



**WILLIAM ANDRÉS QUESADA**

**POTENCIAIS EFEITOS DO HERBICIDA GLIFOSATO NAS  
CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DE  
*Spodoptera frugiperda* E *Chrysodeixis includens***

**LAVRAS-MG  
2023**

**WILLIAM ANDRÉS QUESADA**

**POTENCIAIS EFEITOS DO HERBICIDA GLIFOSATO NAS CARACTERÍSTICAS  
BIOLOGICAS E REPRODUTIVAS *DE Spodoptera frugiperda* E *Chrysodeixis includes***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

**Prof. Dr. Khalid Haddi**

**Orientador**

**LAVRAS-MG  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Quesada, William Andrés.

Potenciais efeitos do herbicida glifosato nas características biológicas e reprodutivas de *Spodoptera frugiperda* e *Chrysodeixis includens* / William Andrés Quesada. - 2023.

59 p.

Orientador(a): Khalid Haddi.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Glifosato. 2. *Spodoptera frugiperda*. 3. *Chrysodeixis includens*. I. Haddi, Khalid. II. Título.

**WILLIAM ANDRÉS QUESADA**

**POTENCIAIS EFEITOS DO HERBICIDA GLIFOSATO NAS CARACTERÍSTICAS  
BIOLOGICAS E REPRODUTIVAS DE:**

*Spodoptera frugiperda* E *Chrysodeixis includens*

**POTENTIAL EFFECTS OF THE HERBICIDE GLYPHOSATE ON BIOLOGICAL AND  
REPRODUCTIVE FEATURES OF**

*Spodoptera frugiperda* E *Chrysodeixis includens*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

**APROVADA em abril 20 de 2023**

**Dr. Khalid Haddi UFLA**

**Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza UFLA**

**Dr. Oscar Fernando Santos Amaya UNIPAMPLONA**

**Prof. Dr Khalid Haddi  
Orientador**

**LAVRAS-MG  
2023**

A minha avó Veronica Fajardo pelos mimos e sabedoria com que me formou,  
À minha mãe Olga Lu Quesada, pelo amor incondicional e verdadeiro que ela sempre soube me  
dar.

A minha enamorada Yura Martinez, que soube compreender-me à distância e nos dias  
complicados

Aos meus amigos e colegas que tanto me ajudaram nos momentos mais difíceis deste caminho.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço A minha família toda pelo amor e apoio nos momentos difíceis.

À entomologia por me colocar no Brasil e na UFLA, especialmente ao professor Khalid Haddi por me receber na sua equipe de trabalho.

Agradeço especialmente a Karen e Mayra, minhas melhores parceiras pelas ajudas no laboratório e pelas palavras e dicas nos momentos precisos. Também a Leia, Ivan, Rocio, Julia, Bruna, Thamiris, Arthur, Elaine e todas as pessoas do laboratório MEET pela ajuda fornecida durante esta etapa da vida.

Aos meus professores, orientador Khalid e funcionários do laboratório pelo conhecimento compartilhado, mas sobretudo pelo carinho e empatia com que me acolheram desde o primeiro dia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ-02230-21) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Finalmente, agradeço especialmente ao UFLA pelo recebimento e ser luz no meio das trevas de uma pandemia.

Muito Obrigado.

## RESUMO

Os produtos herbicidas com base de glifosato são os mais vendidos no Brasil, sua eficácia e baixo custo tornam o produto perfeito para grande parte do setor agrícola do país. Não entanto seu uso é ainda muito polêmico pelos potenciais efeitos que tem em outros organismos não alvo. As culturas de soja, milho e algodão estão entre as principais em usar estes produtos com glifosato para sua irrigação, sobretudo em aquelas regiões onde cultivam plantas modificadas geneticamente com resistência ao glifosato. Além disso, estas culturas são frequentemente atacadas por *Spodoptera frugiperda* e *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) duas mariposas praga que provocam perdas econômicas importantes. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar o efeito do herbicida glifosato sobre a biologia e reprodução de estas duas espécies de insetos praga. O estudo foi realizado no Laboratório de Entomologia Molecular e EcoToxicologia (M.E.E.T) do departamento de entomologia da UFLA. Realizaram-se testes de toxicologia em ovos, lagartas e pupas para cada espécie usando três tratamentos: 1) produto comercial Roundup Original® na dose recomendada na bula do produto, 2) a dose recomendada diluída 20 vezes com água destilada e 3) somente água destilada como grupo controle. Os três tratamentos foram aplicados diretamente com micropipetas sobre os ovos e lagartas das duas espécies. As pupas foram expostas mergulhando-as individualmente em cada tratamento. Depois da exposição, as larvas e pupas foram monitoradas até a emergência do adulto. Os parâmetros avaliados incluem a sobrevivência e duração de cada estágio. O efeito sobre os adultos, oriundos de ovos, lagartas e pupas expostos aos tratamentos, foi estudado avaliando a fertilidade e fecundidade de casais e grupos de casais acondicionados para acasalamento e oviposição em gaiolas especializadas até a morte. Todos os experimentos foram realizados sob condições controladas de temperatura ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa ( $70\pm 10\%$ ) e foto período (12:12 L: D). Durante este estudo foi possível encontrar efeitos negativos significativos do uso do glifosato sobre a taxa de sobrevivência e a fecundidade de organismos pragas não-alvos associadas a culturas de importância econômica no Brasil.

**Palavras-chave:** Glifosato. *Spodoptera frugiperda*. *Chrysodeixis includens*.

## ABSTRACT

The herbicide products based on glyphosate are the champions of sales in Brazil, their effectiveness and low cost make them the ideal product for much of the agricultural sector of the country. However, their use is still very controversial for the potential effects they may have on other non-target organisms. Soybean, corn, and cotton crops are the main targets of these glyphosate products, especially in those regions where genetically modified plants with glyphosate resistance are grown. In addition, these crops have in common that they are often attacked by *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens*, (Lepidoptera: Noctuidae) two pest moths that cause millionaire economic losses in almost everything the world and are a threat to the food security of some regions. Thus, this work aimed to characterize the effect of the herbicide glyphosate on the biology of these two species of insect pests. For this, the study was carried out at the Laboratory of Molecular Entomology and EcoToxicology (M.E.E.T) of the entomology department of UFLA. Toxicology tests were performed on eggs, caterpillars, and pupae for each species using three treatments: 1) commercial product Roundup Original® at the recommended dose in the package insert, 2) the recommended dose diluted 20 times, and 3) only distilled water as a control group. The three solutions were applied directly with micropipettes on the eggs and caterpillars of the two species; pupae were dipped individually in each treatment. After exposure, the larvae and pupae were monitored and their survival and duration of each stage were monitored until the adult emergence. The effect on adults was assessed by evaluating the fertility and fecundity of couples and groups of couples in specialized cages until death. All experiments were carried out under controlled conditions of temperature ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), relative humidity ( $70\pm 10\%$ ) and photoperiod (12:12 L: D). Our results showed significant negative effects of the use of glyphosate on the survival and reproduction of non-target pest organisms associated with crops of economic importance in Brazil.

**Keywords:** Glyphosate. *Spodoptera frugiperda*. *Chrysodeixis includens*



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>Referencial teórico</b> .....	<b>13</b>
2.1	O glifosato: líder mundial dos herbicidas .....	13
2.2	<i>Spodoptera frugiperda</i> .....	14
2.3	<i>Chrysodeixis includens</i> .....	15
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
3.1	Objetivo geral.....	17
3.2	Objetivos específicos.....	17
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	<b>18</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
5.1	Herbicida: glifosato .....	19
5.2	Organismos de Estudo .....	19
5.3	Aspectos gerais da criação .....	20
5.3.1	Gaiolas de criação .....	20
5.3.2	Obtenção dos ovos .....	21
5.3.3	Obtenção das lagartas .....	21
5.3.4	Obtenção das pupas.....	22
5.4	Efeito da exposição dos ovos de <i>S. frugiperda</i> e <i>C. includens</i> ao glifosato .....	22
5.5	Efeito da exposição das lagartas de primeiro, segundo e terceiro instar de <i>S. frugiperda</i> e <i>C. includens</i> ao glifosato.....	23
5.6	Efeito da exposição das pupas de <i>S. frugiperda</i> e <i>C. includens</i> ao glifosato.....	23
5.7	Efeito da exposição ao glifosato na fecundidade e fertilidade das fêmeas de <i>S. frugiperda</i> e <i>C. includens</i> .....	24
5.8	Análise estatística.....	25
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
6.1.	Efeito da exposição ao glifosato nos ovos de <i>S. frugiperda</i> e <i>C. includens</i> .....	26
6.2.	Efeito da exposição ao glifosato em lagartas de <i>S. frugiperda</i> e <i>C. includens</i> .....	28
6.3	Efeito da exposição ao glifosato em pupas de <i>S. frugiperda</i> e <i>C. includens</i> .....	32
6.4	Tempo de duração dos estádios.....	34
6.5	Efeito da exposição ao glifosato em a fecundidade e fertilidade das fêmeas.....	35
6.5.1	<i>Spodoptera frugiperda</i> .....	35
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 1960 em Brasil, os agrotóxicos fazem parte da estratégia tecnológica para acrescentar os resultados de produção agrícola com a chamada “revolução verde” e o “Programa Nacional de defensivos Agrícolas” (PNDA). Assim, com o implemento destas políticas a favor da produção e uso de agrotóxicos, Brasil tornou-se o maior consumidor do planeta destas substâncias e um dos maiores produtores agrícolas (ALVES; SOUZA, 2018).

Embora seu uso tenha favorecido a produção do país, as desvantagens pelo uso excessivo e inadequado são diversas e os estudos que as documentam são cada vez mais frequentes. Antes de 1970, as afetações dos aquíferos e solo eram pouco conhecidas; no entanto, na atualidade os alarmas estão ativados pela presença de substâncias tóxicas nas fontes de água subterrânea e no solo com efeitos contaminantes sobre a saúde das comunidades biológicas e os ecossistemas de rios e mares (BUTTLER; MARTINKOVIC; NESHEIM; 1998).

Os herbicidas correspondem a mais de 50% do comércio dos agrotóxicos no mundo (ZHOU et al., 2020), contudo, os mecanismos que eles têm para combater as plantas daninhas são pouco diversos e muitas dessas pragas têm alcançado desenvolver resistência. Por exemplo, recentemente Clay (2021) reportou resistência aos herbicidas em 521 casos documentados no mundo. Além disso, 23 dos 26 sítios de ação que estes produtos têm para atacar as pragas, estão comprometidos na capacidade de resistência das plantas daninhas e esta é uma tendência que vem crescendo desde a década dos 80s até hoje gerando uma grande preocupação na agricultura (CLAY, 2021).

Não entanto, as vantagens que os herbicidas oferecem aos agricultores em quanto o custo baixo, a facilidade com que eles são usados e a eficiência que tem para solucionar o problema com as ervas daninhas, ainda quando elas têm alguma resistência, fazem que estes produtos sejam muito usados no Brasil até hoje (ALVES et al., 2018). É por isso que atualmente o Brasil é um dos principais importadores dessas substâncias no mundo (PELAEZ et al., 2015) e porém é responsabilidade do país fazer um uso racional e controlado dessas substâncias em seu território se quiser alcançar uma agricultura sustentável.

De todos os herbicidas comercializados neste país, os produtos com glifosato são os mais vendidos nos últimos anos (NODARI; HESS, 2020). Sua eficácia é tão alta que, desde que foi lançado no mercado vem ganhando cada vez mais popularidade em os agricultores e no período desde 2014 até 2018 reportaram-se vendas por 943.626,43 toneladas de produtos com glifosato pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2020). No entanto, segundo

SAMMONS e GAINES (2014) o glifosato não teve ervas resistentes reportadas pelos primeiros 15 anos de uso depois de seu lançamento ou mercado, mas para 2017 foram reportadas 263 populações resistentes em 36 espécies (NODARI et al, 2020) 33% mais que a quantidade registrada até 2014.

Além do problema com a resistência das ervas daninhas, o uso excessivo de agrotóxicos é uma das principais causas de danos aos ecossistemas e perda de biodiversidade no último século (FOX, 2012) porém, seus efeitos a longo prazo são bastante preocupantes, pois podem se acumular e permanecer no ecossistema, passar de um organismo para outro por bioacumulação na cadeia trófica (DABNEY; PATIÑO, 2018), tem baixa especificidade de ação afetando espécies não alvo, podem erodir o solo, contaminar aquíferos e gerar pressões de seleção indesejáveis sobre as pragas que atacam (LIMA; BOËCHAT; GÜCKER, 2021)

Analisando como exemplo o Brasil, em apenas 50 anos de uso dos produtos de glifosato, algumas das regiões agrícolas do país, acumularam no solo concentrações altamente elevadas (MAGGI et al., 2020). Esse fato é de grande preocupação para alguns especialistas devido aos efeitos colaterais, especialmente naquelas regiões onde os cultivos de soja, milho e algodão transgênicos com resistência ao glifosato, são muito comuns e o glifosato é dispersado com maior frequência. Por exemplo, em um estudo de 2021 sobre o glifosato em Brasil, os pesquisadores Lima *et al* (2021) encontraram evidência de efeitos tóxicos em 27 espécies de produtores e consumidores na rede trófica, incluindo humanos, peixes, anfíbios, minhocas, crustáceos e diferentes microrganismos.

Desde o ponto de vista fisiológico, o glifosato é um herbicida sistêmico que interfere na rota do Shikimate por bloqueio do sítio ativo da enzima 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP), que é essencial no metabolismo dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina das plantas (COUTINHO; MAZO, 2005), (SAMMONS et al., 2014), sendo assim, altamente eficaz na eliminação de ervas daninhas e o aumento da produção de culturas de importância econômica. No entanto, os seus componentes são incorporados em diferentes tecidos da planta e podem atingir outros organismos não alvo. Ao mesmo tempo, as moléculas derivadas da sua degradação, como aminometil, ácido fosfônico (AMPA) e N-Metilglifosato têm comportamento recalcitrante no ecossistema e são ainda mais tóxicas (ZACHARIA, 2011).

Não entanto, segundo uma nota técnica da ANVISA publicada no 2019, o uso de glifosato no Brasil é seguro. Mas nos anos anteriores (2015 e 2017) a própria ANVISA classificou a substância

mesma como potencialmente cancerígena. É por isso que são necessários mais estudos que ajudem a compreender as dinâmicas que este tipo de substâncias tóxicas podem ter sobre o ecossistema todo; e assim criar protocolos de uso que possam ajudar a diminuir os efeitos negativos que tem, avaliar os riscos e aportar novas evidências sobre seus efeitos.

Nesse sentido, um dos principais grupos que têm servido para monitorar a dinâmica dos ecossistemas ao longo do tempo é a ordem Lepidoptera (FOX, 2013) devido ao fato de suas populações serem bastante sensíveis às mudanças no ambiente. No entanto, os estudos sobre a influência do glifosato nesses organismos têm sido pouco desenvolvidos e a maior parte da bibliografia tem se concentrado principalmente nas abelhas (DAI et al., 2018) e deixando a relação com as borboletas e mariposas pouco exploradas. Isso é estranho, principalmente porque algumas são excelentes bioindicadores na dinâmica dos ecossistemas e também porque várias espécies de mariposas são pragas de muitas culturas economicamente importantes, pelo que efeitos negativos sobre elas poderiam ser úteis para seu controle no MIP.

Tendo em conta o anterior, neste estudo quisemos caracterizar os efeitos que o glifosato pode ter sobre a biologia de dois das principais mariposas praga que afetam as culturas de milho, soja e algodão onde o uso é a concentração de glifosato e alta. Tais espécies são *Chrysodeixis includens* e *Spodoptera frugiperda*, duas desfolhadoras noturnas que causam perdas de milhões de dólares por ano no território brasileiro e são consideradas mundialmente como uma das espécies de maior preocupação no cultivo dessas plantas, pois podem diminuir a safra de produção entre 20 e 35% (ANDREWS, 1989). Estudar o efeito direto de um herbicida na reprodução e sobrevivência de insetos-praga é um campo pouco explorado, talvez por se supor dentro dos padrões de segurança ambiental dessas moléculas que não devam ter efeito sobre essas espécies. Não entanto, neste estudo encontraram-se vários efeitos negativamente significativos na sobrevivência dessas pragas nas fases de ovo, lagarta e pupa, mesmo assim, no quanto a taxa de fecundidade e fertilidade nos adultos. O tempo de desenvolvimento em diferentes estágios de seus ciclos biológicos também foi avaliado mas não acharam se diferenças significativas entre os tratamentos.

Finalmente, as aplicações que esta pesquisa pode ter no campo de manejo integrado de pragas são diversas, porque um herbicida estaria tendo influência direta sobre a taxa de sobrevivência e reprodução das populações de insetos praga na dose recomendada do produto. Também, os efeitos encontrados sugerem que as borboletas e outras mariposas que habitam os agroecossistemas,

poderiam estar sendo afetadas pelo glifosato. Não entanto são necessários mais estudos sobre as relações entre os herbicidas e este grupo em particular.

## 2. Referencial teórico

### 2.1 O glifosato: líder mundial dos herbicidas

O glifosato ( $C_3H_8NO_5P$ ), também conhecido como N – fosfometil glicina é um herbicida não específico de ação sistêmica, com patente de Monsanto desde 1970 (SHECACKS e DARVAS, 2011) que interfere com a síntese de aminoácidos aromáticos inibindo a enzima 5 - enolpiruvishikimate-3-fosfato synthase (EPSPS) fazendo um bloqueio da via Shikimato em plantas (ANDREOTTI et al., 2018). Porém pode alterar os processos vitais das plantas como é a síntese de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (COUTINHO; LUIZ; MAZO, 2005)

Além disso, os herbicidas a base de glifosato (HBG) contêm coadjuvantes, como tensoativos e surfactantes, além do ingrediente ativo de glifosato que poder ter efeitos tóxicos sobre os animais (NODARI et al., 2020). Em quanto a classe toxicológica estabelecida pela ANVISA (2016) o glifosato é catalogado tipo IV (pouco tóxico) e em 2017, a mesma agência ANVISA classificou o glifosato como potencialmente cancerígeno. Não entanto, em 2019 publicou uma nota técnica afirmando o uso seguro desta substância na agricultura. Contudo, atualmente segue em processo de reavaliação do perfil de segurança pela ANVISA; do mesmo jeito, na Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA) e Agência Europeia de Substância Químicas (ECHA). (ANVISA,2022) devido a seus efeitos controversias.

Para o Brasil, ele tem uso autorizado para aplicação em pós-emergência em culturas de milho, arroz, algodão, café, cana-de-açúcar, pera, ameixa, batata-doce, banana, batata-yacon, citros, beterraba, caju, caqui, cacau, cará, carambola, cenoura, , coco, ervilha, feijão, feijão-caupi, figo, fumo, grão-de-bico, gengibre, nectarina, goiaba, inhame, lentilha, maçã, mamão, mandioca, mandioquinha-salsa, mangaba, nabo, pastagem, pêsego, rabanete, seringueira, soja, amendoim, trigo e uva” (NODARI et al., 2020)

Considerando os estudos realizados por ZANUNCIO et al., (2018), o Roundup Original (48% p/v de sal IPA; Monsanto de Brasil Ltda, Brasil) é um dos produtos comerciais mais usados no Brasil.

Alguns autores, como Martín Rossi (2020) fazem seguimento dos impactos do glifosato sobre os ecossistemas; em seu livro *Antologia toxicológica do glifosato +1000 Evidencias*

*científicas publicadas sobre los impactos del glifosato en la salud, ambiente y biodiversidad*. Ele recopila artículos científicos e outros documentos a nível mundial que aportam evidencia comprovada dos efeitos tóxicos desta substancia, por exemplo, em peixes, mamíferos, plantas não alvo, anfíbios, zooplâncton, fitoplâncton, algas, répteis, fungos, abelhas (BALBUENA et al., 2015) e libélulas no caso dos insetos, tartarugas e outros organismos. Também, efeitos sobre o ambiente no quanto solo e água e a saúde humana, como agente cancerígeno, mutagênico, teratogênico (PAGANELLI et al., 2010) afetações reprodutivas (CLAIR et al., 2012) entre outras. No entanto, o glifosato segue sendo o herbicida campeão de vendas no Brasil, e pese a que autores locais como CORINA HESS no 2020, alertam sobre os perigos que esta sustância tem na agricultura e saúde brasileira, seu uso está ainda bastante estendido.

Nossa pesquisa pretende aportar evidencias novas sobre seu efeito sobre dois das mariposas pragas das lavouras de milho, soja e algodão que tem resistência genética ao glifosato, porque estes estudos não foram feitos anteriormente e os lugares onde são cultivadas estas plantas tem alta concentração de glifosato (MAGGI et al., 2020).

## **2.2 *Spodoptera frugiperda***

A espécie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma mariposa da família Noctuidae de origem na América, sua distribuição pelo mundo é ampla, com presença pela primeira vez no África em 2016 (GEBREYESUS, 2020), em países de Asia como China e Índia foi encontrada em 2018 (WANG et al., 2018). Alcançou na Australia em 2020 (PIGGOT et al., 2021) e também tem reportes em Europa, principalmente associada com culturas de milho e arroz onde pode diminuir os campos de cultivo rapidamente. Pelo que é catalogada como uma das espécies de maior importância econômica no mundo (WANG et al., 2018).

Também conhecida como a lagarta do cartucho é uma mariposa de ciclo de vida curto: 32 a 43 dias em machos e 34 a 46 dias em fêmeas desde ovo até emergência do adulto (SHARANABASAPPA et al., 2018) no entanto, ela pode variar na duração dependendo da fonte de alimentação (ANDREWS, 1980), a temperatura (DU PLESSIS; SCHELEMMER; VAN DER BERG, 2020), e umidade. Por exemplo, CHANG et al., (2022) encontraram que a 25°C, *S. frugiperda* tem um ciclo de duração completo de 39,87 a 43,94 dias; sendo mais longo na fêmea que no macho. Também encontraram, que o tempo de eclosão dos ovos, poderia durar entre 3,30 e 3,41 dias na mesma temperatura. Do mesmo jeito, o desenvolvimento larval pode durar entre 31,09

e 35,02 dias; e finalmente, o tempo de desenvolvimento como pupa foi calculado de 12,83 a 13,92 dias. Este mesmo estudo sugere que o tempo do ciclo de vida completo pode ser mais acelerado perto dos 30°C, pelo que convida a ter cuidado com as adaptações e ampliação nas regiões de distribuição de esta espécie por efeito da mudança climática. (YI CHAI CHEN et al., 2022)

Além do anterior, é a principal praga das lavouras de milho em América; (PAULA et al., 2012) ela pode se alimentar de 76 famílias diferentes (OVERTÓN et al., 2021) e tem 353 espécies de plantas hospedeiras (MONTEZANO et al., 2018). Assim, algumas outras espécies de importância econômica atacadas por *S frugiperda* são arroz, cana de açúcar, soja, pastagem, amendoim, repolho, alfafa, trevo, batata, feijão, tomate, fumo, abóbora, espinafre e algodão (Andrews, 1980) As perdas por esta praga no mundo são difíceis de quantificar, não entanto, se estima que só em Brasil em 2009 foram gastos US 600 milhões em planos de manejo para *S. frugiperda*, e que em o continente africano, as perdas por ano podem chegar até os US 1300 milhões. (OVERTON et al., 2021). Uma parte das perdas estão em os gastos de controle, outra pelos danos ocasionados na produtividade do cultivo e pelos danos na aparência do produto comercial; por exemplo, nas culturas de milho a lagarta de cartucho devora rapidamente as folhas e além pode penetrar no fruto e estragar a espiga.

No que diz respeito à manejo de pragas, em princípio foi controlada efetivamente com diferentes inseticidas químicos, mas com o tempo os casos de resistência foram mais comuns nas populações e a efetividade foi diminuindo com vários inseticidas. (YOUNG, 1979). Com o descobrimento de inseticidas a base de *Bacillus thuringiensis (Bt)* o problema parecia estar solucionado, até que novamente a resistência ressurgiu com mais frequência (HUANG, 2021); contudo e o problema da resistência desenvolvida pela praga, os inseticidas sintéticos e o Bt ainda são as alternativas mais usadas na atualidade para o controle desta espécie; por isso, os cientistas estão em procura de novas alternativas para a seu manejo integrado.

### **2.3 *Chrysodeixis includens***

Também conhecida como lagarta falsa-medideira, o antigamente como do gênero *Pseudoplusia*, é uma espécie de mariposa da família Noctuidae, pertencente ao complexo Plusiinae e originária do continente americano. Assim, desde a safra do ano 2000 -2001 ela mudou de ser uma praga secundária, a ser uma praga de primeira categoria de importância (MOSCARDI et al.,



2012) principalmente por seus efeitos prejudiciais nas culturas de soja e algodão, onde vem incrementando sua presença nas lavouras do Brasil como consequência da perda em populações de inimigos naturais (CARVALHO; FERREIRA; BUENO, 2012) e desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência aos inseticidas químicos (PERINI et al., 2021) sendo assim uma praga difícil de controlar.

Sua distribuição está restringida só nas Américas, desde o norte dos Estados Unidos até América do Sul, tendo ocorrência como praga principalmente no Brasil, Paraguay, Uruguay e Argentina. Não entanto, devido a seu comportamento migratório, amplia capacidade reprodutiva e sua natureza polífaga, tem acrescentado sua presença no continente (PERINI et al., 2021). Ela pode se alimentar de 73 plantas no Brasil, distribuídas em 29 famílias (BERNARDI, 2012) onde tem principal importância na soja, fumo, girassol, tomate, couve, algodão e feijão por seu impacto na produção agrícola; não entanto, as outras plantas hospedeiras podem ser um reservatório para as fêmeas, ovos e lagartas desta espécie.

O ciclo de vida é mais curto, em comparação com *S. frugiperda*, entre 27 a 34 dias até a emergência dos adultos; embora, segundo PALMA *et al.*, 2015 tem duração de 43 dias. O desenvolvimento embrionário no ovo pode durar de 2,5 (PETERSON, 1964) a 5 dias até a eclosão (MOSCARDI et al. 2012) a fase completa como lagarta pode variar de entre 13 a 20 dias até a formação de casulo e crisalida, após de 7 a 9 dias emerge o adulto (MOSCARDI et al., 2012). As fêmeas ovipositam em média 700 ovos (BERNARDI, 2012, p. 21) de jeito individual ou agrupados, e podem se acasalar após de 4 a 22h.

É uma espécie que pode ter comportamento migratório por diferentes regiões de Estados Unidos (PALMA; MAEBE; SMAGGHE, 2015) Em Brasil, está distribuída desde o sul do Brasil até o Roraima MASARO JUNIOR et al., citado em ANDRADE, 2014, apresenta uma alta capacidade reprodutiva, e durante a fase de lagarta ela come a planta rapidamente na fase vegetativa. Não entanto, as pesquisas da sua resposta ante a exposição ao glifosato, que é o herbicida mais usado nestas lavouras nunca foram feitas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar o efeito do herbicida glifosato na formulação comercial do produto Roundup Original sobre a biologia das espécies pragas *S. frugiperda*, e *C. includens*

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da exposição ao herbicida glifosato dos ovos de *S. frugiperda*, e *C. includens*, no que diz respeito à mortalidade e duração do estágio dessas espécies.
- Avaliar os efeitos da exposição ao herbicida glifosato em larvas L1, L2 e L3 de *S. frugiperda* e *C. includens*, no quanto a duração dos estágios, a mortalidade em cada instar e a fertilidade e fecundidade de adultos dessas espécies provenientes de larvas de terceiro instar (L3) tratadas.
- Analisar os efeitos da exposição ao herbicida glifosato das pupas de *S. frugiperda*, e *C. includens*, no que diz respeito a duração do estágio, mortalidade, fertilidade e fecundidade das fêmeas dessas espécies.

#### 4. HIPÓTESES

**H1:** A exposição dos ovos terá um efeito negativamente significativo na duração do estágio e no sucesso de eclosão dos ovos de *S. frugiperda* e *C. includens*.

**H2:** A exposição das lagartas terá um efeito negativamente significativo na duração do instar L1, L2 e L3, também na sobrevivência dos indivíduos, e na fertilidade e fecundidade das fêmeas de *S. frugiperda* e *C. includens*

**H3:** A exposição das pupas terá um efeito positivamente significativo na duração do estágio, na sobrevivência dos indivíduos e na fertilidade e fecundidade das fêmeas de *S. frugiperda*, e *C. includens*.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Herbicida: glifosato

Os bioensaios de toxicologia foram feitos com a formulação comercial do Roundup® (BAYER) que é o herbicida mais vendido no Brasil. A formulação comercial contém em sua composição o equivalente de 480,0 g/L (48,0% m/v) do ácido N-(phosphonomethyl)glycine; comumente chamado de glifosato. Adicionalmente a formulação contém outros ingredientes não especificados na bula do produto na concentração de 678,0 g/L (67,8% m/v). Para a manipulação deste produto é recomendado uso de luvas, óculos, máscara de segurança, capa e avental impermeável.

A concentração de uso recomendada na bula é de 2,5L de Roundup® para cada 30L de água limpa. Assim, a mesma concentração e uma diluição (20X) da mesma foram usadas nos bioensaios de toxicologia para tratar ovos, lagartas e pupas. Ou seja, as doses testadas foram: 1- a dose recomendada na bula, chamada “PC”; 2- a dose diluída chamada “DL” que foi preparada com 1ml da solução PC e 19ml de água destilada e 3- a dose controle chamada “GC” consistindo de água destilada somente.

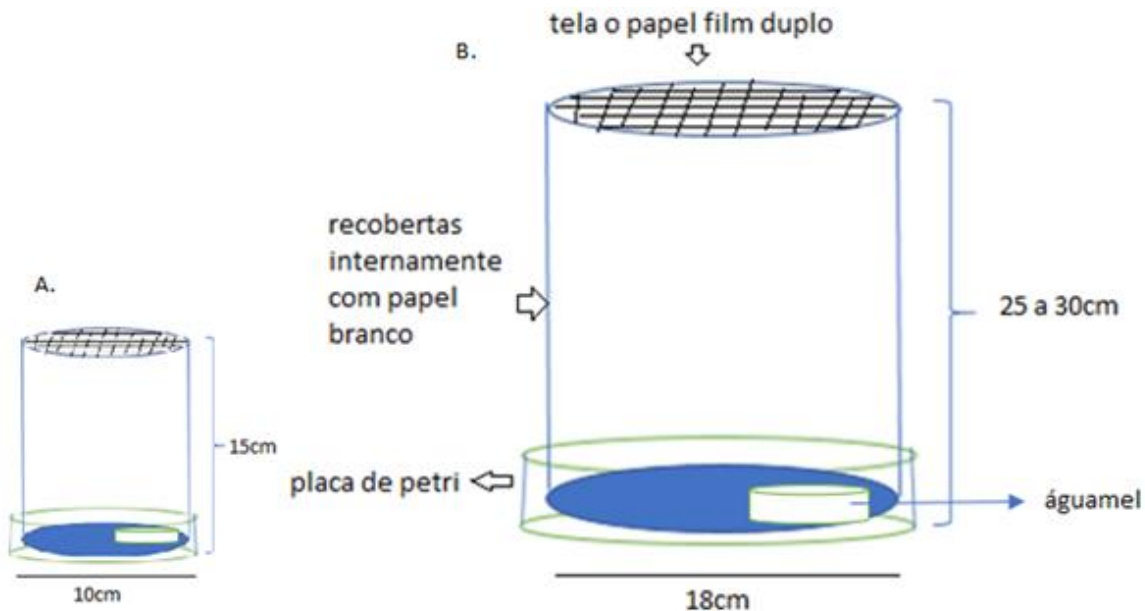
### 5.2 Organismos de Estudo

As duas espécies estudadas foram *S. frugiperda* e *C. includens*, duas espécies da ordem Lepidóptera de grande importância econômica no Brasil e no mundo. As duas espécies foram criadas no laboratório de Entomologia Molecular e Eco-Toxicologia (M.E.E.T) do departamento da Entomologia da Universidade Federal de Lavras (Minas Gerais, Brasil). As criações foram mantidas em condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa do ar ( $70 \pm 10\%$ ) e fotoperíodo de (14:10 L:D) (HOFFMANN; BASSULI; MOSCARDI, 1985). Todos os bioensaios foram conduzidos nas mesmas condições de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo.

### 5.3 Aspectos gerais da criação

#### 5.3.1 Gaiolas de criação

Os adultos das duas espécies estudadas foram mantidos em gaiolas de criação. Essas gaiolas foram feitas com tubos de PVC e tinham tamanhos variados. As gaiolas de criação da *S. frugiperda* possuíam 10 cm de diâmetro e 15cm de altura, quanto as gaiolas de criação da *C. includens* possuíam 18 cm de diâmetro e 25 a 30cm de altura (Ilustração 1). Ambas gaiolas foram cobertas no topo com uma camada dupla de papel filme ou tecido voil, segurados com ligas de borracha para evitar a fuga dos insetos. Na base inferior das gaiolas foi colocada uma placa de Petri (de 10 ou 18 cm de diâmetro) revestida com papel toalha. Às paredes interiores das gaiolas ficavam completamente cobertas com papel branco para oviposição. Os adultos das duas espécies foram alimentados *ad libitum* com uma solução de mel (80% água + 10% mel; APÊNDICE 1) embebida em cotonetes (2 cm de comprimento) e colocados dentro da gaiola numa placa de petri de 3,5 cm de diâmetro.



**Ilustração 1.** Modelo das gaiolas em PVC usadas para nutrição, acasalamento e oviposição dos adultos. A para casais. B. para grupos de adultos

### 5.3.2 Obtenção dos ovos

Depois de 2 a 4 dias de acasalamento, as fêmeas das duas espécies iniciam a oviposição colocando seus ovos no papel das gaiolas. Este papel com ovos é substituído diariamente por um novo. O papel é retirado cuidadosamente e fragmentos do mesmo papel em torno das regiões de oviposição recortados. Os ovos e massas de ovos nos fragmentos cortados foram contados e mantidos em placas de petri (18 a 20cm de diâmetro) cobertas com papel filme e com um cotonete umedecido para evitar a dissecação dos ovos. Os ovos e massas de ovos foram mantidos nessas placas de petri até a eclosão ou até serem usados no bioensaios.

### 5.3.3 Obtenção das lagartas

Como as lagartas recém emergidas são muito vulneráveis e podem sofrer lesões durante o manuseio, é recomendável mantê-las por pelo menos dois dias nas mesmas placas de petri para depois serem manipuladas sem risco de ferimentos.

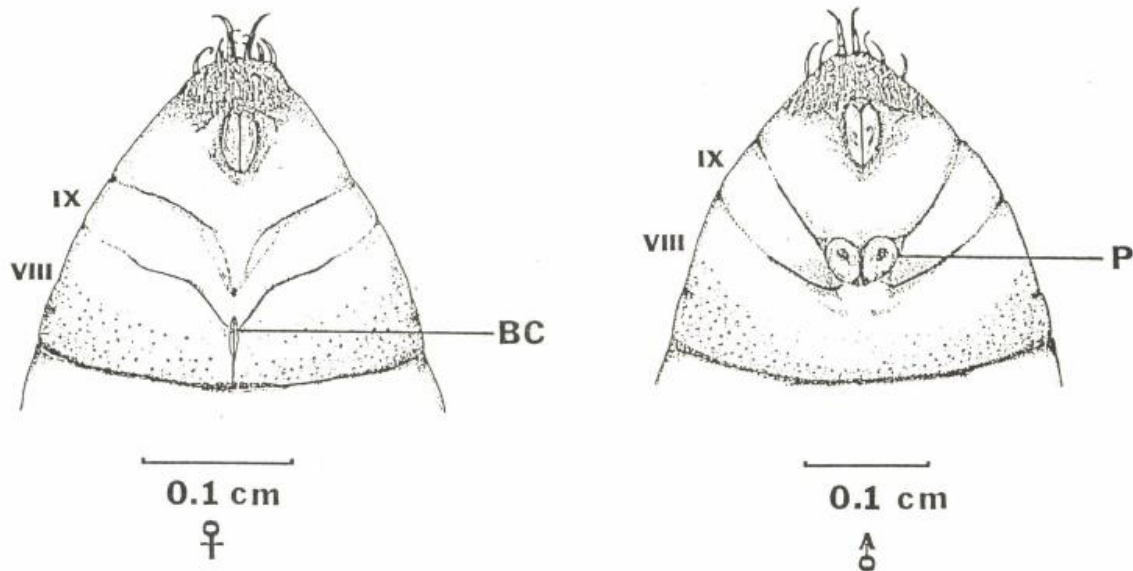
Após o intervalo de dois dias, as lagartas são retiradas das placas de petri com ajuda de um pincel de 1mm e individualizadas em copos de plástico de 15 ml com tampa (Ilustração 2). Este procedimento foi feito perto de duas lamparinas para evitar a inoculação acidental de patógenos sobre a dieta. A individualização das lagartas de *S. frugiperda* é primordial para evitar o canibalismo. Todos os instares larvais foram criados e alimentados com  $\pm 2 \text{ cm}^3$  dieta artificial até a fase de pupa (APÊNDICE 2 e 3). As lagartas foram observadas diariamente e a determinação dos instares larvais foi feita pela observação das larvas sob microscópio estereoscópico binocular e busca por capsulas cefálicas correspondentes.



**Ilustração 2.** Copos de 15ml com tampa furada e dieta artificial para a criação individual de lagartas. Os bicos com álcool são para favorecer condições assépticas no interior do copo.

### 5.3.4 Obtenção das pupas

Depois a fase larval, as pupas obtidas são desinfetadas com uma solução aquosa de água sanitária (0,01%: v/v) e deixadas para secar sobre papel toalha. A sexagem das pupas de *S. frugiperda* (ilustração 3) é feita usando as chaves taxonômicas de BUTT (1968), HOFFMANN et al., (1985) OLIVERA (1981). Em seguida, as pupas das duas espécies são colocadas em gaiolas de acasalamento e oviposição até a emergência do imago.



**Ilustração** Segmentos abdominais apicais de pupas fêmeas e machos de *A. gemmatalis*. (Noctuidae). BC - Bursa copulatrix; P - estruturas arredondadas ("almofadas"); VIII- 8vo segmento; IX - 9no segmento (Desenhado por An-Ly Vao. em OLIVEIRA 1981), citado em HOFFMANN et al., 1985, p. 13.

### 5.4 Efeito da exposição dos ovos de *S. frugiperda* e *C. includens* ao glifosato

Das gaiolas de criação de cada espécie foram coletados ovos (*C. includens*) e massas de ovos (*S. frugiperda*) a partir da segunda postura. Em seguida, foram contados e rotulados de acordo com a espécie, tratamento e data de postura. Foram testados 3 tratamentos correspondendo a três doses do glifosato (PC, DL e GC). Foram usadas 4 repetições para *S. frugiperda* contendo entre 105 e 175 ovos por repetição e 5 repetições para *C. includens* contendo entre 100 e 270 ovos por repetição. Para cada repetição foram escolhidos ovos com características físicas ótimas, descartando ovos achatados ou deformados.

As doses do herbicida foram aplicadas, usando micropipetas, diretamente sobre as massas de ovos em *S. frugiperda*, (50µl para cada 50 ovos) e em ovos individuais (10 µl para cada 10 ovos). Cada repetição foi feita com ovos da mesma data de postura nos três tratamentos. Seguidamente, os ovos tratados foram depositados em placas de Petri de 15 - 20 cm forradas com duas camadas de papel filtro umedecido com água destilada para evitar a dissecação dos ovos. As placas de Petri foram cobertas com papel filme e marcadas com o nome da espécie, o tipo de tratamento e a data de postura e acondicionadas em câmara climatizada, tipo BOD, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $60\% \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas. O tempo até a eclosão (número de dias desde a postura) e o número de ovos eclodidos foram registrados diariamente. A porcentagem da eclosão dos ovos em cada tratamento foi calculada de acordo com o número de ovos eclodidos em relação ao total de ovos tratados.

### **5.5 Efeito da exposição das lagartas de primeiro, segundo e terceiro instar de *S. frugiperda* e *C. includens* ao glifosato**

Como as lagartas podem ser encontradas nas lavouras em diferentes estágios de desenvolvimento, é importante estimar o impacto que os herbicidas podem ter sobre sua biologia. Para isso, foram feitos testes toxicológicos para determinar a taxa de mortalidade em cada espécie e estimar o estágio susceptível ao glifosato.

Nos bioensaios toxicológicos com as lagartas, foram usadas 5 repetições contendo 20 lagartas da mesma idade por repetição para cada espécie. As doses testadas (PC, DL, GC) foram aplicadas na região dorsal do abdômen das lagartas individualmente usando micropipetas. Os volumes aplicados foram ajustados para cada instar (5µl na lagarta de instar 1 (L1), 10µl na lagarta de instar 2 (L2), e 20µl na lagarta de instar 3 (L3). Em seguida, as lagartas foram colocadas em placas de petri com dieta artificial e a mortalidade em cada tratamento, foi avaliada após 1 h, 24 h, 48 h, 72h, 96h, 120h.

### **5.6 Efeito da exposição das pupas de *S. frugiperda* e *C. includens* ao glifosato**

O efeito da exposição ao glifosato nas pupas de cada espécie foi avaliado mergulhando-as individualmente por 45 segundos em 20ml de solução de cada um dos três tratamentos testados (PC, DL, GC). As pupas tratadas foram deixadas secar ao ar livre por 3 minutos e em seguida, foram individualizadas em copos de plástico (15 ml) com tampa até a emergência do adulto. Para



cada tratamento foram usadas 6 repetições de 10 pupas. O tempo até a emergência do adulto e a mortalidade de cada indivíduo tratado foram registrados diariamente.

### **5.7 Efeito da exposição ao glifosato na fecundidade e fertilidade das fêmeas de *S. frugiperda* e *C. includens***

Considerando os resultados do bioensaio de toxicologia e para avaliar o impacto do glifosato sobre a fertilidade e fecundidade das fêmeas, foram realizados dois bioensaios tratando independentemente larvas L3 e pupas das duas espécies de mariposas.

Em relação com o bioensaio com as lagartas, foram usadas 150 lagartas do 3º instar (L3) procedentes de ovos não tratados para os tratamentos (PC, DL, GC). Um volume de 20µl de solução em cada tratamento foi aplicado com micropipetas diretamente na região dorsal do abdômen das lagartas. Depois, as lagartas tratadas foram individualizadas em copos (15 ml) com tampa e alimentadas com  $\pm 2 \text{ cm}^3$  de dieta artificial (como descrito anteriormente) até a fase de pupa. Cada copo foi marcado com o nome da espécie, tipo de tratamento e data de eclosão. O tempo de desenvolvimento de cada instar e da pupa até a fase de adulto foi registrado. Os instares larvais foram determinados baseando-se na troca da capsula cefálica e a variação no tamanho de acordo com a regra de Dyar (GULLAN; CRANSTON, 2014)

As pupas das espécies *S. frugiperda* foram sexuadas usando a chave de BUTT (1969) e HOFFMANN *et al.* (1985) e individualizadas até a fase de adulto. Após a emergência, 17 a 20 casais foram formados e mantidos separados em gaiolas de criação descritas anteriormente. Os adultos emergidos foram alimentados *ad libitum* com solução de mel a 10% embebendo chumaço de algodão colocado em placa de Petri (3cm de diâmetro) dentro as gaiolas. Os chumaços de algodão e o papel sulfite foram trocados cada 24h para evitar contaminação da gaiola. A sexagem das pupas foi confirmada dissecando e extraindo as genitálias dos adultos após a morte seguindo a metodologia proposta por Feng Bo *et al.*, (2020). O número de ovos produzidos e o número de lagartas emergidas foram registrados diariamente por cada casal.

No caso da espécie *C. includens* o protocolo foi modificado a partir da fase de pupa visto que a sexagem usando as características morfológicas nesta fase não foi possível. Assim, os adultos recentes emergidos das pupas individualizadas foram colocados aleatoriamente em grupos de 8 adultos da mesma idade, e acondicionados nas gaiolas de criação maiores descritas anteriormente. Foram usadas 5 repetições de 8 adultos para cada tratamento. Os adultos foram alimentados *ad*

*libitum* com solução de mel a 10% semelhantes ao descrito para a *S. frugiperda*. A sexagem foi realizada depois a morte dos adultos de cada gaiola de acordo com Quimbayo et al, 2010. A fertilidade e fecundidade per fêmea foi calculada dividindo o número total de ovos e de lagartas de cada grupo por o número de fêmeas presentes no mesmo grupo.

Em relação com o bioensaio com as pupas, o tratamento com as três doses (PC, DL, GC) seguiu os mesmos passos descritos na seção 5.6. No caso de *S. frugiperda*, as pupas foram sexuadas e casais formados e colocados em gaiolas de criação. Para *C. includens*, grupos com 5 pupas da mesma idade foram formados e transferidos nas gaiolas de criação. Foram usadas 7 repetições (casais) para *S. frugiperda* e 4 repetições (grupos de 5 pupas/adultos) para a *C. includens*. Após a emergência dos adultos, um chumaço de algodão umedecido com solução de mel a 10% foi colocado nas gaiolas como fonte de alimentação. As gaiolas foram revisadas e o papel de oviposição foi trocado diariamente. O número de ovos e lagartas foi registrado durante toda a fase reprodutiva até a morte do último indivíduo de cada gaiola. A sexagem dos adultos da *C. includens* foi realizada após a morte dissecando e extraíndo as genitálias.

## **5.8 Análise estatística**

Os dados de mortalidade de ovos, lagartas e pupas, de número de ovos, massas de ovos e de lagartas por fêmea e de duração dos diferentes estágios de desenvolvimento foram analisados usando o pacote Agro R do software R Studio (R Core Team, 2022). Os pressupostos associados a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias foram averiguados com os testes de Shapiro Wilk e de Bartlett. Uma vez esses pressupostos são verificados, os dados foram analisados usando uma análise de variância (ANOVA One Way) seguida de um teste de Fisher (F).

## 6. RESULTADOS

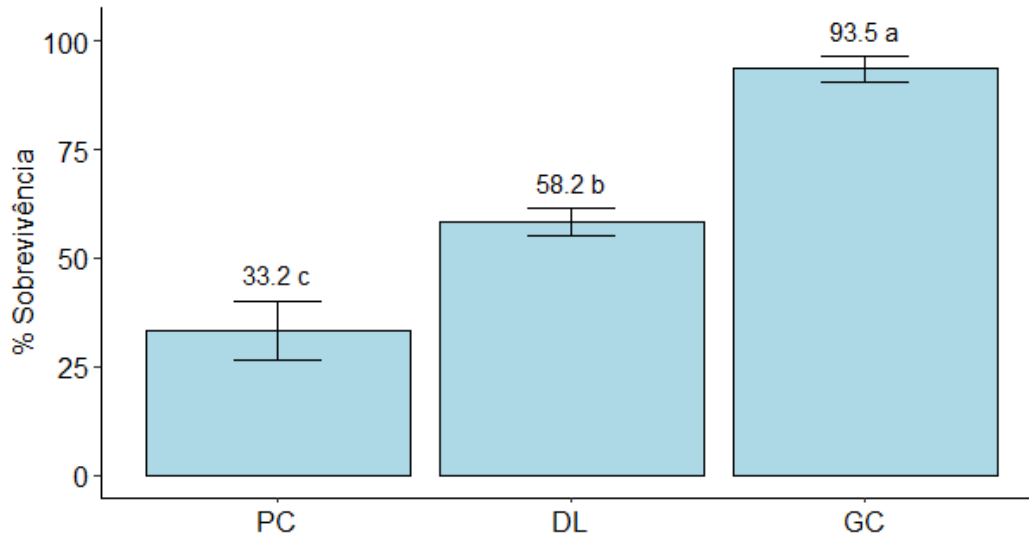
A modo geral, pode se observar que as principais diferenças significativas acontecerem no referente a taxa de sobrevivência dos estádios de ovo, lagarta de primer, segundo e terceiro instar (L1, L2 e L3) e na fase de pupa das duas espécies estudadas. Também no referente a fecundidade de *S. frugiperda* em adultos previamente tratados durante a fase de lagarta e de pupa. No quanto as figuras, as letras a, b, c sobre as barras, significam que existem diferenças significativas entre os três tratamentos, se não encontrar elas, ou tem do mesmo tipo, significa que não tem tales diferenças. A continuação se apresenta os resultados para cada bioensaio.

### 6.1. Efeito da exposição ao glifosato nos ovos de *S. frugiperda* e *C. includens*

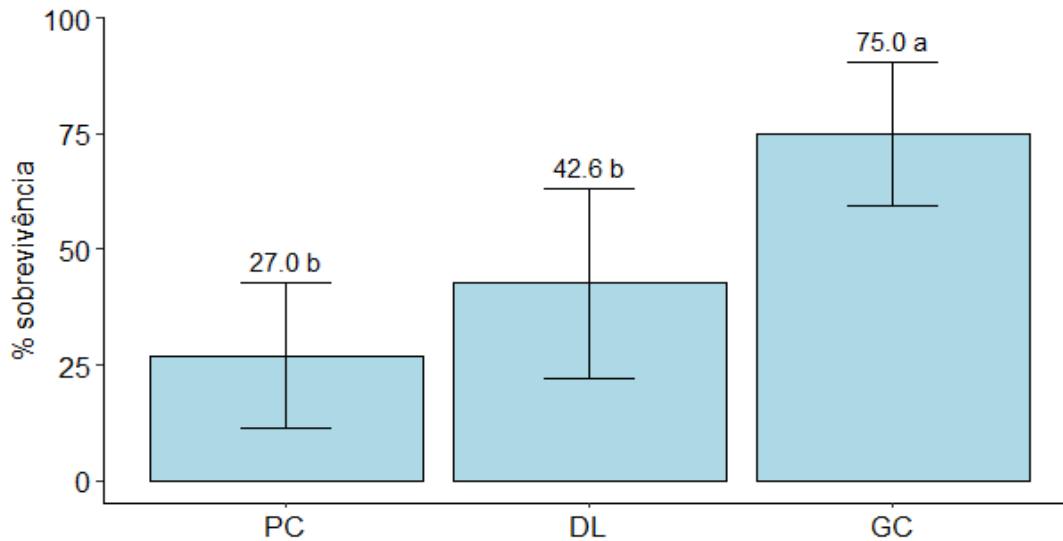
Os resultados para os testes avaliados nas espécies *S. frugiperda* e *C. includens* (Figura 1) diz que os valores de  $P < 0,05$  pelo que os dados obtidos no quanto o sucesso na eclosão dos ovos tem diferenças significativas entre os tratamentos nas duas espécies. Por exemplo, na figura A pode se olhar que os ovos tratados com o PC (33,2%) têm porcentagem de sobrevivência muito menor o GC (93,5%). Do mesmo jeito, só um pouco mais da metade dos ovos tratados com a dose DL alcanço a eclosão (58,2%). Obtivendo que existe uma diferença significativa entre a sobrevivência dos ovos expostos ao glifosato nos tratamentos PC e DL respeito o grupo controle (Figura 1A).

Em quanto os ovos da espécie *C. includens* (Figura 1B) na verificação da diferença entre as médias dos três tratamentos, o p valor também foi  $< 0,05$  pelo tanto tem diferença estatisticamente significativa entre os dois tratamentos que incluíam Roundup original, PC (27%) e DL (42,6%), respeito o grupo controle que foi 75%. No entanto, os tratamentos PC e DL não são significativamente diferentes entre se.

A.



B.



**Figura 1.** porcentagem de sobrevivência dos ovos de: **A.** *S. frugiperda* **B.** *C. includens* expostas a dose recomendada para o uso (PC), a dose recomendada diluída 20x (DL) do produto comercial do herbicida glifosato, e ao controle não tratado (GC). As barras representam o erro padrão e as médias de quatro repetições (entre 105 e 175 ovos cada) para *S. frugiperda* e de cinco repetições (entre 100 e 270 ovos cada) para *C. includens*. As letras minúsculas acima das barras indicam diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste F.

## 6.2. Efeito da exposição ao glifosato em lagartas de *S. frugiperda* e *C. includens*

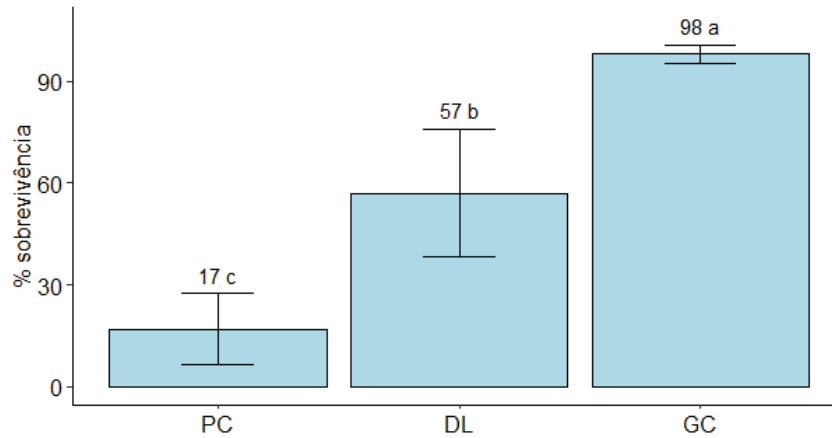
Após de fazer alguns pré-testes na fase previa dos bioensaios, os resultados estabeleceram que o melhor estágio para fazer provas de toxicologia com lagartas e glifosato é antes de terceiro instar; porém, vai encontrar provas com lagartas em instar L1, L2 e L3 para as duas espécies (Figura 2 e 3)

As figuras 2A, 2B e 2C deixa visualizar os resultados dos testes para lagartas de *S. frugiperda* durante os três estádios. A modo geral, pode se achar que os tratamentos PC e GC tem diferencias estatisticamente significativas no referente a supervivência dos três estádios da fase lagarta avaliados. Assim, primeiramente na fase L1 17% em PC vs. 98% de supervivência das lagartas em GC. Mesmo assim, na L2 foi 54% usando PC, em comparação com 94% de supervivência do GC. Finalmente, no estágio de lagarta L3 tratada com PC foi 70% de supervivência, contra o 100% obtivo com lagartas tratadas com água destilada em GC, pelo que é evidente que o glifosato em na dose comercial tem um efeito negativo nos estádios L1, L2 e L3.

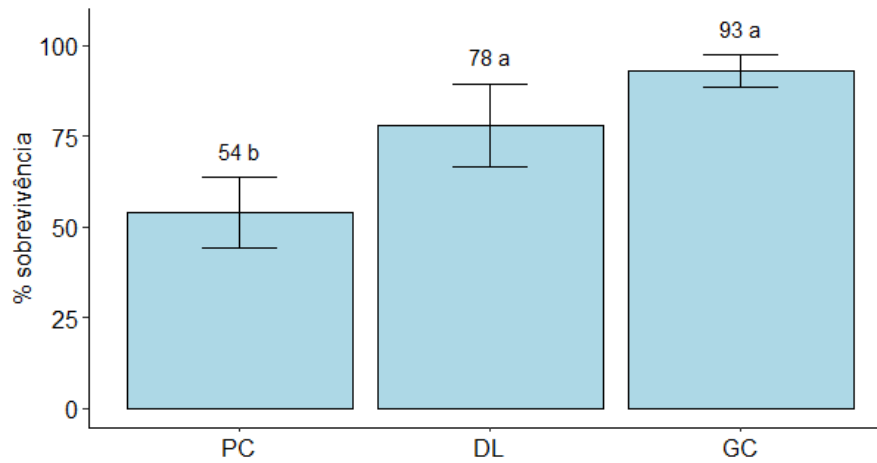
No quanto ou tratamento DL, teve só diferencias significativas com os tratamentos PC e GC na L1 (figura 2A), onde fico perto da metade da sobrevivência com 57% de sucesso respeito ou 98% de sucesso na sobrevivência do GC, e o escasso 17% do PC. No entanto, nos estádios de lagarta L2 e L3 (figura 2B e 2C), alcançou 78% e 91% de supervivência respetivamente nos estados intermédios entre os tratamentos PC que foi menor, e GC que alcançou valores maiores na supervivência.

Embora, se pode olhar um aumento na supervivência conforme as lagartas avançam no processo de desenvolvimento desde L1 até L3, os tratamentos PC e DL tem valores mais baixos que o GC em todos os bioensaios feitos.

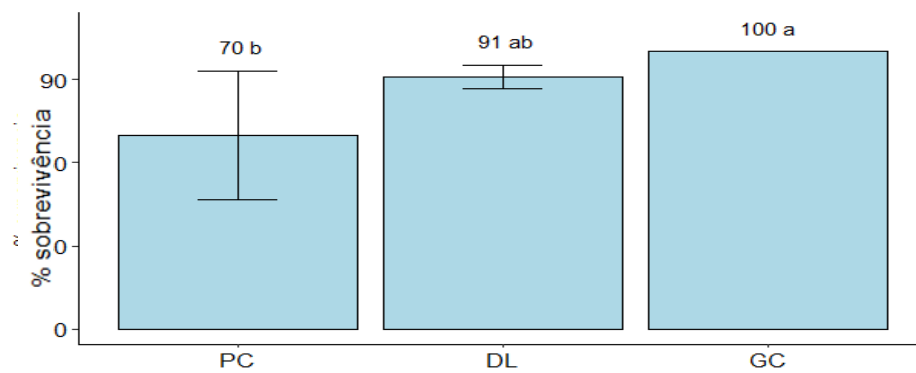
A.



B.



C.

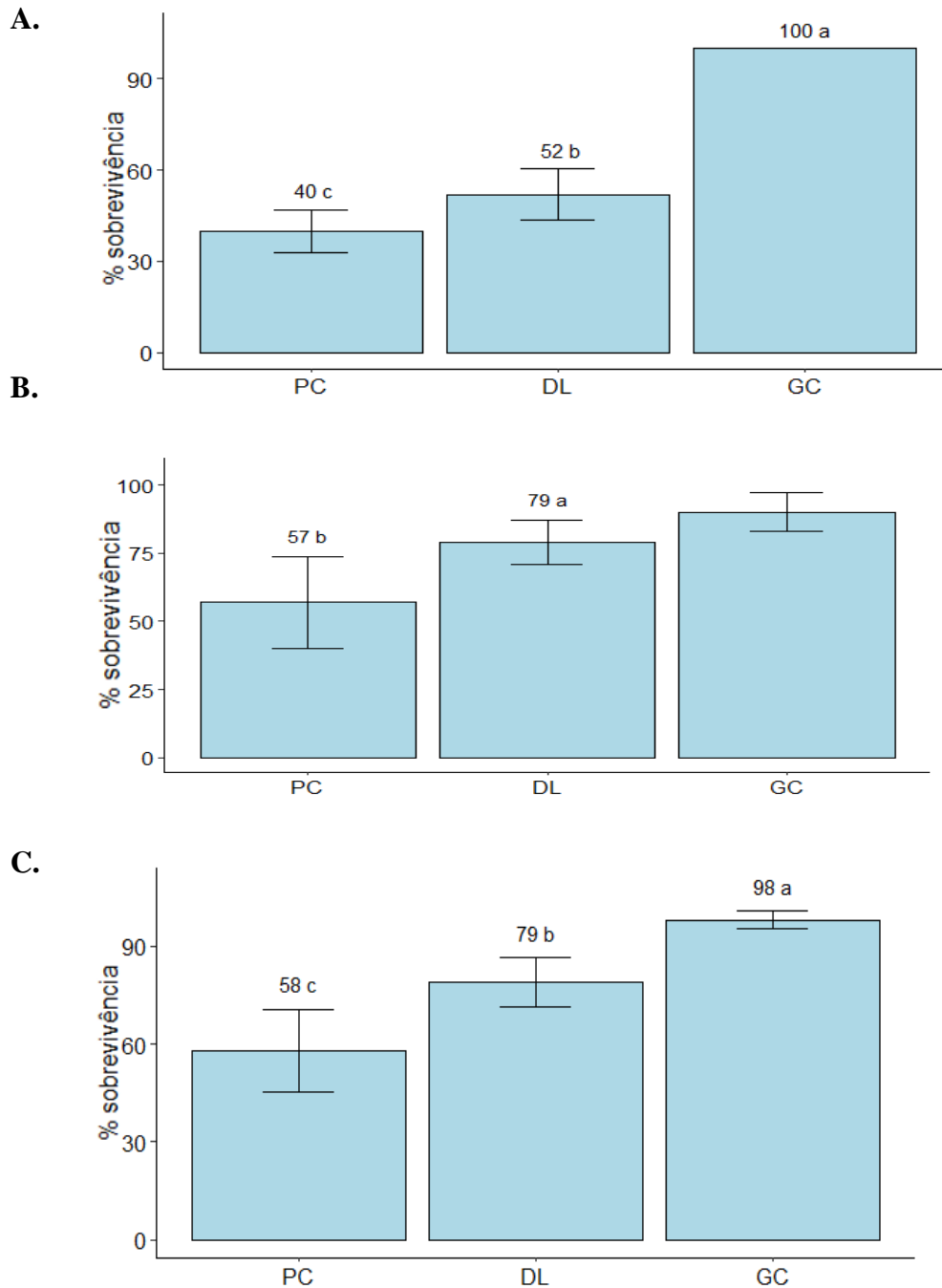


**Figura 2:** Porcentagem de sobrevivência das lagartas de primeiro (A), segundo (B), e terceiro (C) instar de *S. frugiperda* expostas a dose recomendada para o uso (PC), a dose recomendada diluída 20x (DL) do produto comercial do herbicida glifosato, e ao controle não tratado (GC). As barras representam as médias de cinco repetições (20 larvas cada) e o erro padrão. As letras minúsculas acima das barras indicam diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos para o teste F.

No referente aos resultados para *C. includens*, à figura 3 deixa olhar os três estádios de lagarta L1, L2 e L3 com os valores representados por barras para cada tratamento. Pode-se encontrar diferenças significativas entre o grupo tratado com PC em todos os estádios, se é comparado com os resultados do grupo controle (GC). Assim, para a L1 (Figura 3A) a menor sobrevivência foi achada no tratamento com PC, onde só o 40% da população conseguiu viver. Pelo contrário, o 100% dos indivíduos tratados como GC conseguem sobreviver. Pelo que pode se observar diferença significativa com um p valor  $< 0,05$ . Além disso, o grupo tratado com o Roundup original diluído (DL), obteve sobrevivência de 52% da população, pelo que nesta fase L1, o tratamento DL também tem diferenças estatisticamente significativas com o GC e com o PC.

Em relação com o instar L2 os resultados tem diferenças significativas em ao menos dois tratamentos. Embora, aparentemente as barras são mais homogêneas (Figura 3B), continua existindo diferença significativa na porcentagem de sobrevivência entre o PC (57%) e GC (90%) não assim, entre o DL (79%) e o GC, portanto pode se estabelecer que os produtos que contêm glifosato afetam negativamente a média de sobrevivência das lagartas na L2.

Finalmente, o bioensaio para lagartas na L3 de *C. includens* mostrou que no grupo controle a sobrevivência foi de 98%, embora nos outros tratamentos foi 79% em DL e 58% em o PC, pelo que é possível estabelecer que existe diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos todos de acordo com o teste F.



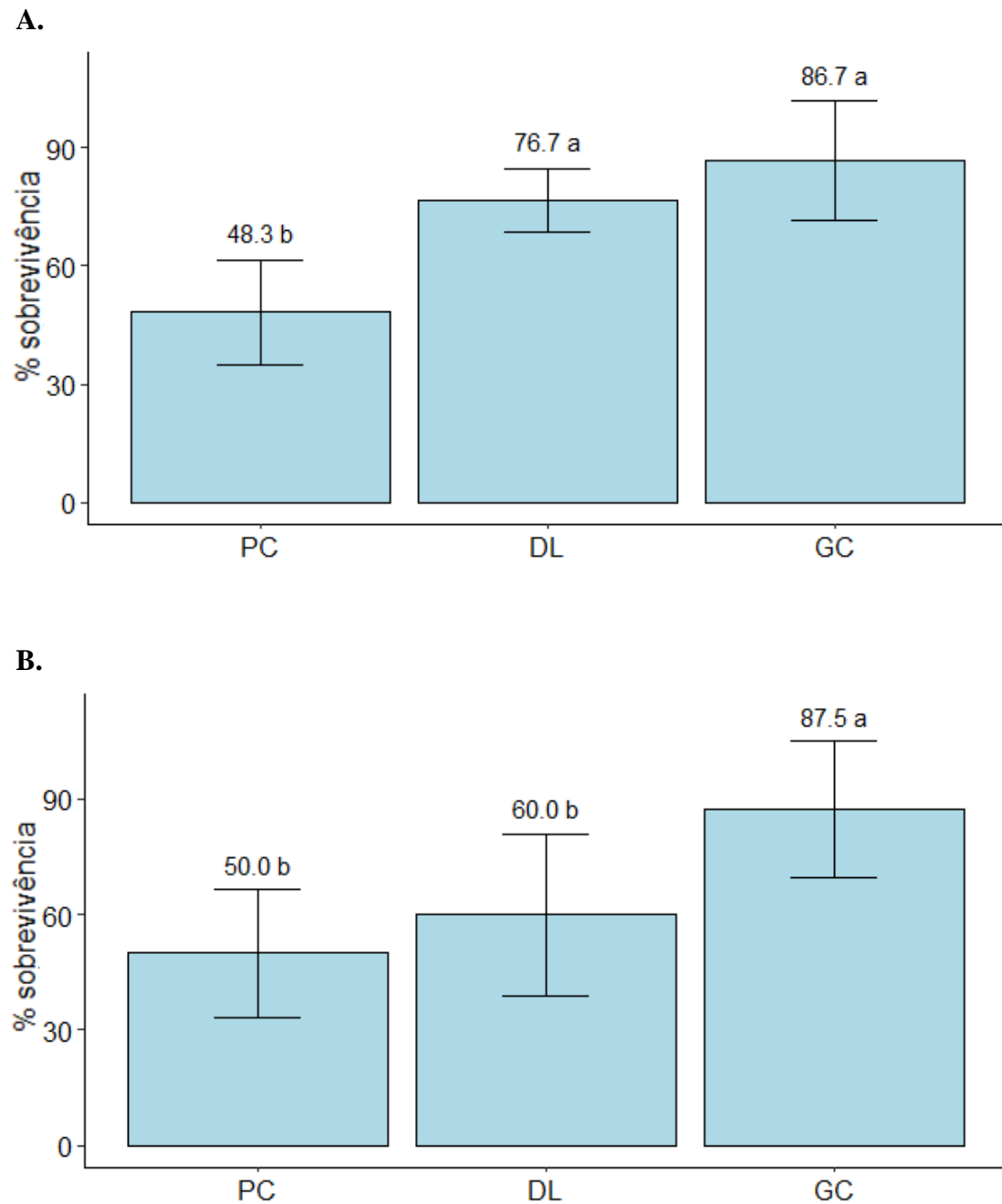
**Figura 3:** Porcentagem de sobrevivência das lagartas de primeiro (A), segundo (B), e terceiro (C) instar de *C. includens* expostas a dose recomendada para o uso (PC), a dose recomendada diluída 20x (DL) do produto comercial do herbicida glifosato, e ao controle não tratado (GC). As barras representam as médias de cinco repetições (20 larvas cada) e erro padrão. As letras minúsculas acima das barras indicam diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos para o teste F.



### **6.3 Efeito da exposição ao glifosato em pupas de *S. frugiperda* e *C. includens***

A sobrevivência das pupas é considerada assim quando o adulto consegue emergir do casulo depois de submetido ao tratamento. Para a espécie *S. frugiperda* os resultados obtidos para o tratamento com PC são significativamente os mais baixos de todos, com 48,3 % de supervivência em comparação com o 76,7% do tratamento DL e o 86,7% do GC. (Figura 4A).

A análise de sobrevivência /emergência das pupas de *C. includens* submetidas aos três tratamentos (Figura 4B) gerou resultados que demonstram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos PC (50%) e o GC (87,5%). Os valores obtidos para o tratamento do produto comercial diluído DL (60%) também foram significativamente diferentes com relação ao tratamento GC. O que sugere que a substância afeta de maneira negativa o sucesso de emergência depois da aplicação dos produtos na dose recomendada na bula e também na menor dose diluída.



**Figura 4:** Porcentagem de sobrevivência das pupas de *S. frugiperda* (A) e *C. includens* (B) expostas a dose recomendada para o uso (PC), a dose recomendada diluída 20x (DL) do produto comercial do herbicida glifosato, e ao controle não tratado (GC). As barras representam as médias de 6 repetições (10 pupas cada) e o erro padrão. As letras minúsculas acima das barras indicam diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos para o teste F.

#### 6.4 Tempo de duração dos estádios

A continuação se apresenta em forma de tabelas a duração dos estádios avaliados anteriormente: ovos, lagartas e pupas tratadas com os três tratamentos até a fase de emergência da pupa, nenhum dos valores mostrou diferença estatisticamente significativas com testes de ANOVA e de comparação múltiplo ( $p > 0,05$ ).

Tabela 1: Comparação do tempo médio de duração dos estádios para *S. frugiperda*

<i>S. frugiperda</i>	Duração média (dias)		
Tratamento	PC	DL	GC
ovo	3,39	3,15	3,08
L1	3,85	4,01	3,63
L2	3,08	2,98	3,0
L3	2,79	2,47	2,8
L4	2,95	3,16	2,7
L5	3,03	3,1	3,2
L6	3,03	3,2	3,4
Prepupa	1,95	1,98	2,05
pupa	10,5	11,0	10,9

Tabela 2: Comparação do tempo médio de duração dos estádios para *C. includens*.

<i>C. includens</i>	Duração média(dias)		
tratamento	PC	DL	GC
ovos	4,5	4,1	3,4
L1	3,98	3,94	3,94
L2	2,94	2,96	3,06
L3	3,74	3,7	3,58
L4	2,15	2,14	2,16
L5	2,11	2,65	2,73
pre pupa	1,8	1,5	1,61
pupa	8,07	8,52	8,43

## 6.5 Efeito da exposição ao glifosato em a fecundidade e fertilidade das fêmeas

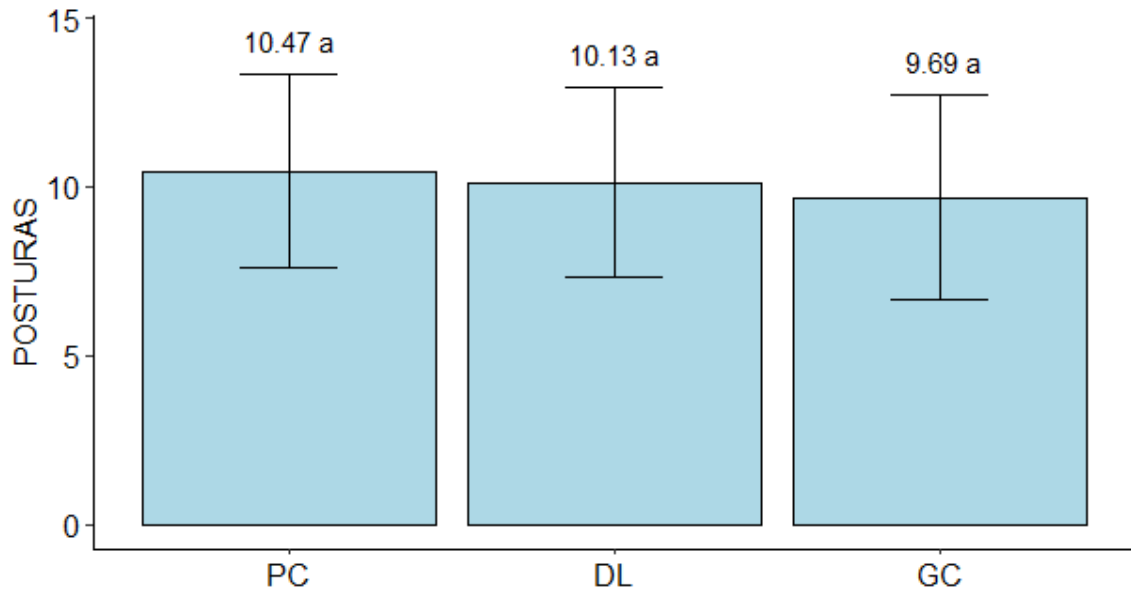
### 6.5.1 *Spodopera frugiperda*

Os casais provenientes de lagartas L3 de *S. frugiperda*, que foram tratados com 20 $\mu$ l de solução (PC, DL ou GC) foram avaliados em términos de fertilidade contando o número de posturas por fêmeas em cada tratamento (Figura 5A). Também foi avaliada a fecundidade contando o número de lagartas obtidas das posturas de cada casal (Figura 5B).

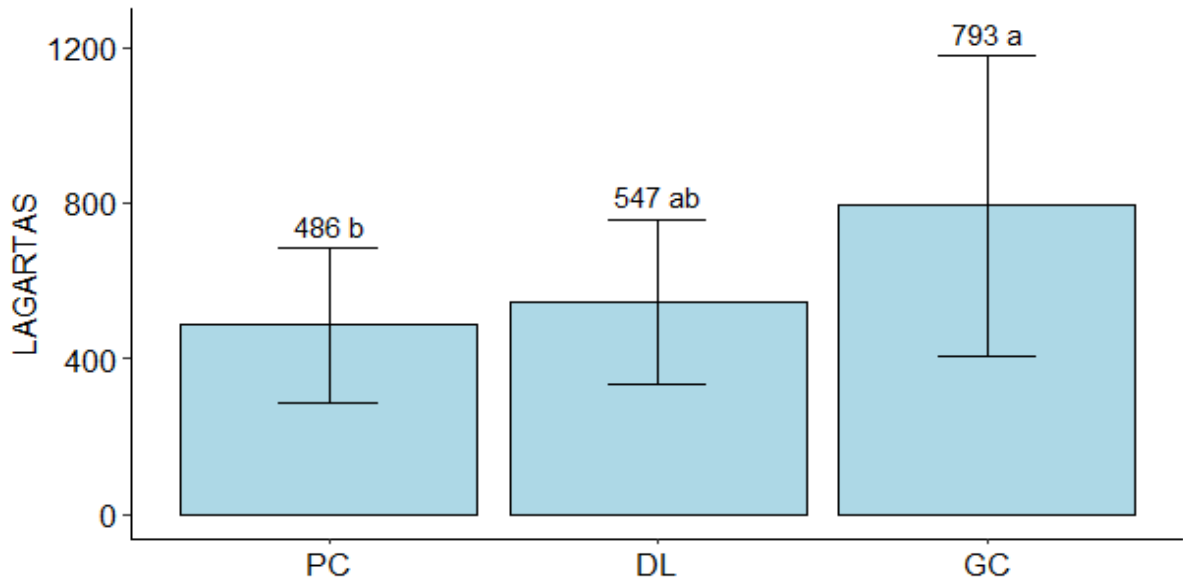
Pode-se olhar que o P valor  $> 0,05$  e, portanto, não existe uma diferencia estatística significativa entre os tratamentos no quanto a fertilidade das fêmeas. Não entanto, a média de PC (10,47) e a média de DL (10,13) foram maiores que no grupo controle (9,69) em relação como o número de sacos de ovos achados na gaiola de cada casal.

Por outro lado, em relação com a fecundidade dos casais de *S. frugiperda* provenientes de lagartas tratadas (Figura 5B), o teste ANOVA arrojou diferencias estatísticas significativas na fecundidade de *S. frugiperda* tratada na fase de lagarta entre os tratamentos ( $F = 4,8$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,012$ ). Além disso, em concordância com o teste F, tem um p valor = 0,0125, que sugere que pelo menos dois tratamentos variam entre si o suficiente para aceitar diferencias estatísticas significativas. O PC (486) e o GC (793) são os valores mais heterogêneos. Mas o DL (547) foi intermédio entre os valores de PC e GC para a média de lagartas nascidas por casal entre os três tratamentos.

A.



B.



**Figura 5:** Fecundidade e fertilidade de *S. frugiperda* depois de tratar lagartas na L3 com 20 $\mu$ l da dose recomendada para o uso (PC), a dose recomendada diluída 20x (DL) do produto comercial do herbicida glifosato, e ao controle não tratado (GC).

**(A) Fecundidade** média contando o número de posturas obtidas de cada casal.

**(B) Fertilidade** média contando o número de lagartas obtidas das posturas em cada casal.

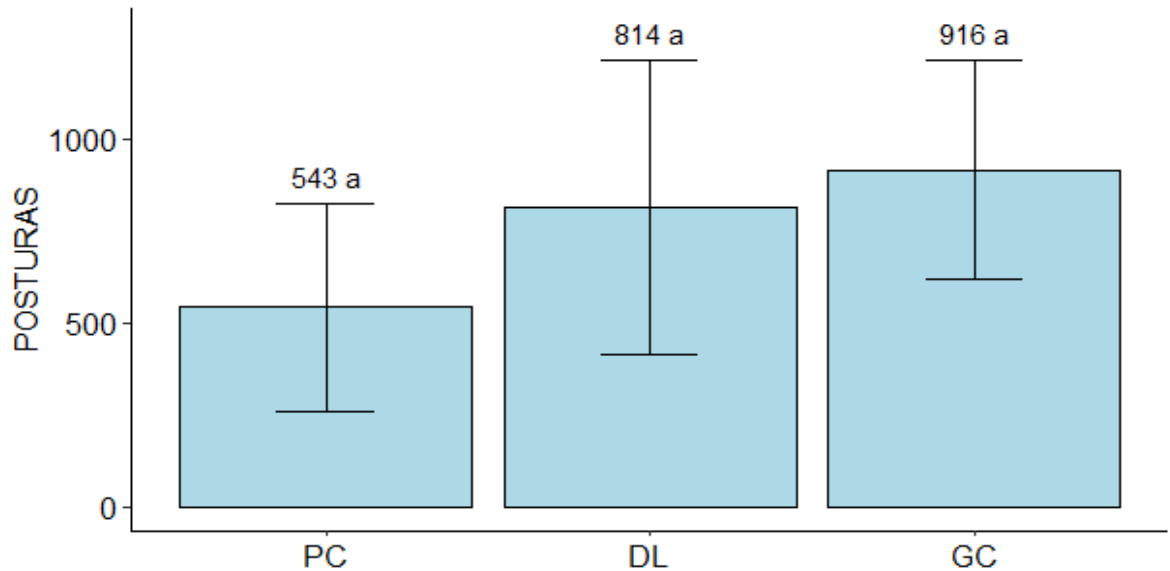
As barras representam as médias de 17 a 20 repetições (um casal para cada) e o erro padrão. As letras minúsculas acima das barras indicam diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos para o teste F.

Em quanto os resultados do bioensaio de fertilidade e fecundidade, mas tratando as pupas de *S. frugiperda* (Figura 6), é importante aclarar que neste bioensaio, a fertilidade foi avaliada contando um por um os ovos presentes nas camadas dos sacos de ovos para obter um valor mais aproximado da quantidade total de ovos colocados por cada fêmea, não assim o número de posturas de sacos de ovos que foi descrito com as lagartas tratadas no experimento anterior.

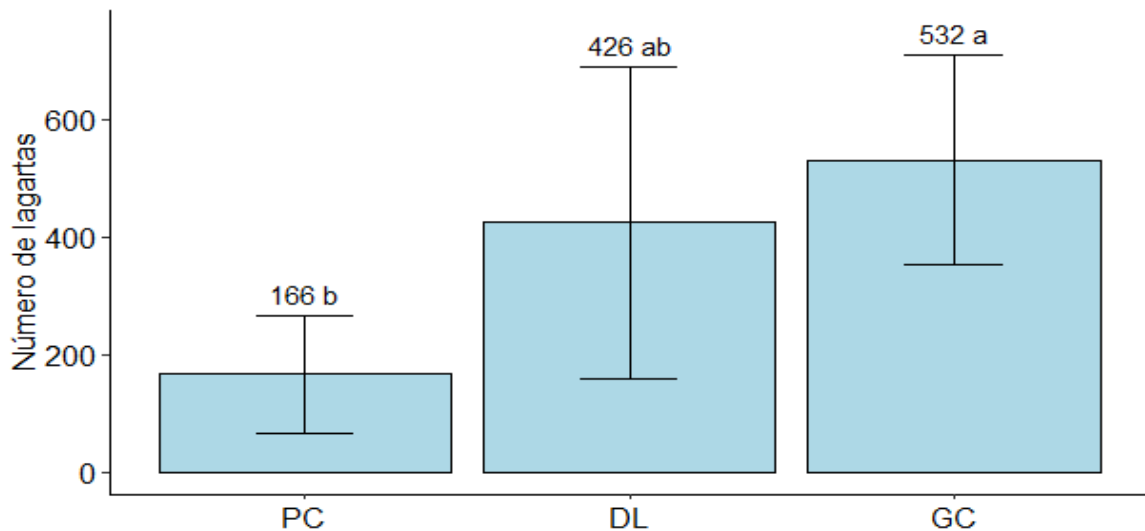
Assim, os valores da média para a fertilidade das fêmeas de *S. frugiperda* foi menor em PC (543) e DL (814) em comparação com o GC (916). Porém, o p valor indica que não existem diferencias estatisticamente significativas entre os três tratamentos (Figura 6A) igual que aconteceu quando se avalio a fertilidade com lagartas tratadas.

Por outro lado, os resultados dos testes para avaliar a fertilidade dos casais de *S. frugiperda* provenientes de pupas tratadas (Figura 6B) demostram que as médias entre os tratamentos são estatisticamente diferentes. Por exemplo, o PC teve a média de 166 lagartas por casal, a mais baixa das três. Enquanto o tratamento GC teve a média mais alta com 532 lagartas nascidas por casal. Finalmente, o tratamento DL teve resultados intermédios com 426 lagartas, valor de média menor que o GC e maior que o PC, mas não tem diferencias significativas com eles.

A.



B.



**Figura 6:** Fecundidade e fertilidade de *S. frugiperda* depois de tratar pupas com a dose recomendada para o uso (PC), a dose recomendada diluída 20x (DL) do produto comercial do herbicida glifosato, e ao controle não tratado (GC).

(A) **Fecundidade** média contando o número de ovos obtidos por cada casal.

(B) **Fertilidade** média contando o número de lagartas obtidas das posturas em cada casal.

As barras representam as médias de 7 repetições (um casal para cada) e o erro padrão. As letras minúsculas acima das barras indicam diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos para o teste F

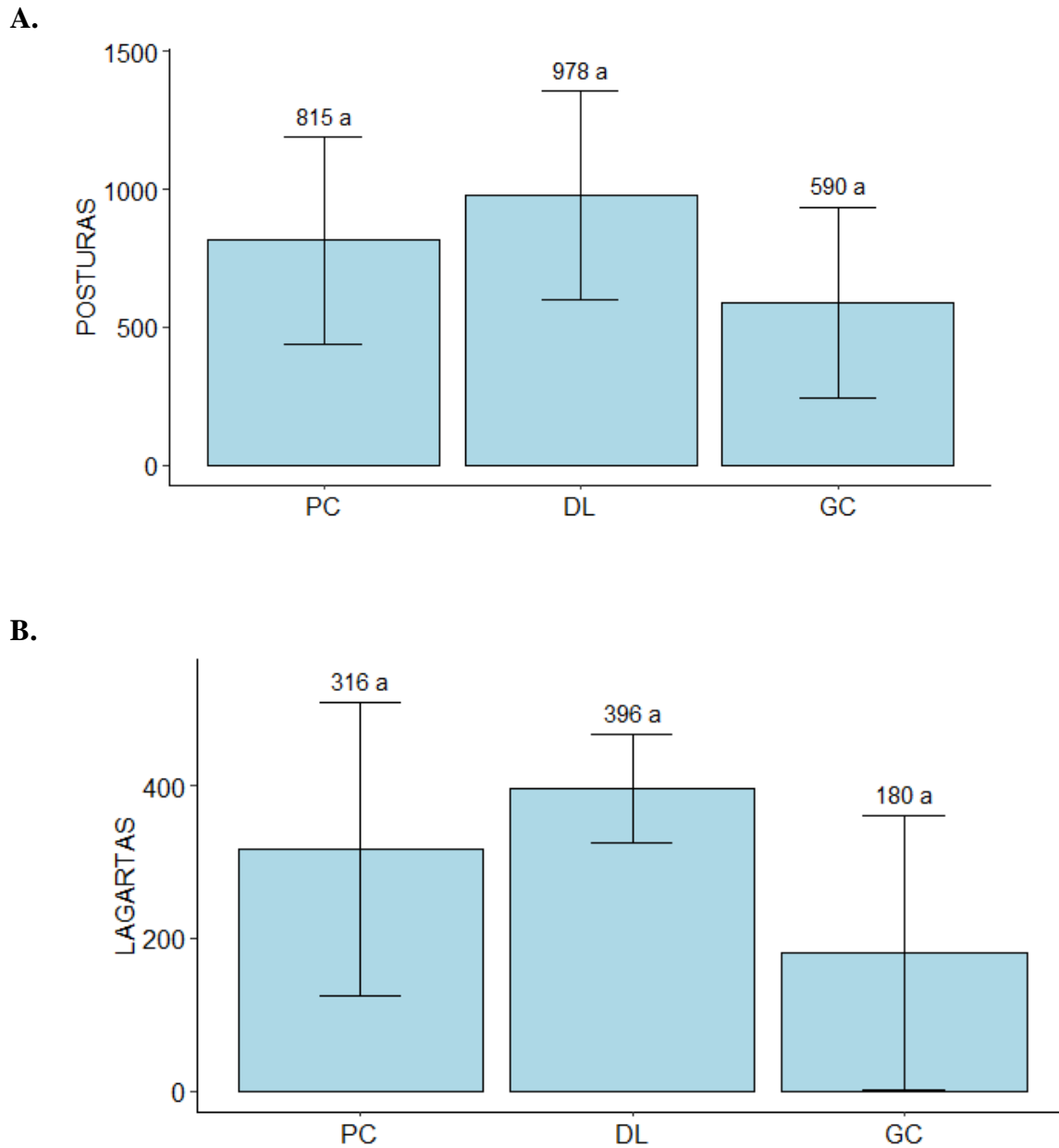
### 6.5.2 *Chrysodeixis includens*

A continuação se apresenta a descrição dos resultados sobre o efeito do glifosato sobre a fertilidade e fecundidade em adultos da espécie praga *C. includens* tratada com PC, DL e GC durante a fase de lagarta L3 (Figura 7).

Em quanto a fertilidade das fêmeas, não se encontrarem diferenças significativas em os tratamentos em quanto o número de posturas para *C. includens*. Do mesmo jeito aconteceu com o teste de comparação F onde novamente a média de posturas por parte das fêmeas é maior nos grupos que foram expostos o glifosato, PC (815) e DL (978) em comparação com o grupo controle (590). Porém, o p valor (0,36) não estabelece diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 7A).

Do mesmo jeito, analisando os resultados obtidos no experimento, mas estudando a fertilidade através de o número de lagartas nascidas dessas posturas; se encontro que não existem diferenças estatísticas significativas para a fertilidade das fêmeas quando são expostas aos três tratamentos durante o estágio de lagarta (L3) para a espécie *C. includens*. No entanto, pode se observar no teste F, que novamente são maiores as médias para os tratamentos com glifosato DL (396) e PC (316) em comparação com o GC (180). Porém, o p valor não evidencia diferenças significativas na quantidade de lagartas entre os tratamentos (Figura 7B).





**Figura 7:** Fecundidade e fertilidade de *C. includens* depois de tratar lagartas na L3 com 20 $\mu$ l da dose recomendada para o uso (PC), a dose recomendada diluída 20x (DL) do produto comercial do herbicida glifosato, e ao controle não tratado (GC).

(A) **Fecundidade** média contando o número de posturas obtidas de cada casal.

(B) **Fertilidade** média contando o número de lagartas obtidas das posturas em cada casal.

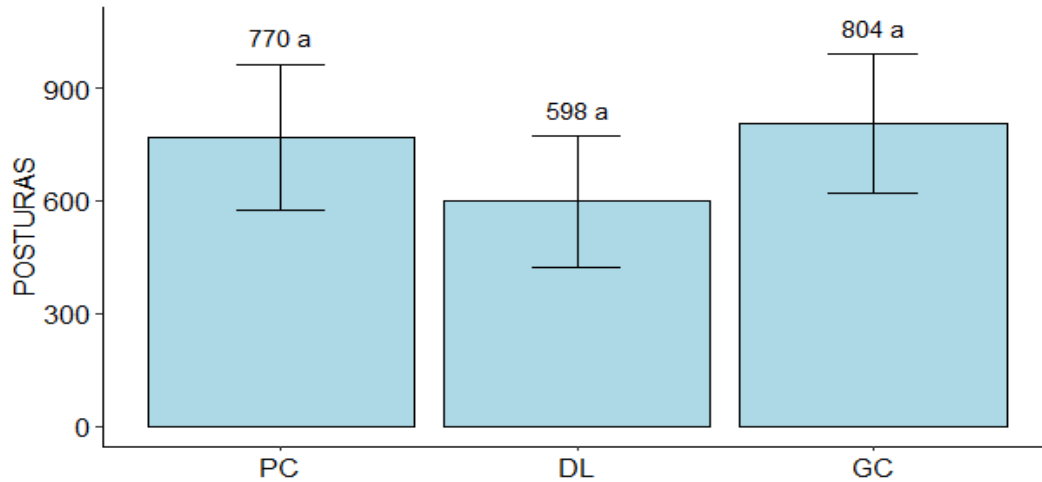
As barras representam as médias de 5 repetições (grupos de 8 adultos para cada) e o erro padrão. As letras minúsculas acima das barras indicam diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos para o teste F.

Nos seguintes gráficos (Figura 8) se podem observar os resultados em quanto a fertilidade e fecundidade de adultos de *C. includens* depois de tratar com os três tratamentos previamente as pupas.

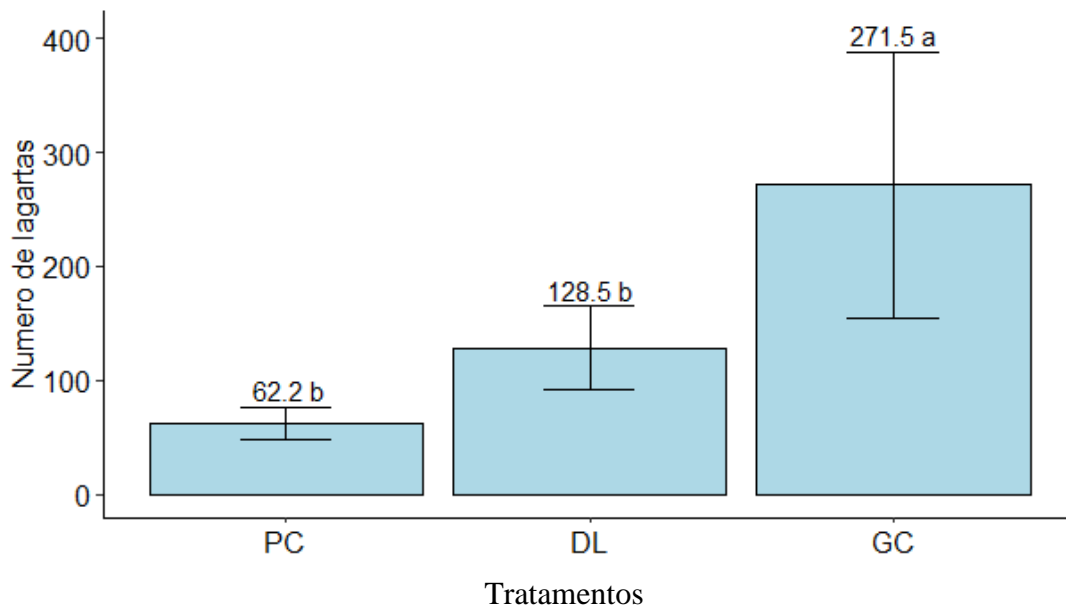
Os resultados para o número de posturas correspondentes com a fertilidade das fêmeas provenientes de pupas tratadas não acharam diferenças estatisticamente significativas para os três tratamentos (Figura 8A) e, embora a quantidade média de ovos produzidos por cada fêmea estudada é ligeiramente maior no GC (804) que em os outros tratamentos, PC (770) e o DL (598) o teste F também determino que não existem diferenças estatísticas entre os tratamentos para a quantidade de posturas nesta espécie.

Finalmente, analisando os resultados para fertilidade dos adultos através do número de lagartas nascidas por fêmea para cada grupo de *C. includens* tratadas na fase de pupa; pode se estabelecer que existem diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e demonstram que al menos dois tratamentos diferem significativamente entre eles (Figura 8B) já que os valores das médias para lagartas nascidas por fêmea para o PC (62,2) e o DL (128,8), são muito menor que em GC (273,5). Por consequência, o p valor para esta comparação também é  $< 0,05$ .

A.



B.



**Figura 8:** Fecundidade e fertilidade de *C. includens* depois de tratar pupas com a dose recomendada para o uso (PC), a dose recomendada diluída 20x (DL) do produto comercial do herbicida glifosato, e ao controle não tratado (GC).

(A) **Fecundidade** média contando o número de ovos obtidos por cada casal.

(B) **Fertilidade** média contando o número de lagartas obtidas das posturas em cada casal. As barras representam as médias de 4 repetições (grupos de 5 adultos para cada) e o erro padrão. As letras minúsculas acima das barras indicam diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos para o teste F

## 7. DISCUSSÃO

Com o desenvolvimento desta pesquisa, ressalta-se a importância de estudar os efeitos diretos e indiretos de herbicidas, principalmente sobre a mortalidade e fecundidade de espécies de insetos-praga da ordem Lepidoptera como as espécies *S. frugiperda* e *C. includens*. Nesse sentido, é importante mencionar que os herbicidas são exclusivamente utilizados para eliminar plantas indesejáveis, mas em teoria não deveriam ter efeitos sobre os insetos. No entanto, nesta pesquisa encontrou-se que o glifosato pode ser usado como mecanismo de controle de estas duas pragas, sobretudo naquelas variedades com resistência ao glifosato onde pode ser aplicado post emergência. Segundo Lopez (2017), os estádios vegetativos iniciais das plantas de milho e soja são os mais vulneráveis porque as lagartas de *S. frugiperda* e *C. includens* são muito vorazes e podem matar a planta nesta fase por perda das folhas. Assim, os resultados da pesquisa sugerem alta mortalidade nas duas espécies praga desde ovo até lagarta de terceiro estágio. Pelo que fazer o plano de manejo que contemple irrigação do herbicida durante este período de vulnerabilidade, reduz a possibilidade de dano econômico futuro pelos insetos e também pelas ervas daninhas no quanto a MIP.

Por outro lado, no que diz respeito à perda de espécies de insetos, neste caso Lepidópteros, que vem ocorrendo nas últimas décadas, Seibold *et al.* (2019) alertam sobre os efeitos que as substâncias usadas em áreas agrícolas, como os agrotóxicos, estão tendo na redução da biomassa de insetos e outros artrópodes. Nesse sentido, os resultados desta pesquisa indicam que o herbicida mais utilizado no Brasil e em outros países do mundo está afetando diretamente a sobrevivência das populações das espécies estudadas. Além disso, por não ser um herbicida específico, pode eliminar também plantas nutricionais de mariposas e borboletas indiretamente, o que poderia estar relacionado à causalidade entre o aumento no uso de glifosato desde a década de 1970 até hoje, com a perda de diversidade de Lepidoptera, e talvez, de outros grupos de insetos, como percevejos, besouros e abelhas, que compartilham hábitos fisiológicos e ecológicos similares nas lavouras onde o glifosato é aplicado.

Além disso, os resultados da pesquisa têm importância quanto ao acrescentamento dos estudos com enfoque ecotoxicológico. O conhecimento das interações entre o glifosato e organismos não alvo, como os insetos praga, pode ajudar a melhorar as estratégias de Manejo

Integrado de Pragas (MIP) e minimizar o impacto negativo no ambiente, na sociedade e na economia, enquanto fornece conhecimentos agroecológicos necessários para administrar e monitorar de maneira mais eficiente os agroecossistemas e os benefícios que estes podem trazer (HECHT, 1999).

### **7.1 Bioensaios em ovos**

Nesse sentido, os bioensaios de toxicologia em ovos para as duas espécies detectaram um impacto significativamente negativo sobre o sucesso de eclosão dos ovos expostos ao herbicida, especialmente no tratamento do produto comercial na dose recomendada (PC). Assim, mais da metade dos ovos de segunda postura (que, segundo Andrews, 1979, e confirmado nos pré-testes, têm a maior taxa de sucesso de eclosão) tratados com glifosato em *S. frugiperda* e *C. includens* não conseguiram nascer, com taxas de mortalidade entre 63% e 77% nos ovos tratados com Roundup original® na dose recomendada pela bula do produto. Quanto ao tratamento com dose recomendada diluída (DL), que tem uma carga muito menor do princípio ativo glifosato, a média de eclosão também foi menor que a do grupo controle, com taxa de mortalidade entre 45% e 54% dos ovos. Ressalta-se que os ovos tratados como grupo controle (GC) nas duas espécies apresentaram taxa de eclosão entre 75% e 98% de sucesso.

Embora os estudos sobre o impacto dos herbicidas sobre lepidópteros sejam escassos, Debbi (2019), trabalhando com quatro espécies de borboletas, encontrou que os ovos expostos ao Roundup® tiveram de 0 a 15% de sucesso na eclosão após a aplicação de 20µl de solução em cada um; uma dose muito maior do que a usada nesta pesquisa. Tal efeito provavelmente é devido à alta solubilidade do glifosato em água, podendo adentrar e ter contato com o embrião, afetando seu desenvolvimento. É importante lembrar que os ovos dos insetos possuem em sua estrutura poros microscópicos, que permitem a passagem de água do exterior para o interior e são vitais para o desenvolvimento do embrião (DONOUGHE, 2022).

### **7.2 Bioensaios em lagartas**

As lagartas representam o estágio que mais tem impacto sobre as culturas, devido ao seu hábito fitófago e aos danos econômicos que ocasionam. Neste estudo, pode-se comprovar que o glifosato pode ter um efeito considerável no controle das populações de lagartas em *S. frugiperda* e *C. includens*. Por exemplo, os resultados dessa pesquisa mostram que entre 60% e 83% das

lagartas do primeiro instar (L1) que foram expostas ao glifosato no tratamento PC morreram, enquanto 98% e 100% das lagartas L1 do grupo controle sobreviveram. Essa é uma diferença muito grande se considerarmos que o produto usado não é inseticida. Nesse mesmo sentido, os resultados do tratamento com o glifosato diluído 20 vezes na dose recomendada (DL) tiveram uma taxa de mortalidade entre 43% e 48%, que é quase a metade do valor alcançado pelo grupo controle.

Assim, embora os resultados anteriores sugeressem que o primeiro instar é o mais vulnerável ao herbicida, foi observado que a taxa de mortalidade para as lagartas L2 tratadas com PC foi de 43% a 46%. Enquanto isso, o tratamento DL apresentou uma taxa de mortalidade de quase 30%, valores muito elevados se considerarmos que o GC teve entre 8% e 10% de mortalidade em todos os tratamentos. Conjuntamente, esses achados podem indicar que os dois primeiros instares larvais são susceptíveis para a exposição ao herbicida com o glifosato com princípio ativo.

Numa perspectiva prática e considerando os resultados anteriores para as lagartas L1 e L2 em relação à mortalidade, tanto na dose de PC quanto no tratamento DL, seria possível economizar no uso e custo de inseticidas para o manejo dessas pragas se as aplicações de glifosato fossem coordenadas com esses estágios de desenvolvimento, incluindo o estágio do ovo, que também apresentou níveis de mortalidade muito altos.

Além do exposto anteriormente, outro resultado importante, já confirmado por outros autores no uso de inseticidas, é que a partir do terceiro instar (L3) em diante, as lagartas têm uma maior capacidade de resiliência aos agrotóxicos. Nesse caso, a média de mortalidade das lagartas L3 foi de cerca de 30% para *S. frugiperda* e 42% para *C. includens* quando são tratadas com o produto PC. Mesmo assim, o tratamento DL ainda conseguiu alcançar 9% para *S. frugiperda* e 21% para *C. includens*. Novamente, esses resultados sugerem efeitos negativos diretos do glifosato na sobrevivência das lagartas, uma vez que o grupo controle obteve uma média de sobrevivência de 100% em *S. frugiperda* e 98% em *C. includens* nos bioensaios. De acordo com esses resultados, parece haver uma margem de ação inseticida ótima desde o estágio do ovo até o início de terceiro instar larval (L3).

Embora tenham sido realizados pré-testes em outros instares larvais (L4, L5 e L6), eles não foram considerados neste estudo porque os resultados foram pouco significativos com sobrevivência de 100% em todos os casos. No entanto, é importante mencionar que as lagartas

expostas ao herbicida, na dose recomendada como na dose diluída, alteravam notoriamente seu comportamento, afastando-se da fonte de estímulo e fazendo movimentos em espiral apoiando-se sobre suas pernas posteriores. Seria interessante verificar no futuro se algum dos componentes do produto comercial desse herbicida tem efeitos repelentes para essas duas espécies de lepidóptera.

### 7.3 Bioensaios em pupas

As pupas de Lepidoptera não causam danos às culturas, pois elas não são ativas e não se alimentam. No entanto, em seu interior ocorre a formação dos adultos, que posteriormente produzirão ovos e posteriormente lagartas, as quais são grandes consumidoras das lavouras. Por isso, as pupas são importantes para a agroecologia. Nesse sentido, ao avaliar a toxicidade dos tratamentos sobre as pupas, encontrou-se diferença estatisticamente significativa em relação à mortalidade das pupas de ambas as espécies quando são expostas principalmente ao PC, em comparação com os valores do grupo controle. Além disso, o tratamento com o produto DL também teve uma diminuição na taxa de sobrevivência das pupas em relação ao GC.

Um aspecto que não foi medido, mas foi observado, é que muitos adultos emergindo de pupas tratadas com PC apresentaram deformações, como asas fracas, partes da pupa ligadas ao corpo dos adultos e abdômen mais volumoso do que o normal. Além disso, muitos dos grupos tratados com PC não conseguiram emergir do casulo e, ao serem estimulados para observar movimentos ou sinais de vida, não deram nenhuma resposta, sendo considerados mortos na contagem de sobrevivência.

Em concordância com o exposto anteriormente, um estudo publicado por Cherednichenko *et al.* (2017) encontrou que as pupas de *Bombyx mori* expostas ao Roundup® apresentaram estresse oxidativo e aumento na mortalidade, além de diminuição na produção de proteínas e modificações na expressão de genes associados ao crescimento e desenvolvimento da mariposa. Além disso, Pleasants *et al.* (2018) encontraram que o glifosato provocou uma redução na taxa de eclosão das pupas de *Danaus plexippus*, alterações no tamanho delas e também na expressão de genes relacionados com o desenvolvimento e resposta imunológica. Portanto, no futuro, poderiam ser feitas análises genéticas sobre o impacto do Roundup original® no desenvolvimento das espécies *S. frugiperda* e *C. includens* para melhor confirmar os resultados deste estudo.

#### 7.4 Bioensaios em adultos

A fase adulta dos insetos está adaptada principalmente para a consecução da reprodução. Por isso, para controlar as populações de pragas, esta fase pode ser crítica e ter um papel chave no sucesso do controle.

Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo podem ajudar a melhorar o manejo das pragas estudadas, principalmente aqueles relacionados com a fecundidade. Por exemplo, nos bioensaios em que foram expostas as pupas das duas espécies, a quantidade média de lagartas nascidas por fêmea no tratamento com PC foi menor em comparação com o grupo controle. Os resultados apoiam a ideia de que o glifosato na formulação comercial está afetando o fitness reprodutivo dessas espécies.

Da mesma forma, ocorreu nos tratamentos com lagartas, exceto que na espécie *C. includens* demonstrou-se um aumento na média em relação ao grupo controle. Isso poderia indicar um efeito simulatório ou hormético. Uma possível explicação é que a lagarta teve mais tempo para responder ao estresse causado pela presença de glifosato em seu ambiente. Além disso, a ideia também é apoiada pelos resultados das posturas obtidas quando as lagartas das duas espécies foram tratadas, já que a média do grupo tratado com PC foi maior do que no grupo controle. No entanto, é necessário fazer mais testes para comprovar os efeitos horméticos da exposição ao glifosato, já que o resultados de alguns dos tratamentos sustentam a ideia contrária especialmente quando as pupas foram tratadas.

Os tratamentos com a solução DL são interessantes no sentido de que os resultados apresentaram valores intermediários entre o grupo tratado com PC e o grupo controle, o que indica que apenas a presença de quantidades menores da dose recomendada de glifosato nos bioensaios teve um efeito diferencial em relação aos tratamentos com água destilada.

Assim, e como um antecedente ligado aos resultados, os efeitos na reprodução de caranguejos expostos ao glifosato na formulação Roundup Ultramax® foram estudados por Canosa (2019), que encontrou um possível efeito de desorganização endócrina. Por exemplo, ela observou que "no ovário das fêmeas expostas a 0,2 mg/L de Roundup foi observada uma diminuição estatisticamente significativa no conteúdo de vitelogenina, correlacionada com a diminuição no



tamanho dos oócitos vitelogênicos e uma maior incidência de oócitos vitelogênicos em reabsorção" (CANOSA, 2019), o que resultou na diminuição da taxa reprodutiva final. Esses resultados podem estar associados ao glifosato como princípio ativo ou à combinação com os coadjuvantes. De qualquer forma, os efeitos sobre a diminuição da fertilidade das fêmeas são evidentes nessa pesquisa.

**APENDICE 1**

Dieta para adultos de *S. frugiperda* e *C. includens*.<sup>1</sup>

Composição	Quantidade
Mel	5g
Sacarose (ou açúcar)	30g
Água destilada	500 ml

**PROCEDIMENTO**

Os componentes são dissolvidos na água destilada e a solução obtida deve ser conservada em geladeira pelo máximo 5 dias.

---

<sup>1</sup> Ajustada aos requerimentos desta pesquisa de acordo com a dieta para criação de adultos de *Anticarsia gemmetalis* proposta por Hoffman; Olivera e Moscardi. (1985). EMBRAPA

## APENDICE 2

Composição da dieta artificial usada para *C. includens*<sup>2</sup>

	Componentes	Quantidade
1	Feijão	57,50g
2	Germe de trigo	30,00g
3	Proteína de soja	15,00g
4	Caseína	15,00g
5	Levedura	18,75
6	Solução vitamínica <sup>3</sup>	4,50ml
7	Ácido ascórbico	1,80g
8	Ácido sórbico	0,90g
9	Metil parabem (Nipagin®)	1,50g
10	Tetraciclina	56,50g
11	Formaldeído (40%)	1,80ml
12	Agar - agar	11,50g
13	Água destilada	650ml

### PREPARO

Cozer a fogo o feijão branco em 1L de água hasta ferver; enquanto isso, em outra tigela misture os ingredientes 2, 3, 4, 5, 7, 8, tendo cuidado com as quantidades corretas e bata no liquidificador com 600ml de água e o feijão cozido por aproximadamente 2 minutos até obter uma consistência pastosa.

<sup>2</sup> Baseada na dieta para criação de lagartas de *Anticarsia gemmetalis* proposta por HOFFMAN *et al.* (1985). EMBRAPA.

<sup>3</sup> o complexo vitamínico contém os seguintes componentes: biotina, ácido fólico, piridoxina, tiamina, riboflavina, niacinamida. Todos os componentes do complexo vitamínico, podem ser adquiridos no mercado nacional. Se misturam as formulações em 1L de água para obter a solução vitamínica, que deve ser guardada em geladeira.

Separadamente, dissolver muito bem o agar – agar em 600ml de água destilada, misturar com a pasta feita anteriormente e adicionar o formol. Levar a fogo a mescla ate ferver por 15 minutos movimentando constantemente para que nenhum grumo se forme.

Os componentes 6, 9 e 10 devem ser dissolvidos em 50ml de água destilada fria e misturados com a massa ainda quente, porém, fora do fogo. Bater muito bom em liquidificador ou com ajuda de uma espátula devidamente esterilizada e distribuir em bandejas de acero inoxidable também esterilizadas para cortar em pedaços de 2cm<sup>2</sup> e distribuir nos copos das lagartas.

### APENDICE 3

Composição da dieta artificial usada para *S. frugiperda* (GREENE et al., 1976)

	Componentes	Quantidade
1	Feijão carioca	166, 66g
2	Germe de trigo	79,2g
3	Levedura de cerveja	50,7g
4	Ácido sórbico	1,65g
5	Ácido ascórbico	5,1g
6	Nipagin	3,15g
7	Agar – agar	27g
8	Formol	4,15ml
9	Solução inibitória <sup>4</sup>	4,15ml
10	Água destilada	750ml

### PREPARO

Adicionar ao feijão 1,2 L de água para cada receita e cozinhar em panela de pressão por 40 min aproximadamente. Em seguida retirar 750 ml do caldo de feijão e transferir para liquidificador junto com os componentes 2, 3, 4, 5, 6 e misturar com o feijão cozido, bater durante 1 minuto no liquidificador.

Separadamente, dissolver muito bem o agar – agar em 750ml de água destilada, misturar com a pasta feita anteriormente e levar a fogo a mescla até ferver por 15 minutos movimentando constantemente para que nenhum grumo se forme.

Os componentes 6, 8 e 9 devem ser dissolvidos em 50ml de água destilada fria e misturados com a massa ainda quente, porém, fora do fogo. Bater muito bom em liquidificador ou com ajuda de uma espátula devidamente esterilizada e distribuir em bandejas de acero inoxidável também esterilizadas para cortar em pedaços de 2cm<sup>2</sup> e distribuir nos copos das lagartas.

<sup>4</sup> A solução inibitória cote os seguintes componentes: Ácido propiónico (18ml); ácido fosfórico (43ml); água (540ml)

## REFERÊNCIAS

- ALBANESE, D. Negative effects of common herbicides on non-target invertebrates. **Electronic Theses and Dissertations**, p. 53, 2019.
- ANDRADE, K. **Aspectos bioecológicos de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Nocturidae) en diferentes hospederos**. 2014.
- ANDREOTTI, G. et al. **Glyphosate Use and Cancer Incidence in the Agricultural Health Study**. Journal of the National Cancer Institute, v. 110, n. 5, p. 509–516, 2018.
- ANDREWS, K. L. **Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. *Florida entomologist*, (1988). 630-653.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota Sobre o Uso de Agrotóxicos Em Área Urbana**, de 15 de janeiro de 2010. Available: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/informes/informe-uso-de-agrotoxicos-em-area-urbana.pdf/view>. Accessed: 23 dec. 2020.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Glifosato prossegue sob análise na Anvisa**. Available: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2017/glifosato-prossegue-sob-analise-na-anvisa>. Accessed: 23 dec. 2020.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota técnica No23/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DERE3/ANVISA**. Available: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/notas-tecnicas/nota-tecnica-23-de-2018-glifosato.pdf/view>. Accessed: 23 dec. 2020
- BALBUENA M SOL, TISON L, HAHN ML, GREGGERS U, MENZEL R, FARINA WM. 2015. **Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation**.
- BAYER, MONSANTO BRASIL. Bula do produto online [Rua Samuel Aizemberg, 1707 – São Bernardo do Campo – SP – 09851-550 \(roundup.com.br\)](http://Rua Samuel Aizemberg, 1707 – São Bernardo do Campo – SP – 09851-550 (roundup.com.br))
- BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil**. 2012 P.20-21. 144f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012
- BRIAN, FATH, (2019) *encyclopedia of ecology: second edition*. ELSEVIER, vol1.
- BUTT, B. **Sex determination of lepidopterous pupae**. *USDA, Agric. Res. Serv. Rep.*, 1962, vol. 33, no 75, p. 1-7.

BUTTLER, T. M., MARTINKOVIC, W., & NESHEIM, O. N. (1998). **Factors influencing pesticide movement to ground water**. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.

CANOSA, IVANA, SOFIA. (2019) **Interferencia de herbicida glifosato sobre el control endocrino de la reproducción, en el cangrejo de estuario *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura)**. Tese doctoral UBA. [CONICET Digital\\_Nro.87ff761e-9d54-4f31-9ee6-8ddb5a2d7b99\\_A.pdf](https://doi.org/10.3390/digital.87ff761e-9d54-4f31-9ee6-8ddb5a2d7b99)

CARVALHO, L; FERREIRA, F; BUENO, N. **Importância econômica e generalidades para o controle da lagarta falsa-medideira na cultura da soja**. *Enciclopédia Biosfera*, 2012, vol. 8, no 15.

CLAY, S. A. (2021). **Near-term challenges for global agriculture: Herbicide-resistant weeds**. *Agronomy Journal*, 113(6), 4463-4472.

CLAIR, E.; MESNAGE, R.; TRAVERT, C.; SERALINI, G. E. **A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels**. *Toxicology in Vitro*, v. 26, p. 269-279, 2012

CONRAD, K. F. et al. **Rapid declines of common, widespread British moths provide evidence of an insect biodiversity crisis**. *Biol Cons.*, v. 132, p. 279–291, 2006.

COUTINHO, C. F. B.; LUIZ, E.; MAZO, H. **complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão** *Quim. Nova*, 28, 1038-1045. 2005

CHEN, Y.-C.; CHEN, D.-F.; YANG, M.-F.; LIU, J.-F. **El efecto de las temperaturas y los huéspedes en el ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. *Insectos* 2022, 13, 211. <https://doi.org/10.3390/insects13020211>

CHENGZENG ZHOU, XIAOXIA LUO, NENGYI CHEN, LILI ZHANG, AND JIANGTAO GAO. **C–P Natural Products as Next-Generation Herbicides: Chemistry and Biology of Glufosinate**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2020 68 (11), 3344-3353 DOI: 10.1021/acs.jafc.0c00052

CHEREDNICHENKO, G., ZHANG, R., BANNISTER, R. A., & TIMOFEEVA, O. A. (2017). **Effects of glyphosate and its formulation, Roundup, on reproduction in an invertebrate model organism (*Bombyx mori* L.)**. *Environmental Pollution*, 230, 1018-1025.

DABNEY, B.L., PATIÑO, R. **Low-dose stimulation of growth of the harmful alga, *Prymnesium parvum*, by glyphosate and glyphosate-based herbicides**. *Harmful Algae*, 2018. v. 80, p. 130-139,

DAI, P., YAN, Z., MA, S., YANG, Y., WANG, Q., HOU, C., & DIAO, Q. (2018). **The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro**. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(29), 7786-7793.

DU PLESSIS, HANNALINE. SCHELEMMER, MARIE LUISE. VAN DER BERG, JHONNIE. *The Effect of Temperature on the Development of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) Insects* 2020, 11(4), 228; <https://doi.org/10.3390/insects11040228>.

DONOUGHE, SETH. **Insect egg morphology: evolution, development, and ecology.** *Current Opinion in Insect Science*, 2022, vol. 50, p. 100868.

ECARNOT, F. et al. Writing a scientific article: **A step-by-step guide for beginners.** *European Geriatric Medicine*, v. 6, n. 6, p. 573–579, 2015.

EHRLISH, P. EHRLISH, A.(1961) **How to know the butterflies.** WM. C. Brown company publishers. Dubuque Iowa.

FENG BO; GUO QIANSHUANG; WANG HAOJIE; PAN LIEMING; DU YONGJUNET . **Identificação precisa do gusano cogollero do milho.** (2020) [Identificación precisa del gusano cogollero \\* \(magtechjournal.com\)](https://magtechjournal.com)

FOX, R. (2013). **The decline of moths in Great Britain: a review of possible causes.** *Insect conservation and diversity*, 6(1), 5-19.

GEBREZIHHER, H. G. **Review on management methods of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) in Sub-Saharan Africa.** *Int. J. Entomol. Res*, 5(2), 9-14. (2020).

GULLAN, Penny J.; CRANSTON, Peter S. **The insects: an outline of entomology.** John Wiley & Sons, 2014.

HALLMANN, C. A. et al. **More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas.** *PLOS ONE*, v. 12, n. 10, p. e0185809, out. 2017.

HECHT, SUSANNA, et al. **La evolución del pensamiento agroecológico.** *Agroecología: bases científicas para una agricultura sustentable*, 1999, vol. 4, p. 15-30.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja.** *Londrina, Brazil*, 1985.

HUANG, F, 2020, **Resistance of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to transgenic *Bacillus thuringiensis* Cry1F corn in the Americas: lessons and implications** for Bt corn IRM in China. *Rev, Insects science*, Volume28, Issue3, June 2021. Pages 574-589

KALLESHWARASWAMY, C. M., MARUTHI, M. S., & PAVITHRA, H. B. **Biology of invasive fall army worm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) on maize.** *Indian Journal of Entomology*, 80(3), 540-543. (2018).

KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas a herbicidas.** São Paulo: Basf Brasileira S.A., 1996.

KUNIN, WILLIAM E. **"Robust evidence of declines in insect abundance and biodiversity."** (2019): 641-642.



- LIMA, I. B., BOËCHAT, I. G., & GÜCKER, B. (2021). **Glifosato no Brasil**. Caderno de Geografia, 31(1), 90-90.
- LOPES, C. V. A., & ALBUQUERQUE, G. S. C. D. **Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática**. *Saúde em debate*, 42, 518-534. (2018).
- LÓPEZ OSEGUERA, Irving Rubén. **Manejo Integrado de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo de Maíz (*Zea mays* L)**. 2017. Tesis de Licenciatura. Babahoyo: UTB, 2017.
- NATURALEZA DE DERECHOS **183 Efectos de dosis subletales de glifosato sobre la navegación de abejas**. *J Exp Biol*. 2015 Sep; 218(Pt 17):2799-805
- NODARI, R, O; HESS, S, C. **Campeão de vendas, cientificamente o Glifosato é um agrotóxico perigoso**. *Extensio: Revista Eletrônica de Extensão*, 2020, vol. 17, no 35, p. 2-18.
- MAGGI, F., LA CECILIA, D., TANG, F. H., & MCBRATNEY, A. (2020). **The global environmental hazard of glyphosate use**. *Science of the total environment*, 717, 137167.
- MARTIN-CULMA, N. Y.; ARENAS-SUÁREZ, N. E. A.-S. E. **Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola**. *Entramado*, v. 14, n. 1, p. 232–240, 2018.
- MONTEZANO, D. G. et al. **Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas**. *African Entomology*, v. 26, n. 2, p. 286–300, set. 2018.
- MOSCARDI, F., BUENO, A. D. F., SOSA-GÓMEZ, D. R., ROGGIA, S., HOFFMANN-CAMPO, C. B., POMARI, A. F., ... & YANO, S. A. C. (2012). **Artrópodes que atacam as folhas da soja. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**, 4, 859.
- OLIVEIRA, E, B. *Effect of resistant and susceptible soybean genotypes at different phenological stages on development, leaf consumption, and oviposition of *Anticarsia gemmatalis* Hubner*. (1981). Tesis de Maestría. University of Florida.
- OVERTON, K., MAINO, J. L., DAY, R., UMINA, P. A., BETT, B., CARNOVALE, D., & REYNOLDS, O. L. **Global crop impacts, yield losses and action thresholds for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): A review**. *Crop Protection*, 145, 105641. (2021).
- PAGANELLI, A.; GNAZZO, V.; ACOSTA, H.; LÓPEZ, S. L.; CARRASCO, A. E. **Glyphosate based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling**. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 23, p. 1586-1595, 2010.
- PAULA, A. et al. **Danos De *Spodoptera frugiperda* ( Smith , 1797 ) Em Milho Expressando A Proteína Cry 1A . 105 / Cry 2Ab2 Em Terras Baixas**. n. 1, 2012.
- PALMA, JANINNE. MAEBE, KEVIN. GUEDES, JERSON. SMAGGHE, GUY. (2015) *Molecular Variability and Genetic Structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an Important Soybean Defoliator in Brazil*. PLoS ONE 10(3): e0121260. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121260>

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; SILVA, L. R. DA. **A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente.** Revista de Economia, v. 36, n. 1, p. 27–48, 2010.

PELAEZ, V., TEODOROVICZ, T., ANDRÉ GUIMARÃES, T., RODRIGUES DA SILVA, L., MOREAU, D., & MIZUKAWA, G. (2016). **A dinâmica do comércio internacional de agrotóxicos.** *Revista de Política Agrícola*, 25(2), 39-52.

PERINI, C. R., PERINI, C. R., TABULOC, C. A., CHIU, J. C., ZALOM, F. G., STACKE, R. F., BERNARDI, O., GUEDES, J. C. **Transcriptome analysis of pyrethroid-resistant *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) reveals overexpression of metabolic detoxification genes.** *Journal of Economic Entomology*, 2021, vol. 114, no 1, p. 274-283.

PERINI, C. R., SOSA, V. I., KODA, V. E., SILVA, H., RISSO, A. A., VASCONCELOS, W. N., GUEDES, J. C. **Genetic structure of two Plusiinae species suggests recent expansion of *Chrysodeixis includens* in the American continent.** *Agricultural and Forest Entomology*, (2021). 23(3), 250-260.

PERINI, C. R.; TABULOC, C. A.; CHIU, J. C.; ZALOM, F. G.; STACKE, R. F.; BERNARDI, O.; NELSON, D. R.; GUEDES, J. C. **Transcriptome Analysis of Pyrethroid-Resistant *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) Reveals Overexpression of Metabolic Detoxification Genes,** *Journal of Economic Entomology*, Volume 114, Issue 1, February 2021, Pages 274–283, <https://doi.org/10.1093/jee/toaa233>

PETERSON, A. (1964) **Types of eggs among moth of Noctuidae (LEPIDOPTERA)** Rev. The Florida Entomologist, Vol 47. Nº 2 (june 1964) p. 71 – 91. Florida Entomological society.

PIGGOTT, M.P., TADLE, F.P.J., PATEL, S. ET AL. **Corn-strain or rice-strain? Detection of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in northern Australia.** *Int J Trop Insect Sci* 41, 2607–2615 (2021). <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00441-7>

PLEASANTS, J. M., HELLMICH, R. L., & DIVELY, G. P. (2018). **Effects of the herbicide glyphosate on monarch butterfly (*Danaus plexippus*) development and survival.** *Chemosphere*, 212, 262-271.

QUIMBAYO N, SERNA F, OLIVARES T, ANGULO A. 2010. Noctuids (Lepidoptera) in Colombian flower crops. *Revista Colombiana de Entomología* 36: 38–46.

SALOMÃO, P. E. A.; FERRO, A. M. S.; RUAS, W. F. **Herbicidas no Brasil: uma breve revisão.** *Research, Society and Development*, v. 9, n. 2, p. e32921990, 2020a.b.

SAMMONS, R. D., & GAINES, T. A. (2014). **Glyphosate resistance: state of knowledge.** *Pest management science*, 70(9), 1367-1377. <https://doi.org/10.1002/ps.3743>

SEIBOLD, SEBASTIAN, et al. **Arthropod decline in grasslands and forests is associated with landscape-level drivers**. *Nature*, 2019, vol. 574, no 7780, p. 671-674.

SHECAKS, A., DARVAS, B. ***Herbicides, Properties, Synthesis And Control Of Weeds***- Edited by Mohammed Naguib Abd El-Ghany Hasaneen. Cap, 14: *Forty years of glyphosate*. InTechOpen, Croatia. p. 249. (2011)

STECCA, C. BUENO, A. PASINI, A. SILVA, D. ANDRADE, K. **side effect of glyphosate ti the perasitoid *Telenomus remus***. PR. Sociedade Entomológica do Brasil, 2016.

RULIN WANG, CHUNXIAN JIANG, XIANG GUO, DONGDONG CHEN, CHAO YOU, YUE ZHANG, MINGTIAN WANG, QING LI. **Potential distribution of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in China and the major factors influencing distribution**. Rev, Global Ecology and Conservation. Vol 21, March 2020, <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00865>

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, Biblioteca universitaria . ***Manual para normalização e estrutura de trabalhos acadêmicos: TCCs, monografias, dissertações e teses***. 3. ed. rev., atual. e ampl. Lavras, 2020. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/11017>. Acesso em: data de acesso.

WANG, R., JIANG, C., GUO, X., CHEN, D., YOU, C., ZHANG, Y., & LI, Q. **Potential distribution of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) in China and the major factors influencing distribution**. *Global Ecology and Conservation*, 21, e00865. (2020).

YOUNG, JOHN R. **"Fall Armyworm: Control with Insecticides"**. *The Florida Entomologist*, vol. 62, no. 2, 1979, pp. 130–33. *JSTOR*, <https://doi.org/10.2307/3494089>. Consultado el 12 de marzo de 2023.

ZACHARIA, J. T. (2011). **Identity, physical and chemical properties of pesticides**. *Pesticides in the modern world-trends in pesticides analysis*, 1-18.

ZANUNCIO, J. et al. **Glyphosate-based herbicides toxicity on life history parameters of zoophytophagous *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 147, n. August 2017, p. 245–250, 2018.