificial, tal como foram recebidas, até a sua transformação em pupas, as quais se transferiram para frascos de plástico (3,8 cm de diâmetro por 7,1 cm de altura) providos de tampa perfurada para o arejamento, tendo na parte inferior um pedaço de papel de filtro cortado em círculo e embebido em água, para manter a umidade ideal, tendo sido feita a sua sexagem.

Após a emergência dos adultos, formavam-se os casais, que eram colocados isoladamente em recipientes de plástico (11 cm de comprimento por 9 cm de largura e 5,5 cm de altura), providos de tampa plástica, perfurada, para o arejamento.

A alimentação dos adultos era constituída por uma solução de mel com água, na proporção de 1:1, na qual era embebido um algodão, colocado na tampa plástica; a dieta era trocada diariamente, para evitar o aparecimento de fungos. As caixas de plástico onde eram colocados os casais foram forradas com papel sulfite branco, sobre o qual as fêmeas realizavam as posturas, normalmente durante a noite. Todos os dias, pela manhã, as posturas eram recolhidas e o papel trocado.

Todos os experimentos, incluindo a criação massal, foram realizados em câmara climatizada à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12 horas.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DO DIFLUOROBENZON

Difluorobenzon é o nome comum para 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil) urea, que foi sintetizado por Philips-Duphar B.V., nos Países Baixos, e desenvolvido pela Thompson-Hayward Chemical Company, nos Estados Unidos da América, cuja marca comercial é Dimilin. A formulação usada nos ensaios foi pó molhável, contendo 25% do princípio ativo.

### 3.3 SOBREVIVÊNCIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE *Spodoptera frugiperda* E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL DE REPRODUÇÃO

As larvas neonatas, obtidas a partir da criação massal, eram coletadas isoladamente em frascos de plástico, iguais aos usados para as pupas, onde se processava o seu desenvolvimento até à altura do tratamento, sendo alimentadas com folhas de milho, que eram substituídas diariamente.

Quando as larvas atingiam o 3º (5 dias de idade), 5º (10 dias de idade) e 6º (12 dias de idade) instares, eram alimentadas durante 48 horas com folhas de milho pulverizadas com uma suspensão de difluorobenzon, à concentração de 1 ppm, tendo sido utilizadas 150, 100 e 75 larvas, respectivamente. Após o tratamento, as larvas eram transferidas para frascos de polietileno, onde passavam a alimentar-se de folhas de milho não tratadas; o seu desenvolvimento, até atingir o estado adulto, foi observado e registrado diariamente.

Para avaliar a ação do difluorobenzon sobre a fecundidade, fertilidade e longevidade de *S. frugiperda*, foram utilizados 10 casais resultantes dos tratamentos anteriores, para cada um dos seguintes acasalamentos:

- machos e fêmeas normais
- machos tratados e fêmeas normais
- machos normais e fêmeas tratadas
- machos e fêmeas tratados

Para cada casal foi registrada a fecundidade, o número de posturas, o número de ovos por postura, o número de ovos férteis, os períodos de pré-postura, postura e pós-postura e a longevidade dos adultos.

As posturas, um dia antes da eclosão, eram retiradas dos recipientes onde tinham sido colocadas e feita a sua contagem. No dia seguinte

ocorria a eclosão, contavam-se as larvas, que eram observadas até ao fim do período larval, para registro das características que apresentavam.

Para a contagem do número de ovos e do número de larvas, utilizou-se uma lupa marca WILD M-5.

### 3.4 MICROSCOPIA ÓPTICA

Para determinar qual a zona do tegumento das larvas de *S. frugiperda* que é afetada pelo difluorobenzon, utilizaram-se larvas do 4º, 5º e 6º instares que eram alimentadas com folhas de milho pulverizadas com uma calda de difluorobenzon a 1 ppm, logo após a muda e durante 48 horas. Após as 48 horas, foram transferidas para folhas de milho não tratadas, colocadas em placas de Petri.

Após a morte das larvas com clorofórmio, cortava-se a cabeça e retirava-se o aparelho digestivo pela parte anterior do corpo para facilitar o corte histológico, sendo preparadas 50 larvas para cada instar.

Em seguida, cortava-se o abdômen, de modo a obter peças constituídas pelo 4º e 5º segmentos abdominais, 24 e 48 horas após a muda, para observar as diferenças histológicas apresentadas, sendo feito o mesmo processo para as larvas não tratadas.

As peças do tegumento cortadas foram colocadas no fixador de Helly<sup>1</sup>, durante 6 horas, ao fim das quais estas peças eram lavadas com água corrente durante 12 horas.

A desidratação do material foi realizada na escala crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), durante 5 horas, e a diafanização foi feita com benzol, durante 90 minutos. A inclusão em parafina teve uma duração de uma hora para cada uma.

Para obtenção dos blocos de parafina, onde estavam inclusas as peças atrás mencionadas, usaram-se molduras, chamadas ângulos de Leuckart, num total de 25 blocos para as larvas tratadas e 25 blocos para as larvas normais.

Os cortes destes blocos de parafina foram feitos com o microtomo tipo Minot, sendo a sua espessura de 8  $\mu$ , após o que eram colocados em lâminas com albumina, num total de 400 cortes, procedendo-se em seguida

<sup>1</sup> 95 ml de soluto de Zenker stock, sem ácido acético, 60 g de HgCl<sub>2</sub>, 25 g de KCr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> em 1.000 ml de água destilada e 5 ml de formol puro.

ã sua desparafinação em xilol, durante 30 minutos, e hidratação em série de álcoois descendentes.

Em ensaios preliminares utilizaram-se os corantes hematoxilina (hemalume de Mayer) e eosina, e o tricrômico de Mallory, mas foi este último o que apresentou maior contraste, pelo que foi o utilizado nos cortes definitivos.

A montagem foi realizada em bálsamo-do-canadá e o estudo destas lâminas, para observação das diferentes estruturas que formam o tegumento da larva, foi feito utilizando o microscópio Yashima. Após o estudo e observação destas lâminas foram selecionadas cinco para fotografar e ilustrar este trabalho.

### 3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Após os resultados obtidos com a utilização da microscopia óptica verificou-se a necessidade de recorrer à microscopia eletrônica para poder observar e estudar melhor as alterações ultra-estruturais do tegumento das larvas de *S. frugiperda* tratadas com difluorobenzon, em relação às larvas não tratadas.

Assim, foram utilizadas 20 larvas do 4º, 20 larvas do 5º e 20 larvas do 6º instares, de *S. frugiperda*, para a realização de cortes do tegumento, 24, 48, 60, 72 e 96 horas após a muda; todas elas foram submetidas ao mesmo tratamento com difluorobenzon, da mesma maneira que as usadas nos experimentos em que se utilizou a microscopia óptica.

Para a análise ultra-estrutural, imediatamente após a morte das larvas foram retirados fragmentos do tegumento do 4º e 5º segmentos abdominais. Estes fragmentos foram dispostos numa placa de parafina, sobre uma gota de aldeído glutárico, e recortados em porções de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Foram fixados durante 1 hora e 40 minutos em glutaraldeído a 2%, em tampão cacodilato de sódio 0,15 M, numa câmara de vácuo, tendo sido a seguir lavados em tampão cacodilato 0,15 M crescido de 0,2% de NaCl, durante 15 minutos a 4°C, e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, em tampão cacodilato 0,30 M, durante 1 hora a 4°C. Posteriormente foram lavados em tampão cacodilato 0,15 M + 0,2% de NaCl, durante 15 minutos. A desidratação foi feita passando o material em uma série crescente de álcoois 30, 50, 70 e 90, e três vezes em álcool 100, durante 5 minutos cada um. Complementando a desidratação, foram feitas três passagens em acetona a 100% durante 10 minutos cada uma. Os fragmentos foram incluídos em polylite. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrô-

tomo Sorval MT2-B, tendo sido realizados 25 cortes, com espessura aproximada de 40 a 80 nm. Estes foram colhidos em telas de cobre de 200 malhas e corados pelos métodos de Watson (1958) e Reynolds (1963).

Assim, os cortes foram colocados em solução saturada de acetato de uranila durante 1 hora, passados em água bidestilada e em citrato de chumbo durante 30 minutos. As observações foram realizadas no microscópio eletrônico Philips M-300, usando-se 40 e 50 kV.

Após o estudo e observação destes cortes selecionaram-se 13 para fotografar e ilustrar este trabalho.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar os resultados referentes à ação letal do difluorobenzon e à avaliação do potencial reprodutivo das fêmeas de *S. frugiperda*, foram utilizados o Teste do Qui-Quadrado (Tabela de Contingência 2x2) e o Teste  $t$  (Vieira, 1981).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SOBREVIVÊNCIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO  
DE *Spodoptera frugiperda*

No Quadro 1 apresentam-se os resultados concernentes à sobrevivência larval e pupal que se verificou durante o desenvolvimento desta espécie, quando as larvas são tratadas em idades diferentes.

QUADRO 1. Sobrevivência de *Spodoptera frugiperda*, nos vários estados do seu desenvolvimento, quando larvas do 3º, 5º e 6º instares foram alimentadas com folhas de milho tratadas com 1 ppm de difluorobenzon, durante 48 horas.

CONCENTRAÇÃO (ppm)	Nº DE LARVAS VIVAS				Nº DE PRÉ-PUPAS	Nº DE PUPAS	Nº DE ADULTOS
	3º	4º	5º	6º			
1	150	130	73	56	50	48	42
%	100	86,60	48,60	37,30	33,30	32,00	28,00
1			100	75	60	54	43
%			100	75,00	60,00	54,00	43,00
1				75	60	53	41
%				100	80,00	70,66	54,66
TESTEMUNHA	150	142	130	120	118	115	110
%	100	94,66	86,66	80,00	78,66	76,66	73,33

Analisando esses resultados pelo teste do  $\chi^2$ , verifica-se que o número de adultos resultantes na testemunha é maior (e significativamente diferente) do que o número de adultos resultantes das larvas tratadas no 3º, 5º e 6º instares ( $\chi^2 = 61,66$  para o 3º instar;  $\chi^2 = 23,25$  para o 5º instar e  $\chi^2 = 7,89$  para o 6º instar), verificando-se que a ação letal do difluorobenzon foi maior quanto mais cedo foi o tratamento. Verificaram-se também diferenças significativas entre o número de adultos resultantes entre o 3º e 5º instares ( $\chi^2 = 6,02$ ) e entre o 3º e 6º ( $\chi^2 = 15,28$ ), mas não houve diferença significativa entre o tratamento no 5º e 6º instares. Quando as larvas são alimentadas com a dieta tratada com difluorobenzon, no 3º instar (5 dias de idade), atingiram o estado de pré-pupa apenas 33,3% das larvas tratadas, mas quando esse tratamento é feito no 5º instar (10 dias de idade) a porcentagem de pré-pupas sobe para 60%, e se o tratamento é feito no 6º instar (12 dias de idade) a porcentagem de larvas tratadas que atinge esta fase é de 80%.

Os resultados obtidos nesta parte do trabalho concordam com os achados por Mulder & Gijswijt (1973); Ascher & Nemny (1976); Flint & Smith (1977) e Segistân (1980) no concernente a:

- que existe uma mortalidade alta, embora não seja de 100%, porque neste caso foi utilizada uma concentração pequena do difluorobenzon, que permitiu que um maior número de larvas jovens (3º instar) atingissem o estado adulto, para poder-se realizar os outros experimentos que constituem este trabalho;
- que quanto mais cedo se realiza o tratamento, maior mortalidade larval se produz; no caso das larvas do 3º instar, foi devida a que seu peso é menor na altura do tratamento;
- que a porcentagem de emergência dos adultos aumentava quando a concentração do produto diminuía.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REPRODUTIVO

##### DE *Spodoptera frugiperda*

O Quadro 2 e os Apêndices I a X apresentam os resultados referentes ao potencial de reprodução e longevidade dos adultos resultantes de larvas de *S. frugiperda* tratadas no 3º (5 dias de idade); 5º (10 dias de idade) e 6º (12 dias de idade) instares.

QUADRO 2. Fecundidade, número de ovos férteis, longevidade dos adultos de *Spodoptera frugiperda*.

CASAI	FECUNDIDADE			Nº DE OVOS FÉRTEIS			LONGEVIDADE (dias)					
							♂			♀		
	3♀	5♀	6♀	3♀	5♀	6♀	3♀	5♀	6♀	3♀	5♀	6♀
♂ normais e ♀ tratadas	9.823	9.922	9.020	9.390	9.455	8.450	9,0±0,30	9,9±0,43	9,2±0,51	9,0±0,30	10,1±0,5	9,7±0,55
♂ tratados e ♀ normais	8.597	9.135	8.273	8.269	8.630	7.752	9,1±0,53	9,8±0,36	9,1±0,46	9,0±0,52	9,8±0,36	9,1±0,46
♂ e ♀ tratados	8.399	8.746	7.879	7.867	8.210	7.432	11,3±0,40	9,9±0,64	9,7±0,73	7,6±0,34	9,9±0,64	9,7±0,79
♂ e ♀ normais	10.691			10.293			11,4±0,52			11,4±0,52		

O principal fator a analisar neste experimento seria a fecundidade, verificando-se que o acasalamento entre machos e fêmeas tratados foi o que mais afetou esse parâmetro, seguindo-se machos tratados com fêmeas normais e machos normais com fêmeas tratadas, qualquer que seja a idade ensaiada. A fecundidade desses três tratamentos, para qualquer idade das larvas tratadas, foi menor do que na testemunha, mas, embora a diferença seja grande, não se verificaram diferenças significativas entre os casais tratados e a testemunha, pelo teste  $t$ , fato este devido à variação observada entre os casais, dentro de cada tratamento, o que motivou um desvio padrão elevado.

Sob o ponto de vista biológico, pode dizer-se que o tratamento larval afetou a fecundidade das fêmeas, principalmente dos casais em que o macho era tratado, sendo maior quando ambos eram tratados.

Esses resultados também indicam que houve um maior número de ovos estéreis nos tratamentos de machos normais com fêmeas tratadas e de machos e fêmeas tratados, em relação à testemunha, pelo teste do  $\chi^2$  (6,18 e 69,21 para o 3º instar; 12,39; 36,94 e 60,87 para o 5º instar e 70,63; 67,06 e 39,73 para o 6º instar, respectivamente), mostrando uma certa ação esterilizante do difluorobenzon.

Os resultados aqui encontrados estão de acordo com Moore & Taft (1975); Taft & Hopkins (1975); McLaughlin (1976); Ganyard *et al.* (1977); Lloyd *et al.* (1977); Oliver *et al.* (1977); Villavaso *et al.* (1977) e Earle *et al.* (1979), que usaram *Anthonomus grandis* (Col., Curculionidae).

Verificou-se, também, um aumento no número total de ovos estéreis, portanto uma diminuição do potencial reprodutivo, qualquer que fosse a idade das larvas durante o tratamento e para qualquer dos tipos de acasalamento realizados, tal como foi encontrado por Schroeder *et al.* (1976) e Schroeder & Sutton (1978), que realizaram seus experimentos com a *Diaprepes abbreviatus* (Col., Curculionidae), e Wright & Harris (1976); Kunz *et al.* (1977); Pickens & De milo (1977) e Ivie & Wright (1978), que utilizaram as espécies *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*, *Musca autumnalis* e *Musca domestica* para a realização de seus experimentos.

### 4.3 MICROSCOPIA ÓPTICA

A Fig. 7 (a e b) apresenta dois cortes do tegumento normal da larva de *S. frugiperda*, no 4º instar, 24 e 48 horas após a muda para este instar, respectivamente, que mostram os tubérculos epicuticulares (TE), a epicutícula (EPC), a endocutícula lamelar (EL), o espaço exuvial (EE) e as células epidermais com seus núcleos (EPD).

(a)

(b)

Fig. 7. Tegumento da larva normal de *Spodoptera frugiperda*, no 4º instar. 40 x.

- a) 24 horas após a muda;
- b) 48 horas após a muda.

A Fig. 8 (a, b e c) mostra cortes do tegumento de larvas tratadas, nos 4º, 5º e 6º instares, 48 horas após a muda, podendo, já, observar-se a separação da cutícula velha, pela existência do espaço exuvial (EE) em todos os cortes; nas larvas normais, às 48 horas, pode-se notar, também, o aparecimento do espaço exuvial, mas não tão evidenciado como nas larvas tratadas (Fig. 7b).

O estudo destes cortes, utilizando a microscopia óptica, permitiu verificar que o processo da muda larval se iniciou mais cedo e que a espessura da endocutícula é menor nas larvas tratadas do que nas normais.

Como as alterações observadas por meio da microscopia óptica não foram suficientes para atingir os objetivos que se pretendia, recorreu-se à microscopia eletrônica para detectar as possíveis alterações ultra-estruturais causadas no tegumento das larvas de *S. frugiperda*, pelo difluorobenzon.

#### 4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

##### 4.4.1 Muda da larva normal

Ao realizar os estudos ultra-estruturais do tegumento das larvas de *S. frugiperda*, observou-se que esse processo da muda ocorre da mesma maneira nos três instares aqui estudados, pelo que a apresentação dos resultados obtidos e sua análise se fará sem individualizar cada um dos mesmos.

A muda das larvas de *S. frugiperda*, normalmente, tem uma duração de 72 horas, mas em alguns casos, devido a fatores abióticos, como a temperatura, a luminosidade e até a disponibilidade de alimento, pode ir até 96-120 horas, como foi observado durante os experimentos.

Na Fig. 9a, que representa o aspecto normal do tegumento da larva do 4º instar de *S. frugiperda* com 24 horas após a muda, podem observar-se na endocutícula os micelos dispostos em planos paralelos à superfície, dando-lhe um aspecto lamelar. A epiderme é constituída por uma só camada de células cúbicas, limitadas distalmente por uma camada membranosa, a subcutícula, que possui alguns microvilos (MV), pouco desenvolvidos, que são expansões do citoplasma e cuja função é aumentar a área da membrana a fim de facilitar o transporte dos alimentos para o interior das células, e proximalmente, pela membrana basal (MB), formada por filamentos finos, que em algumas áreas envolvem os nervos (NE).

(a)

(b)

(c)

Fig. 8. Tegumento da larva tratada de *Spodoptera frugiperda*, 48 horas após a muda. 40 x.

- a) larva do 4º instar;
- b) larva do 5º instar;
- c) larva do 6º instar.

Nesta Fig. 9a pode observar-se, no citoplasma, a membrana plasmática lateral de trânsito irregular, sendo constante a presença do complexo unitivo, as mitocôndrias (MT), com predominância da forma esférica, em torno do núcleo (N), e a presença do retículo endoplasmático granular (REG), bastante reduzido.

Continuando o estudo desta Fig. 9a, pode assinalar-se, ainda, a presença de outras estruturas na epiderme, como seja, o complexo de Golgi (CG) atípico, o núcleo (N), que é central ou ligeiramente basal, e o seu contorno, que se apresenta, algumas vezes, lobulado.

Por outro lado, na Fig. 9b, que representa um corte normal do tegumento da larva do 5º instar, 24 horas após a muda, além da endocutícula lamelar (EL) podem observar-se os microvilos, um pouco mais volumosos (MV), as vesículas secretoras (VS), na região supranuclear, os ribossomos (R), distribuídos pelo citoplasma, o nucléolo (NUC) bem visível e a cromatina aderente à parte interna do envoltório nuclear e, também, dispersa no nucleoplasma.

Na larva do 6º instar, 40 horas após a muda, observa-se que não existem sinais do início da metamorfose para o estado de pupa porque a epicutícula (EPC) e a endocutícula (EL) mantêm a sua estrutura lamelar. No citoplasma existem poucas vesículas secretoras (VS), mas grande quantidade de ribossomos dispersos (R), que se localizam na região perinuclear externa. O núcleo (N) é alongado e a membrana basal (MB) encontra-se bem evidenciada (Fig. 10).

Quando se observam os cortes realizados em larvas do 4º instar, 48 horas após a muda já se pode verificar a existência da membrana ecdisial (ME) e do espaço exuvial (EE), evidenciando que o processo da muda, para o 5º instar, já se iniciou (Fig. 11).

Estudos idênticos foram realizados por Bautz (1975), que confirma a existência desses diferentes passos no processo da muda larval.

Nos cortes realizados 60 e 64 horas após a muda para o 5º e 6º instares, respectivamente, já se pode observar o aspecto granular da epicutícula (EPC) e da endocutícula (EG), e no corte realizado às 64 horas pode verificar-se a existência de células claras (CC) ao lado de células escuras (CE) (Figs. 12 e 13).

A Fig. 14, que representa um corte 72 horas após a muda para o 5º instar, mostra o aspecto fibrilar da endocutícula, com fibrilas cruzadas entre si devido à inter-relação da sua polaridade e o gradiente de comportamento do epitélio, em vez do aspecto lamelar e granular apresentado nas Figs. 9 e 12.

(a)

(b)

Fig. 9. Tegumento de larva normal de *Spodoptera frugiperda*, 24 horas após a muda.

a) larva do 4º instar (22.000 x);

b) larva do 5º instar (25.000 x).

EL - endocutícula lamelar; CG - complexo de Golgi; M - micelos; MB - membrana basal; MV - microvilos; MI - membrana intercelular; MT - mitocôndrias; N - núcleo; NE - nervo; REG - retículo endoplasmático granular; R - ribossomos dispersos; VS - vesículas secretoras.

Fig. 10. Tegumento da larva normal do 6º instar de *Spodoptera frugiperda*, 40 horas após a muda, para este instar.  
23.000 x

EPC - epicutícula;  
EL - endocutícula lamelar; MV - microvilos; VS - vesículas secretoras;  
N - núcleo; R - ribosomos dispersos;  
MB - membrana basal.

Fig. 11. Tegumento da larva normal de *Spodoptera frugiperda*, 48 horas após a muda para o 4º instar. 22.000 x.

EL - endocutícula lamelar; ME - membrana ecdisial; EE - espaço exuvial; MI - membrana intercelular; MT - mitocôndrias; MV - microvilos; R - ribosomos dispersos; VS - vesículas secretoras.

Fig. 12. Tegumento da larva normal de *Spodoptera frugiperda*, no 5º instar, 60 horas após a muda. 20.000 x.

Fig. 13. Tegumento da larva de *Spodoptera frugiperda*, no 6º instar, 64 horas após a muda. 23.000 x.

EPC - epicutícula; EG - endocutícula granular; C - cuticulina; MV - microvilos; R - ribosomos dispersos; CE - célula escura; CC - célula clara; MI - membrana intercelular; N - núcleo; NUC - nucléolo; MB - membrana basal; REG - retículo endoplasmático granular; L - lisossomos secundários.

Na mesma Fig. 14, na parte apical da membrana plasmática, podem ver-se os microvilos (MV) engrossados e com uma pequena quantidade de cuticulina (C) no seu ápice.

As larvas normais, 96 horas após a muda, já se encontram no instar seguinte, fato que foi constatado pela observação diária das larvas do experimento, que eram mantidas isoladas nos frascos de plástico.

Fig. 14. Tegumento da larva normal de *Spodoptera frugiperda*, no 5º instar, 72 horas após a muda. 30.000 x.

C - cuticulina; EPC - epicutícula; E - endocutícula fibrilar; MV - microvilos; R - ribossomos dispersos.

#### 4.4.2 Muda da larva tratada

Quanto à larva alimentada de folhas de milho tratadas com diflufenozon por 48 horas, constatou-se uma aceleração no processo da muda em relação às larvas normais, pois 72 horas após a muda de instar já se verificou a passagem para o seguinte; na muda normal este processo completou-se entre 72 e 96 horas, às vezes 120 horas, após a muda. Estes resultados concordam com os de Sedlak & Gilbert (1976) ao afirmarem que uma acumulação de ecdisona na larva produz um certo progresso no desenvolvimento normal do mecanismo de muda.

Na larva tratada do 5º instar, o processo iniciou-se 24 horas após a muda, mostrando que este instar é o mais susceptível ao tratamento com o difluorobenzon, fato este que coincide com os resultados obtidos por Segistán (1980), já se podendo observar a endocutícula (EG) com aspecto granular, o citoplasma com grande desorganização celular, a existência de ribosomos dispersos (R), de mitocôndrias (MT) abundantes e de cisternas do retículo endoplasmático granular (REG) (Fig. 15).

Fig. 15. Tegumento da larva tratada de *Spodoptera frugiperda*, no 5º instar, 24 horas após a muda. 20.000 x.

Na larva tratada do 4º instar, 48 horas após a muda constata-se que as células epidermais começam a mudar de cúbicas para colunares e que apresentam variação na sua densidade eletrônica, aparecendo a maioria como células claras (CC) ao lado de algumas escuras (CE); estas últimas aparecem com aspecto estrelado. Estes tipos de célula também foram encontrados por Bautz (1975), que realizou experimentos com *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae). No citoplasma das células claras, as cisternas do retículo endoplasmático granular (REG) são mais numerosas do que nas células escuras e estão dispostas paralelamente entre si (Fig.16).

Por outro lado, na Fig. 17a, que representa também um corte do tegumento de larva tratada 48 horas após a muda, pode observar-se o aspecto granular que apresentam tanto a epicutícula (EPC) como a endocutícula (EG); uma grande quantidade de vesículas secretoras (VS) na epiderme,

Fig. 16. Tegumento da larva tratada de *Spodoptera frugiperda*, 48 horas após a muda para o 4º instar. 25.000 x.

CC - células claras; CE - células escuras; EE - espaço exuvial;  
MI - membrana intercelular; MV - microvilos; MT - mitocôndrias;  
MB - membrana basal; N - núcleo; REG - retículo endoplasmático  
granular; VS - vesículas secretoras.

tidas como provenientes do complexo de Golgi e necessárias para o remodelamento celular. O núcleo (N) mantém a sua forma ovóide; os grânulos de cromatina encontram-se principalmente na sua periferia, notando-se perfeitamente o duplo envoltório nuclear.

A Fig. 17b, na qual os microvilos (MV) são numerosos, de forma regular e com sua terminação apical mostrando engrossamentos densos e secreção prematura de cuticulina (C), concorda com o observado por Locke (1969) em *Calpodes ethlius* (Lep., HesperIIDae).

Nota-se, também, nesta mesma Figura 17b, uma secreção flocular, produzida pelas células epidermais, que forma o espaço exuvial (EE), o qual separa a membrana plasmática apical da cutícula velha. Pouco depois, aparece a secreção granular (SG) formada por grânulos bem densos, que permanecem até que a nova camada de cuticulina seja depositada. Estes grânulos liberam enzimas, as quais atacam a cutícula velha, que nesta altura já está grandemente desorganizada, tal como é mencionado por Taylor & Richards (1965).

No corte realizado 60 horas após a muda para o 5º instar evidencia-se a formação das camadas de cuticulina (C) e de proteína epicuticular (PE), que seguem as sinuosidades da superfície, aspecto que não é observado na larva normal nesta mesma altura (Fig. 12). Este processo ocorre doze horas antes que se complete a muda e está de acordo com os resultados obtidos por Locke (1969), em *Calpodes ethlius* (Fig. 18).

Observa-se, ainda, na mesma Fig. 18, a endocutícula com aspecto fibrilar (EF) e dispendo-se os microvilos paralelamente, como primeiro passo para a transformação do aspecto fibrilar da endocutícula para lamelar. Na larva normal (Fig. 12) a endocutícula ainda apresenta aspecto granular.

Por outro lado, na larva tratada no 6º instar, às 64 horas, observou-se, ainda, a endocutícula (EG) com aspecto granular, mas constatou-se na membrana plasmática apical que as vesículas secretoras (VS) tomam o aspecto de bolhas (B) (membrane blebbing) que ao arrebentarem libertam enzimas que vão ajudar a digestão da cutícula velha, originando o espaço exuvial (EE). Estes resultados concordam com os de Sedlak & Gilbert (1976) em *Hyalophora cecropia* (Fig. 19).

Ao comparar o processo da muda, nas larvas normais e tratadas, verifica-se que existe uma antecipação das fases do processo nas larvas tratadas, que é mais acentuada nas larvas do 5º instar, não se tendo observado qualquer alteração a nível celular, pois as modificações ocorridas são consequência da mitose celular. Esta antecipação foi detectada já através dos estudos de microscopia óptica, tendo a microscopia

(a)

(b)

Fig. 17. Tegumento da larva tratada de *Spodoptera frugiperda*, 48 horas após a muda para o 4º instar. 23.000 x.

- a) mostrando o aumento das vesículas secretoras;
- b) evidenciando a desintegração endocuticular e a formação do espaço exuvial.

C - cuticulina; CC - célula clara; CE - célula escura; EE - espaço exuvial; REG - retículo endoplasmático granular; MV - microvilos; SG - secreção granular; EPC - epicutícula; EG - endocutícula granular; MI - membrana intercelular; N - núcleo; VS - vesículas secretoras.

Fig. 18. Tegumento da larva tratada de *Spodoptera frugiperda*, no 5º instar, 60 horas após a muda, evidenciando a formação da cuticulina e da proteína epicuticular. 30.000 X

C - cuticulina; PE - proteína epicuticular; EF - endocutícula fibrosa; MV - microvilos; R - ribossomos dispersos.

Fig. 19. Tegumento da larva tratada de *Spodoptera frugiperda*, com 64 horas após a muda. 22.000 x.

EG - endocutícula granular; MV - microvilos; VS - vesículas secretoras; MI - membrana intercelular; R - ribossomos dispersos; EE - espaço exuvial; B - bolhas.

eletrônica confirmado este resultado e proporcionado maior evidência deste fato. Para poder detectar alterações, a nível de incorporação de bases nitrogenadas do ácido deoxirribonucléico e alterações quantitativas e qualitativas no teor da quitina endocuticular, devido à inibição enzimática produzida pelo difluorobenzon, haverá que realizar estudos genéticos e histoquímicos, tal como foram realizados por Post *et al.* (1974); Yu & Terriere (1975); Ker (1977); Mitlin *et al.* (1977) e Deul *et al.* (1978).

## CONCLUSÕES

- O difluorobenzon, quando adicionado à dieta das larvas de *Spodoptera frugiperda*, na concentração de 1 ppm, aos 5, 10 e 12 dias de idade, por 48 horas, provoca uma mortalidade maior, e significativamente diferente, do que na testemunha; esta mortalidade é tanto maior quanto mais jovens foram as larvas tratadas.

- A fecundidade das fêmeas tratadas é também afetada, em relação à testemunha, mas não é significativamente diferente do ponto de vista estatístico, embora seja de considerar do ponto de vista biológico, pois diminuiu muito, principalmente quando os machos foram tratados.

- No que concerne ao número de ovos estéreis em relação ao total de ovos postos, verificou-se haver uma diferença significativa por tratamento em comparação com a testemunha; constatou-se, também, haver diferença significativa entre os tratamentos quando se acasalam machos normais e fêmeas tratadas e quando ambos eram tratados, mostrando uma certa ação esterilizante do difluorobenzon.

- Através da microscopia óptica e eletrônica constatou-se que os cortes histológicos realizados nas larvas normais e nas tratadas mostraram uma menor espessura da endocutícula e uma antecipação dos fenômenos que se processam durante a muda larval, e que essa antecipação é maior nas larvas tratadas no 5º instar.

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi investigar o efeito do difluorobenzon no potencial de reprodução dos adultos de *Spodoptera frugiperda*, resultantes de larvas que foram alimentadas, durante 48 horas, com folhas de milho tratadas com esse produto, à concentração de 1 ppm, e estudar quais as zonas do tegumento das larvas que foram afetadas e quais as estruturas que foram alteradas, por meio de cortes histológicos, na área de microscopia óptica e ultra-estrutural.

O tratamento das larvas provoca uma mortalidade maior do que a da testemunha, durante o subsequente desenvolvimento dessa espécie; que foi tanto maior quanto mais jovens eram as larvas tratadas. No concernente aos aspectos relacionados com a reprodução, constatou-se que o tratamento com o difluorobenzon afetou mais as larvas que deram origem a machos do que as larvas que deram origem a fêmeas.

Através da microscopia óptica constatou-se que a espessura da endocutícula nas larvas tratadas era menor do que nas larvas normais.

Nos estudos ultra-estruturais, verificou-se uma antecipação na muda das larvas tratadas, em todos os instares estudados (4º, 5º e 6º), com relação à testemunha. Nas larvas normais do 4º e do 5º instares esse processo começou às 48 horas, e nas larvas do 6º instar às 40 horas ainda não se observara qualquer alteração; o processo completou-se às 96 horas, nos três instares. Nas larvas tratadas no 4º instar o processo começou antes das 48 horas; nas larvas tratadas no 5º instar esse processo iniciou-se às 24 horas; nas do 6º instar às 40 horas já se tinham iniciado os processos para a passagem ao estado de pupa. Todo esse processo estava terminado às 72 horas, nos três instares.

Em nenhum dos instares testados foi constatada qualquer alteração a nível celular, pois somente se observaram modificações resultantes da mitose celular e do mesmo processo de muda. A epiderme das larvas tratadas no 4º instar apresenta células claras ao lado das escuras, numerosos microvilos de forma regular na região subcuticular, com engrossamentos densos na parte apical e com secreção prematura de cuticulina.

A camada de cuticulina e de proteína epicuticular se formou às 60 horas após a muda para o 6º instar larval na larva tratada no 5º instar. Na larva tratada do 6º instar encontrou-se que a parte apical da membrana plasmática apresentou expansões ("membrane blebbing") que não eram mais do que acúmulo de secreção proveniente das vesículas secretoras.

## SUMMARY

The aim of this research was to investigate the effect of difluorobenzon in the reproductive potential of adult *Spodoptera frugiperda* born from larvae fed for 48 hours with corn leaves treated with the product, at a concentration of 1 ppm, and also to study by means of histological procedures — optical microscopy and ultra-structural analysis — which zone of larval tegument were affected and which structures were altered.

The treatment of larvae causes a mortality which is higher in the treated group than in the control group, and the mortality being higher the younger the larvae were at the time of treatment.

As regards reproductive aspects was observed that the effect of difluorobenzon was stronger in the group of larvae that gave origin to males than in those that gave origin to females.

Through optical microscopy was observed that those larvae that underwent treatment had a less thick endocuticle than the control ones.

By means of ultra-structural studies was observed an earliness in the moulting of treated larvae in all the instar studied, compared to the control group.

For the normal larvae in the 4th and 5th instars this process started at 48 hours, and those in the 6th instar at 48 hours were had not yet observed any alteration; the process was complete at 96 hours for all instars.

Those larvae treated at the 4th instar the process began before 48 hours, but for those in the 5th instar the process began at 24 hours; for those in the 6th instar, at 40 hours the process for passing to the pupal stage had already started. The whole process was finished at 72 hours for all instars.

In no instar tested was observed any alteration at the cellular level; the only modifications observed resulted from cellular mitosis and from the same moulting process.

The epidermis of treated larvae in the 4th instar shows clear cells beside dark cells, many regular microvilli in the subcuticular region with dense thickening at the apical part and premature secretion of cuticulin.

The cuticulin and epicuticular protein layer were formed at 60 hours after moulting for the 6th larval instar in the larvae treated at the 5th instar.

In the larvae treated in the 6th instar was observed expansions at the apical region of plasma membrane (Membrane Blebbing) which were no more than deposition of secretion form the secretor vesicles.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Armando Antunes de Almeida, orientador, meu agradecimento pelo estímulo, paciência, compreensão, sugestões, críticas e revisão dos originais deste trabalho.

Ao Padre Jesus S. Moure e ao Prof. Doutor Albino Morimassa Sakakibara, Coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela oportunidade para a realização deste Curso.

Ao Prof. Doutor Orlando Teodorico de Freitas, Diretor do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pelas facilidades oferecidas para a realização dos estudos ultra-estruturais e pela revisão dos originais.

À Profa. Vânia Beatriz Vieira de Souza, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, meu carinhoso agradecimento pela ajuda sincera e desinteressada no processamento do material para a confecção das microfotografias e por toda a força que me deu para finalizar esta pesquisa.

Ao Prof. Doutor José Roberto Postali Parra, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, de Piracicaba, SP, pelo fornecimento das larvas de *Spodoptera frugiperda* inicialmente utilizadas para a criação massal no laboratório.

Ao Prof. Angelo Molfi, do Departamento de Morfologia da UFPR, pelo estímulo constante e preocupação na parte da microscopia óptica.

Ao Prof. Doutor Sylvio Ferri, do Departamento de Histologia e Embriologia da USP, pela atenta e objetiva revisão dos originais deste trabalho.

À Profa. Doutora Carminda da Cruz Landim, da Universidade de Rio Claro, SP, pelas sugestões dadas para a realização deste trabalho.

Minha sincera homenagem à Dra. Maria Helena Imayuki, da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela amizade e pela imensa ajuda na obtenção da bibliografia utilizada neste trabalho; agradecimento que estendo à sua colaboradora imediata, Márcia Elisa Sbaraini.

A meus amigos Dr. Ivan Zulian, Maria A. Canever, Irene Mondragón, Carminda Sierra, Angeles Trevia, Bruno Zachrisson e Julio Dellone Filho, pelo apoio e colaboração durante o Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa Tecnológica (CNPq), pela bolsa concedida durante os três anos do Curso.

## BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, D.W. & ELLIOTT, R.H. (1982). Efficacy of diflubenzuron against the codling moth, *Laspeyresia pomonella* (Lepidoptera: Olethreutidae) and impact on orchard mites. *Can.Entomol.*, 114(8):733-738.
- ASCHER, K.R.S. & NEMNY, N.E. (1976). Toxicity of the chitin synthesis inhibitors diflubenzuron and its dichloro-analogue to *Spodoptera littoralis* larvae. *Pestic.Sci.*, 7(1):1-9.
- BAUTZ, A.M. (1975). Growth and degeneration of the larval abdominal epidermis in *Calliphora erythrocephala* Meig) (Diptera: Calliphoridae) during larval life and metamorphosis. *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.*, 4(6):495-515.
- CALKINS, C.O.; HILL, A.J.; HUETTEL, M.D. & MITCHELL, E.R. (1977). Effect of diflubenzuron on plum curculio populations in laboratory and field tests. *J.Econ.Entomol.*, 70:463-466.
- CAMPBELL, J.B. & WRIGHT, J.E. (1976). Field evaluations of insect growth regulators, insecticides and a bacterial agent for stable fly control in feedlot breeding areas. *J.Econ.Entomol.*, 69(5):566-568.
- CHIPPENDALE, G.M. & ALEXANDER, B.R. (1973). Spermatogenesis in the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. 2. Resumption in diapause larvae. *Annu.Soc.Ent.Amer.*, 66(4):761-768.
- DEUL, D.H.; DE JONG, B.J. & KORTENBACH, J.A.M. (1978). Inhibition of chitin synthesis by two 1-(2,6-disubstituted benzoyl) - 3-phenyl-urea insecticides. *Pestic.Biochem.Physiol.*, 8:98-105.
- EARLE, N.W.; NILAKNE, S.S. & SIMMONS, L.A. (1979). Mating ability of irradiated male boll weevils treated with diflubenzuron or penfluron. *J.Econ.Entomol.*, 72(3):334-336.
- FLINT, H.M. & SMITH, R.L. (1977). Laboratory evaluation of the TH 6040 against the pink bollworm. *J.Econ.Entomol.*, 70(1):51-53.
- GANYARD, M.C.; BRADLEY, J.R. & BRAZZEL, J.R. (1977). Field evaluation of diflubenzuron (Dimilin) for control of boll weevil reproduction. *J.Econ.Entomol.*, 70(3):347-350.
- GRANETT, J. & DUNBAR, D.M. (1975). TH 6040: laboratory and fields trials for control of gipsy moths. *J.Econ.Entomol.*, 68(1):99-102.
- HAJJAR, N.P. & CASIDA, J.E. (1978). Insecticidal benzoylphenylureas: structure activity relationships as chitin synthesis inhibitors. *Science*, 200(4349):1499-1500.
- IVIE, G.W. & WRIGHT, J.E. (1978). Fate of diflubenzuron in the stable fly and house fly. *J.Agric.Food Chem.*, 26(1):90-94.

- JENKIN, P.M. & HINTON, H.E. (1966). Apolysis in arthropod moulting cycles. *Nature* (London), 211(5051):871.
- KER, R.F. (1977). Investigation of locust cuticle using the insecticide diflubenzuron. *J.Insect Physiol.*, 23(1):39-48.
- KUNZ, S.E.; HARRIS, R.L.; HOGAN, B.G. & WRIGHT, J.E. (1977). Inhibition of development in a field population of horn flies treated with diflubenzuron. *J.Econ.Entomol.*, 70(3):298-300.
- LOCKE, M. (1969). The structure of an epidermal cell during the formation of the protein epicuticle and the uptake of moulting fluid in an insect. *J.Morphol.*, 127:7-40.
- LLOYD, E.P.; WOOD, R.H. & MITCHELL, E.B. (1977). Boll weevil: suppression with TH 6040 applied in cotton seed oil as a foliar spray. *J.Econ. Entomol.*, 70:442-444.
- McLAUGHLIN, R.E. (1976). Response of boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman, to TH 6040 administered by feeding. *J. Econ. Entomol.*, 69 : 317-318.
- MILO, A.B. de; OSTROMECKY, D.M.; CHANG, S.Ch.; REDFERN, R.W. & FYE, R.L. (1978). Heterocyclic analogues of diflubenzuron as growth and reproduction inhibitors of the fall armyworm and house fly. *J.Agric.Food Chem.*, 26(1):164-165.
- MITLIN, N.; WIYGUL, G. & HAYNES, J.W. (1977). Inhibition of DNA synthesis in boll weevils (*Anthonomus grandis*, Boheman) sterilized by Dimilin. *Pestic.Biochem.Physiol.*, 7:559-563.
- MOORE Jr., R.F. & TAFT, H.M. (1975). Boll weevils: chemosterilization of both sexes with busulfan plus Thompson-Hayward TH 6040. *J.Econ. Entomol.*, 68(1):96-98.
- MULDER, R. & GIJSWIJT, M.J. (1973). The laboratory evaluations of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition. *Pestic.Sci.*, 4:737-745.
- MULLA, M.S.; KRAMER, W.L. & BARNARD, D.R. (1976). Insect growth regulators for control of chironomid midges in residential recreational lakes. *J. Econ.Entomol.*, 69(2):285-291.
- NEISSES, J.; MARKIN, G.P. & SCHAEFER, R. (1976). Field evaluation of acephate and Dimilin against the douglas-fir tussock moth. *J.Econ. Entomol.*, 69(6):783-786.
- NOWOCK, J. (1973). Growth and metamorphosis in the testes of *Ephesia kuhniella* in vitro. *J.Insect Physiol.*, 19(4):941-949.
- OLIVER, J.E.; DE MILO, A.B.; BROWN, R.T. & McHAFFEY, D.G. (1977). AI 3-63233. a highly effective boll weevil sterilizant. *J.Econ.Entomol.*, 70:286-288.
- PICKENS, L.G. & De MILO, A.B. (1977). Face fly: inhibition of hatch by diflubenzuron and related analogues. *J.Econ.Entomol.*, 70(5):595-597.
- POST, L.C.; JONG, B.B. de; VINCENT, W.R. (1974). 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3- phenylurea insecticides: inhibitors of chitin synthesis. *Pestic.Biochem.Physiol.*, 4:473-483.

- REYNOLDS, E.S. (1963). The use of lead citrate at the high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J.Cell Biol.*, 17:208-212.
- RICHARDS, A.G. (1981). Insect hormones in development. *Biol.Rev.*, 56: 501-549.
- ROBBINS, W.E.; KAPLANIS, J.N.; THOMPSON, M.J.; SHORTINO, T.J.; COHEN, C.F. & HOYNER, S.C. (1968). Ecdysones and analogs: Effects on development and reproduction of insects. *Science*, 161(3846):1158-1159.
- SCHROEDER, W.J.; BEAVERS, J.B.; SUTTON, R.A. & SELHIME, A.G. (1976). Ovicidal effect of Thompson - Hayward TH 6040 in *Diaprepes abbreviatus* on citrus in Florida. *J.Econ.Entomol.*, 69:780-782.
- SCHROEDER, W.J. & SUTTON, R.A. (1978). *Diaprepes abbreviatus*: suppression of reproductive potential on citrus with an insect growth regulator plus spray oil. *J.Econ.Entomol.*, 71(1):69-70.
- SEDLAK, B.J. & GILBERT, L.I. (1976). Effects of ecdysone and juvenile hormone on epidermal cell development in *Hyalophora cecropia*. *Tissue Cell*, 8(4):649-658.
- SEGISTÁN, C.R.E. (1980). *Ação do Dimilin no desenvolvimento da Spodoptera frugiperda (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) e avaliação toxicológica de inseticidas para o seu controle*. Tese de Mestrado, Departamento de Zoologia, UFPR, Curitiba. 149 pp.
- TAFT, H.M. & HOPKINS, A.R. (1975). Boll weevils: field populations controlled by sterilizing emerging overwintered females with a TH 6040 sprayable bait. *J.Econ.Entomol.*, 68(4):551-554.
- TAYLOR, R.L. & RICHARDS, A.G. (1965). Integumentary changes during moulting of arthropods with special reference to the subcuticle and ecdysial membrane. *J.Morphol.*, 116:1-22.
- VIEIRA, S. (1981). *Introdução à bioestatística*. Editora Campus Ltda., Rio de Janeiro. 294 p.
- VILLAVASO, E.J.; EARLE, N.W. & HOLLIER, D.D. (1977). Boll weevils: field and laboratory assessment of mating ability and sperm content after irradiation with or without diflubenzuron treatment. *J.Econ.Entomol.*, 70(5):562-564.
- WATSON, M.L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J.Biophys.Biochem.Cytol.*, 4:475-478.
- WAY, M.J. (1950). The structure and development of the larva cuticle of *Diataraxia oleracea* (Lepidoptera). *Q.J.Microsc.Sci.*, 91:145-182.
- WELLINGA, K.; MULDER, R.; Van DAALEN, J.J. (1973). Synthesis and laboratory evaluation of 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3- phenil ureas, a new class of insecticides. I. 1-(2,6-diclorobenzoyl)-3- phenylureas. *J. Agric.Food Chem.*, 21(3):348-354.
- WOLFENBARGER, D.A.; GUERRA, A.A. & GARCIA, R.D. (1977): Diflubenzuron: effect on the tobacco budworm and the boll weevil. *J.Econ.Entomol.*, 70(1):126-128.

- WRIGHT, J.E. & HARRIS, R.L. (1976). Ovicidal activity of Thompson-Hayward TH 6040 in the stable fly and horn fly after surface contact by adults. *J.Econ.Entomol.*, 69(6):728-730.
- YU, S.J. & TERRIERE, L.C. (1975). Activities of hormone metabolizing enzymes in house flies treated with some substituted urea growth regulators. *Life Sci.*, 17:619-626.
- YU, S.J. & TERRIERE, L.C. (1977). Ecdysone metabolism by soluble enzymes from three species of Diptera and its inhibition by the insect growth regulator TH 6040. *Pestic.Biochem.Physiol.*, 7:48-55.

APÊNDICES

APÊNDICE I. Fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos de *Spodoptera frugiperda* que foram tratados no 3º instar (♂ tratados e ♀ normais).

		DIAS										Nº DE POSTURAS	OVOS FÉRTILS (%)	PRÉ-POSTURA	POSTURA	PÓS-POSTURA	LONGEVIDADE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						Total	♂	♀
1	Fec	304	107	222	104	100	100	44	25	-	-	1.006	8	97,71	3	8	0	11	11
	Fer	300	100	220	103	100	100	40	20	-	-	983							
2	Fec	200	24	27	57	100	100	-	-	-	-	508	6	95,66	3	6	0	9	9
	Fer	196	20	20	50	100	100	-	-	-	-	486							
3	Fec	108	206	100	100	72	-	-	-	-	-	586	5	97,26	3	5	0	8	8
	Fer	100	200	100	100	70	-	-	-	-	-	570							
4	Fec	69	219	240	130	126	100	100	-	-	-	984	7	96,54	3	7	0	10	10
	Fer	60	210	235	125	120	100	100	-	-	-	950							
5	Fec	84	369	190	182	84	134	156	40	-	-	1.239	8	89,99	4	8	0	12	12
	Fer	80	360	100	180	80	130	150	35	-	-	1.115							
6	Fec	340	308	100	-	-	-	-	-	-	-	748	3	96,25	4	3	0	7	7
	Fer	320	300	100	-	-	-	-	-	-	-	720							
7	Fec	402	604	200	180	115	100	-	-	-	-	1.601	6	99,00	3	6	0	9	9
	Fer	400	600	200	175	110	100	-	-	-	-	1.585							
8	Fec	89	264	24	11	-	-	-	-	-	-	388	4	95,36	3	4	0	7	7
	Fer	80	260	20	10	-	-	-	-	-	-	370							
9	Fec	433	116	109	83	57	40	-	-	-	-	838	6	96,65	3	6	0	10	9
	Fer	430	110	100	80	50	40	-	-	-	-	810							
10	Fec	200	100	100	153	146	-	-	-	-	-	699	5	97,28	3	5	0	8	8
	Fer	190	100	100	150	140	-	-	-	-	-	680							
TOTAL												8.597					91	90	
$\bar{x}$												859,7					9,10	9	
D.P.												114,99					0,54	0,53	

APÊNDICE II. Fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos de *Spodoptera frugiperda* que foram tratados no 3º instar (♂ e ♀ tratados).

		DIAS										Total	Nº DE POSTURAS	OVOS FÉRTEIS (%)	PRÉ- POSTURA	POSTURA	PÓS- POSTURA	LONGE- VIDADE	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10							♂	♀
1	Fec	200	100	100	73	122	100	-	-	-	-	695	6	96,69	3	6	0	11	9
	Fer	200	90	90	70	122	100	-	-	-	-	672							
2	Fec	150	200	175	140	98	-	-	-	-	-	763	5	94,36	3	5	0	12	8
	Fer	100	100	150	120	250	-	-	-	-	-	720							
3	Fec	230	375	302	252	160	-	-	-	-	-	1.319	5	95,90	3	5	0	11	8
	Fer	200	370	300	245	150	-	-	-	-	-	1.265							
4	Fec	393	320	260	150	50	-	-	-	-	-	1.173	5	96,33	3	5	0	11	8
	Fer	390	310	250	140	40	-	-	-	-	-	1.130							
5	Fec	293	230	180	110	40	-	-	-	-	-	853	5	90,85	4	5	0	12	9
	Fer	290	215	150	90	30	-	-	-	-	-	775							
6	Fec	380	303	238	190	-	-	-	-	-	-	1.111	4	91,62	4	4	0	12	8
	Fer	350	298	220	150	-	-	-	-	-	-	1.018							
7	Fec	273	132	91	-	-	-	-	-	-	-	496	3	93,14	3	3	0	12	6
	Fer	250	130	82	-	-	-	-	-	-	-	462							
8	Fec	258	151	134	-	-	-	-	-	-	-	543	3	90,23	3	3	0	12	6
	Fer	230	140	120	-	-	-	-	-	-	-	490							
9	Fec	402	303	174	60	-	-	-	-	-	-	939	4	93,18	3	4	0	12	7
	Fer	390	295	150	40	-	-	-	-	-	-	875							
10	Fec	272	135	70	30	-	-	-	-	-	-	507	4	90,72	3	4	0	8	7
	Fer	260	120	60	20	-	-	-	-	-	-	460							
TOTAL											8.399						113,0	76,0	
x̄											839,9							11,30	7,6
D.P.											92,38							0,40	0,34

APÊNDICE III. Fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos de *Spodoptera frugiperda* que foram tratados no 3º instar (♂ não tratados e ♀ tratadas).

		DIAS										Nº DE POSTURAS	OVOS FÉRTEIS (%)	PRÉ-POSTURA	POSTURA	PÓS-POSTURA	LONGEVIDADE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						Total	♂	♀
1	Fec	108	74	148	300	297	103	118	-	-	-	1.148	7	96,68	3	7	0	10	10
	Fer	100	70	140	300	290	100	110	-	-	-	1.110							
2	Fec	167	366	357	149	167	130	-	-	-	-	1.336	6	97,30	3	6	0	9	9
	Fer	160	360	350	140	160	130	-	-	-	-	1.300							
3	Fec	168	300	300	118	140	100	-	-	-	-	1.126	6	98,57	3	6	0	9	9
	Fer	160	300	300	110	140	100	-	-	-	-	1.110							
4	Fec	134	100	170	173	150	-	-	-	-	-	727	5	97,66	3	5	0	8	8
	Fer	130	100	165	170	145	-	-	-	-	-	710							
5	Fec	132	155	160	200	180	-	-	-	-	-	827	5	98,66	4	5	0	9	9
	Fer	130	150	160	200	176	-	-	-	-	-	816							
6	Fec	172	155	160	200	180	170	-	-	-	-	1.037	6	98,36	4	6	0	10	10
	Fer	170	150	160	200	175	165	-	-	-	-	1.020							
7	Fec	224	90	54	40	-	-	-	-	-	-	408	4	95,58	3	4	0	7	7
	Fer	220	80	50	40	-	-	-	-	-	-	390							
8	Fec	167	366	149	167	130	149	-	-	-	-	1.128	6	96,18	3	6	0	9	9
	Fer	160	360	140	160	125	140	-	-	-	-	1.085							
9	Fec	108	174	148	300	297	103	-	-	-	-	1.130	6	97,34	3	6	0	9	9
	Fer	100	170	140	300	290	100	-	-	-	-	1.100							
10	Fec	134	100	170	172	140	150	90	-	-	-	956	7	78,34	3	7	0	10	10
	Fer	130	50	130	130	100	120	89	-	-	-	749							
TOTAL											9.823					90	90		
x̄											982,3					9,0	9,0		
D.P.											84,27					0,30	0,30		

APÊNDICE IV. Fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos de *Spoãoptera frugiperda* que foram tratados no 5º instar (♂ não tratados e ♀ tratadas).

		DIAS										Nº DE POSTURAS	OVOS FÉRTIS (%)	PRÉ-POSTURA	POSTURA	PÓS-POSTURA	LONGEVIDADE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						Total	♂	♀
1	Fec	200	126	150	132	143	-	-	-	-	-	751	5	92,54	3	5	0	8	8
	Fer	200	120	145	130	100	-	-	-	-	-	695							
2	Fec	323	432	250	223	136	132	-	-	-	-	1.496	6	98,93	3	6	0	9	9
	Fer	320	430	250	220	130	130	-	-	-	-	1.480							
3	Fec	168	173	192	146	150	123	135	-	-	-	1.087	7	97,51	3	7	0	10	10
	Fer	160	170	190	140	150	120	130	-	-	-	1.060							
4	Fec	174	150	136	126	196	175	136	125	-	-	1.218	8	93,59	3	8	0	11	11
	Fer	170	150	130	120	150	170	130	120	-	-	1.140							
5	Fec	136	145	132	125	143	115	100	93	83	-	1.072	9	97,01	4	9	0	12	13
	Fer	130	140	130	120	140	110	100	90	80	-	1.040							
6	Fec	232	250	195	183	132	100	93	83	65	-	1.333	9	95,27	4	9	0	12	13
	Fer	230	250	150	180	130	100	90	80	60	-	1.270							
7	Fec	126	111	100	90	83	75	-	-	-	-	585	6	97,43	3	6	0	9	9
	Fer	120	110	100	90	80	70	-	-	-	-	570							
8	Fec	132	83	63	42	35	20	-	-	-	-	375	6	96,00	3	6	0	9	9
	Fer	130	80	60	40	30	20	-	-	-	-	360							
9	Fec	143	185	143	130	120	125	-	-	-	-	846	6	94,56	3	6	0	9	9
	Fer	140	180	140	130	120	90	-	-	-	-	800							
10	Fec	150	172	152	200	250	100	135	-	-	-	1.159	7	89,73	3	7	0	10	10
	Fer	140	170	150	200	200	100	80	-	-	-	1.040							
TOTAL												9.922					99	101	
$\bar{x}$												992,2					9,9	10,1	
D.P.												110,1					0,43	0,55	

APÊNDICE V. Fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos de *Spodoptera frugiperda* que foram tratados no 5º instar (♂ e ♀ tratados).

		DIAS											Nº DE POSTURAS	OVOS FÉRTEIS (%)	PRÉ-POSTURA	POSTURA	PÓS POSTURA	LONGEVIDADE	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total						♂	♀
1	Fec	200	150	143	126	135	126	-	-	-	-	880	6	96,59	3	6	0	9	9
	Fer	200	140	140	120	130	120	-	-	-	-	850							
2	Fec	300	350	326	200	150	100	50	43	-	-	1.519	8	95,45	3	8	0	11	11
	Fer	300	300	320	200	140	100	50	40	-	-	1.450							
3	Fec	250	260	232	225	250	135	145	165	100	40	1.802	10	97,11	3	10	0	13	13
	Fer	240	250	230	220	240	130	140	160	100	40	1.750							
4	Fec	200	250	260	240	120	100	50	40	-	-	1.260	8	89,68	3	8	0	11	11
	Fer	200	200	230	210	100	100	50	40	-	-	1.130							
5	Fec	250	200	210	150	160	170	80	75	40	-	1.335	9	93,25	4	9	0	13	13
	Fer	200	200	200	140	160	150	80	75	40	-	1.245							
6	Fec	100	150	80	40	20	-	-	-	-	-	390	5	92,30	4	5	0	9	9
	Fer	100	120	80	40	20	-	-	-	-	-	360							
7	Fec	150	100	100	120	60	40	-	-	-	-	570	6	87,71	3	6	0	9	9
	Fer	100	100	100	100	60	40	-	-	-	-	500							
8	Fec	100	50	40	35	-	-	-	-	-	-	225	4	100,00	3	4	0	7	7
	Fer	100	50	40	35	-	-	-	-	-	-	225							
9	Fec	100	60	40	35	30	-	-	-	-	-	265	5	94,33	3	5	0	8	8
	Fer	100	50	40	30	30	-	-	-	-	-	250							
10	Fec	100	150	100	75	50	25	-	-	-	-	500	6	90,00	3	6	0	9	9
	Fer	100	100	100	75	50	25	-	-	-	-	450							
TOTAL													8.746					99	99
x̄													874,6					9,9	9,9
D.P.													179,42					0,64	0,64

APÊNDICE VI. Fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos de *Spodoptera frugiperda* que foram tratados no 5º instar (♂ tratados e ♀ não tratadas)

		DIAS										Nº DE POSTURAS	OVOS FÉRTILS (%)	PRÉ-POSTURA	POSTURA	PÓS-POSTURA	LONGEVIDADE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						Total	♂	♀
1	Fec	200	150	100	100	140	135	120	-	-	-	945	7	89,94	3	7	0	10	10
	Fer	200	100	100	100	120	130	100	-	-	-	850							
2	Fec	200	100	100	120	130	165	-	-	-	-	815	6	95,70	3	6	0	9	9
	Fer	200	100	100	100	120	160	-	-	-	-	780							
3	Fec	250	320	250	100	120	70	50	40	-	-	1.200	8	95,00	3	8	0	11	11
	Fer	240	300	240	100	100	70	50	40	-	-	1.140							
4	Fec	300	150	120	100	140	130	120	-	-	-	1.060	7	89,62	3	7	0	10	10
	Fer	250	100	120	100	140	120	120	-	-	-	950							
5	Fec	350	100	100	150	140	130	-	-	-	-	970	6	94,84	4	6	0	10	10
	Fer	300	100	100	150	140	130	-	-	-	-	920							
6	Fec	125	100	120	120	100	150	-	-	-	-	715	6	89,51	4	6	0	10	10
	Fer	120	100	100	100	100	120	-	-	-	-	640							
7	Fec	100	120	102	175	180	145	130	-	-	-	952	7	97,68	3	7	0	10	10
	Fer	100	120	100	170	180	140	120	-	-	-	930							
8	Fec	135	125	100	175	160	130	100	-	-	-	925	7	97,29	3	7	0	10	10
	Fer	130	120	100	170	160	120	100	-	-	-	900							
9	Fec	143	135	120	150	175	140	100	150	-	-	1.113	8	97,93	3	8	0	11	11
	Fer	140	130	120	150	170	140	100	140	-	-	1.090							
10	Fec	190	100	100	50	-	-	-	-	-	-	440	4	97,72	3	4	0	7	7
	Fer	180	100	100	50	-	-	-	-	-	-	430							
TOTAL											9.135					98	98		
x̄											913,5					9,8	9,8		
D.P.											68,51					0,36	0,36		

APÊNDICE VII. Fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos de *Spodoptera frugiperda* que foram tratados no 6º instar (♂ e ♀ tratados)

		DIAS										Nº DE POSTURAS	OVOS FÉRTEIS (%)	PRÉ-POSTURA	POSTURA	PÓS-POSTURA	LONGEVIDADE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						Total	♂	♀
1	Fec	142	150	160	170	120	-	-	-	-	-	742	5	92,99	3	5	0	6	8
	Fer	140	140	150	160	100	-	-	-	-	-	690							
2	Fec	200	250	230	200	125	100	120	-	-	-	1.225	7	91,42	3	7	0	10	10
	Fer	200	200	200	200	120	100	100	-	-	-	1.120							
3	Fec	250	230	200	160	150	100	100	80	50	-	1.320	9	93,18	3	9	0	12	12
	Fer	250	200	200	100	150	100	100	80	50	-	1.230							
4	Fec	200	200	150	100	120	100	100	85	42	40	1.137	10	98,68	3	10	0	13	13
	Fer	200	200	140	100	120	100	100	80	42	40	1.122							
5	Fec	180	172	190	150	143	125	120	100	83	49	1.312	10	96,79	4	10	0	13	14
	Fer	170	170	180	150	140	120	120	100	80	40	1.270							
6	Fec	100	100	40	40	-	-	-	-	-	-	280	4	92,85	4	4	0	8	8
	Fer	100	90	40	30	-	-	-	-	-	-	260							
7	Fec	120	100	50	-	-	-	-	-	-	-	270	3	96,29	3	3	0	8	6
	Fer	120	100	40	-	-	-	-	-	-	-	260							
8	Fec	100	120	130	85	50	40	-	-	-	-	525	6	93,33	3	6	0	9	9
	Fer	100	120	100	80	50	40	-	-	-	-	490							
9	Fec	150	100	120	72	60	56	-	-	-	-	558	6	89,60	3	6	0	9	9
	Fer	120	100	100	70	60	50	-	-	-	-	500							
10	Fec	100	100	120	100	50	40	-	-	-	-	510	6	96,07	3	6	0	9	9
	Fer	100	100	100	100	50	40	-	-	-	-	490							
TOTAL											7.879					97	98		
x̄											787,9					9,7	9,8		
D.P.											133,26					0,73	0,79		

APÊNDICE VIII. Fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos de *Spodoptera frugiperda* que foram tratados no 6º instar (♂ não tratados e ♀ tratadas).

		DIAS										Nº DE POSTURAS	OVOS FÉRTEIS (%)	PRÉ-POSTURA	POSTURA	PÓS-POSTURA	LONGEVIDADE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						Total	♂	♀
1	Fec	200	145	105	100	100	120	60	-	-	-	830	7	98,79	3	7	0	8	10
	Fer	200	140	100	100	100	120	60	-	-	-	820							
2	Fec	200	100	100	120	130	165	150	120	-	-	1.085	8	92,16	3	8	0	9	11
	Fer	200	100	100	100	110	150	130	110	-	-	1.000							
3	Fec	150	100	200	250	200	150	140	130	-	-	1.320	8	95,45	3	8	0	11	11
	Fer	130	100	190	240	200	140	130	130	-	-	1.260							
4	Fec	350	300	200	250	200	100	150	100	50	-	1.700	9	92,35	3	9	0	11	12
	Fer	300	300	190	240	200	100	100	100	40	-	1.570							
5	Fec	200	200	250	230	200	100	50	40	-	-	1.270	8	96,06	4	8	0	12	12
	Fer	190	190	240	220	200	100	40	40	-	-	1.220							
6	Fec	100	100	120	150	-	-	-	-	-	-	470	4	82,97	4	4	0	8	8
	Fer	90	80	100	120	-	-	-	-	-	-	390							
7	Fec	150	120	130	120	140	100	-	-	-	-	760	6	86,84	3	6	0	9	9
	Fer	130	100	120	100	130	80	-	-	-	-	660							
8	Fec	200	220	200	175	120	130	-	-	-	-	1.045	6	95,69	3	6	0	9	9
	Fer	200	200	190	160	120	130	-	-	-	-	1.000							
9	Fec	100	50	40	30	-	-	-	-	-	-	220	4	95,45	3	4	0	7	7
	Fer	100	50	40	20	-	-	-	-	-	-	210							
10	Fec	100	100	50	40	30	-	-	-	-	-	320	5	100,00	3	5	0	8	8
	Fer	100	100	50	40	30	-	-	-	-	-	320							
<b>TOTAL</b>											9.020					92	97		
<b><math>\bar{x}</math></b>											902					9,2	9,7		
<b>D.P.</b>											149,69					0,51	0,55		

APÊNDICE IX. Fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos de *Spodoptera frugiperda* que foram tratados no 6º instar (♂ tratados e ♀ não tratadas).

		DIAS											Nº DE POSTURAS	OVOS FÉRTEIS (%)	PRÉ-POSTURA	POSTURA	PÓS-POSTURA	LONGEVIDADE	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total						♂	♀
1	Fec	146	153	100	100	100	120	-	-	-	-	719	6	95,96	3	6	0	9	9
	Fer	140	150	100	100	100	100	-	-	-	-	690							
2	Fec	40	57	83	109	116	423	-	-	-	-	828	6	96,62	3	6	0	9	9
	Fer	40	50	80	100	110	420	-	-	-	-	800							
3	Fec	12	25	274	189	120	-	-	-	-	-	620	5	96,29	3	5	0	8	8
	Fer	12	25	270	180	110	-	-	-	-	-	597							
4	Fec	100	115	180	200	160	150	100	-	-	-	1.005	7	96,51	3	7	0	10	10
	Fer	100	110	170	200	150	140	100	-	-	-	970							
5	Fec	350	220	130	145	120	-	-	-	-	-	965	5	91,19	4	5	0	9	9
	Fer	300	200	120	140	120	-	-	-	-	-	880							
6	Fec	365	300	310	200	150	100	120	-	-	-	1.545	7	94,49	4	7	0	11	11
	Fer	360	300	300	200	100	100	100	-	-	-	1.460							
7	Fec	250	250	200	210	185	150	100	120	-	-	1.465	8	90,78	3	8	0	11	11
	Fer	200	200	200	210	180	140	100	100	-	-	1.330							
8	Fec	120	100	40	-	-	-	-	-	-	-	260	3	90,38	3	3	0	6	6
	Fer	100	100	35	-	-	-	-	-	-	-	235							
9	Fec	120	100	50	40	30	20	-	-	-	-	366	6	92,89	3	6	0	9	9
	Fer	100	100	50	40	30	20	-	-	-	-	340							
10	Fec	150	100	70	80	50	50	-	-	-	-	500	6	90,00	3	6	0	9	9
	Fer	100	100	70	80	50	50	-	-	-	-	450							
TOTAL													8.273				91	91	
$\bar{x}$													827,30				9,10	9,10	
D.P.													136,17				0,46	0,46	

APÊNDICE X. Fecundidade, fertilidade e longevidade dos adultos de *Spodoptera frugiperda* da testemunha.

		DIAS										Nº DE POSTURAS	OVOS FÉRTEIS (%)	PRÉ-POSTURA	POSTURA	PÓS-POSTURA	LONGEVIDADE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						Total	♂	♀
1	Fec	200	226	160	132	143	150	-	-	-	-	1.011	6	96,93	3	6	0	14	9
	Fer	200	220	150	130	140	140	-	-	-	-	980							
2	Fec	340	450	260	225	136	140	-	-	-	-	1.551	6	89,61	3	6	2	10	11
	Fer	300	400	200	220	130	140	-	-	-	-	1.390							
3	Fec	180	190	192	150	170	125	140	-	-	-	1.147	7	98,95	3	7	2	10	12
	Fer	180	190	190	145	170	120	140	-	-	-	1.135							
4	Fec	180	160	140	130	200	180	170	125	-	-	1.285	8	96,49	3	8	0	10	11
	Fer	170	150	130	130	200	170	170	120	-	-	1.240							
5	Fec	140	145	130	129	143	116	100	93	85	-	1.081	9	97,31	4	9	1	14	14
	Fer	130	140	130	120	140	115	100	92	85	-	1.052							
6	Fec	240	250	190	183	140	100	93	80	60	-	1.336	9	95,58	4	9	1	13	14
	Fer	220	240	180	180	135	100	92	80	50	-	1.277							
7	Fec	125	110	100	90	80	76	80	-	-	-	661	7	99,24	3	7	1	11	11
	Fer	120	110	100	90	80	76	80	-	-	-	656							
8	Fec	140	85	60	43	36	25	20	-	-	-	409	7	100,00	3	7	1	11	11
	Fer	140	85	60	43	36	25	20	-	-	-	409							
9	Fec	150	190	150	135	125	130	140	-	-	-	1.020	7	97,45	3	7	0	10	10
	Fer	149	185	140	130	120	130	140	-	-	-	994							
10	Fec	160	180	160	200	250	120	120	-	-	-	1.190	7	97,47	3	7	1	11	11
	Fer	160	180	160	200	220	120	120	-	-	-	1.160							
TOTAL											10.691					114	114		
x̄											1.069,1					11,4	11,4		
D.P.											104,29					0,50	0,50		