

CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS
CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS NO MANEJO DE RESISTÊNCIA DE *Plutella xylostella*
(L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

DONALD MANIGAT

(Sob Orientação do Professor Claudio Augusto Gomes da Camara -UFRPE)

RESUMO

O uso intensivo de inseticidas sintéticos para controlar a traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*) tem acarretado problemas na produção sustentável de hortaliças. Uma possível estratégia de minimizar os danos econômicos e ecológicos seria a busca por plantas com metabólitos secundários ativos, que possam atuar como inseticidas naturais para o manejo dessa praga no cultivo de hortaliças. Desta maneira, esta tese teve como objetivo investigar os mecanismos fitoquímicos da bioatividade, em *P. xylostella*, de constituintes majoritários de Eugenol e Limoneno pertencentes aos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (Tumb) e *Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), respectivamente. Por isso, a suscetibilidade de *P. xylostella* aos formulados foi avaliada por meio de concentração média Letal (CL₅₀) sobre larvas do terceiro instar e por razão de toxicidade (TR₅₀) entre as CL_{50s}. Também, verificou-se através do teste de fitotoxicidade os níveis dos índices de fitotoxidez dos formulados sobre as folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga). A avaliação da variação metabólica foi feita através de extratos do corpo das larvas de *P. xylostella*, visando averiguar os efeitos dos xenobióticos na produção de substâncias capazes de metabolizar esses produtos. A diferença dos metabólitos foi analisado pelo método comparativo das Análises de Componentes Principais (PCA). Além disso, foram avaliados os recursos adaptativos de sobrevivência baseados nos parâmetros biológicos de

P. xylostella após 25 gerações e sob pressão seletiva em laboratório. Pois, foi verificada uma perda na suscetibilidade a partir da razão de toxicidade das CL_{50} s, [*E. caryophyllata* (1,63-2,59 mg.L⁻¹) e TR_{50} = 1,6]; [Limoneno (14,86-29,67 mg.L⁻¹) e TR_{50} = 2,0]; [Decis® (3,25-14,01 mg.L⁻¹) e TR_{50} = 4,31] e [Lufenuron (0,45-2,9 mg.L⁻¹) e TR_{50} = 6,4]. Os testes de fitotoxicidade realizados demonstraram que os maiores índices de fitotoxidez estão dentro do limite aceitável segundo a escala diagramática para avaliação de danos. As análises de variações metabólicas indicaram a presença em maior proporção de ácidos graxos, dipeptídeos, compostos fenólicos, entre outros. Os bioensaios realizados em laboratório demonstraram que todos os formulados interferiram negativamente no peso das pupas, na duração de período larval e pupal, fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas. No experimento sobre os fatores biológicos de crescimento populacional, observou-se que houve diferenças na taxa líquida de reprodução (R_0) e no tempo médio entre gerações (T). Desta maneira, os resultados mostraram que a suscetibilidade de *P. xylostella* aos constituintes majoritários de óleos essenciais pode variar após gerações consecutivas e sob pressão seletiva em laboratório.

PALAVRAS-CHAVE: Metabólitos secundários, inseticidas naturais, hortaliças, *Eugenia caryophyllata*, *Citrus aurantium*, inseticida comercial, análise metabólica, recursos adaptativos.

CHARACTERIZATION OF THE BIOACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AND THEIR MAJOR
CONSTITUENTS IN THE RESISTANCE MANAGEMENT OF *Plutella xylostella* (L.)

(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

DONALD MANIGAT

(Under the Direction of Professor Claudio Augusto Gomes da Camara -UFRPE)

ABSTRACT

The intensive use of synthetic insecticides to control the diamondback moth (*Plutella xylostella*) has caused problems such as: overdosing in the application due to the inefficiency of the active ingredient and contamination of the water table, among others. A possible strategy to minimize economic and ecological damage would be the search for plants with active secondary metabolites acting as natural insecticides for the management of this pest in the cultivation of leafy vegetables. Thus, this thesis aimed to investigate the phytochemical mechanisms of the bioactivity of major constituents Eugenol and Limonene belonging to the essential oils of *Eugenia caryophyllata* (Tumb) and *Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), respectively, in *P. xylostella*. Therefore, the susceptibility of *P. xylostella* to essential oils and their major constituents was evaluated using a lethal average concentration (LC₅₀) on third instar larvae, also based on the toxicity ratio (TR₅₀) of LC₅₀ between generations and under selective pressure in the laboratory. The evaluation of metabolic variation between successive generations of *P. xylostella* was performed using extracts of *P. xylostella* insects and was performed by the comparative method of Principal Component Analysis (PCA). Furthermore, adaptive survival requirements was evaluated based on the biological parameters of *P. xylostella* after successive generations and under

selective pressure in the laboratory. A greater tolerance of *P. xylostella* was verified in susceptibility from the toxicity ratio of CL₅₀S, [*E. caryophyllata* (1.63-2.59 mg/l) and TR₅₀=1.6]; [Limonene-(R) (14.86-29.67 mg/l) and TR₅₀=2.0]; [Decis® 25 EC (3.25-14.01 mg/l) and TR₅₀=4.31] and [Lufenuron (0.45-2.9 mg/l) and TR₅₀=6.4]. The analyzes of metabolic variations indicated the presence in a greater proportion of fatty acids, dipeptides, phenolic compounds, among others, which are considered as metabolizers of active compounds, with emphasis on the selective pressure of *P. xylostella* with Decis® 25 EC, Lufenuron and Limonene. The bioassays carried out in the laboratory showed that those formulated based on essential oils and commercial insecticides negatively interfered with the pupae weight, on the duration of the larval period, on the duration of the pupal period, fecundity, fertility and longevity in the female's life. In the experiment on biological factors of population growth, it was observed that there were differences in the net reproduction rate (R₀) and in the average time between generations (T). Thus, the results showed that the susceptibility of *P. xylostella* to major constituents of essential oils can vary after consecutive generations and under selective pressure in the laboratory.

KEY WORDS: Secondary metabolites, natural insecticides, vegetables, *Eugenia caryophyllata*, *Citrus aurantium*, commercial insecticide, metabolomic analysis, adaptive resources

CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS
CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS NO MANEJO DE RESISTÊNCIA DE *Plutella xylostella*
(L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

DONALD MANIGAT

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia.

RECIFE - PE

Setembro – 2021

CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS
CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS NO MANEJO DE RESISTÊNCIA DE *Plutella xylostella*
(L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

DONALD MANIGAT

Comitê de Orientação:

Claudio Augusto Gomes da Câmara – UFRPE

César Auguste Badji – UFAPE

CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS
CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS NO MANEJO DE RESISTÊNCIA DE *Plutella xylostella*
(L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

por

DONALD MANIGAT

Banca Examinadora:

César Auguste Badji – UFAPE

Cláudio Augusto Gomes da Câmara – UFRPE

Fernando Hercos Valicente – EMBRAPA

Marcilio Martins de Moraes – UFRPE

Vaneska Barbosa Monteiro – UFRPE



Donald Manigat
Doutor em Entomologia



Prof. Cláudio Augusto Gomes da
Câmara – UFRPE
Orientador

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M245m96 Manigat, Donald
3cc CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS CONSTITUÍNTES MAJORITÁRIOS
NO MANEJO DE RESISTÊNCIA DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) / Donald Manigat. -
2021.
133 f.

Orientador: Claudio Augusto Gomes da Camara.
Coorientador: Cesar Auguste Badji.
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Entomologia
Agrícola, Recife, 2021.

1. Metabólitos secundários. 2. Inseticidas naturais. 3. Traça-das-crucíferas. 4. Análise metabólica. 5. Parâmetros
biológicos. I. Camara, Claudio Augusto Gomes da, orient. II. Badji, Cesar Auguste, coorient. III. Título

CDD 632.7

DEDICATÓRIA

Ofereço aos meus pais, minha filha e meus irmãos, que mesmo distante, são os maiores incentivadores e ensinam sempre os valiosos caminhos.

AGRADECIMENTOS

Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós (Efésios 3:20).

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelas oportunidades e pela formação acadêmica.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa PROEX concedida e ao Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) – CAPES-PRINT pelo financiamento da pesquisa científica no exterior.

A minha família, pela força, incentivo a lutar pelos meus sonhos, pelo carinho, amor e pelos ensinamentos valiosos.

A minha filha Savannah, pelo amor, carinho e me proporcionar a maior alegria na minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio A. Gomes da Câmara pelo compromisso, pela confiança, pelos valiosos ensinamentos e pelas contribuições.

Aos membros da Banca examinadora por aceitar o convite e pelas contribuições no trabalho.

A minha coorientadora Dr^a. Gaelle LE GOFF da “Université Côte d’Azur, INRAE, Nice – France” por me receber de porta aberta na França, pelo convívio e por todo aprendizado.

A toda equipe do laboratório “Insect Defence: genomics and adaptations” do “Institut Sophia Agrobiotech – ISA, Nice – France” pelos compartilhamentos de experiências ao longo da minha estadia na França.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e a coordenação, pela contribuição na formação acadêmica, pelos ensinamentos científicos e pelo profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Marcílio Martins, pelo auxílio na realização das análises de identificação dos compostos nos óleos essenciais e na análise metabolômica.

Ao Prof. Dr. Jorge Torres que esteve sempre disponível pelas dúvidas nas análises estatísticas.

À Profa. Dr^a. Leila Louback, pelo incentivo a olhar as coisas sempre com otimismo e pelas palavras de apoio.

A todos os colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelos ensinamentos, bons momentos compartilhados e convívio durante essa jornada.

A toda equipe do Laboratório de Investigação Química dos Inseticidas Naturais (LABIQIN) do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (PPGE) e do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos do Departamento de Química: Mayara, Carla, Dr^a. Vaneska, Dr. João Paulo, Guilherme, Fernando, Carolina, Amanda, Tchiara e Lucas pela alegria no convívio diário, pela ajuda nos experimentos e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos Barnet, Wesly, Dr^a. Priscilla, Réginal, Léo, Prof. Dr^a. Talita e Fernanda pelos valiosos conselhos e pelo apoio moral durante essa caminhada.

A todos (as) que contribuíram diretamente e indiretamente durante essa jornada.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	x
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	9
2 MONITORAMENTO DA SUSCETIBILIDADE DE <i>Plutella xylostella</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) AOS ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS PARA O SEU MANEJO DE RESISTÊNCIA	14
RESUMO	15
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	19
MATERIAL E MÉTODOS	21
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO.....	34
AGRADECIMENTOS.....	46
LITERATURA CITADA.....	47
3 CAPACIDADE E ADAPTAÇÃO BIOLÓGICA DE <i>Plutella xylostella</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) NO MANEJO DE RESISTÊNCIA COM ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS.....	85
RESUMO	86

ABSTRACT	88
INTRODUÇÃO	90
MATERIAL E MÉTODOS	91
RESULTADOS	95
DISCUSSÃO.....	98
AGRADECIMENTOS	102
LITERATURA CITADA.....	103
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	118

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

As hortaliças se destacam-se no mundo pelo seu consumo como espécies vegetais mais produzidas nos últimos anos, isso gera uma demanda crescente de áreas e comercialização. O mercado mundial de hortaliças produz em torno de 70 milhões de toneladas de produtos anualmente numa área calculada a mais de 2,4 milhões de hectares (FAOSTAT 2019). As hortaliças conhecidas como folhosas englobam as brássicas que são consumidas na forma verde ou vegetativa. As brássicas folhosas mais destacadas, referem-se do repolho, brócolis, couve, alface, entre outras (Monteiro & Lunn 1998). Na cadeia produtiva, o Brasil representa uma parcela significativa na produção e na demanda de hortaliças folhosas. Os dados de pesquisas mais recentes relacionados aos cultivos de hortaliças folhosas relataram que há uma produção superior a 1,3 milhão de toneladas e uma área plantada em 174 mil hectares (Kist *et al.* 2019).

No cultivo de hortaliças, ou seja, até 60% está dependendo da agricultura familiar o que faz a mão de obra dessa categoria desempenha um papel importante na produção de hortas. Nesse caso, a produção intensifica-se não somente como uma atividade de demanda de alimentos para suprimentos alimentar mas também como uma fonte de renda para os agricultores familiares (Melo *et al.* 2017). Em vista disso, o consumo de hortaliças folhosas tem uma importância na alimentação humana pela sua composição em vitaminas e sais minerais que são elementos essenciais na saúde nutritiva do ser humano (Kapusta-Duch *et al.* 2012).

As brássicas possuem uma ampla adaptação climática, sendo que o cultivo de espécies ocorre em todas as estações do ano por ter variedades diferentes e adaptadas. A temperatura de cultivo em ambiente livre varia de regiões, com temperaturas entre 16°C a 35°C. Além disso, o ciclo curto das variedades de brássicas é um benefício para o produtor na obtenção de múltiplas safras por ano

(Filgueira 2000). Por isso, a principal vantagem de brássicas folhosas está relacionada na produção em áreas limitadas e uma demanda grande para o mercado de consumo, criando uma atividade lucrativa para os pequenos ou médios agricultores (Franzke *et al.* 2011).

Artropodes e fitopatógenos causam danos diretos e indiretos severos a brassicas folhosas, que resulta em perdas sucessivas em espécies de importância econômica (Ahuja *et al.* 2011). Por isso, a adoção de manejo adequado e boas práticas agrícolas são necessários para evitar grandes prejuízos econômicos (Burkness & Hutchison 2014). Dentre as espécies de artrópodes capazes de atacar as brássicas destacam-se a mosca branca (*Bemisia tabaci*, biótipo B Hemiptera: Aleyrodidae), tripes (*Frankliniella occidentalis*, Thysanoptera: Thripidae), pulgões (*Brevicoryne brassicae*, Hemiptera: Aphididae) e (*Myzus persicae* (Sulzer 1776), Hemiptera: Aphididae), a curuquerê-da-couve (*Ascia monuste orseis*, Lepidoptera: Pieridae), a lagarta falsa-medideira (*Trichoplusia nii*, Lepidoptera: Noctuidae), a broca-da-couve (*Hellula phidilealis*, Lepidoptera: Pyralidae) e a traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella* (Linnaeus) Lepidoptera: Plutellidae) (Vendramim & Martins 1982, Carvalho *et al.* 2008, Cardoso *et al.* 2010, Zalucki *et al.* 2012).

Dentre as pragas de maior importância agrícola e que tem causado grandes danos econômicos nas brássicas folhosas destaca-se a traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*). Essa é uma das principais pragas de brássicas folhosas cultivadas e comercializadas, encontra-se mundialmente em áreas de olerícolas e caracteriza-se como uma praga que é capaz de devorar rapidamente a parte atacada da planta na sua alimentação (Shakeel *et al.* 2017). Por essa razão, o inseto é considerado como uma praga com alta capacidade de destruir as plantas em especial da família Brassicaceae (Furlong *et al.* 2013).

A traça-das-crucíferas possui um ciclo curto que favorece múltiplas gerações anualmente. Na fase imatura, as larvas passam-se por quatro ínstares até a fase pupal onde há a presença do casulo, e as pupas localizam-se habitualmente na face inferior das folhas para emergir posteriormente.

Uma vez eclodidos os ovos depositados pelas fêmeas, as folhas são minadas pelas larvas de primeiro instar, enquanto as de segundo e terceiro instares consomem todo o tecido foliar, deixando só a epiderme superior, o que ocasiona a perda total ou redução considerável (Talekar & Shelton 1993).

Os adultos são microlepidópteros, que medem cerca de 10 mm de comprimento, os machos se identificam morfológicamente em relação as fêmeas por meio de uma mancha que se estende longitudinalmente até o final do dorso. Os ovos apresentam uma coloração amarelada no início da oviposição e já escurecem quando chegar perto de eclodir, e são depositados na superfície inferior das folhas e encaixam-se próximo as nervuras foliares. O período de incubação dos ovos varia de 2 a 4 dias para a eclosão e isso pode ser influenciado por variáveis como a temperatura e a idade da fêmea. O ciclo biológico completo é de cerca de 16-18 dias nas condições de temperatura 25 ± 2 °C, umidade relativa $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas, sendo que uma fêmea tem a capacidade de colocar em média entre 150-200 ovos durante toda sua vida adulta (Golizadeh *et al.* 2007, Henniges-Janssen *et al.* 2011, Ang *et al.* 2014).

Desta maneira, em função de prejuízos causados por *P. xylostella* em brássicas folhosas, as principais medidas de controle empregadas no manejo dessa praga incluem métodos: cultural, biológico, legislativo, genético e químico (Sarfraz *et al.* 2005, Raymond *et al.* 2008). O controle químico por meio de aplicação de inseticidas comerciais sintéticos é o mais comum nas medidas de controle contra *P. xylostella* devido à sua disponibilidade no mercado de defensivos agrícolas, sua ação acumulada e alto poder de toxicidade (Zhang *et al.* 2016). No entanto, o uso constante e inadequado desses formulados convencionais têm contribuído para o surgimento de populações menos sensíveis, como já foi relatado vários casos de resistência de *P. xylostella* a grupos distintos de inseticidas sintéticos em estudos realizados por diversos autores na literatura (Santos *et al.* 2011, Qin *et al.* 2018, Mallott *et al.* 2019). O número de casos de resistência e falha dos ingredientes

ativos no controle dessa praga aumenta constantemente e com isso causa aumento das aplicações e do custo da produção. Porém, a situação se torna cada vez mais insustentável para os agricultores (Grzywacz *et al.* 2010).

Entretanto, devido aos relatos de aparecimento de casos de insetos resistentes e entre outros prejuízos causados pelo uso indiscriminado dos inseticidas sintéticos como o alto teor residual nos alimentos comercializados, houve um foco considerável nas pesquisas relacionadas à utilização de inseticidas naturais nas últimas décadas. Desse modo, existem métodos que buscam alternativas de produtos mais eficientes e/ou menos impactantes no ambiente, assim como um novo modelo de uso de inseticidas, sendo uma delas o uso de inseticidas naturais, com toxicidade que permitam a formulação e aplicação no manejo de insetos-praga (Endersby *et al.* 1992, Isman 2020, Godlewska *et al.* 2021).

Dessa maneira, torna-se necessário a utilização de produtos alternativos com potencial bioativo e menos persistente no ambiente para o manejo de insetos-praga. O uso de produtos provenientes de plantas como uma alternativa no controle de pragas gera uma riqueza pela grande quantidade de espécies de plantas e biodiversidade que existem ao redor do mundo (Isman *et al.* 2010). Uma das estratégias que engloba o manejo de insetos seria a utilização de inseticidas naturais feitos a partir de substâncias de origem vegetal e microrganismos entomopatógenos (Amoabeng *et al.* 2020).

Os inseticidas naturais apresentam propriedades bioativas para controlar os artrópodes-praga, atuando como ingredientes ativos que preenchem os requisitos de eficácia, seletividade e biodegradabilidade (Marangoni *et al.* 2013, Pavela 2016). Inseticidas naturais podem ser classificados em dois grupos distintos: os formulados que provêm de animais feitos à base de microrganismos e os formulados botânicos provenientes de compostos do metabolismo secundário de plantas, que podem ser encontradas nas raízes, folhas, flores e sementes, entre eles: os

hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetona, que podem atuar no organismo de artrópodes-praga, causando efeitos toxicológicos ou deletérios como mortalidade, repelência, deterrência alimentar, crescimento e desenvolvimento (Akhtar *et al.* 2012, Lacey *et al.* 2015, Mondédji *et al.* 2021).

Nesse contexto, os inseticidas botânicos podem ser utilizados de diferentes formas como pós, óleos essenciais e extratos vegetais. Entre esses, os óleos essenciais destacam-se nos últimos anos pelo grande volume de publicações de trabalhos que envolvem o manejo de artrópodes-praga (Pavela 2012). Os óleos essenciais são substâncias de misturas complexas, proveniente da reação bioquímica do metabolismo secundário em plantas e possuem características voláteis, lipofílicas, contêm as moléculas, tais como os monoterpenos e sesquiterpenos que são os principais responsáveis de atividades biológicas em artrópodes-praga. Os constituintes majoritários representam os compostos mais significativos em quantidade presente na composição dos óleos essenciais e podem ser utilizados como compostos puros (Koul *et al.* 2008, Fierascu *et al.* 2020).

Além disso, os efeitos antagônicos ou sinérgicos são comuns nos óleos essenciais por meio de interações entre seus constituintes químicos, influenciando a atividade biológica sobre os artrópodes-praga. Assim, com o avanço de pesquisas relacionadas aos óleos essenciais destacam-se as famílias de plantas Rutaceae e Myrtaceae, sendo consideradas as mais estudadas como as principais espécies representativas na produção de química orgânica e seu uso no manejo de insetos-praga (Isman 2000, Ikbal & Pavela 2019).

As famílias Rutaceae e Myrtaceae encontram-se em diversos tipos de vegetação e são consideradas entre as mais distribuídas geograficamente no mundo. Dentre essas, a maioria das espécies dessas famílias já foram descritas e são amplamente utilizadas na gastronomia, alimentação, medicina tradicional, ornamentais e também como inseticidas (Bennett 2011). As espécies provenientes dessas famílias fornecem através de suas estruturas vegetais os materiais para a extração de substâncias de diversas classes de metabólitos secundários, destinados para as

atividades biológicas. Destacam-se como espécies de maior uso na forma de óleos essenciais como inseticidas (Lawrencet 2001, Liaqat *et al.* 2018, Noël *et al.* 2021).

Os óleos essenciais atuam como compostos tóxicos que preenchem os requisitos para o controle de *P. xylostella*, também possuem um menor impacto ambiental pela sua capacidade de degradar rapidamente na natureza. O potencial inseticida de *Murraya koenigii* (L.) (Rutaceae), cujo o nome comum curry indiano que é originário da Índia, foi evidenciado contra larvas de *P. xylostella*, demonstrando suas propriedades bioativas de toxicidade, deterrência alimentar e repelência (Kumar *et al.* 2016). Observou-se em estudos da avaliação sobre ovos de *P. xylostella* com *Eucalyptus polybractea* (Baker) (Myrtaceae) que a taxa de eclosão foi afetada significativamente pela atividade do óleo essencial (Sangha *et al.* 2017). Tak & Isman (2017), relataram a bioatividade de *Thymus vulgaris* sobre as larvas de *P. xylostella* devido à sua composição química diversificada, indicando que o timol e o p-cimeno apresentaram um nível expressivo de eficiência na absorção pela quitina do exoesqueleto e conseqüentemente sua ação reguladora de crescimento.

Nas últimas décadas, o número de publicações envolvendo bioatividade de óleos essenciais dentro das famílias Rutaceae e Myrtaceae vêm apresentado um nível expressivo que resume os dados de estudos. Dessa forma, há mais base para o conceito de sustentabilidade devido os relatos científicos sobre bioatividades dos óleos essenciais e seus constituintes majoritários. Por isso, a prática de uso de formulados à base de óleos essenciais na agricultura familiar passa a ser uma realidade no manejo de insetos-praga, em especial na produção orgânica de alimentos (Czaja *et al.* 2015, Nile *et al.* 2019). Entretanto, esses formulados a base de óleos essenciais têm uma natureza química que podem atuar de maneira direta ou indireta no organismo do inseto, faz-se necessário pesquisas voltadas na caracterização, potencial biológico e mecanismos de bioatividade desses produtos (Theis & Lerdau 2003, Reddy *et al.* 2016).

Os óleos essenciais, mesmo com diferentes ações biológicas sobre artrópodes-praga, são ainda com estudos limitados sobre os mecanismos de ação ou sítios de atividade (Ebadollahi 2013). Através da teoria da coevolução entre plantas e insetos na natureza, qualquer inseto fitófago tende a desenvolver uma grande diversidade de mecanismos para se defender contra compostos químicos ou metabólitos secundários através de adaptações biológicas como mudança do sítio de ação, sequestro, biodegradação, excreção e as vezes um mecanismo de defesa baseado no comportamento (Li *et al.* 2007, Rattan 2010).

A biodegradação de compostos bioativos representa um mecanismo fundamental que garante uma transformação no corpo do inseto para se proteger de uma infinidade de toxinas que ingerem periodicamente (Li *et al.* 2007). Mas, como os inseticidas naturais vêm sendo utilizados em proporções ilimitadas ultimamente no controle de artrópodes-praga, algumas populações sob o efeito contínuo de alguns formulados podem reduzir sua sensibilidade, no caso de *Tetranychus urticae* Koch que apresentou pouca sensibilidade a três extratos de plantas de *Deverra scoparia*, *Hertia cheirifolia* e *Allium sativum*, apesar de uma mínima fixação dessa detecção (Attia *et al.* 2015).

Nesse sentido, o conhecimento sobre o mecanismo de bioatividade a partir do uso de óleos essenciais e seus constituintes majoritários de plantas evidenciará os níveis de ação que deveriam ser adotados dentro de uma perspectiva de Manejo de Resistência de Insetos (MRI), em especial, *P. xylostella*.

O manejo de resistência de insetos pode ser conhecido como diversas práticas ou medidas agrícolas com o objetivo de manter a suscetibilidade ou sensibilidade de populações de insetos que são expostos diretamente a um determinado formulado (Elzen & Hardee 2003, Bass *et al.* 2015). Esse conceito vem sendo tratado no manejo de muitas pragas e pode ser empregado para o manejo de resistência de insetos nas áreas de brássicas folhosas onde se pode aplicar periodicamente os

óleos essenciais e seus constituintes puros isolados (Elzen & Hardee 2003). De forma geral, as recomendações ou táticas utilizadas para o manejo de resistência de insetos seguem alguns procedimentos, entre eles: monitoramento da suscetibilidade e uso alternado de ingredientes ou compostos ativos (Pimentel *et al.* 1992, Tabashnik *et al.* 2014).

Assim, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de gerar conhecimentos de base para a implementação de programas de manejo de resistência de *P. xylostella* na utilização de óleos essenciais e seus constituintes puros isolados em cultivos de brássicas folhosas, investigando os mecanismos fitoquímicos da bioatividade de constituintes majoritários Eugenol e Limoneno pertencentes aos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* (Tumb), Myrtaceae) e laranja amarga (*Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), Rutaceae), respectivamente, contra *P. xylostella*.

Literatura Citada

- Ahuja, I., Rohloff, J., & Bones, A. M. 2011.** Defence mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. *Sustain. Agric.*, 2: 623-670.
- Akhtar, Y., A. Stevens, R. Bradbury, C. A. da Camara & Isman, M. B. 2012.** Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. *Physiol. Entomol.*, 37: 81-91.
- Amoabeng, B. W., Stevenson, P. C., Mochiah, B. M., Asare, K. P. & Gurr, G. M. 2020.** Scope for non-crop plants to promote conservation biological control of crop pests and serve as sources of botanical insecticides. *Sci Rep*, 10: 1-15.
- Ang, G. C., Silva, R., Maxwell, S. L., Zalucki, M. P. & Furlong, M. J. 2014.** Contrary effects of leaf position and identity on oviposition and larval feeding patterns of the diamondback moth. *Entomol. Exp. Appl.*, 151: 86-96.
- Attia, S., Lebdi, K. G., Heuskin, S., Lognay, G. & Hance, T. 2015.** An analysis of potential resistance of the phytophagous mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to four botanical pesticides. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 19: 232.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. 2015.** The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 121: 78-87.
- Bennett, B. 2011.** Twenty-five economically important plant families. *Encyclopedia of Life Support Systems. Economic Botany*.
- Burkness, E. C. & Hutchison, W. D. 2014.** Implementing reduced-risk integrated pest management in fresh-market cabbage: improved net returns via scouting and timing of effective control. *J. Econ. Entomol.*, 101: 461-471.
- Cardoso, M. O., Pamplona, A. M. S. R. & Michereff Filho, M. 2010.** Recomendações técnicas para o controle de lepidópteros-pragas em couve e repolho no Amazonas. *Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- Carvalho, G. A., Santos, N. M., Pedroso, E. C. & Torres, A. F. 2008.** Eficiência do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no controle de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em couve-manteiga *Brassica oleracea* Linnaeus var. *acephala*. *Arq. Inst. Biol.*, 75: 181-186.
- Czaja, K., Góralczyk, K., Struciński, P., Hernik, A., Korcz, W., Minorczyk, M. & Ludwicki, J. K. 2015.** Biopesticides—towards increased consumer safety in the European Union. *Pest Manag. Sci.*, 71: 3-6.
- Ebadollahi, A. 2013.** Essential oils isolated from Myrtaceae family as natural insecticides. *Annu. Res. & Rev. Biol.*, 148-175.

- Elzen, Gary W., and Dick D. Hardee. 2003.** United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on managing insect resistance to insecticides. *Pest Manag. Sci.*, 59: 770-776.
- Endersby, N. M., Morgan, W. C., Stevenson, B. C. & Waters, C. T. 1992.** Alternatives to regular insecticide applications for control of lepidopterous pests of *Brassica oleracea* var. *capitata*. *Biol. Agric. Hortic.*, 8: 189-203.
- Fierascu, R. C., Fierascu, I. C., Dinu-Pirvu, C. E., Fierascu, I. & Paunescu, A. 2020.** The application of essential oils as a next-generation of pesticides: Recent developments and future perspectives. *Z Naturforsch Sect C*, 75: 183-204.
- Filgueira, F. A. R. 2000.** Novo manual de olericultura. Viçosa: UFV, 402.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Faostat. 2019.** Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 06 de julho de 2021.
- Franzke, A., Lysak, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Koch, M. A. & Mummenhoff, K. 2011.** Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends Plant Sci.*, 16: 108-116.
- Furlong, M. J., D. J. Wright & Dossall, L. M. 2013.** Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 517-541.
- Godlewska, K., Ronga, D. & Michalak, I. 2021.** Plant extracts-importance in sustainable agriculture. *Ital. J. Agron.*, 16:2.
- Golizadeh, A. L. I., Kamali, K., Fathipour, Y. & Abbasipour, H. 2007.** Temperature-dependent development of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) on two brassicaceous host plants. *Insect Sci.*, 14: 309-316.
- Grzywacz, D., Rossbach, A., Rauf, A., Russell, D. A., Srinivasan, R. & Shelton, A. M. 2010.** Current control methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassicas in Asia and Africa. *Crop Prot.*, 29: 68-79.
- Henniges-Janssen, K., Reineke, A., Heckel, D. G. & Groot, A. T. 2011.** Complex inheritance of larval adaptation in *Plutella xylostella* to a novel host plant. *Heredity*, 107: 421-432.
- Ikbal, C. & Pavela, R. 2019.** Essential oils as active ingredients of botanical insecticides against aphids. *J. Pest Sci.*, 1-16.
- Isman, M. B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.*, 19: 603-608.
- Isman, M. B. 2020.** Botanical insecticides in the twenty-first century—fulfilling their promise?. *Annu. Rev. Entomol.*, 65: 233-249.

- Isman, M.B., S. Miresmailli & Machial, C.M. 2010.** Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochem. Rev.* 9: 1-8.
- Jansson, R. K. & Lecrone, S. H. 1990.** Management of diamondback moth, *Plutella xylostella*, with. In *Proc. Fla. State Hort.*,103:122-126.
- Kapusta-Duch, J., Kopec, A., Piatkowska, E., Borczak, B. & Leszczynska, T. 2012.** The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Rocz Panstw Zakl Higien*, 63 :4.
- Kist, B. B., Santos, C. E., Carvalho, C. & Beling, R. R. 2019.** Anuário Brasileiro de Horti&Fruti. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 96 p.
- Koul, O., Walia, S. & Dhaliwal, G. S. 2008.** Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopest. Int.*, 4: 63-84.
- Kumar, V., Reddy, S. E., Chauhan, U., Kumar, N. & Singh, B. 2016.** Chemical composition and larvicidal activity of *Zanthoxylum armatum* against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Nat. Prod. Res.*, 30: 689-692.
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M. & Goettel, M. S. 2015.** Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J. Invertebr. Pathol.*, 132: 1-41.
- Lawrencet, B. M. 2001.** Essential oils: from agriculture to chemistry. *Int. J. Aromatherapy*, 10: 82-98.
- Li, X., Schuler, M. A. & Berenbaum, M. R. 2007.** Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 231-253.
- Liaqat, I., Riaz, N., Saleem, Q. U. A., Tahir, H. M., Arshad, M. & Arshad, N. 2018.** Toxicological evaluation of essential oils from some plants of Rutaceae family. *Evidence-Based Complementary and Alternative, Medicine*.
- Mallott, M., Hamm, S., Troczka, B. J., Randall, E., Pym, A., Grant, C. & Bass, C. 2019.** A flavin-dependent monooxygenase confers resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 115: 103247.
- Marangoni, C., de Moura, N. F. & Garcia, F. R. M. 2013.** Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. *Rev. Cienc. Farm. Amb.*, 6: 92-112.
- Melo, R. D. C., Vendrame, L. D. C., Madeira, N. R., Blind, A. D. & Vilela, N. J. 2017.** Caracterização e diagnóstico de cadeia produtiva de brássicas nas principais regiões produtoras brasileiras. *Embrapa Hortaliças-Documents (INFOTECA-E)*.

- Mondédji, A. D., Silvie, P., Nyamador, W. S., Martin, P., Agboyi, L. K., Amévoïn, K. & Glitho, I. A. 2021.** Cabbage production in West Africa and IPM with a focus on plant-based extracts and a complementary worldwide vision. *Plants*, 10: 529.
- Monteiro, A., & Lunn, T. 1998.** Trends and perspectives of vegetable Brassica breeding worldwide. In WCHR-World Conference on Horticultural Research, 495: 273-280.
- Nile, A. S., Kwon, Y. D. & Nile, S. H. 2019.** Horticultural oils: possible alternatives to chemical pesticides and insecticides. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26: 21127-21139.
- Noël, M. S. G., Illiassa, N., Habiba, K. & Elias, N. N. 2021.** Insecticidal Activity of Powder and Essential Oils of *Vepris heterophylla* (Rutaceae) and *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) Towards *Callosobruchus maculatus* F. walp (Coleoptera: Bruchidae) on Post-Harvest *Vigna unguiculata* (Fabaceae) in the Far-North Region of Cameroon. *J. Exp. Agric. Int.*, 98-112.
- Pavela, R. 2012.** Efficacy of three newly developed botanical insecticides based on pongam oil against *Plutella xylostella* L. larvae. *J. Biopest.*, 5: 62.
- Pavela, R. 2016.** History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects-a review. *Plant Protect Sci*, 52: 229-241.
- Pimentel, D., Acquay, H., Biltonen, M., Rice, P., Silva, M., Nelson, J. & D'amore, M. 1992.** Environmental and economic costs of pesticide use. *Bioscience*, 42: 750-760.
- Qin, C., Wang, C. H., Wang, Y. Y., Sun, S. Q., Wang, H. H., & Xue, C. B. 2018.** Resistance to diamide insecticides in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): comparison between lab-selected strains and field-collected populations. *J. Econ. Entomol.*, 111: 853-859.
- Rattan, R. S. 2010.** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.*, 29: 913-920.
- Raymond, B., Elliot, S. L. & Ellis, R. J. 2008.** Quantifying the reproduction of *Bacillus thuringiensis* HD1 in cadavers and live larvae of *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 98: 307-313.
- Reddy, S. E., Kirti Dolma, S., Koundal, R. & Singh, B. 2016.** Chemical composition and insecticidal activities of essential oils against diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Nat. Prod. Res.*, 30: 1834-1838.
- Sangha, J. S., Astatkie, T. & Cutler, G. C. 2017.** Ovicidal, larvicidal, and behavioural effects of some plant essential oils on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Can. Entomol.*, 149: 639-648.
- Santos, V. C., De Siqueira, H. A. A., Da Silva, J. E., & De Farias, M. J. D. C. 2011.** Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)

(Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. *Neotrop. Entomol.*, 40: 264-270.

Sarfraz, M., Dossdall, L.M. & Keddie, B.A. 2006. Diamondback moth-host plant interactions: implications for pest management. *Crop Prot.*, 25: 625–639.

Shakeel, M., Farooq, M., Nasim, W., Akram, W., Khan, F. Z. A., Jaleel, W. & Jin, F. 2017. Environment polluting conventional chemical control compared to an environmentally friendly IPM approach for control of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), in China: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24: 14537-14550.

Tabashnik, B. E., Mota-Sanchez, D., Whalon, M. E., Hollingworth, R. M. & Carrière, Y. 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *J. Econ. Entomol.*, 107: 496-507.

Tak, J. H. & Isman, M. B. 2017. Enhanced cuticular penetration as the mechanism of synergy for the major constituents of thyme essential oil in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Ind. Crops Prod.*, 101, 29-35.

Talekar, N. S. & Shelton, A. M. 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.*, 38: 275-301.

Theis, N. & Lerdau, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int. J. Plant Sci.*, 164: 93-102.

Vendramim, J. D. & Martins, J. C. 1982. Aspectos biológicos de *Ascia monuste orseis* (Latreille: Pieridae) em couve (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*). *Poliagro*, 4.

Zalucki, M. P., Shabbir, A., Silva, R., Adamson, D., Shu-Sheng, L. & Furlong, M. J. 2012. Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string?. *J. Econ. Entomol.*, 105: 1115-1129.

Zhang, S., Zhang, X., Shen, J., Mao, K., You, H., & Li, J. 2016. Susceptibility of field populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, to a selection of insecticides in Central China. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 132: 38-46.

CAPÍTULO 2

MONITORAMENTO DA SUSCETIBILIDADE DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) AOS ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS PARA O SEU MANEJO DE RESISTÊNCIA ¹

DONALD MANIGAT² & CLAUDIO A.G. CAMARA³

²Departamento de Agronomia, Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av.

Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE –Brasil.

³Departamento de Química, Produtos Naturais, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE –Brasil.

¹Manigat, D. & C.A.G. Camara. Monitoramento da suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos óleos essenciais e seus compostos majoritários para o seu manejo de resistência. A ser submetido.

RESUMO - A traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*) é um inseto fitófago que causa problemas sérios na sanidade das plantas. Com isso, é apresentada como uma das principais pragas na cultura de brássicas folhosas, provocando prejuízos econômicos e limitações na produção. É necessário o manejo dessa praga na cultura das brássicas para evitar ou reduzir os danos. Desta maneira, o monitoramento da suscetibilidade se torna um instrumento importante no manejo de resistência. Por isso, este trabalho objetivou-se, i) caracterizar e monitorar a bioatividade de constituintes majoritários Eugenol e Limoneno pertencentes aos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (Tumb) e *Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl) respectivamente, sobre *P. xylostella*, comparados ao inseticida botânico comercial Azamax® e aos inseticidas sintéticos comerciais Decis® e Lufenuron, ii) Identificar possíveis variações metabólicas entre as gerações de *P. xylostella* aos óleos essenciais e/ou seus constituintes majoritários e inseticidas comerciais. Desta maneira, a suscetibilidade de *P. xylostella* aos formulados foi avaliada por meio de concentração média Letal (CL₅₀) sobre larvas do terceiro instar e por razão de toxicidade (TR₅₀) entre as CL₅₀s. Também, verificou-se através do teste de fitotoxicidade os níveis dos índices de fitotoxidez dos formulados sobre as folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga). Os mecanismos fitoquímicos de bioatividade foram verificados através de variações metabólicas entre as gerações sucessivas de *P. xylostella* e analisado pelo método comparativo das Análise de Componentes Principais (PCA). Os resultados obtidos do monitoramento das gerações sucessivas, mostraram variações na suscetibilidade explicitada pela razão de toxicidade das CL₅₀s, [*E. caryophyllata* (1,63-2,59 mg.L⁻¹) e TR₅₀= 1,6]; [Limoneno (14,86-29,67 mg.L⁻¹) e TR₅₀= 2,0]; [Decis® 25 EC (3,25-14,01 mg.L⁻¹) e TR₅₀= 4,31] e [Lufenuron (0,45-2,9 mg.L⁻¹) e TR₅₀= 6,4]. Pois, foi verificada uma perda de suscetibilidade de *P. xylostella* para os inseticidas sintéticos comerciais de Decis® e Lufenuron, para o constituinte majoritário Limoneno. Os testes de fitotoxicidade realizados demonstraram que os maiores índices de fitotoxidez estão dentro do limite aceitável segundo a escala

diagramática para avaliação de lesões. As análises de variações metabólicas indicaram a presença em maior proporção de ácidos graxos, dipeptídeos, compostos fenólicos, entre outros e que são considerados como metabolizadoras de compostos ativos, com destaque na pressão seletiva de *P. xylostella* com Decis®, Lufenuron e Limoneno. O monitoramento da suscetibilidade de *P. xylostella* aos inseticidas naturais é importante para gerar conhecimentos de base para a implementação de programas de manejo de resistência na utilização de óleos essenciais e seus constituintes na agricultura.

PALAVRAS-CHAVE: Bioatividade, caracterização, traça-das-crucíferas, *Eugenia caryophyllata*, *Citrus aurantium*, pressão de seleção, análise metabolômica

MONITORING THE SUSCEPTIBILITY OF *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA:
PLUTELLIDAE) TO ESSENTIAL OILS AND THEIR MAJOR CONSTITUENTS FOR ITS
RESISTANCE MANAGEMENT

ABSTRACT – The diamondback moth (*Plutella xylostella*) is a phytophagous that causes serious problems in plant health, it is considered as one of the main pests in the culture of hardwoods, causing economic losses and production limitations. It is necessary to manage this pest in the brassica culture. In this way, susceptibility monitoring becomes an instrument in resistance management. Therefore, this work aimed to i) characterize and monitor the bioactivity of major constituents Eugenol and Limonene belonging to the essential oils of *Eugenia caryophyllata* (Tumb) and *Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl) respectively, compared with the commercial botanical insecticide Azamax®, the commercial synthetic insecticides Decis® and the Lufenuron, ii) Identify possible metabolic variations between generations of *P. xylostella* to essential oils and/or their major constituents and commercial insecticides. Thus, the susceptibility of *P. xylostella* to essential oils and their major constituents was evaluated using a lethal average concentration (LC₅₀) on third instar larvae, also based on the toxicity ratio (TR₅₀) of LC₅₀ between generations and under selective pressure in the laboratory, compared to the commercial botanical insecticide Azamax®, the commercial synthetic insecticides Decis® and the Lufenuron. The phytochemical mechanisms of bioactivity were verified through metabolic variations between successive generations of *P. xylostella* and analyzed by the comparative method of Principal Component Analysis (PCA). The results obtained from the monitoring showed variations in susceptibility from the toxicity ratio of CL₅₀, [*E. caryophyllata* (1.63-2.59 mg/l) and TR₅₀=1.6]; [Limonene (14.86-29.67 mg/l) and TR₅₀=2.0]; [Decis® 25 EC (3.25-14.01 mg/l) and TR₅₀=4.31]

and [Lufenuron (0.45-2.9 mg/l) and $TR_{50}=6.4$]. A greater tolerance of *P. xylostella* was verified for the commercial synthetic insecticides of Decis® and Lufenuron, for the major constituent Limonene and partially for the essential oil of *E. caryophyllata*. The analyzes of metabolic variations indicated the presence in a greater proportion of fatty acids, dipeptides, phenolic compounds, among others, which are considered as metabolizers of active compounds, with emphasis on the selective pressure of *P. xylostella* with Decis®, Lufenuron and Limonene. Monitoring the susceptibility of *P. xylostella* to natural insecticides is important to generate basic knowledge for the implementation of resistance management programs in the use of essential oils and their isolated pure constituents in agriculture.

KEY WORDS: Bioactivity, characterization, diamondback moth, *Eugenia caryophyllata*, *Citrus aurantium*, selection pressure, metabolomic analysis.

Introdução

A traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (L.) caracteriza-se pela sua capacidade de fitofagia como um dos agentes causadores de perdas no cultivo de hortaliças folhosas, provocando prejuízos econômicos na produção. Devido às altas infestações e os ataques constantes nas brássicas, o controle dessa praga é essencial para reduzir os danos (Zalucki *et al.* 2012).

É frequente a realização do manejo de *P. xylostella* no cultivo das brássicas, sendo que o controle químico, por meio de uso de inseticidas convencionais, é a principal medida utilizada (Shakeel *et al.* 2017). No entanto, o uso constante e abusivo de inseticidas convencionais em hortaliças folhosas tem contribuído para o aparecimento de diversos problemas, entre eles a quantidade elevada de resíduos na pós-colheita e a resistência em populações da praga a alguns princípios ativos (Eziah *et al.* 2009, Mawussi *et al.* 2014).

Com a evolução da resistência de *P. xylostella* a certos grupos de inseticidas convencionais, a tomada de decisão no controle dessa praga passa a ser mais difícil e restrita. Devido as falhas desses produtos no controle de *P. xylostella* e impactos negativos no ambiente, faz-se necessário o interesse pelo uso de inseticidas naturais à base de plantas com potencial biológico e mais seguro para o meio ambiente por sua facilidade de biodegradação (Penteado 2006, Gerwick & Sparks 2014).

Nos últimos anos, a procura por plantas contendo metabólitos secundários ativos, ou seja, que atuam no combate a insetos-praga vem sendo muito explorada e principalmente com a grande biodiversidade e riqueza da flora brasileira (Silva *et al.* 2007). As plantas com potencial biótico têm em comum metabólitos secundários que são responsáveis pelas destacadas atividades biológicas no controle de pragas. Os inseticidas naturais provenientes de metabolismo secundário

de plantas, são substâncias que possuem propriedades bioativas com diversas características, entre elas: toxidez, eficiência, seletividade, biodegradável e baixa toxicidade aos mamíferos (Rattan 2010).

Os inseticidas naturais provenientes de metabolismo secundário de plantas são extraídos e utilizados na forma de pós, óleos essenciais e extratos vegetais (Marangoni *et al.* 2013). Dentre os formulados à base de substâncias naturais que vem sendo utilizadas nos sistemas orgânicos de produção e na agricultura familiar no manejo de insetos-praga, destacam-se os óleos essenciais com ações de mortalidade, repelência, deterrência alimentar e fisiológica como no crescimento do inseto (Bakkali *et al.* 2008, Mossa 2016).

A traça-das-crucíferas é uma das principais pragas de brássicas folhosas. Uma das alternativas para o manejo dessa praga, consiste na utilização de inseticidas feitos a bases de metabólitos secundários de plantas. Camara *et al.* 2015, avaliaram os efeitos inseticidas de plantas das famílias de Rutaceae e Myrtaceae sobre *P. xylostella*. Observou-se que os óleos essenciais de *Melaleuca leucadendra* e *Citrus reticulata* apresentaram uma ampla atividade inseticida, repelente e deterrência alimentar.

Na agricultura orgânica torna-se frequentes o uso de formulados a base de inseticidas botânicos e ainda espera-se expandir mais nos próximos anos (Campos *et al.* 2019, Isman 2020). Porém, nas áreas plantadas em que esses formulados são utilizados precisam de cuidados para manter a eficiência, além da sua sustentabilidade como filosofia no manejo integrado de pragas (Benelli *et al.* 2018). Pois, com a crescente preocupação de desenvolvimento da resistência em insetos, além de poucos conhecimentos dos mecanismos de bioatividade em relação aos inseticidas naturais, o monitoramento da suscetibilidade de *P. xylostella* se torna uma necessidade para o seu manejo de resistência (Kostyukovsky *et al.* 2002).

Portanto, o monitoramento da suscetibilidade de populações de *P. xylostella* aos óleos essenciais e seus constituintes majoritários tem sido relevante para direcionar no futuro o manejo de resistência dessa praga, também é fundamental para estabelecer as diretrizes na implementação de programas de manejo de resistência.

Assim, este trabalho objetivou: i) caracterizar e monitorar a bioatividade dos constituintes majoritários Eugenol e Limoneno pertencentes aos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* (Tumb)) e laranja amarga (*Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl)), respectivamente, sobre *P. xylostella*, comparados ao inseticida botânico comercial Azamax® e aos inseticidas sintéticos comerciais Decis® e Lufenuron, ii) Identificar possíveis variações metabólicas entre as gerações consecutivas de *P. xylostella* sob a pressão de seleção aos óleos essenciais e/ou seus constituintes majoritários e inseticidas comerciais.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Investigação Química dos Inseticidas Naturais (LABIQIN) do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (PPGE) do Departamento de Agronomia, no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos do Departamento de Química e no Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Insetos e Criação em Laboratório. Foi utilizada uma população de *P. xylostella* suscetível de referência a inseticidas químicos, criada desde 1998 e mantida no Laboratório de Investigação Química dos Inseticidas Naturais (LABIQIN) do PPGE da UFRPE na ausência de pressão de seleção por inseticidas e alimentadas somente com folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga) orgânicas produzidas em casa de vegetação. A criação de *P. xylostella* foi mantida

conforme as recomendações descritas por Torres *et al.* (2006), multiplicada, mantida em sala climatizada: (Temperatura, T: 25 ± 2 °C); (Umidade Relativa, UR: $70 \pm 10\%$) e Fotoperíodo de 12 horas.

Os adultos de *P. xylostella* foram mantidos e confinados em gaiolas plásticas transparentes retangulares ou circulares (12 cm de diâmetro x 15 cm de altura) com abertura lateral fechada em tela de náilon para a ventilação. Dentro das gaiolas, foram oferecidos discos foliares de couve e cortada na medida de oito centímetros de diâmetro para que as fêmeas possam colocar as posturas, sobrepostos a um papel de filtro e este sobrepõe esponjas umedecidas com água e dimensionada no interior de uma placa de Pétri. Para alimentar os adultos, uma solução de mel a 10% diluída em água foi oferecida e colocada em pedaços de algodão disponibilizados em copo plástico de 50 mL no interior das gaiolas de criação para favorecer o regime nutritivo dos adultos. Os discos contendo as posturas foram transferidos a cada 24 horas para recipientes plásticos retangulares (6,0 x 11 x 16 cm) com abertura na tampa, fechada com tecido voil para ventilação onde os ovos entraram na fase de incubação até a eclosão.

Após a eclosão dos ovos, folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga) produzidas em casa de vegetação própria foram oferecidas as larvas recém-eclodidas como alimento e trocadas diariamente incluindo a limpeza das gaiolas até a formação das pupas. Antes de alimentar as larvas, as folhas de couve foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 1%, enxaguadas três vezes em água corrente, a fim de evitar uma possível ação de contaminação por patógenos. As pupas foram coletadas e mantidas em tubos de ensaio cobertos com filme plástico PVC contendo pequenas perfurações para permitir trocas gasosas, que posteriormente foram transferidos em outras gaiolas para a emergência dos adultos.

Obtenção dos Óleos Essenciais, Compostos Majoritários e Inseticidas. Foram utilizados óleos essenciais (OEs) comerciais de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* (Tumb), Myrtaceae) e

laranja amarga (*Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), Rutaceae), tais como os constituintes majoritários desses OEs Eugenol e Limoneno, todos foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil e FERQUIMA Ind. e Com. Ltda. Após a aquisição, todos os óleos essenciais e constituintes foram armazenados em ambiente adequado e/ou recomendado com o objetivo de manter a integridade química para o uso posterior. Os inseticidas comerciais, como o inseticida botânico Azamax® (12 g i.a./L C.E., E.I.D. Parry) com princípio ativo azadiractina, Decis® 25 EC (25 g i.a./L C.E., Bayer CorpScience) com princípio ativo deltametrina e Match (50 i.a. g/L C.E, Syngenta S.A) com princípio ativo Lufenuron que foram adquiridos em lojas autorizadas para a comercialização de produtos fitossanitários.

Análise e Identificação Química dos Constituintes Majoritários. A análise química de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química da UFRPE, objetivou-se identificar os constituintes majoritários nos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (Tumb) e *Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), essa análise foi desenvolvida conforme a metodologia adaptada e proposta por Adams (2007). Os compostos químicos dos óleos essenciais foram identificados por meio do equipamento PerkinElmer Clarus 500 GC de CG/EM com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar não polar de sílica fundida entre DB-5 de (30m x 0,25mm x 0,25µm) (J & W Scientific). A temperatura da coluna programada foi entre 60-240°C à 3°C min⁻¹. As temperaturas foram de 240°C para o injetor e 260°C para o detector, o carreador gasoso foi o hélio com o fluxo de 1,0 mL min⁻¹ por (1:30) e o espectro de massa foi obtido à 70eV. O volume de injeção foi de 1,0 µL de solução diluída (1/100) de óleo em n-hexano. A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi baseada na comparação dos índices de retenção calculados em conformidade da analogia de equação proposta por Van der Dool & Kratz (1963), seguida pela comparação do fragmento-grama de massa espectral no sistema de dados GC-MS da biblioteca do

computador (NIST 14 and WILEY 14th). O índice de retenção foi obtido por extrapolação e variável com uma amostra do óleo essencial por mistura de hidrocarbonetos lineares C8-C40.

Obtenção dos Formulados. Para obtenção dos formulados e inseticidas diluídos, foi feita uma solução padrão separadamente para ambos com acetona + óleos essenciais/constituintes majoritários e acetona + inseticidas comerciais, foi estimada em (mg/L) conforme as recomendações propostas por Miller *et al.* (2010) para diluir um composto puro ou inseticida. Após a diluição em acetona, todas as soluções padrões foram armazenadas sob refrigeração de 5°C em recipientes vedados. Em seguida, para as diluições e a determinação de concentrações para os bioensaios, foram misturadas: solução padrão, água destilada, adjuvantes (Dimetilsulfóxido a 0,5%; Ácido Dodecilbenzeno Sulfônico a 0,1%) aos formulados e adjuvante (Triton x-100 a 0,1%) aos inseticidas comerciais.

Teste de Fitotoxicidade dos Óleos Essenciais e dos Constituintes Majoritários. O método da técnica de imersão de discos foliares foi utilizado para determinar os níveis dos índices de fitotoxicidade sobre as folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga), conforme a escala diagramática para avaliação de números de lesões proposta por Horsfall & Barrat (1945). Foram cortados discos foliares de couve (5 cm de diâmetro) e mergulhados durante 10 segundos em diferentes concentrações pré-determinadas por misturas a partir do estoque de solução padrão, utilizando diluições seriais conforme descrita por Finney (1971). Colocaram-se os discos foliares para secar durante 30 minutos à temperatura do ambiente da sala. Após a secagem, os discos foliares foram transferidos separadamente em placas de Petri (8 cm de diâmetro), colocado um papel de filtro no fundo e umedecido com 125µL de água destilada. As placas de Petri foram vedadas e mantidas em sala climatizada: (Temperatura, T: 25±2 °C); (Umidade Relativa, UR: 70 ± 10%) e Fotoperíodo de 12 horas. A fitotoxicidade foi avaliada 48 h após a exposição. Os tratamentos foram constituídos por função logarítmica entre 7 a 9 concentrações e um controle

(água destilada + adjuvante). A identificação foi baseada na comparação de análises em lotes de imagens para classificar os sintomas encontrados nas folhas como necrose, tomando por referência os discos de folhas sem aplicação do formulado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com duas repetições e de triplicata cada.

Os lotes de imagens obtidos a partir dos discos de folhas foram analisados através do AFSoft software da EMBRAPA (Silva & Jorge 2009) para determinar os índices (%) de fitotoxicidade de cada formulado.

Bioensaios de Monitoramento da Suscetibilidade. O método utilizado para determinar o efeito da toxicidade dos formulados e inseticidas comerciais sobre *P. xylostella* foi de toxicidade residual sobre as larvas por meio da técnica de imersão de discos foliares, conforme a metodologia adaptada e proposta por Iqbal & Wright (1997), discos foliares de couve (5 cm de diâmetro) foram cortados e mergulhados durante 10 segundos em concentrações pré-determinadas a partir do estoque de solução padrão, utilizando diluições seriais conforme descrita por Finney (1971). Os discos de folhas foram secados durante 30 minutos à temperatura do ambiente da sala. Após a secagem, 10 larvas de terceiro ínstar de *P. xylostella* foram transferidas com um pincel para cada disco foliar em placas de Petri (8 cm de diâmetro) separadamente, colocado um papel de filtro no fundo e umedecido com 125µL de água destilada. As placas de Petri foram vedadas e mantidas em sala climatizada: (Temperatura, T: 25±2 °C); (Umidade Relativa, UR: 70 ± 10%) e Fotoperíodo de 12 horas. Os discos foliares de couve foram trocados a cada 24 h. Os tratamentos de bioensaios de toxicidade foram distribuídas por função logarítmica entre 7 a 9 concentrações e um controle (água destilada + adjuvante). A mortalidade foi registrada em 48h, 72h e 96h após a exposição. Foram consideradas mortas as larvas que não caminharam ou não apresentaram qualquer estímulo ao toque com um pincel de cerdas macias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com duas repetições e de triplicata cada.

Os dados de mortalidade foram analisados pelo modelo Probit (Finney 1971) através do Polo-Plus® software (LeOra Software, Berkeley, CA, USA) para determinar a concentração média letal (CL₅₀), com intervalos de confiança de 95%. A metodologia de Robertson *et al* (2007) foi utilizada para calcular a razão de toxicidade entre uma geração em relação à anterior.

Seleção de Insetos aos Óleos Essenciais, Constituintes Majoritários e Inseticidas sintéticos. A metodologia adaptada e proposta por Iqbal & Wright (1997) foi empregada neste experimento para seleção de insetos aos formulados em condições de laboratório. Para iniciar a pressão de seleção, foi utilizada a população de *P. xylostella* suscetível de referência do estoque da criação de Laboratório de Investigação Química dos Inseticidas Naturais (LABIQIN). Foram utilizadas entre 1.500 a 2.300 larvas de terceiro ínstar de *P. xylostella* para iniciar a pressão de seleção em condições de laboratório, as larvas foram expostas as folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga) tratadas a partir da concentração média letal (CL₅₀) pré-determinada com formulados de óleos essenciais e/ou constituintes majoritários e inseticidas comerciais, as folhas de couve tratadas com formulados a base de óleos essenciais e/ou constituintes majoritários e inseticidas comerciais foram trocadas a cada 24 h, em seguida as larvas foram transferidas para outros recipientes de criação até completar o seu ciclo total. Cada formulado de óleos essenciais ou constituintes e inseticida comercial foram usados separadamente na exposição de larvas do terceiro ínstar de *P. xylostella* a pressão de seleção. Foram selecionadas 24, 22, 25, 22 números totais de gerações com Eugenol, *Eugenia caryophyllata* (Tumb), Limoneno e *Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), respectivamente, tais como os inseticidas comerciais de 16, 11, 14 números totais de gerações com Azamax®, Decis® 25 EC e Lufenuron, respectivamente, em condições de laboratório e mantida na sala climatizada: (Temperatura, T: 25±2 °C); (Umidade Relativa, UR: 70 ± 10%) e Fotoperíodo de 12 horas.

Análise da variação metabólica de *P. xylostella* após seleção com óleos essenciais, compostos majoritários e inseticidas comerciais. Após a determinação da concentração média letal (CL₅₀) nos bioensaios de toxicidade residual, larvas de terceiro ínstar foram submetidas através de testes de contato e baseadas nas concentrações das CL_{50s} dos óleos essenciais, compostos majoritários e inseticidas comerciais para a avaliação da variação metabólica de *P. xylostella*. Os insetos foram tratados com as CL_{50s} pré-determinadas em cada geração. Foram utilizadas no mínimo, 60 a 80 larvas por tratamento. As larvas que sobreviveram após ser tratadas com as CL_{50s} foram transferidas para tubos de eppendorf de 1,5 mL e congelados. Os extratos das larvas foram realizados com metanol, seu volume reduzido em rota-evaporador. Uma alíquota do extrato (4mg) foi solubilizado em água sob agitação passado em um cartucho SPE C-18, que foi pré-condicionado com água ultrapura (5 mL) e metanol (5 mL). O extrato foi fracionado em duas partes com água ultrapura (10 mL) seguida de metanol (10 mL). A fração metanólica foi filtrada em filtro de 0,45 µm para análise em CLAE-EM e CG-EM.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As análises cromatográficas foram realizadas em um aparelho Shimadzu modelo SCL-10Avp, equipado com duas bombas analíticas LC-10AD, conectadas a um detector de arrasto de diodo SPD-M10Avp e um injetor automático SIL-9A, controlado por um módulo de comunicação SCL-10AVP. As análises foram realizadas em uma coluna Phenomenex® de fase reversa C-18 (Luna C18 150 x 4,6 mm, 5 µm) e os dados analisados pelo programa Class-VP versão 6.10. Todas as amostras foram dissolvidas em metanol (grau HPLC), na concentração de 1 mg/mL e filtradas em filtro de 0,45 µm (Acrodisc CRPTFE). O volume de injeção foi de 20 µL. A eluição por CLAE foi feita usando gradiente de solventes A (H₂O + ácido fórmico a 0,01%) e B (MeOH + ácido fórmico a 0,01%) no seguinte gradiente: 0-2 min (A: B, 7: 3); 10 min (3: 2); 45 (0: 1); 50 (0: 1); 55 (7: 3).

Análise dos extratos das larvas de *P. xylostella* por CLAE-EM. A cromatografia foi realizada com um cromatográfico líquido de alta eficiência (CLAE) Acquity H-Class (Waters). Foi empregada uma coluna BEH 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,7µm. O volume da injeção foi de 1 µL em um auto injetor. A eluição foi realizada em condições de gradiente usando os solventes A (H₂O + 0,1% ácido fórmico) e B (MeOH + 0,1% ácido fórmico) nas seguintes condições: 0-0,25 min (98:2); 0,25-8,5 min (1:99) 8.5-11.0 min (98:2) em uma vazão de 0,3 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. O sistema CLAE foi acoplado a um espectrômetro de massa simples quadrupolo SQ Detector 2 (Waters). A voltagem do capilar foi de 3,5 Kv, a uma voltagem do cone de 30 V, a temperatura de dessolvatação foi de 450 °C, com fluxo de gás da fonte de 650 L/h. A aquisição dos dados foi feita em modo full scan, buscando massas entre 50 a 1000 Da, em ionização modo negativa. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massas foi feita através do software MassLynx™ (Waters). A identificação dos compostos presente nas larvas foi realizada através de busca dos dados obtidos de massas na plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ID using MetaboAnalyst (Chong *et al.* 2018).

Os dados das análises cromatográficas das larvas de *P. xylostella* foram submetidos a uma Análise Hierárquica de Cluster (HCA) com o auxílio do software BioDiversity Pro versão 2.17 com objetivo de identificar possíveis variações metabólicas nas gerações consecutivas de *P. xylostella* sob diferentes tratamentos. Para confirmar os resultados obtidos com análise de HCA uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada com base no conjunto completo de dados, que foi conduzida para avaliar a variabilidade metabólica nas gerações consecutivas de *P. xylostella* submetidos aos óleos essenciais, compostos majoritários e inseticidas comerciais. Para essas análises, os dados foram exportados em formato ASCII para Microsoft Excel para produzir uma matriz de dados de amostra versus picos de metabólitos com áreas de picos associados. Todas

as análises foram realizadas usando Unscrambler® versão 9.5.18 (CAMO Process AS, Norway, 1996-2010).

Resultados

Análise e Identificação Química dos Constituintes Majoritários. Na identificação dos compostos do óleo essencial de *E. caryophyllata*, dez constituintes foram registrados, o composto eugenol foi considerado como majoritário com uma porcentagem de 75,8%, além de acetato de eugenol (12,81%) e β -cariofileno (6,77%) (Tabela 1). Já para o óleo essencial de *C. aurantium*, dezesseis constituintes foram identificados e o composto predominante foi o Limoneno (92,28%) que representou a maior parte do valor total de 98,39% da composição do óleo essencial (Tabela 1).

Teste de Fitotoxicidade dos Óleos Essenciais e dos Constituintes Majoritários. O controle não apresentou fitotoxidez em nenhum dos casos de análises. A partir da Tabela 2, podem-se observar as médias (\pm EP) de lesões (%) de fitotoxidez em discos foliares de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga). Anotou-se que o aumento na concentração dos óleos essenciais e seus respectivos constituintes majoritários provocou proporcionalmente um aumento nos números de lesões nos discos de folhas de couve. Os índices de fitotoxicidade observados foram o aparecimento de necrose nos discos de folhas na forma de lesões. A fitotoxicidade foi pequena para ambos os formulados quando aplicar em concentração mínima. Para todos os formulados avaliados, as concentrações mais baixas apresentaram poucas lesões: limoneno (1,57%), eugenol (1,68%), *C. aurantium* (1,84%) e *E. caryophyllata* (2,65%). O óleo essencial de *E. caryophyllata* foi o que apresentou mais lesões aos discos foliares de couve, pois na maior concentração as lesões foram de

(37,22%), ou seja maiores lesões entre os outros formulados avaliados (Tabela 2). Um padrão referencial da escala diagramática baseada nos níveis de lesões: nível 1 = 0%; nível 2 = (0-3%); nível 3 = (3-6%); nível 4 = (6-12%); nível 5 = (12-25%); nível 6 = (25-50%); nível 7 = (50-75%); nível 8 = (75-88%); nível 9 = (88-94%); nível 10 = (94-97%); nível 11 = (97-100%) e nível 12 = 100% de lesões. A fitotoxicidade é considerada pequena para os níveis de lesões <3% e para <40% está dentro do limite aceitável de acordo com a escala diagramática proposta por Horsfall & Barrat (1945).

Bioensaios de Monitoramento da Suscetibilidade. As concentrações letais (CL_{50S}) estimadas dos óleos essenciais, constituintes majoritários e inseticidas comerciais para *P. xylostella* após sucessivas gerações de insetos selecionados em laboratório foram variadas através da análise de Probit ($\chi^2 \geq 0,05$) com intervalos de confiança de 95% (Tabela 3,4,5,6,7,8,9). Foram observadas diferenças significativas entre as gerações a partir da razão de toxicidade das CL_{50S} , baseada na descrição da formula de Robertson *et al.* (2007), na qual a razão de toxicidade é significativa quando o valor é superior a 1 no limite de intervalos de confiança de 95%. Na avaliação dos efeitos letais de CL_{50S} sobre as larvas de *P. xylostella*, para o constituinte eugenol, o óleo essencial *C. aurantium* e o inseticida botânico comercial Azamax® não foram verificadas diferenças na suscetibilidade até as gerações G_{24} , G_{22} e G_{16} monitoradas, respectivamente (Tabela 3,6,7). Para o óleo essencial *E. caryophyllata*, foram verificadas diferenças na suscetibilidade dentre as gerações G_{18} e G_{19} com concentração letal (CL_{50}) de 2,59 e 1,44 $mg.L^{-1}$ e razão de toxicidade 1,59 e 1,8 vezes maiores, respectivamente (Tabela 4). Porém, para o constituinte majoritário Limoneno, foram verificadas diferenças na suscetibilidade dentre as gerações G_{19} e G_{25} com concentração letal (CL_{50}) de 17,08 e 29,67 $mg.L^{-1}$ e com razão de toxicidade de 1,69 e 2,0 vezes maiores, respectivamente (Tabela 5). Para o inseticida sintético comercial Decis® 25 EC com princípio ativo deltametrina, verificou-se que há diferenças na suscetibilidade dentre as gerações G_8 , G_9 e

G₁₁ com concentração letal (CL₅₀) de 7,47; 4,2 e 14,01 mg.L⁻¹ e com razão de toxicidade de 2,82; 1,77 e 4,31 vezes maiores (Tabela 8). No entanto, ao analisar o inseticida sintético comercial Lufenuron (Match 50 ® EC), verificou-se que há diferenças na suscetibilidade dentre as gerações G₈; G₉; G₁₃ e G₁₄ com concentração letal (CL₅₀) de 0,92; 0,51; 1,73 e 2,9 mg.L⁻¹ e com razão de toxicidade de 2,04; 1,8; 3,84 e 1,68 vezes maiores, respectivamente (Tabela 9). Assim, verificaram que houve uma diminuição na suscetibilidade de *P. xylostella* sob a pressão de seleção pelos inseticidas sintéticos comerciais de Decis® 25 EC e Lufenuron (Match 50 ® EC), também para o constituinte majoritário Limoneno e parcialmente pelo óleo essencial de *E. caryophyllata*.

Análise da variação metabólica de *P. xylostella* após seleção com óleos essenciais, compostos majoritários e inseticidas comerciais. A análise por CLAE-EM dos insetos selecionados revelou a presença de um total de 43 compostos. Foram identificados compostos de diferentes classes químicas como ácidos graxos, aminoácidos, dipeptídeos, compostos fenólicos, amidas e ácidos cinâmicos (Tabela 10).

Nas análises não foram detectadas a presença dos compostos puros, constituintes majoritários dos óleos ou dos princípios ativos dos inseticidas comerciais utilizados nos experimentos. Este resultado revela que mesmo após a pressão seletiva de *P. xylostella* por gerações consecutivas, a praga não desenvolveu um mecanismo de sequestro dos compostos puros ou ingredientes ativos que foram testados nos bioensaios.

Após a normalização dos dados de CG-EM das amostras, foi realizada a Análise Hierárquica de Clusters (HCA) com objetivo de observar as variações metabólicas entre os tratamentos que apresentaram diferenças (Figura 1). Nas avaliações de *P. xylostella* sob a pressão seletiva com óleos essenciais, constituintes majoritários e inseticidas comerciais durante várias gerações, verificou-se uma modificação do efeito tóxico que resultou na observação de variações metabólicas nas amostras analisadas a partir da terceira geração quando foi selecionada com Lufenuron (Match

50 ® EC), na nona geração selecionada com Decis® 25 EC (deltametrina) e na décima e quinta geração selecionada com o constituinte majoritário Limoneno. As amostras tratadas com Eugenol, Azamax® (azadiractina) e com os óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. aurantium* var. *amara* não apresentaram diferenças mesmo após pressão seletiva durante gerações consecutivas.

A análise de HCA dos extratos adquiridos a partir das amostras de insetos selecionados revelou a formação de dois clusters principais A e B entre os extratos que não apresentaram resistência [pressão de seleção de *P. xylostella* com Eugenol (G₁), Azamax® (G₃) e os óleos essenciais de *E. caryophyllata* (G₁) e *C. aurantium* var. *amara* (G₂), Limoneno (G₁), Decis® 25 EC (G₁) e o controle tratado apenas com água destilada] em comparação com aqueles extratos que se diferenciaram do controle e revelaram uma variação decrescente na suscetibilidade tais como: Limoneno (G₁₈), Decis® 25 EC (G₁₁) e Lufenuron (G₅) (Figura 2).

No grupo A verificou-se uma alta similaridade (> 90%) entre as amostras analisadas e que não mostraram diferenças. Já no grupo B a similaridade foi de 67,63% referente as amostras que evidenciaram diferenças. Por outro lado, as amostras do grupo A e do grupo B mostraram uma similaridade de apenas 32,16 %, revelando uma maior variação metabólica produzida por esses dois grupos.

Os resultados da análise de HCA de *P. xylostella* selecionados aos óleos essenciais, compostos majoritários e inseticidas comerciais foram confirmados através de Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 3,4 e 5).

Após a normalização dos dados, foi realizada uma PCA com todas as amostras e verificou-se uma separação entre os principais formulados utilizados para selecionar os insetos. A variabilidade das amostras foi suportada por duas componentes explicando 80% da separação entre os grupos (PC1 = 61% e PC2= 19%). O grupo A além das amostras de controle (tratamento com água destilada) reuniu também as amostras de *P. xylostella* que não apresentaram diferenças em relação ao controle

[selecionados com Eugenol entre as gerações (G₁-G₂₂), Azamax® (G₁-G₁₆) e os óleos essenciais de *E. caryophyllata* (G₁-G₂₄) e *C. aurantium* var. *amara* (G₁-G₂₂), Limoneno (G₁-G₁₄), e Decis® 25 EC (G₁-G₈)]. Por outro lado, as amostras com Limoneno entre as gerações (G₁₅-G₁₈), Decis® 25 EC (G₉-G₁₁) e Lufenuron (G₃-G₆) foram separadas em três outros grupos.

Ao analisar isoladamente por PCA as amostras de *P. xylostella* que foram selecionadas com Decis® 25 EC, verificou-se a formação de três grupos no gráfico referente ao controle, as amostras de *P. xylostella* que não apresentaram diferenças entre as gerações (G₁-G₈) e as que mostraram diferenças entre as gerações (G₉-G₁₁). A separação entre os grupos foi explicada por duas componentes que totalizaram 95% de dissimilaridade entre os grupos (PC1 = 90% e PC2= 5%).

Para a análise de PCA, as amostras de *P. xylostella* que foram selecionadas com Lufenuron também se verificou a formação de três grupos no gráfico referente ao controle, as amostras de *P. xylostella* que não apresentaram diferenças entre as gerações (G₁-G₂) e as que mostraram diferenças entre as gerações (G₃-G₆). A separação entre os grupos foi explicada por dois componentes totalizando 99% de dissimilaridade entre os grupos (PC1 = 98% e PC2= 1%).

Por outro lado, a análise de PCA das amostras de *P. xylostella* que foram selecionadas com Limoneno se verificou a formação de apenas dois grupos no gráfico referente ao controle, sendo as amostras de *P. xylostella* que não apresentaram diferenças entre as gerações (G₁-G₁₄) e as que mostraram diferenças entre as gerações (G₁₅-G₁₈). A separação entre os grupos foi explicada por duas componentes totalizando 95% de dissimilaridade entre os grupos (PC1 = 90% e PC2= 5%). Foi verificado no mesmo caso do Limoneno que as análises entre as gerações (G₁-G₁₄) não apresentaram diferenças em relação as amostras do controle. Este resultado indica que as primeiras gerações selecionadas com o Limoneno não apresentaram diferenças nas suas composições químicas em referência do controle.

Discussão

Análise e Identificação Química dos Constituintes Majoritários. Em plantas, os metabólitos secundários são produzidos pela biossíntese de componentes orgânicos. Há milhares de anos, no processo de coevolução entre plantas e herbívoros, as substâncias químicas provenientes do metabolismo secundário nas plantas são envolvidas na defesa para assegurar a sobrevivência dessas espécies contra seus agentes nocivos. No entanto, os fatores genéticos e climáticos podem interferir na composição química e produção de metabólitos secundários nas plantas (Bennett & Wallsgrove 1994, Erb *et al.* 2013, Jan *et al.* 2021). Em estudos realizados por Porter *et al.* (1991), no qual se avaliou a presença e biossíntese dos metabólitos secundários em plantas, foram observadas a quantidade total de metabólitos secundários produzidos ao longo da vida de uma planta e concluíram que o rendimento desses elementos varia com cada estágio do desenvolvimento vegetal.

Os óleos essenciais, misturas de substâncias complexas com origem a partir dos metabólitos secundários em plantas, têm sido amplamente estudados com o objetivo de avaliar ou demonstrar a composição química e as ações biológicas, entre elas farmacológicas e inseticidas (Rasooli & Mirmostafa 2003, Abdel-Kawy *et al.* 2021). Tirado *et al.* (1995) avaliaram a composição química e o teor de compostos nos óleos essenciais de *Citrus volkameriana*, *C. reticulata* e *C. sinensis* nas fases diferentes de maturação dos frutos, concluíram que o constituinte majoritário limoneno foi o composto encontrado mais abundantes, com variações entre 94,01% a 98,66%. Na identificação de compostos, utilizando a cromatografia de gás-líquido, Boussaada & Chemli (2007) mostraram o

limoneno como constituinte majoritário do óleo essencial de *C. aurantium* L. var. *amara*, na porcentagem de 92,2%.

Para o óleo essencial de *C. sinensis*, foram encontrados os compostos majoritários de limoneno (94%), β -mirceno (1,18%), linalool (0,89%) e sabineno (0,74%), o composto limoneno foi registrado em maior percentual nos compostos identificados (Stashenko *et al.* 1996, Espina *et al.* 2011).

De acordo com Muñoz Castellanos *et al.* (2020), ao analisar o óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*, o composto majoritário indentificado foi eugenol (77,5%), seguido dos compostos de acetato de eugenol (15%) e β -Cariofileno (4%). Matos *et al.* (2020) identificaram o eugenol como o maior composto do óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* na concentração de 74,31%. Em estudos realizados por Defaveri *et al.* (2011), ao investigar os principais compostos dos óleos essenciais de duas espécies de *Eugenia neonitida* Sobral e *Eugenia rotundifolia* Casar (Myrtaceae), as precipitações pluviais influenciaram na diferença da composição dos óleos essenciais dessas duas espécies. Da Costa *et al.* (2020) concluíram em estudos que a percentual de compostos majoritários provenientes do óleo essencial de *Eugenia uniflora* alteraram devido ao déficit hídrico nas plantas. Em análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) do óleo essencial comercializado de *Eugenia caryophyllus*, Jirovetz *et al.* (2006) encontraram como principais constituintes eugenol (76,8%), β -Cariofileno (17,4%), α -humuleno (2,1%) e acetato de eugenol (1,2%). Desta maneira, os compostos ou metabólitos secundários possuem uma grande diversidade química de estruturas e o perfil químico de cada óleo essencial pode ser modificado em função de fatores bióticos ou abióticos (Li & Madden 1995, Castelo *et al.* 2012, Berini *et al.* 2018).

Teste de Fitotoxicidade dos Óleos Essenciais e dos Constituintes Majoritários. Para a atividade de fitotoxicidade em folhas de couve com óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. aurantium* var. *amara* com seus respectivos compostos majoritários de eugenol e limoneno, não foram

encontrados trabalhos semelhantes na literatura. No entanto, discutimos de maneira clara as múltiplas abordagens de estudos que mostram a ação fitotóxica desses óleos essenciais e seus componentes majoritários em famílias iguais ou espécies similares de plantas. Além disso, vários registros na literatura evidenciam a reação fitoquímica e a citotoxicidade desses óleos essenciais e seus componentes majoritários.

Os óleos essenciais podem ter efeitos variáveis sobre os artrópodes-praga como repelência, deterrência alimentar, crescimento e, além da fitotoxicidade sobre folhas de espécies vegetais. A fitotoxicidade ocorre uma vez que houve uma incidência como necrose ou clorose nas folhas, essa reação se caracteriza geralmente pela capacidade dos compostos que são isolados e provenientes dos óleos essenciais que são substâncias complexas de origem no metabolismo secundário da planta (Hamdan *et al.* 2010, Almarie *et al.* 2016). Meyer *et al.* (2008) em teste de fitotoxicidade, o óleo essencial de *E. caryophyllata* mostrou-se uma severidade inexpressiva de danos como necrose e clorose nas mudas de pepineiro, meloeiro, pimenteiro e tomateiro durante 48h de exposição na concentração de 0,3%. A fitotoxicidade dos óleos essenciais é descrita paralelamente como um efeito alelopático entre as plantas cultivadas, ou seja, há uma influência desejada de uma planta a partir de seus metabólitos secundários específicos para interferir nos fatores funcionais responsáveis pela atividade de crescimento e desenvolvimento de uma outra planta (Qasem & Foy 2001, Ibáñez & Blázquez 2019). Ibrahim *et al.* (2004) avaliou a fitotoxicidade do limoneno nas concentrações crescentes de 10-120 mL.L⁻¹ baseadas nas lesões foliares e fluorescência da clorofila sobre plantas de repolho (cv Rinda e Lennox) e cenoura (cv Parano e Splendid), observaram-se as lesões foliares severas e menor fluorescência da clorofila, concluiu-se que o mecanismo da fitotoxicidade é relativo porque na mesma concentração do composto limoneno as variedades de repolho e cenoura reagiram de maneira diferente em relação a inibição dos sítios biossintéticos, bem como a fitotoxidez. A fitotoxicidade nos discos das folhas de couve pode ser explicada pela

propriedade antagonica de compostos majoritários dos óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. aurantium* var. *amara* com seus respectivos compostos majoritários de eugenol e limoneno que foram avaliados no experimento, sendo que a reação nas folhas de couve pode afetar a estrutura celular da membrana. Uma das funções dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais é interagir positivamente ou negativamente com outras estruturas químicas. Em estudos realizados com o óleo essencial *Psidium cattleianum*, no qual avaliou-se o efeito da fitotoxidez sobre o comprimento de raiz das mudas de alface (*Lactuca sativa*), baseando na atividade de células meristemáticas da raiz, Vasconcelos *et al.* (2019) concluíram que houve uma redução no crescimento de raízes devido ao obstáculo de limitação sofrido pela divisão mitótica celular e alterações frequentes dos cromossomos, resultantes da ação de compostos presentes nos óleos essenciais.

Blázquez & Carbó (2015) ao analisar as concentrações do óleo essencial de laranja com os maiores compostos de limoneno (59,28%), β -pineno (12,96%) e γ -terpineno (10,92%) sobre as folhas de *Portulaca oleracea* para avaliar o efeito de herbicida baseado no alto nível de fitotoxicidade, verificou que a fitotoxidez não foi amostrada mesmo em maiores concentrações após a aplicação do óleo essencial. Desse fato, a inativação fitoquímica entre as substâncias ativas que contêm no óleo essencial e da planta de *P. oleracea* pode ser a explicação de ausência de danos foliares. Montes-Belmont & Carvajal (1998), avaliou a fitotoxicidade do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) nas concentrações de 2-8% (Eugenol constituinte majoritário) sobre as folhas e sementes de milho, observou-se que *S. aromaticum* não provocou a inibição da germinação e o crescimento da plântula, assim como não mostrou nenhuma ação fitotóxica nas folhas do milho.

De acordo com os resultados, ao avaliar a fitotoxicidade dos óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. aurantium* var. *amara* com seus respectivos compostos majoritários de eugenol

e limoneno nos discos de folhas de couve constatou-se que as folhas de couve apresentaram lesões de necrose por efeito de fitotoxidez nas concentrações maiores. No entanto, os índices de fitotoxidez proporcionados pelas concentrações mais altas estão dentro do limite aceitável de acordo com a escala diagramática proposta por Horsfall & Barrat (1945).

Bioensaios de Monitoramento da Suscetibilidade. Os avanços nas pesquisas por buscar de inseticidas alternativos têm sido significativos nos últimos anos e o emprego desses formulados se torna uma evidência nos programas de manejo integrado de pragas (MIP) (Isman 2006). No entanto, os estudos sobre os mecanismos de ação desses inseticidas são ainda escassos. Por isso, é necessário estabelecer um programa de monitoramento da suscetibilidade na exploração e entendimento de mecanismos da bioatividade de produtos formulados a base de óleos essenciais ou seus constituintes majoritários no manejo de resistência de pragas. De acordo com nossos resultados, ficou evidente a toxicidade desses formulados a base de óleos essenciais ou inseticidas comerciais sobre *P. xylostella*. Assim como a variação na suscetibilidade em alguns casos após a pressão contínua de seleção de insetos em gerações consecutivas no laboratório. Resultados similares aos nossos foram relatados em experimentos com produtos de mesmos modos de ação sobre *P. xylostella* (Ho *et al.* 1983, Baker & Kovaliski 1999, Josan & Singh 2002, Singh *et al.* 2006, Gonzalez *et al.* 2014, Badgular *et al.* 2017).

Os bioensaios realizados em laboratório demonstraram que os formulados a base de óleos essenciais e inseticidas comerciais apresentaram níveis de toxicidade larval para *P. xylostella* ao monitorar as sucessivas gerações. No entanto, ocorreu também uma baixa suscetibilidade com a crescente exposição de *P. xylostella* aos inseticidas sintéticos comerciais Decis® 25 EC e Lufenuron, bem como o constituinte majoritário Limoneno proveniente do óleo essencial de *C. aurantium* var. *amara* e uma diminuição parcial da suscetibilidade do óleo essencial de *E. caryophyllata*. A mortalidade observada na utilização do inseticida Decis® 25 EC com princípio

ativo deltametrina pode ser explicada devido a sua ação tóxica após a ingestão ou contato pelas larvas de *P. xylostella* (Ho *et al.* 1983), atuando principalmente na influência de abertura dos canais de sódio no sistema nervoso central, com isso o inseto entra em estado de paralisia, provocando a morte (Clements & May 1977, Riley 2014, Nansen *et al.* 2016). Os principais mecanismos de defesas promovidos pelos insetos podem causar limitações na toxicidade ou efeitos deletérios dos inseticidas e são materializados por diversos processos, como alta atividade das enzimas de detoxificação (Mohan & Gujar 2003), redução da sensibilidade no sítio de ação (Li *et al.* 2018) e uma mudança comportamental (Lockwood *et al.* 1984). Após a pressão de seleção de onze (11) gerações no laboratório, os insetos de *P. xylostella* mostraram uma resistência ao inseticida sintético comercial Decis® 25 EC, baseada na razão de toxicidade das CL₅₀s da geração anterior em comparação com a geração sucessiva. Kim *et al.* (1990) observaram que a deltametrina provocou mortalidade alta numa população suscetível de *P. xylostella* mantida em laboratório, o que os autores descreveram como a suscetibilidade da praga em relação ao ingrediente ativo do produto. Entretanto, essa suscetibilidade verificada por ação tóxica do inseticida naquela população criada e mantida em laboratório já era diferente quando foi selecionada durante 24 gerações consecutivas ao princípio ativo de deltametrina e mostrou-se uma razão de toxicidade de 145 vezes maiores. A perda dessa suscetibilidade pode ser explicada pela exposição contínua e consequentemente essa aplicação provocou uma alta atividade das monooxigenases do citocromo P450 para diminuir ou eliminar os efeitos do inseticida (Schuler *et al.* 1998, Eziah *et al.* 2009, Endersby *et al.* 2011), resultados que corroboram com nossa pesquisa após a seleção de *P. xylostella* com o ingrediente ativo deltametrina.

Os inseticidas do grupo químico de benzoiluréia agem como reguladores de crescimento em *P. xylostella*, com principal atuação na inibição da síntese de quitina, ou seja, o crescimento do inseto é influenciado pelos seus efeitos tóxicos (Van Leeuwen *et al.* 2012, Douris *et al.* 2016). O

uso crescente do inseticida comercial Lufenuron contra *P. xylostella* com certeza impõe riscos aos insetos expostos de potencializar a evolução da resistência (Perng *et al.* 1988). Pois, a resistência de um inseto em relação a um formulado envolve vários mecanismos (Bouvier *et al.* 2002, Chen & Hou 2021), uma vez que a natureza química e o modo de ação do inseticida são fatores chaves para que o inseto possa desenvolver mudanças genéticas para conter as ações tóxicas. Estudos realizados por Ismail & Wright (1991), avaliou-se a frequência da resistência de diferentes classes de benzoiluréia em populações de *P. xylostella*, e demonstrou que a resistência parecia ser relativamente instável em populações coletadas em campo comparadas com outra população suscetível criada em laboratório. No entanto, importante destacar que enquanto houve um número elevado de gerações de insetos selecionados tiveram um aumento muito rápido na taxa de resistência, por exemplo, houve uma maior razão de toxicidade que foi observada entre as populações quando selecionar 21 gerações. O início da pressão de seleção de *P. xylostella* a partir de uma população suscetível criada no laboratório sem nenhuma histórica de resistência pode ser o fator dessa pequena perda de suscetibilidade com baixa razão de toxicidade mesmo após 14 gerações de insetos selecionados (Noppun *et al.* 1984). Assim como o aspecto fisiológico do inseticida Lufenuron no seu diferente modo de ação em *P. xylostella* (Furlong & Wright 1994, Douris *et al.* 2016), atuando ativamente no corpo do inseto como inibidores da síntese da quitina para coibir o desenvolvimento o que explica essa resistência (Perng & Sun 1987, Furlong & Wright 1994).

O inseticida botânico comercial Azamax® com princípio ativo azadiractina no controle de insetos-praga tem sido destacado como um inseticida de diferentes modos de ação (Nisbet 2000). A resistência pode ser considerada como um fator genético (Pimprikar & Georghiou 1979), seus aspectos biológicos podem ser influenciados pela exposição excessiva de artrópodes a inseticidas e utilização de formulações em altas concentrações (Hama 1990). Estudos a cerca dos principais

mecanismos de resistência de insetos em relação aos produtos à base de azadiractina são escassos. Ao monitorar a suscetibilidade de *P. xylostella* em relação ao inseticida botânico comercial Azamax® com princípio ativo azadiractina durante (G₁-G₁₆) gerações sob pressão de seleção em laboratório, observamos que os insetos não apresentaram nenhuma resistência no monitoramento através das avaliações, entretanto nossos resultados encontrados divergem de trabalhos realizados por Feng & Isman (1995) sobre a diminuição da suscetibilidade ou surgimento de resistência em populações de pulgões (*Myzus persicae*) sob pressão de seleção. Em estudos realizados por Vollinger (1987), no qual avaliou-se uma possível resistência de *P. xylostella* ao extrato de semente de nim (*Azadirachta indica*) após uma exposição contínua, concluiu que houve um aumento na concentração média letal da formulação para reduzir em 50% a população de *P. xylostella*, mas essa resistência não foi gradativa quando observar uma a suscetibilidade fixa da população em avaliação feita posteriormente. A ausência de resistência de *P. xylostella* mesmo sob altos níveis de pressão de seleção é explicada devido ao fato de que azadiractina é um princípio ativo com modos de ação diferentes em insetos, atuando como reguladores de crescimento (Sharma *et al.* 2006) e inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Breuer *et al.* 2003). A suscetibilidade pode ter mantida por ser um inseticida de múltiplas ações cujo qualquer mudança genética ligada a resistência pode ser inviabilizada (Huang *et al.* 2004). Além de barreiras de diferentes modos de ação, a estrutura química da azadiractina é complexa e pode variar sua toxicidade de acordo com a espécie do inseto (Simmonds *et al.* 1990, Ley *et al.* 1993).

Os óleos essenciais ou compostos isolados por possuir substâncias bioativas podem atuar como agentes tóxicos de mortalidade, além de inibir a biossíntese de quitina que é responsável do crescimento dos insetos (Regnault-Roger 1997). Ainda são poucos e imprecisos os estudos de mecanismos da bioatividade dos óleos essenciais e seus constituintes sobre os insetos, em especial, *P. xylostella*. Os efeitos toxicológicos dos constituintes majoritários ou isolados dos óleos

essenciais destacam por suas diversas propriedades biológicas sobre artrópodes-praga, em alguns casos o isolamento de um composto favorece ou potencializa mais as ações quando comparados com as componentes todas do óleo essencial (Miresmailli *et al.* 2006, Afshar *et al.* 2017). Entretanto a potencialização da toxicidade de um composto por meio de isolamento aumenta a base de conhecimentos do mecanismo de bioatividade ou principal modo de ação, como também um aumento de risco do desenvolvimento de resistência dos insetos expostos por ser um único ingrediente ativo nas formulações (López & Pascual-Villalobos 2010, Attia *et al.* 2015). Yang *et al.* (2021) em teste de laboratório avaliaram o composto limoneno proveniente do óleo essencial de hortelã sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), com *Reticulitermes dabieshanensis*, e observaram que o composto apresentou fortes propriedades de inibição da AChE. Assim, o constituinte limoneno apresenta um efeito inibidor de acetilcolinesterase, portanto isso pode definir seu modo de ação no inseto e também indica qualquer mudança genética na enzima para criar uma resistência. Na pressão de seleção de *P. xylostella* em laboratório com uso de limoneno durante 25 gerações (G₁-G₂₅), foi observada uma diminuição da suscetibilidade dos insetos selecionados ao composto limoneno e, isso demonstrou a capacidade de *P. xylostella* de desenvolver resistência após um longo período de exposição a um composto isolado. Assim, com uma pressão de seleção de maneira contínua sobre as populações de *P. xylostella*, uma mudança genética pode ser viabilizada para gerar essa perda de suscetibilidade (Li *et al.* 2007). Lee *et al.* (2000), observaram que as populações de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) resistentes ao inseticida clorpirifos-metil, apresentaram uma razão de toxicidade de 1,9 e 2,2 vezes maior do que o composto 1,8-cineol proveniente do óleo essencial de eucalipto em comparação da suscetibilidade de uma população suscetível. Os mecanismos de resistência dos insetos foram evidenciados devido as atividades elevadas das enzimas de detoxificação do citocromo P450 e esterases. Em estudos realizados sobre as populações de *Tetranychus urticae* expostas aos óleos essenciais de *Deverra*

scoparia e *Hertia cheirifolia* durante 20 gerações (G₁-G₂₀) consecutivas, no qual avaliou-se o desenvolvimento da resistência dos ácaros selecionados, Attia *et al.* (2015) concluíram que um nível de resistência de 10% e 30% foi observada nos óleos essenciais de *D. scoparia* e *H. cheirifolia*, respectivamente. Isso pode ser justificada pela composição química de cada óleo essencial que na maioria das vezes a sua toxicidade depende unicamente de um constituinte majoritário (Araújo *et al.* 2012, Lima *et al.* 2014).

Os óleos essenciais possuem características lipofílicas, e essa natureza química permite uma maior absorção no tegumento do inseto após o contato (Tak & Isman 2017). Para Kim *et al.* (2021), a dificuldade ou longevidade de um artrópode para desenvolver resistência aos óleos essenciais mesmo após um período longo de exposição pode estar relacionada a complexidade de misturas, composição química e modos de ação simultaneamente entre os constituintes, o que podem justificar os resultados obtidos na nossa pesquisa. O óleo essencial é formado por uma mistura complexa de diversas substâncias que são ativas em conjuntos ou separadamente, entre elas: monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (Cosimi *et al.* 2009, Isman 2020). Feng & Isman (1995) investigaram o desenvolvimento da tolerância de uma mesma população de pulgões (*Myzus persicae*) sob a pressão de seleção com o princípio ativo azadiractina de nim e extrato de semente de nim, após sucessivas gerações, concluíram que os pulgões selecionados somente com o ingrediente ativo azadiractina de nim demonstraram uma perda da suscetibilidade, pelo outro lado os pulgões permaneceram suscetíveis ao extrato de semente de nim mesmo após um longo período de pressão seletiva. O extrato de semente de nim possui na sua composição outros constituintes além do ingrediente ativo azadiractina, o que pode gerar, consequentemente, essa permanência da suscetibilidade nos pulgões.

Análise da variação metabólica de *P. xylostella* após seleção com óleos essenciais, compostos majoritários e inseticidas comerciais. Devido à grande capacidade dos insetos de detoxificar

compostos xenobióticos diferentes, se torna evidente os recursos de análises da variação metabólica para identificar a especificidade de classes, relações fitoquímicas e estruturas dos metabólitos (Pang *et al.* 2018, Teixeira *et al.* 2019). Nossos resultados não mostraram a presença dos constituintes majoritários ou de princípios ativos dos inseticidas comerciais. Porém, foram observados outros metabólitos de diferentes classes químicas como ácidos graxos, aminoácidos, dipeptídeos, compostos fenólicos, amidas e ácidos cinâmicos, o que indicou um mecanismo de bioatividade a partir da metabolização dos compostos principalmente os ácidos ou derivados de ácidos que foram encontrados (Leiss *et al.* 2009, Shi *et al.* 2018). Na identificação de ácidos graxos de *Tamarindus indica*, com a utilização da cromatografia de gás-líquido, Pitke *et al.* (1977) mostraram os seguintes ácidos: ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoléico, ácido linolênico, ácido araquídico, ácido beênico e ácido lignocérico. Estudos de variação metabólica em insetos ou plantas são utilizados para esclarecer o papel de aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, dipeptídeos, amidas entre outros na sua capacidade de metabolização ou efeitos adversos dos constituintes de óleos essenciais ou ingredientes ativos de inseticidas (Mahdavi *et al.* 2015, Shi *et al.* 2018). Diversos estudos relacionam os efeitos tóxicos de inseticidas em artrópodes como as causas de algumas alterações fisiológicas ou morfológicas em decorrência de exposição contínua (Southwell *et al.* 1995, Fiaz *et al.* 2018). A presença em insetos de vários derivados de compostos de uma mesma classe química pode ser relacionada com o mecanismo de ação e a capacidade de efetuar a metabolização de elementos ativos (Esther *et al.* 2017, Macel *et al.* 2019). De acordo com Abdelgaffar *et al.* (2019), as substâncias ativas provenientes de inseticidas que são alojados no corpo do inseto, pode acarretar modificações como produção de anti-metabólitos, e ainda pode estimular uma habilidade para ativar as propriedades imunológicas. Nossos resultados mostraram que houve uma dissimilaridade entre os grupos baseada na análise de componentes principais (PCA). No entanto,

essas diferenças de variação metabólica aparecem somente em insetos selecionados com os inseticidas comerciais Decis® 25 EC entre as gerações (G₉-G₁₁), Lufenuron gerações (G₅-G₆) e o composto majoritário Limoneno gerações (G₁₇-G₁₈). Zhang *et al.* (2018), ao efetuar a infecção de *Sogatella furcifera* por um vírus da família de reoviridae para identificar a diferença de metabólitos acumulados em *S. furcifera* após a infecção pelo vírus, verificou-se pela análise metabolômica de comparação que os ácidos nucleicos e os ácidos graxos foram os principais metabólitos acumulados. Isso pode ser explicado pela tolerância de *S. furcifera* ao vírus, resultando no acúmulo e regulação de quantidades de ácidos nucleicos, ácidos graxos e aminoácidos no corpo do inseto. Desta maneira, nosso resultado demonstra sob a pressão seletiva que os metabólitos originados de classes químicas como ácidos graxos, aminoácidos e fenólicos podem interferir no mecanismo de ação em *P. xylostella* por meio de saturação, produção e bioacumulação (Riach *et al.* 2019). Stanley-Samuelson *et al.* (1988) observaram que os ácidos graxos desempenham um papel na defesa de artrópodes. Guil-Guerrero *et al.* (2018) relataram que em lepidópteros, os índices de ácidos graxos tais como, o ácido α -linolênico e ácido oleico, são diferentes à de dípteros e coleópteros. A resistência de *P. xylostella* aos inseticidas Decis® 25 EC, Lufenuron e ao composto majoritário Limoneno parece aumentar os níveis de ácidos ou seus derivados quando ocorrer a pressão de seleção. Assim, já foi relatado em estudos de análise metabolômica que os ácidos graxos reagem em virtude de efeitos tóxicos, mas isso varia com as espécies de artrópodes, Wang *et al.* (2020) relataram que *Plutella xylostella* e *Pieris rapae* quando foram submetidos aos inseticidas diamidas, os índices de ácidos graxos e aminas são maiores em *P. xylostella*, com isso uma maior tolerância foi observada nos insetos. A biossíntese de compostos a base de ácidos pode ser considerada como um mecanismo de defesa celular nos insetos, uma vez que os compostos anti-metabólitos são na maioria de derivados de proteínas, lipídios e ácidos (Stanley-Samuelson *et al.* 1988, Guil-Guerrero *et al.* 2018). A análise metabolômica em *P. xylostella* é baseada na

identificação e comparação dos principais metabólitos referente a composição química de classes (Kim *et al.* 2017). Portanto, as análises da variação metabólica em insetos são importantes para identificar diferentes classes químicas ou metabólitos que surgiram por efeitos de inseticidas. Vale lembrar também que é fundamental a realização de análise metabolômica quantitativa porque os metabólitos podem estar atuando em quantidade desproporcional nos insetos.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa PROEX de estudo concedida à Donald Manigat, pelo financiamento da pesquisa (Processo #88882.183152/2018-01) e pela bolsa do Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) – CAPES-PRINT (Processo #88887.364426/2019-00).

Literatura Citada

- Abdelgaffar, H., Tague, E. D., Gonzalez, H. F. C., Campagna, S. R. & Jurat-Fuentes, J. L. 2019.** Midgut metabolomic profiling of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) with field-evolved resistance to Cry1F corn. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 106: 1-9.
- Abdel-Kawy, M. A., Michel, C. G., Kirolos, F. N., Hussien, R. A., Al-Mahallawi, A. M. & Sedeek, M. S. 2021.** Chemical composition and potentiation of insecticidal and fungicidal activities of *Citrus trifoliata* L. fruits essential oil against *Spodoptera littoralis*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* via nano-cubosomes. *Nat. Prod. Res.*, 35: 2438-2443.
- Adams, R.P. 2007.** Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Illinois, Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 804 p.
- Afshar, F. H., Maggi, F., Iannarelli, R., Cianfaglione, K. & Isman, M. B. 2017.** Comparative toxicity of *Helosciadium nodiflorum* essential oils and combinations of their main constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera). *Ind. Crops Prod.*, 98: 46-52.
- Almarie, A. A., Mamat, A. S., Wahab, Z. & Rukunudin, I. H. 2016.** Chemical composition and phytotoxicity of essential oils isolated from Malaysian plants. *Allelopath. J.*, 37: 55-70.
- Araújo, M. J., Câmara, C. A., Born, F. S., Moraes, M. M. & Badji, C. A. 2012.** Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. *Exp. Appl. Acarol.*, 57: 139-155.
- Attia, S., Lebdi, K. G., Heuskin, S., Lognay, G. & Hance, T. 2015.** An analysis of potential resistance of the phytophagous mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to four botanical pesticides. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 19: 232.
- Badgajar, R. H., Mendki, P. S. & Kotkar, H. M. 2017.** Management of *Plutella xylostella* using *Cinnamomum zeylanicum* and *Syzygium aromaticum* extracts and their major secondary metabolites. *Biopestic. Int. J.*, 13: 1-14.
- Baker, Greg J., and John Kovaliski. 1999.** "Detection of insecticide resistance in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) populations in South Australian crucifer crops." *Aust. J. Entomol.*, 38: 132-134.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. 2008.** Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 446-475.

- Benelli, G., Pavela, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Santini, G., Fiorini, D. & Maggi, F. 2018.** The essential oil from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops. *Ind. Crops Prod.*, 122: 308-315.
- Bennett, R. N. & Wallsgrove, R. M. 1994.** Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127: 617-633.
- Berini, J. L., Brockman, S. A., Hegeman, A. D., Reich, P. B., Muthukrishnan, R., Montgomery, R. A. & Forester, J. D. 2018.** Combinations of abiotic factors differentially alter production of plant secondary metabolites in five woody plant species in the boreal-temperate transition zone. *Front. Plant Sci.*, 9: 1257.
- Blázquez, M. A. & Carbó, E. 2015.** Control of *Portulaca oleracea* by boldo and lemon essential oils in different soils. *Ind. Crops Prod.*, 76: 515-521.
- Boussaada, O. & Chemli, R. 2007.** Seasonal variation of essential oil composition of *Citrus aurantium* L. var. amara. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 10: 109-120.
- Bouvier, J. C., Boivin, T., Beslay, D. & Sauphanor, B. 2002.** Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch. Insect Physiol. Biochem.*: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, 51: 55-66.
- Breuer, M., Hoste, B., De Loof, A. & Naqvi, S. N. H. 2003.** Effect of *Melia azedarach* extract on the activity of NADPH-cytochrome c reductase and cholinesterase in insects. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 76: 99-103.
- Camara, C.A.G., J.P.R Melo & M.M.C Silva. 2015.** Insecticidal activity of *Melaleuca leucadendra* and *Citrus reticulata* essential oils against larvae of *Plutella xylostella*. *Rev. Protec. Veg.* 30: 39.
- Campos, E. V., Proença, P. L., Oliveira, J. L., Bakshi, M., Abhilash, P. C., & Fraceto, L. F. 2019.** Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. *Ecol. Indic.*, 105: 483-495.
- Castelo, A. V. M., Del Menezzi, C. H. S. & Resck, I. S. 2012.** Seasonal variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two Brazilian native arbustive species. *J. Appl. Sci.*, 12: 753-760.
- Chen, E. H. & Hou, Q. L. 2021.** Identification and expression analysis of cuticular protein genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 104943.
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G. & Xia, J. 2018.** MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.*, 46: 486-494.

- Clements, A. N. & May, T. E. 1977.** The actions of pyrethroids upon the peripheral nervous system and associated organs in the locust. *Pestic. Sci.*, 8: 661-680.
- Cosimi, S., Rossi, E., Cioni, P. L. & Canale, A. 2009.** Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *J. Stored Prod. Res.*, 45: 125-132.
- Da Costa, J. S., Barroso, A. S., Mourão, R. H. V., da Silva, J. K. R., Maia, J. G. S. & Figueiredo, P. L. B. 2020.** Seasonal and antioxidant evaluation of essential oil from *Eugenia uniflora* L., curzerene-rich, thermally produced in situ. *Biomol.*, 10: 328.
- Defaveri, A. C., Sato, A., Borré, L. B., Aguiar, D. L., San Gil, R. A., Arruda, R. C. & Riehl, C. A. 2011.** *Eugenia neonitida* Sobral and *Eugenia rotundifolia* Casar. (Myrtaceae) essential oils: composition, seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. *J. Braz. Chem. Soc.*, 22: 1531-1538.
- Douris, V., Steinbach, D., Panteleri, R., Livadaras, I., Pickett, J. A., Van Leeuwen, T. & Vontas, J. 2016.** Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 113: 14692-14697.
- Endersby, N. M., Viduka, K., Baxter, S. W., Saw, J., Heckel, D. G. & McKechnie, S. W. 2011.** Widespread pyrethroid resistance in Australian diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), is related to multiple mutations in the para sodium channel gene. *Bull. Entomol. Res.*, 101: 393-405.
- Erb, M., Huber, M., Robert, C. A., Ferrieri, A. P., Machado, R. A. & Arce, C. C. 2013.** The role of plant primary and secondary metabolites in root-herbivore behaviour, nutrition and physiology. *Adv. Insect Physiol.*, 45: 53-95.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D. & Pagán, R. 2011.** Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food control*, 22: 896-902.
- Esther, E., Human, H., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Nicolson, S. W. & Pirk, C. W. 2017.** Proteomic and metabolomic analysis reveals rapid and extensive nicotine detoxification ability in honey bee larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 82: 41-51.
- Eziah, V. Y., Rose, H. A., Wilkes, M. & Clift, A. D. 2009.** Biochemical mechanisms of insecticide resistance in the diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae), in the Sydney region, Australia. *Aust. J. Entomol.*, 48: 321-327.
- Feng, R. & Isman, M. B. 1995.** Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Experientia*, 51: 831-833.

- Fiaz, M., Martínez, L. C., da Silva Costa, M., Cossolin, J. F. S., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G. & Serrão, J. E. 2018.** *Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae).* *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 156: 1-8.
- Finney, D.J. 1971.** Probit analysis. London, Cambridge University Press, 333p.
- Furlong, M. J. & Wright, D. J. 1994.** Examination of stability of resistance and cross-resistance patterns to acylurea insect growth regulators in field populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from Malaysia. *Pestic. Sci.*, 42: 315-326.
- Gerwick, B. C. & Sparks, T. C. 2014.** Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. *Pest Manag. Sci.*, 70: 1169-1185.
- Gonzalez, M. S., Lima, B. G., Oliveira, A. F., Nunes, D. D., Fernandes, C. P., Santos, M. G. & Feder, D. 2014.** Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. *Rev. Bras. Farm.*, 24: 413-418.
- Guil-Guerrero, J. L., Ramos-Bueno, R. P., González-Fernández, M. J., Fabrikov, D., Sánchez-Muros, M. J. & Barroso, F. G. 2018.** Insects as food: fatty acid profiles, lipid classes, and sn-2 fatty acid distribution of lepidoptera larvae. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 120: 1700391.
- Hama, H. 1990.** Insecticide resistance characteristics of diamondback moth. *Generations*, 1: 10.
- Hamdan, D., El-Readi, M. Z., Nibret, E., Sporer, F., Farrag, N., El-Shazly, A. & Wink, M. 2010.** Chemical composition of the essential oils of two *Citrus* species and their biological activities. *Int. J. Pharm. Sci.*, 65: 141-147.
- Ho, S. H., Lee, B. H. & See, D. 1983.** Toxicity of deltamethrin and cypermethrin to the larvae of the diamond-back moth, *Plutella xylostella* L. *Toxicol. Lett.*, 19: 127-131.
- Horsfall, J. & Barratt, R. 1945.** An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology*, 35: 655.
- Huang, Z., Shi, P., Dai, J., & Du, J. 2004.** Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 80: 85-93.
- Ibáñez, M. D. & Blázquez, M. A. 2019.** Phytotoxic effects of commercial *Eucalyptus citriodora*, *Lavandula angustifolia*, and *Pinus sylvestris* essential oils on weeds, crops, and invasive species. *Molecules*, 24: 2847.
- Ibrahim, M. A., Oksanen, E. J. & Holopainen, J. K. 2004.** Effects of limonene on the growth and physiology of cabbage (*Brassica oleracea* L) and carrot (*Daucus carota* L) plants. *J. Sci. Food Agric.*, 84: 1319-1326.

- Iqbal, M. & Wright, D. J. 1997.** Evaluation of resistance, cross-resistance and synergism of abamectin and teflubenzuron in a multi-resistant field population of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull. Entomol. Res.*, 87: 481-486.
- Ismail, F. & Wright, D. J. 1991.** Cross-resistance between acylurea insect growth regulators in a strain of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) from Malaysia. *Pestic. Sci.*, 33: 359-370.
- Isman, M. B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 45-66.
- Isman, M. B. 2020.** Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry Rev.*, 19: 235-241.
- Jan, R., Asaf, S., Numan, M. & Kim, K. M. 2021.** Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, 11: 968.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A. & Schmidt, E. 2006.** Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 6303-6307.
- Josan, A., & Singh, G. 2002.** Lethal effects of a new acylurea insect growth regulator (lufenuron) against *Plutella xylostella* (Linn.). *J. Insect Sci.*, 2: 53-55.
- Kim, G. H., Seo, Y. S., Lee, J. H. & Cho, K. Y. 1990.** Development of fenvalerate resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) and its cross resistance. *Korean J. Appl. Entomol.*, 29: 194-200.
- Kim, S., Yoon, J. & Tak, J. H. 2021.** Synergistic mechanism of insecticidal activity in basil and mandarin essential oils against the tobacco cutworm. *J. Pest Sci.*, 1-13.
- Kim, T. J., Choi, J., Kim, K. W., Ahn, S. K., Ha, S. H., Choi, Y. & Kim, J. K. 2017.** Metabolite profiling of peppers of various colors reveals relationships between tocopherol, carotenoid, and phytosterol content. *J. Food Sci.*, 82: 2885-2893.
- Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N. & Shaaya, E. 2002.** Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag. Sci.: formerly Pest Sci.*, 58: 1101-1106.
- Lee, S. E., Choi, W. S., Lee, H. S. & Park, B. S. 2000.** Cross-resistance of a chlorpyrifos-methyl resistant strain of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae) to fumigant toxicity of essential oil extracted from *Eucalyptus globulus* and its major monoterpene, 1, 8-cineole. *J. Stored Prod. Res.*, 36: 383-389.

- Leiss, K. A., Maltese, F., Choi, Y. H., Verpoorte, R. & Klinkhamer, P. G. 2009.** Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in *chrysanthemum*. *Plant Physiology*, 150: 1567-1575.
- LeOra, 1987.** POLO - PC: a User's Guide to Probit Logit Analysis. Berkely, CA.
- Ley, S. V., A. A. Denholm, and A. Wood. 1993.** "The chemistry of azadirachtin." *Nat. Prod. Rep.*, 10: 109-157.
- Li, H. & Madden, J. L. 1995.** Analysis of leaf oils from a Eucalyptus species trial. *Biochem. Syst. Ecol.*, 23: 167-177.
- Li, X., Schuler, M. A. & Berenbaum, M. R. 2007.** Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 231-253.
- Li, X., Shi, H., Gao, X. & Liang, P. 2018.** Characterization of UDP-glucuronosyltransferase genes and their possible roles in multi-insecticide resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Manag. Sci.*, 74: 695-704.
- Lima, T. C., da Silva, T. K. M., Silva, F. L., Barbosa-Filho, J. M., Marques, M. O. M., Santos, R. L. C. & de Sousa, D. P. 2014.** Larvicidal activity of *Mentha villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. *Chemosphere*, 104: 37-43.
- Lockwood, J. A., Sparks, T. C. & Story, R. N. 1984.** Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 30: 41-51.
- López, M. D. & Pascual-Villalobos, M. J. 2010.** Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Ind. Crops Prod.*, 31: 284-288.
- Macel, M., Visschers, I. G., Peters, J. L., Kappers, I. F., de Vos, R. C. & van Dam, N. M. 2019.** Metabolomics of thrips resistance in pepper (*Capsicum* spp.) reveals monomer and dimer acyclic diterpene glycosides as potential chemical defenses. *J. Chem. Ecol.*, 45: 490-501.
- Mahdavi, V., Farimani, M. M., Fathi, F. & Ghassempour, A. 2015.** A targeted metabolomics approach toward understanding metabolic variations in rice under pesticide stress. *Anal. Biochem.*, 478: 65-72.
- Marangoni, C., de Moura, N. F. & Garcia, F. R. M. 2013.** Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. *Rev. Cienc. Farm. Amb.*, 6: 92-112.
- Matos, L. F., da Cruz Lima, E., de Andrade Dutra, K., Navarro, D. M. D. A. F., Alves, J. L. R. & Silva, G. N. 2020.** Chemical composition and insecticidal effect of essential oils from *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllus* on *Callosobruchus maculatus* in cowpea. *Ind. Crops Prod.*, 145: 112088.

- Mawussi, G., Júnior, R. P. S., Dossa, E. L. & Alaté, K. K. A. 2014.** Insecticide residues in soil and water in coastal areas of vegetable production in Togo. *Environ. Monit. Assess.*, 186: 7379-7385.
- Meyer, S. L., Lakshman, D. K., Zasada, I. A., Vinyard, B. T. & Chitwood, D. J. 2008.** Phytotoxicity of clove oil to vegetable crop seedlings and nematotoxicity to root-knot nematodes. *HortTechnology*, 18: 631-638.
- Miller, A. L., Tindall, K. & Leonard, B. R. 2010.** Bioassays for monitoring insecticide resistance. *J. Vis. Exp.*, 46: 2129.
- Miresmailli, S., Bradbury, R. & Isman, M. B. 2006.** Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. *Pest Manag. Sci.: formerly Pestic. Sci.*, 62: 366-371.
- Mohan, M. & Gujar, G. T. 2003.** Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. *Crop prot.*, 22: 495-504.
- Montes-Belmont, R. & Carvajal, M. 1998.** Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *J. Food Prot.*, 61: 616-619.
- Mossa, A. T. H. 2016.** Green pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *J. Environ. Sci. Technol.*, 9: 354.
- Muñoz Castellanos, L., Amaya Olivas, N., Ayala-Soto, J., De La O Contreras, C. M., Zermeño Ortega, M., Sandoval Salas, F. & Hernández-Ochoa, L. 2020.** In vitro and in vivo antifungal activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) and pepper (*Piper nigrum* L.) essential oils and functional extracts against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Int. J. Microbiol.*, 2020.
- Nansen, C., Baissac, O., Nansen, M., Powis, K. & Baker, G. 2016.** Behavioral avoidance-will physiological insecticide resistance level of insect strains affect their oviposition and movement responses?. *PloS one*, 11: 49994.
- Nisbet, A. J. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc. Entomol. Bras.*, 29: 615-632.
- Noppun, V., Miyata, T. & Saito, T. 1984.** Decrease in Insecticide Resistance in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* L.:(Lepidoptera: Yponomeutidae) on Release from Selection Pressure. *Appl. Entomol. Zool.*, 19: 531-533.
- Pang, R., Chen, M., Yue, L., Xing, K., Li, T., Kang, K. & Zhang, W. 2018.** A distinct strain of *Arsenophonus* symbiont decreases insecticide resistance in its insect host. *PLoS genetics*, 14: 1007725.

- Penteado, S. R. 2006.** Defensivos alternativos e naturais. Via Verde Agroecologia.
- Perng, F. S. & Sun, C. N. 1987.** Susceptibility of diamondback moths (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to conventional insecticides to chitin synthesis inhibitors. *J. Econ. Entomol.*, 80: 29-31.
- Perng, F. S., Yao, M. C., Hung, C. F. & Sun, C. N. 1988.** Teflubenzuron resistance in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 81: 1277-1282.
- Pimprikar, G. D. & Georghiou, G. P. 1979.** Mechanisms of resistance to diflubenzuron in the house fly, *Musca domestica* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 12: 10-22.
- Pitke, P. M., Singh, P. P. & Srivastava, H. C. 1977.** Fatty acid composition of Tamarind kernel oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54: 592-592.
- Porter, A. J. R., Morton, A. M., Kiddle, G., Doughty, K. J. & Wallsgrove, R. M. 1991.** Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves: I. Effect of leaf age and position. *Ann. Appl. Biol.*, 118: 461-467.
- Qasem, J. R.; Foy, C. L. 2001.** Weed allelopathy, its ecological impacts and future prospects: a review. *J. crop prod.*, 4: 43-119.
- Rasooli, I. & Mirmostafa, S. A. 2003.** Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2200-2205.
- Rattan, R. S. 2010.** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.*, 29: 913-920.
- Regnault-Roger, C. 1997.** The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integr. Pest Manag. Rev.*, 2: 25-34.
- Riach, A. C., Perera, M. V. L., Florance, H. V., Robinson, L. A., Penfield, S. D. & Hill, J. K. 2019.** Metabolic fingerprints reveal how an insect metabolome is affected by different larval host plant species. *Arthropod-Plant Interact.*, 13: 571-579.
- Riley, D. G. 2014.** Insecticide rotations for the management of lepidopteran pests in cabbage and collards. *J. Entomol. Sci.*, 49: 130-143.
- Robertson, J.L., Russell, R.M., Preisler, H.K. & Savin, N.E. 2007.** Bioassays with arthropods. 2^a Ed., California, CRC Press, 224p.
- Schuler, T. H., Martinez-Torres, D., Thompson, A. J., Denholm, I., Devonshire, A. L., Duce, I. R. & Williamson, M. S. 1998.** Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 59: 169-182.

- Shakeel, M., Farooq, M., Nasim, W., Akram, W., Khan, F. Z. A., Jaleel, W., & Jin, F. 2017.** Environment polluting conventional chemical control compared to an environmentally friendly IPM approach for control of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), in China: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24: 14537-14550.
- Sharma, Vandana et al. 2006.** Azadirachtin-A and tetrahydroazadirachtin-A concentrates: preparation, LC-MS characterization and insect antifeedant/IGR activity against *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pest Manag. Sci.: formerly Pestic. Sci.*, 62: 965-975.
- Shi, T., Burton, S., Wang, Y., Xu, S., Zhang, W. & Yu, L. 2018.** Metabolomic analysis of honey bee, *Apis mellifera* L. response to thiacloprid. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 152: 17-23.
- Silva, C. J., Barbosa, L. C., Maltha, C. R., Pinheiro, A. L. & Ismail, F. M. 2007.** Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. *Flavour Fragr. J.*, 22: 474-478.
- Simmonds, M. S. J., Blaney, W. M., Ley, S. V., Anderson, J. C. & Toogood, P. L. 1990.** Azadirachtin: structural requirements for reducing growth and increasing mortality in lepidopterous larvae. *Entomol. Exp. Appl.*, 55: 169-181.
- Singh, G., Kaur, V. & Singh, D. 2006.** Lethal and sublethal effects of different ecotypes of *Melia azedarach* against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Int. J. Trop. Insect Sci.*, 26: 92-100.
- Southwell, I. A., Maddox, C. D. & Zalucki, M. P. 1995.** Metabolism of 1, 8-cineole in tea tree (*Melaleuca alternifolia* and *M. linariifolia*) by pyrgo beetle (*Paropsisterna tigrina*). *J. Chem. Ecol.*, 21: 439-453.
- Souza Alves, M., Campos, I. M., de Brito, D. D. M. C., Cardoso, C. M., Pontes, E. G. & de Souza, M. A. A. 2019.** Efficacy of lemongrass essential oil and citral in controlling *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae), a post-harvest cowpea insect pest. *Crop prot.*, 119: 191-196.
- Stanley-Samuelson, David W., et al. 1988.** "Fatty acids in insects: composition, metabolism, and biological significance." *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 9: 1-33.
- Stashenko, E. E., Martínez, R., Pinzón, M. H. & Ramírez, J. 1996.** Changes in chemical composition of catalytically hydrogenated orange oil (*Citrus sinensis*). *J. Chromatogr. A*, 752: 217-222.
- Tak, J. H. & Isman, M. B. 2017.** Penetration-enhancement underlies synergy of plant essential oil terpenoids as insecticides in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Sci. Rep.*, 7: 1-11.
- Teixeira, M. G., Moraes, M. M. D. & da Camara, C. A. 2019.** Chemical profiles of essential oils and fatty acids from *Erythrina velutina*. *Química Nova*, 42: 65-70.

- Tirado, C. B., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y. & Martinez, J. R. 1995.** Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 697: 501-513.
- Torres, A.L., Boiça Júnior, A.L., Medeiros, C.A.M. & Barros, R. 2006.** Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia* 65: 447-457.
- Unscrambler® software version 9.5**, CAMO Process AS, Norway, 1996-2010.
- Van Leeuwen, T., Demaeght, P., Osborne, E. J., Dermauw, W., Gohlke, S., Nauen, R. & Clark, R. M. 2012.** Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109: 4407-4412.
- Vasconcelos, L. C., de Souza Santos, E., de Oliveira Bernardes, C., da Silva Ferreira, M. F., Ferreira, A., Tuler, A. C. & Praça-Fontes, M. M. 2019.** Phytochemical analysis and effect of the essential oil of *Psidium* L. species on the initial development and mitotic activity of plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26: 26216-26228.
- Vollinger, M. 1987.** The possible development of resistance against neem seed kernel extract and deltamethrin in *Plutella xylostella*. In *Natural Pesticides from the Neem Tree (Azadirachta indica A. Juss) and Other Tropical Plants*, Proceedings of the Third International Neem Conference: 10-15 July 1986; Nairobi, 543-554.
- Wang, D., Lv, W., Yuan, Y., Zhang, T., Teng, H., Losey, J. E. & Chang, X. 2020.** Mechanism of the different metabolome responses between *Plutella xylostella* and *Pieris rapae* treated with the diamide insecticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 203: 111033.
- Yang, X., Han, H., Li, B., Zhang, D., Zhang, Z. & Xie, Y. 2021.** Fumigant toxicity and physiological effects of spearmint (*Mentha spicata*, Lamiaceae) essential oil and its major constituents against *Reticulitermes dabieshanensis*. *Ind. Crops Prod.*, 171: 113894.
- Zalucki, M. P., Shabbir, A., Silva, R., Adamson, D., Shu-Sheng, L. & Furlong, M. J. 2012.** Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string?. *J. Econ. Entomol.*, 105: 1115-1129.
- Zhang, T., Feng, W., Ye, J., Li, Z. & Zhou, G. 2018.** Metabolomic Changes in *Sogatella furcifera* under Southern rice black-streaked dwarf virus Infection and Temperature Stress. *Viruses*, 10: 344.

Tabela 1. Análise da composição química dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* e *Citrus aurantium* L. var. *amara*.

^{1/} Compostos	^{2/} IR	^{3/} <i>Eugenia caryophyllata</i>	^{3/} <i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>amara</i>
α -Tujeno	924	-	0,16±0,00
α -pineno	932	0,33±0,01	0,77±0,01
Sabineno	969	-	0,95±0,00
β -pineno	974	-	1,37±0,07
δ -2-Careno	1001	0,03±0,00	-
Limoneno	1024	0,19±0,02	92,28±0,93
Silvestreno	1025	0,22±0,00	-
β -Felandreno	1025	-	0,11±0,00
1,8-Cineol	1026	0,17±0,01	-
β -Z-Ocimeno	1032	-	0,28±0,00
γ -Terpineno	1054	-	0,35±0,00
Terpinoleno	1086	-	0,38±0,00
Linalool	1095	-	0,19±0,00
<i>cis</i> - β -Terpineol	1140	-	0,34±0,00
Citronellal	1148	-	0,10±0,01
<i>E</i> -Isocitral	1177	-	0,22±0,00
Eugenol	1356	75,80±0,80	-
β -Cariofileno	1417	6,77±0,02	0,08±0,00
α - <i>trans</i> -bergamotene	1432	-	0,11±0,00
α -Humuleno	1452	1,02±0,00	
γ -Gurjuneno	1475	-	0,70±0,01

...continuação Tabela 1.

Acetato de eugenol	1521	12,81±0,04	-
Oxido de cariofileno	1582	0,71±0,01	-
Total		98,05±0,82	98,39±1,01

¹/Composto classificado conforme a Nomenclatura da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC); ²/Índice de retenção da composição química; ³/Óleo essencial com a porcentagem (%) de cada composto.

Tabela 2. Médias da fitotoxicidade em discos foliares de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga), em função da aplicação crescente de concentrações de óleos essenciais e seus constituintes.

^{1/} Óleos essenciais	^{2/} Menor índice de lesões (%)	^{2/} Maior índice de lesões (%)
<i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>amara</i>	1,84 (±0,21)	34,48 (±3,26)
<i>Eugenia caryophyllata</i>	2,65 (±0,24)	37,22 (±4,17)
Eugenol	1,68 (±0,3)	34,6 (±2,93)
Limoneno	1,57 (±0,4)	30,03 (±2,58)

^{1/}Óleos essenciais e constituintes majoritários; ^{2/}Maior e Menor índices de lesões com média de fitotoxidez estatisticamente.

**Escala diagramática para avaliação de números de lesões proposta por Horsfall & Barrat (1945): nível 1 = 0%; nível 2 = (0-3%); nível 3 = (3-6%); nível 4 = (6-12%); nível 5 = (12-25%); nível 6 = (25-50%); nível 7 = (50-75%); nível 8 = (75-88%); nível 9 = (88-94%); nível 10 = (94-97%); nível 11 = (97-100%) e nível 12 = 100% de lesões.

Tabela 3. Concentração média Letal (CL₅₀) do constituinte eugenol proveniente do óleo essencial de folhas de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) sobre larvas do terceiro ínstar de *Plutella xylostella* (L.) após sucessivas gerações em laboratório.

G	N	GL	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)	Inclinação ± E.P	χ ²	P	TR ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)
G ₀	538	7	4,92 (4,37 - 5,47)	3,26±0,29	2,63	0,1877	***
G ₁	543	7	5,4 (4,22 - 6,45)	3,19±0,35	10,49	0,7454	1,13 (0,9 - 1,41)
G ₂	296	3	4,95 (4,3 - 5,73)	2,64±0,29	1,73	0,2216	1,01 (0,84 - 1,21)
G ₃	539	7	5,05 (4,61 - 5,52)	3,16±0,25	4,37	0,3104	0,98 (0,83 - 1,16)
G ₄	479	6	4,94 (4,33 - 5,56)	2,90±0,28	2,32	0,1842	0,97 (0,84 - 1,14)
G ₅	542	4	6,13 (5,46 - 6,78)	3,14±0,29	1,26	0,1325	0,81 (0,68 - 1,0)
G ₆	532	4	5,9 (5,38 - 6,47)	3,13±0,24	2,93	0,3083	0,96 (0,83 - 1,11)

...continuação Tabela 3.

G ₈	543	7	6,51 (5,98 - 7,11)	3,30±0,25	3,69	0,2621	0,91 (0,8 -1,03)
G ₉	357	4	5,65 (4,97 - 6,39)	2,75±0,27	3,42	0,3608	0,87 (0,74 -1,01)
G ₁₁	283	5	4,65 (3,59 - 6,01)	2,13±0,26	5,73	0,5178	1,21 (0,98 -1,51)
G ₁₂	406	5	5,93 (4,66 - 7,73)	2,07±0,21	7,38	0,6668	1,28 (1,01 -1,61)
G ₁₃	482	4	6,9 (5,66 - 8,5)	2,64±0,23	6,23	0,6561	0,86 (0,71 -1,04)
G ₁₄	400	3	6,5 (5,35 - 8,2)	3,25±0,29	4,07	0,5211	0,94 (0,81 -1,1)
G ₁₅	631	5	6,2 (5,33 -7,05)	3,39±0,28	5,29	0,4785	1,05 (0,9 -1,22)
G ₁₇	534	4	7,4 (6,58 - 8,3)	2,79±0,26	3,5	0,3688	1,19 (1,02 -1,39)
G ₁₈	413	5	6,47 (5,22 - 8,14)	2,79±0,25	9,79	0,8842	1,14 (0,97 -1,35)

...continuação Tabela 3.

G ₁₉	362	4	8,25 (6,32 - 11,59)	2,55±0,27	8,05	0,8485	1,27 (1,06 -1,53)
G ₂₀	476	4	8,28 (7,68 - 8,92)	4,20±0,32	3,37	0,3555	1,0 (0,85 -1,17)
G ₂₁	325	6	8,47 (7,67 - 9,41)	3,57±0,37	1,93	0,1529	1,02 (0,9 -1,16)
G ₂₂	300	3	6,77 (4,64 - 9,09)	3,02±0,37	3,74	0,4781	1,25 (1,03 - 1,53)
G ₂₃	476	6	9,85 (8,31 - 11,29)	3,95±0,5	6,6	0,5239	1,46 (1,19 -1,78)
G ₂₄	485	6	7,96 (7,04 - 8,95)	3,41±0,32	6,06	0,4816	1,24 (1,07 -1,43)

G= Número de gerações; N= Número de insetos utilizados na experimentação; GL= Grau de Liberdade; CL₅₀=Concentração letal de Eugenol em (mg.L⁻¹) que reduz em 50% a população de *Plutella xylostella*; I.C.= intervalo de confiança; P= Valor de probabilidade de significância para a concentração média letal (P-valor>0.05); TR₅₀= Intervalo de confiança da razão de toxicidade das CL₅₀ (geração sucessiva em relação a anterior) a 95% de probabilidade (Robertson *et al.* 2007); E.P= Erro Padrão; Inclinação= Coeficiente angular relativo; X²= qui-quadrado (P-valor>0.05).

Tabela 4. Concentração média Letal (CL₅₀) do óleo essencial de folhas de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) sobre larvas do terceiro ínstar de *Plutella xylostella* (L.) após sucessivas gerações em laboratório.

G	N	GL	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)	Inclinação ± E.P	χ ²	P	TR ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)
G ₀	536	7	0,98 (0,8 -1,17)	1,72±0,15	4,42	0,3146	***
G ₁	643	6	1,4 (1,14 -1,7)	2,03±0,14	6,81	0,5409	0,7 (0,55 -1,0)
G ₂	479	4	1,18 (0,98 -1,4)	1,78±0,15	2,31	0,2435	0,84 (0,67 -1,06)
G ₃	321	6	1,21 (0,9 -1,54)	1,86±0,22	1,02	0,0813	0,98 (0,71 - 1,34)
G ₅	294	3	1,66 (1,01 -2,79)	1,5±0,16	3,98	0,5089	1,37 (0,95 -1,98)
G ₇	320	6	1,68 (1,34 -2,11)	1,57±0,17	0,79	0,0627	0,99 (0,7 -1,39)
G ₈	716	7	2,08 (1,83 -2,37)	1,9±0,13	3,79	0,2696	1,24 (0,95 -1,61)

...continuação Tabela 4.

G ₉	482	6	2,27 (1,82 -2,88)	1,26±0,13	4,78	0,3796	0,92 (0,7 -1,19)
G ₁₀	349	4	2,53 (1,78 - 3,56)	1,9±0,19	6,42	0,6771	1,12 (0,83 - 1,5)
G ₁₁	425	5	2,35 (1,85 -3,03)	1,73±0,16	5,24	0,4736	1,08 (0,83 -1,39)
G ₁₂	476	6	1,61 (1,34 -1,95)	1,56±0,14	2,04	0,1623	0,69 (0,53 -0,89)
G ₁₃	404	3	1,19 (0,68 -2,07)	1,25±0,12	4,74	0,6071	1,35 (0,98 -1,86)
G ₁₄	414	5	1,0 (0,65 -1,56)	1,13±0,11	7,02	0,6338	0,84 (0,58 -1,23)
G ₁₅	531	7	1,55 (1,27 -1,89)	1,99±0,15	8,87	0,6308	0,65 (0,47 -0,88)
G ₁₆	533	7	1,36 (1,17 -1,59)	1,83±0,15	6,63	0,4711	0,88 (0,71 -1,09)
G ₁₇	480	4	1,63 (1,38 -1,92)	1,8±0,15	2,0	0,2108	0,84 (0,67 -1,05)

...continuação Tabela 4.

G ₁₈	413	5	2,59 (2,07 -3,17)	1,93±0,21	4,24	0,3833	1,59 (1,22 -2,08)
G ₁₉	424	5	1,44 (0,99 -2,14)	1,31±0,12	6,74	0,6091	0,55 (0,39 -1,14)
G ₂₀	304	3	1,97 (1,14 -3,45)	1,58±0,16	5,26	0,6732	1,37 (0,97 -1,93)
G ₂₁	561	5	3,27 (2,42 -4,74)	1,61±0,14	9,46	0,8542	1,7 (1,45 -2,81)
G ₂₂	425	5	2,38 (1,78 - 3,25)	1,72±0,16	7,49	0,6762	0,73 (0,57 - 1,0)

G= Número de gerações; N= Número de insetos utilizados na experimentação; GL= Grau de Liberdade; CL₅₀=Concentração letal de *Eugenia caryophyllata* em (mg.L⁻¹) que reduz em 50% a população de *Plutella xylostella*; I.C= intervalo de confiança; P= Valor de probabilidade de significância para a concentração média letal (P-valor>0.05); TR₅₀= Intervalo de confiança da razão de toxicidade das CL₅₀ (geração sucessiva em relação a anterior) a 95% de probabilidade (Robertson *et al.* 2007); E.P= Erro Padrão; Inclinação= Coeficiente angular relativo; X²= qui-quadrado (P-valor>0.05).

Tabela 5. Concentração média Letal (CL₅₀) do constituinte limoneno proveniente do óleo essencial de laranja amarga (*Citrus aurantium* L. var. *amara*) sobre larvas do terceiro ínstar de *Plutella xylostella* (L.) após sucessivas gerações em laboratório.

G	N	GL	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)	Inclinação ± E.P	χ ²	P	TR ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)
G ₀	411	5	8,32 (7,29 -9,38)	2,64±0,25	2,37	0,2141	***
G ₁	517	7	9,34 (7,14 -11,52)	2,64±0,27	13,13	0,9334	0,89 (0,74 -1,08)
G ₂	412	5	8,81 (7,67 -9,93)	2,61±0,26	2,24	0,2031	0,94 (0,78 -1,14)
G ₃	530	7	7,73 (6,66 -8,79)	3,54±0,3	9,48	0,6737	1,14 (0,97 -1,34)
G ₄	538	7	9,59 (7,68 -11,77)	2,047±0,22	12,057	0,8571	1,24 (1,06 -1,46)
G ₅	648	6	9,96 (9,04 -11,0)	2,55±0,2	5,55	0,4406	0,96 (0,82 -1,13)
G ₇	402	3	13,32 (10,59 -16,82)	3,86±0,32	6,66	0,8516	1,34 (1,17 -1,53)

...continuação Tabela 5.

G ₈	298	3	12,36 (11,12 - 13,88)	3,63±0,38	2,63	0,3367	1,08 (0,93 - 1,24)
G ₁₀	539	4	12,91 (11,09 - 15,12)	3,28±0,26	6,19	0,6529	1,04 (0,91 - 1,2)
G ₁₁	421	5	12,13 (10,77 - 13,65)	2,56±0,27	1,96	0,1774	1,07 (0,92 - 1,23)
G ₁₂	416	5	12,08 (10,76 - 13,47)	2,79±0,29	3,02	0,2726	0,97 (0,85 - 1,17)
G ₁₃	646	6	11,84 (10,78 - 13,03)	2,63±0,21	5,43	0,4312	1,02 (0,88 - 1,18)
G ₁₄	478	4	14,37 (12,15 - 17,33)	4,06±0,31	9,21	0,9708	1,21 (1,07 - 1,38)
G ₁₆	416	5	13,77 (12,49 - 15,26)	3,21±0,3	4,35	0,3926	1,04 (0,92 - 1,19)
G ₁₇	415	5	13,84 (11,73 - 16,6)	2,65±0,28	5,95	0,5378	1,01 (0,86 - 1,17)
G ₁₈	538	4	13,62 (12,51 - 14,88)	3,26±0,26	1,06	0,1113	1,02 (0,88 - 1,18)

...continuação Tabela 5.

G ₁₉	563	5	23,08 (20,72 -25,95)	4,17±0,36	8,38	0,7572	1,69 (1,52 -2,77)
G ₂₀	413	5	16,82 (14,91 -19,12)	3,42±0,32	5,04	0,4551	0,88 (0,74 -1,05)
G ₂₁	560	5	15,66 (14,54 -16,8)	3,79±0,31	2,23	0,2015	0,93 (0,83 -1,05)
G ₂₂	352	4	15,79 (12,10 -19,75)	3,03±0,44	4,45	0,4689	0,99 (0,84 -1,17)
G ₂₃	412	5	17,08 (15,41 -19,08)	2,96±0,3	1,66	0,1497	1,08 (0,9 -1,3)
G ₂₄	357	4	14,86 (12,7 -17,18)	2,71±0,34	1,86	0,1960	0,87 (0,65 -1,21)
G ₂₅	419	5	29,67 (26,78 -32,33)	7,29±0,74	9,55	0,8629	2,0 (1,63 -3,39)

G= Número de gerações; N= Número de insetos utilizados na experimentação; GL= Grau de Liberdade; CL₅₀=Concentração letal do Limoneno em (mg.L⁻¹) que reduz em 50% a população de *Plutella xylostella*; I.C.= intervalo de confiança; P= Valor de probabilidade de significância para a concentração média letal (P-valor>0.05); TR₅₀= Intervalo de confiança da razão de toxicidade das CL₅₀ (geração sucessiva em relação a anterior) a 95% de probabilidade (Robertson *et al.* 2007); E.P= Erro Padrão; Inclinação= Coeficiente angular relativo; X²= qui-quadrado (P-valor>0.05).

Tabela 6. Concentração média Letal (CL₅₀) do óleo essencial de laranja amarga (*Citrus aurantium* L. var. *amara*) sobre larvas do terceiro ínstar de *Plutella xylostella* (L.) após sucessivas gerações em laboratório.

G	N	GL	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)	Inclinação ± E.P	χ ²	P	TR ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)
G ₀	478	6	14,8 (13,38 - 16,1)	4,75±0,52	5,48	0,4349	***
G ₁	531	7	15,68 (14,52 - 16,78)	6,05±0,49	10,07	0,7161	0,94 (0,85 - 1,05)
G ₂	649	6	15,99 (14,6 - 17,56)	4,23±0,34	9,32	0,7399	1,02 (0,94 - 1,1)
G ₄	539	7	16,96 (15,38 - 18,52)	4,37±0,44	10,39	0,7384	0,94 (0,87 - 1,03)
G ₅	296	3	16,74 (15,2 - 18,26)	4,9±0,55	0,86	0,110	1,12 (1,03 - 1,23)
G ₆	473	6	17,35 (15,88 - 18,76)	4,68±0,54	5,69	0,4517	1,1 (0,99 - 1,22)
G ₇	565	5	17,93 (16,73 - 19,05)	5,82±0,57	1,76	0,1588	1,03 (0,93 - 1,15)

...continuação Tabela 6.

G ₈	421	5	17,28 (16,02 - 18,48)	6,64±0,58	5,66	0,5116	1,04 (0,96 - 1,13)
G ₉	421	5	17,68 (16,15 - 19,4)	4,72±0,47	5,54	0,5007	1,02 (0,94 - 1,11)
G ₁₀	358	4	17,8 (16,11 - 19,39)	5,28±0,65	2,46	0,2596	0,99 (0,89 - 1,11)
G ₁₂	621	5	19,06 (17,17 - 21,34)	4,19±0,35	8,83	0,7972	1,07 (0,96 - 1,2)
G ₁₃	415	5	19,53 (17,5 - 21,84)	4,91±0,5	8,28	0,7481	0,98 (0,89 - 1,07)
G ₁₄	539	7	19,62 (16,64 - 22,32)	4,73±0,58	13,51	0,9602	1,01 (0,91 - 1,11)
G ₁₅	362	4	19,97 (18,74 - 21,37)	5,47±0,51	3,13	0,3303	0,98 (0,89 - 1,09)
G ₁₆	422	5	19,36 (17,47 - 21,01)	6,62±0,81	5,09	0,4604	0,97 (0,88 - 1,07)
G ₁₈	557	5	19,56 (17,82 - 21,78)	5,39±0,44	9,97	0,9006	0,99 (0,91 - 1,08)

...continuação Tabela 6.

G ₁₉	355	4	19,61 (16,82 - 22,32)	5,78±0,71	5,66	0,5968	1,0 (0,91 - 1,1)
G ₂₀	364	4	19,75 (18,39 - 21,11)	6,05±0,65	2,93	0,3086	0,99 (0,9 - 1,1)
G ₂₁	563	5	20,45 (18,72 - 22,51)	5,29±0,44	8,83	0,7972	1,04 (0,95 - 1,13)
G ₂₂	562	5	20,02 (19,08 - 21,02)	5,66±0,45	4,48	0,4049	1,02 (0,95 - 1,1)

G= Número de gerações; N= Número de insetos utilizados na experimentação; GL= Grau de Liberdade; CL₅₀=Concentração letal de *Citrus aurantium* L. var. *amara* em (mg.L⁻¹) que reduz em 50% a população de *Plutella xylostella*; I.C= intervalo de confiança; P= Valor de probabilidade de significância para a concentração média letal (P-valor>0.05); TR₅₀= Intervalo de confiança da razão de toxicidade das CL₅₀ (geração sucessiva em relação a anterior) a 95% de probabilidade (Robertson *et al.* 2007); E.P= Erro Padrão; Inclinação= Coeficiente angular relativo; X²= qui-quadrado (P-valor>0.05).

Tabela 7. Concentração média Letal (CL₅₀) do inseticida botânico comercial Azamax® (*Azadirachta indica*) com princípio ativo azadiractina sobre larvas do terceiro ínstar de *Plutella xylostella* (L.) após sucessivas gerações em laboratório.

G	N	GL	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)	Inclinação ± E.P	χ ²	P	TR ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)
G ₀	362	4	1,11 (0,98 - 1,25)	4,64±0,43	4,65	0,4901	***
G ₁	486	4	1,0 (0,87 - 1,16)	2,23±0,2	2,61	0,2752	1,1 (0,93 - 1,3)
G ₂	641	6	0,99 (0,9 - 1,1)	2,48±0,19	2,22	0,1761	1,02 (0,85 - 1,22)
G ₃	306	3	0,95 (0,66 - 1,25)	2,65±0,28	3,73	0,4776	1,05 (0,86 - 1,27)
G ₅	400	3	1,08 (0,85 - 1,35)	2,85±0,25	4,12	0,5266	0,87 (0,71 - 1,07)
G ₇	620	5	1,21 (1,04 - 1,42)	3,19±0,26	10,04	0,9067	0,9 (0,78 - 1,04)
G ₈	419	5	1,3 (0,96 - 1,71)	2,67±0,26	10,7	0,9667	0,93 (0,79 - 1,09)

...continuação Tabela 7.

G ₉	424	5	1,46 (1,2 - 1,77)	2,96±0,39	6,06	0,5475	0,89 (0,74 - 1,08)
G ₁₀	411	5	1,35 (1,03 - 1,7)	2,49±0,27	6,39	0,5768	1,08 (0,88 - 1,33)
G ₁₁	421	5	1,57 (1,38 - 1,79)	2,37±0,23	4,02	0,3632	1,17 (0,95 - 1,44)
G ₁₂	402	3	1,56 (1,11 - 2,33)	2,32±0,21	6,49	0,8309	1,0 (0,83 - 1,22)
G ₁₄	361	4	1,82 (1,35 - 2,41)	2,41±0,27	5,34	0,5626	0,86 (0,69 - 1,07)
G ₁₅	476	6	1,57 (1,31 - 1,86)	2,71±0,25	6,57	0,5220	1,16 (0,94 - 1,44)
G ₁₆	415	5	1,44 (1,18 - 1,74)	2,99±0,26	8,56	0,7736	1,09 (0,92 - 1,29)

G= Número de gerações; N= Número de insetos utilizados na experimentação; GL= Grau de Liberdade; CL₅₀=Concentração letal do inseticida Azamax® (*Azadirachta indica*) em (mg.L⁻¹) que reduz em 50% a população de *Plutella xylostella*; I.C= intervalo de confiança; P= Valor de probabilidade de significância para a concentração média letal (P-valor>0.05); TR₅₀= Intervalo de confiança da razão de toxicidade das CL₅₀ (geração sucessiva em relação a anterior) a 95% de probabilidade (Robertson *et al.* 2007); E.P= Erro Padrão; Inclinação= Coeficiente angular relativo; X²= qui-quadrado (P-valor>0.05).

Tabela 8. Concentração média Letal (CL₅₀) do inseticida sintético comercial Decis® 25 EC com princípio ativo deltametrina sobre larvas do terceiro ínstar de *Plutella xylostella* (L.) após sucessivas gerações em laboratório.

G	N	GL	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)	Inclinação ± E.P	χ ²	P	TR ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)
G ₀	480	4	1,94 (1,34 - 2,62)	2,61±0,27	8,3	0,8752	***
G ₁	479	6	1,86 (1,54 - 2,25)	2,69±0,23	10,82	0,8596	1,04 (0,87 - 1,26)
G ₂	483	6	2,09 (1,76 - 2,45)	2,37±0,26	4,65	0,3692	1,13 (0,92 - 1,37)
G ₃	803	7	2,39 (2,21 - 2,59)	2,86±0,18	5,06	0,3598	0,88 (0,73 - 1,05)
G ₄	623	5	2,53 (2,09 - 3,1)	2,45±0,2	9,87	0,8912	1,06 (0,93 - 1,21)
G ₆	446	3	2,4 (1,98 - 2,91)	2,85±0,22	3,23	0,4137	1,05 (0,9 - 1,23)
G ₇	558	5	2,65 (2,2 - 3,28)	2,55±0,21	9,14	0,8260	1,11 (0,94 - 1,3)
G ₈	363	4	7,47 (6,76 - 8,2)	4,17±0,4	3,43	0,3615	2,82 (2,49 - 3,64)

...continuação Tabela 8.

G ₉	479	6	4,2 (3,64 - 4,86)	3,53±0,3	10,67	0,8475	0,56 (0,38 - 0,75)
G ₁₀	424	5	3,25 (2,56 - 4,4)	2,04±0,22	7,62	0,6883	0,77 (0,49 - 0,88)
G ₁₁	425	5	14,01 (11,94 - 15,43)	7,73±1,04	8,73	0,7884	4,31 (3,67 - 5,73)

G= Número de gerações; N= Número de insetos utilizados na experimentação; GL= Grau de Liberdade; CL₅₀=Concentração letal do inseticida Decis® 25 EC em (mg.L⁻¹) que reduz em 50% a população de *Plutella xylostella*; I.C= intervalo de confiança; P= Valor de probabilidade de significância para a concentração média letal (P-valor>0.05); TR₅₀= Intervalo de confiança da razão de toxicidade das CL₅₀ (geração sucessiva em relação a anterior) a 95% de probabilidade (Robertson *et al.* 2007); E.P= Erro Padrão; Inclinação= Coeficiente angular relativo; X²= qui-quadrado (P-valor>0.05).

Tabela 9. Concentração média Letal (CL₅₀) do inseticida sintético comercial Lufenuron (Match 50 ® EC) sobre larvas do terceiro ínstar de *Plutella xylostella* (L.) após sucessivas gerações em laboratório.

G	N	GL	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)	Inclinação ± E.P	χ ²	P	TR ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% I.C)
G ₀	481	6	0,28 (0,22 - 0,35)	1,72±0,19	5,06	0,4017	***
G ₁	475	6	0,22 (0,19 - 0,25)	5,83±0,66	4,82	0,3831	1,29 (0,99 - 1,68)
G ₂	539	4	0,35 (0,25 - 0,47)	2,35±0,22	7,24	0,7633	1,57 (1,31 - 1,97)
G ₃	539	7	0,39 (0,35 - 0,43)	2,82±0,21	5,47	0,3889	0,9 (0,75 - 1,08)
G ₄	416	5	0,43 (0,37 - 0,49)	3,02±0,3	3,98	0,3598	1,1 (0,93 - 1,3)
G ₅	478	6	0,38 (0,33 - 0,43)	2,93±0,27	4,92	0,3909	1,13 (0,94 - 1,36)
G ₆	373	4	0,48 (0,31 - 0,69)	2,56±0,32	8,39	0,8843	1,25 (1,01 - 1,56)
G ₇	448	3	0,45 (0,38 - 0,52)	2,7±0,29	2,02	0,2586	1,06 (0,83 - 1,35)

...continuação Tabela 9.

G ₈	422	5	0,92 (0,82 - 1,03)	4,47±0,38	6,62	0,5977	2,04 (1,79 - 2,66)
G ₉	804	7	0,51 (0,44 - 0,58)	2,21±0,21	5,15	0,3662	0,55 (0,36 - 0,87)
G ₁₀	556	5	0,58 (0,48 - 0,7)	3,02±0,23	10,23	0,9244	1,14 (0,95 - 1,38)
G ₁₁	297	3	0,58 (0,5 - 0,65)	3,08±0,31	1,17	0,1498	1,0 (0,85 - 1,18)
G ₁₂	423	5	0,45 (0,35 - 0,59)	2,13±0,21	7,78	0,7027	0,78 (0,48 - 1,04)
G ₁₃	361	4	1,73 (1,64 - 1,82)	6,61±0,62	3,59	0,3785	3,84 (2,94 - 4,58)
G ₁₄	414	5	2,9 (2,65 - 3,14)	8,37±0,87	7,38	0,6669	1,68 (1,56 - 1,81)

G= Número de gerações; N= Número de insetos utilizados na experimentação; GL= Grau de Liberdade; CL₅₀=Concentração letal do inseticida Lufenuron em (mg.L⁻¹) que reduz em 50% a população de *Plutella xylostella*; I.C= intervalo de confiança; P= Valor de probabilidade de significância para a concentração média letal (P-valor>0.05); TR₅₀= Intervalo de confiança da razão de toxicidade das CL₅₀ (geração sucessiva em relação a anterior) a 95% de probabilidade (Robertson *et al.* 2007); E.P= Erro Padrão; Inclinação= Coeficiente angular relativo; X²= qui-quadrado (P-valor>0.05).

Tabela 10. Composição química identificada nos extratos a partir das larvas do terceiro ínstar de *Plutella xylostella* (L.) e selecionados aos óleos essenciais, seus constituintes majoritários e inseticidas comerciais após sucessivas gerações em laboratório.

Composto	Massa	Controle (G ₀)	<i>E. caryophyllata</i> (G ₄ -G ₈)	Eugenol (G ₁ -G ₄)	Azamax (G ₁ -G ₅)	<i>Citrus amara</i> (G ₁ -G ₄)	Limoneno (G ₁ -G ₅)	Decis 25 EC (G ₅ -G ₆)	Lufenuron (G ₅ -G ₆)	Limoneno (G ₁₇ -G ₁₈)	Decis 25 EC (G ₉ -G ₁₁)
L-alanina	89,09	XXX	XXX			XXX		XXX			XXX
Fenol	94,11		XXX	XXX	XXX				XXX	XXX	
Uracil	112,08	XXX				XXX		XXX		XXX	XXX
L-Valine	117,15	XXX	XXX	XXX		XXX	XXX		XXX		
Ácido picolínico	123,11		XXX	XXX	XXX		XXX				
Ácido L-pipecólico	129,15	XXX	XXX	XXX		XXX	XXX				
Ácido mesacônico	130,10		XXX		XXX	XXX			XXX		
L-isoleucina	131,17	XXX	XXX		XXX	XXX	XXX			XXX	
Acetilcolina	146,20	XXX	XXX	XXX	XXX		XXX	XXX	XXX		XXX
(S) -2-hidroxi-glutarato	148,11	XXX		XXX	XXX	XXX			XXX	XXX	
D-Lyxose	150,13	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX		XXX	XXX
2-Hidroxi-adenina	151,12	XXX				XXX		XXX		XXX	
D-alanina	160,17			XXX							
L-fenilalanina	165,19	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX				XXX	
Sulfóxido de DL-metionina	165,21	XXX	XXX	XXX		XXX	XXX				
Glicerol 3-fosfato	172,07	XXX	XXX	XXX		XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	
Ácido cáprico	172,26		XXX			XXX		XXX	XXX	XXX	XXX
Ácido alantóico	176,13									XXX	XXX
Ácido hipúrico	179,17	XXX		XXX	XXX	XXX	XXX	XXX		XXX	XXX
D-manose	180,15	XXX			XXX			XXX			XXX
Ácido cafeico	180,16	XXX	XXX	XXX		XXX		XXX			
Ácido dodecanóico	200,31		XXX			XXX			XXX	XXX	XXX
Ácido 3-hidroxidodecanoico	216,31		XXX		XXX			XXX	XXX		XXX

N-acetil-manosamina	221,21	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX		XXX
2'-Desoxiuridina	228,20	XXX			XXX					XXX	XXX
Inosina	268,22	XXX	XXX	XXX	XXX		XXX	XXX	XXX		XXX
Ribosídeo de alopurinol	268,23	XXX	XXX		XXX	XXX	XXX	XXX	XXX		XXX
Ácido 16-hidroxi palmítico	272,42		XXX				XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
Ácido linoleico	280,44	XXX		XXX		XXX		XXX	XXX	XXX	XXX
3'-O-metil-adenosina	281,26	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX			XXX	
Ácido eicosapentaenóico	302,45		XXX	XXX	XXX		XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
5-L-glutamil-L-alanina	331,36	XXX			XXX				XXX		
Ácido beénico	340,58				XXX			XXX	XXX	XXX	XXX
1-Estearoil-sn-glicerol	358,60	XXX	XXX					XXX	XXX	XXX	XXX
Astragalin	448,40	XXX		XXX					XXX		
Ácido folínico	473,44	XXX		XXX	XXX	XXX	XXX		XXX		XXX
Protoporfirina IX	562,65	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX		XXX	XXX	XXX
Ácido pristanico	298,50	XXX	XXX		XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	
Xantine	152,11	XXX	XXX			XXX	XXX	XXX		XXX	XXX
Ácido mirístico	228,37		XXX		XXX			XXX	XXX	XXX	XXX
Tocoferol	430,71	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX			XXX
Ácido palmítico	256,40		XXX			XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX

XXX = detecção do composto na amostra.

Gn = Número de geração.

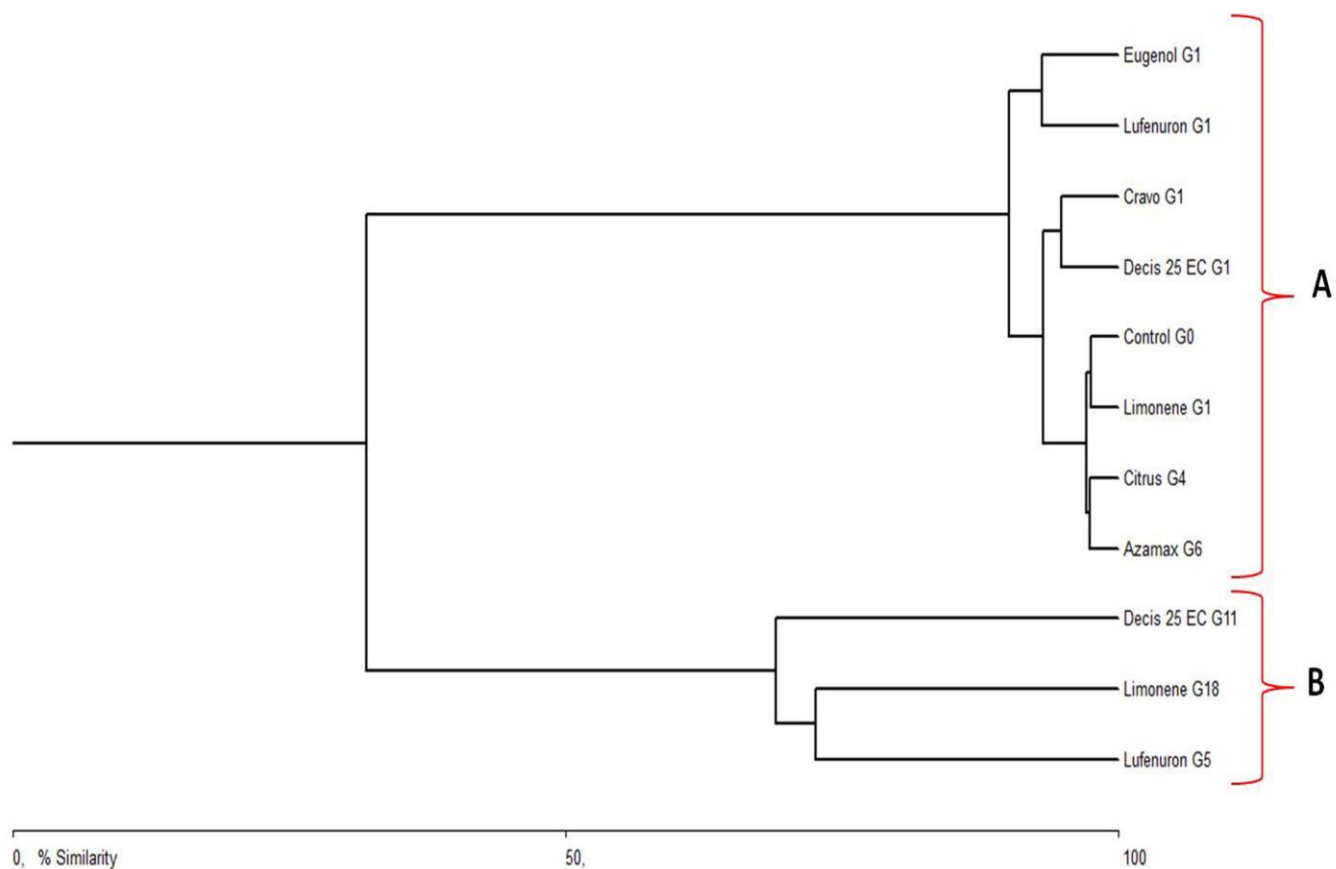


Fig 1. Análise Hierárquica de Clusters entre as gerações sucessivas de *Plutella xylostella* (L.), selecionados aos óleos essenciais e seus constituintes majoritários, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial.

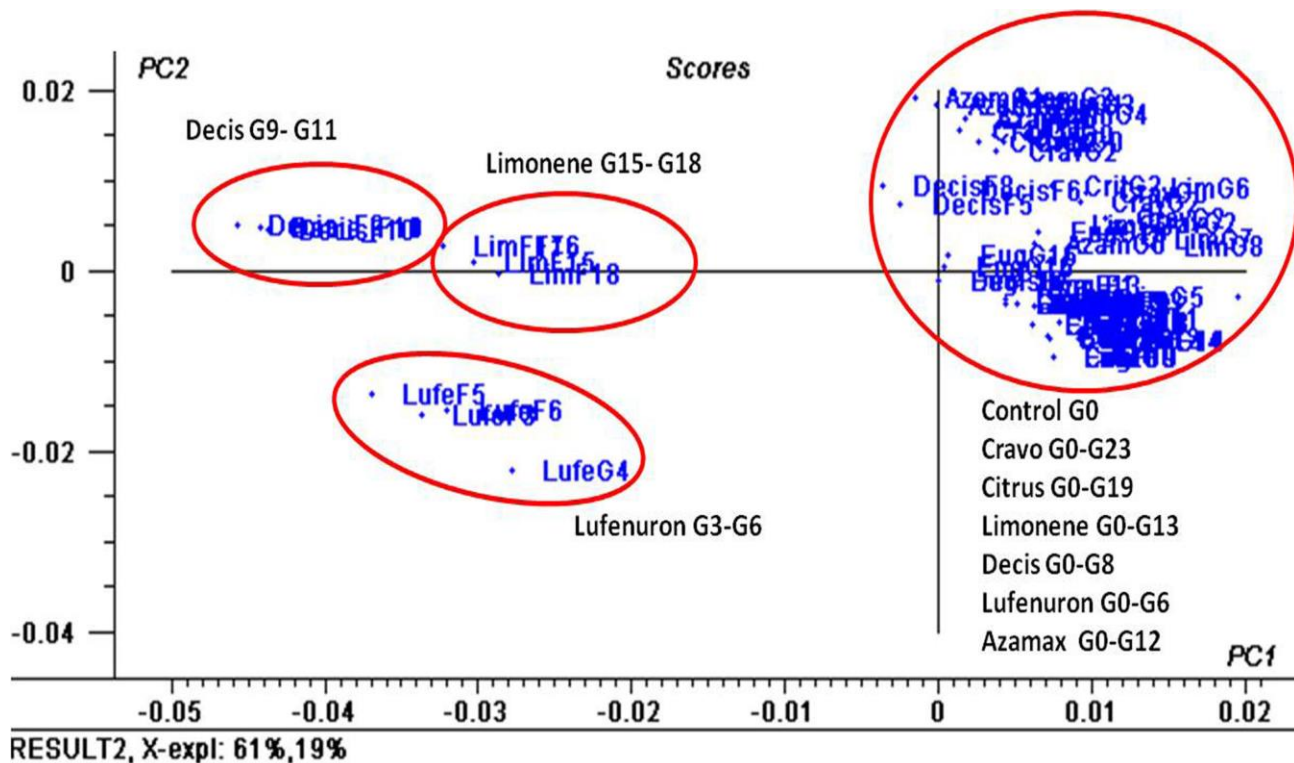


Fig 2. Análise de Componente Principal entre as gerações sucessivas de *Plutella xylostella* (L.), selecionados aos óleos essenciais e seus constituintes majoritários, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial.

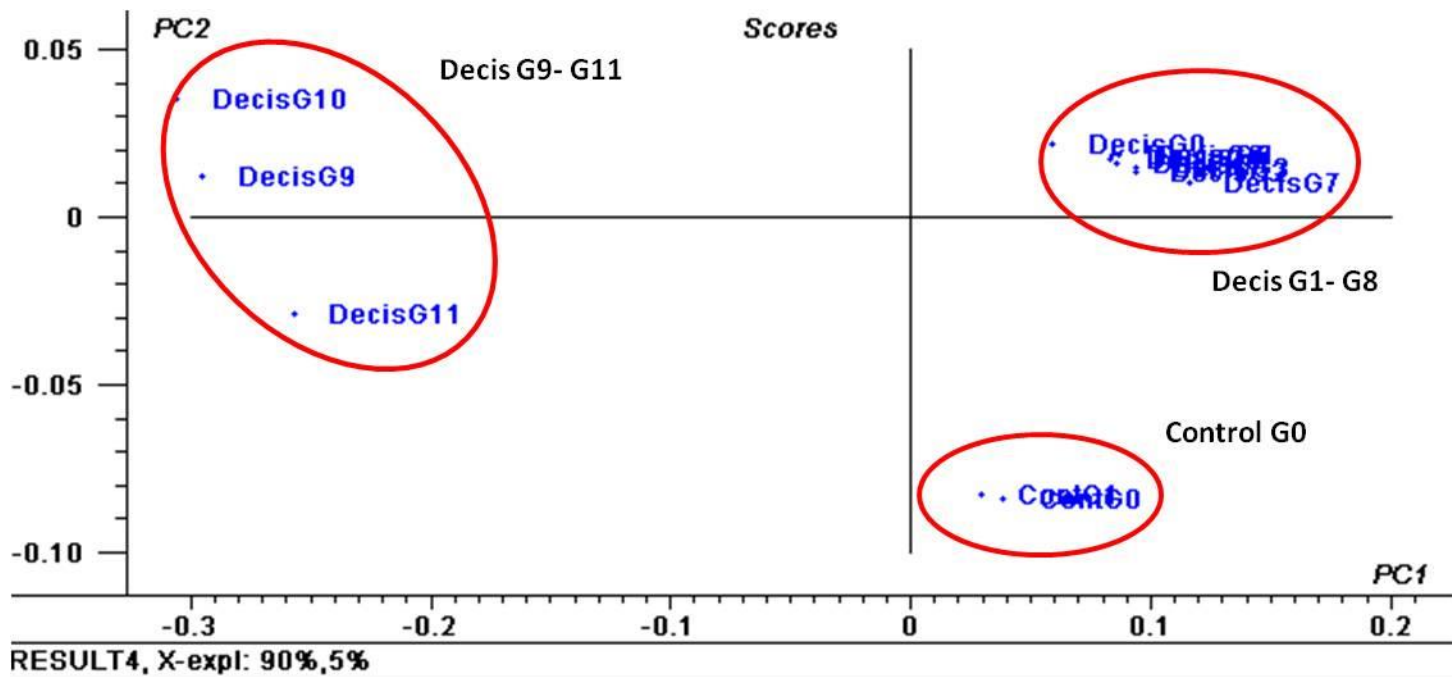


Fig 3. Análise de Componente Principal entre as gerações sucessivas de *Plutella xylostella* (L.), selecionado ao inseticida sintético comercial de Decis® 25 EC com princípio ativo deltametrina.

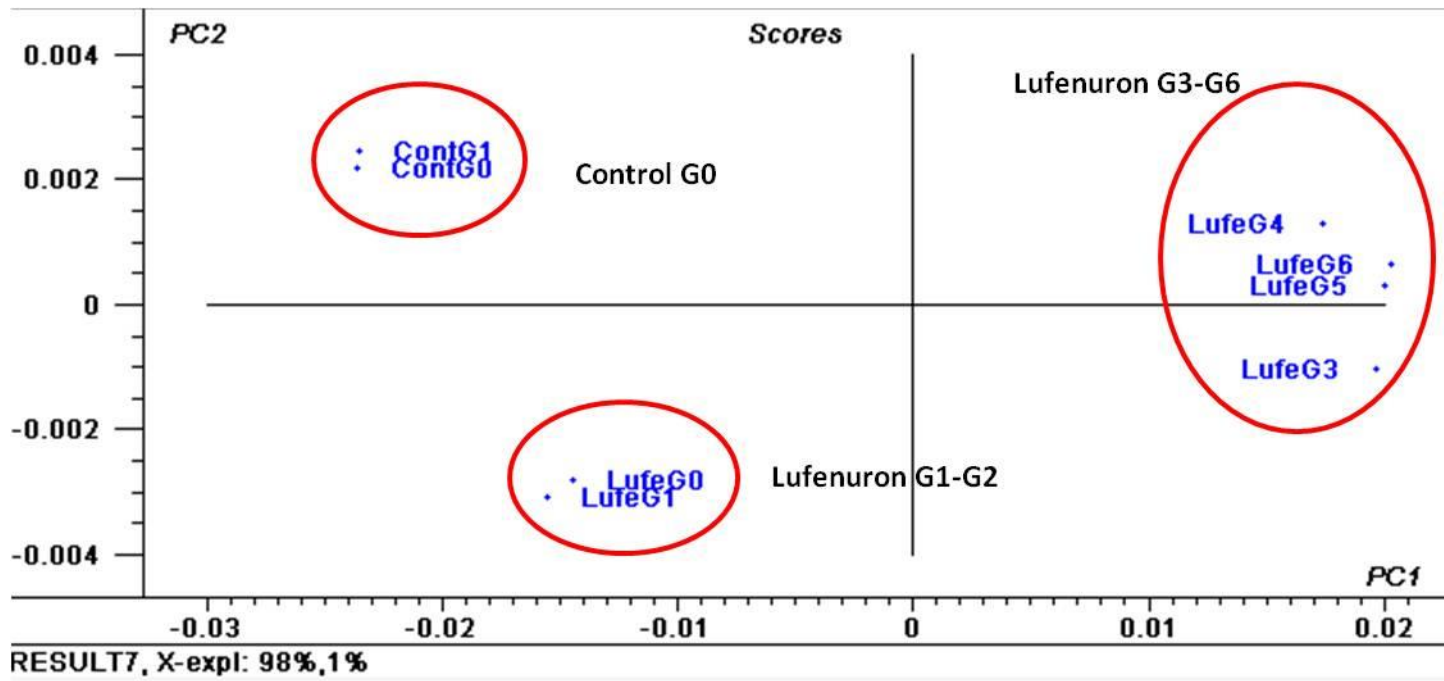


Fig 4. Análise de Componente Principal entre as gerações sucessivas de *Plutella xylostella* (L.), selecionado ao inseticida sintético comercial de Lufenuron (Match 50 ® EC).

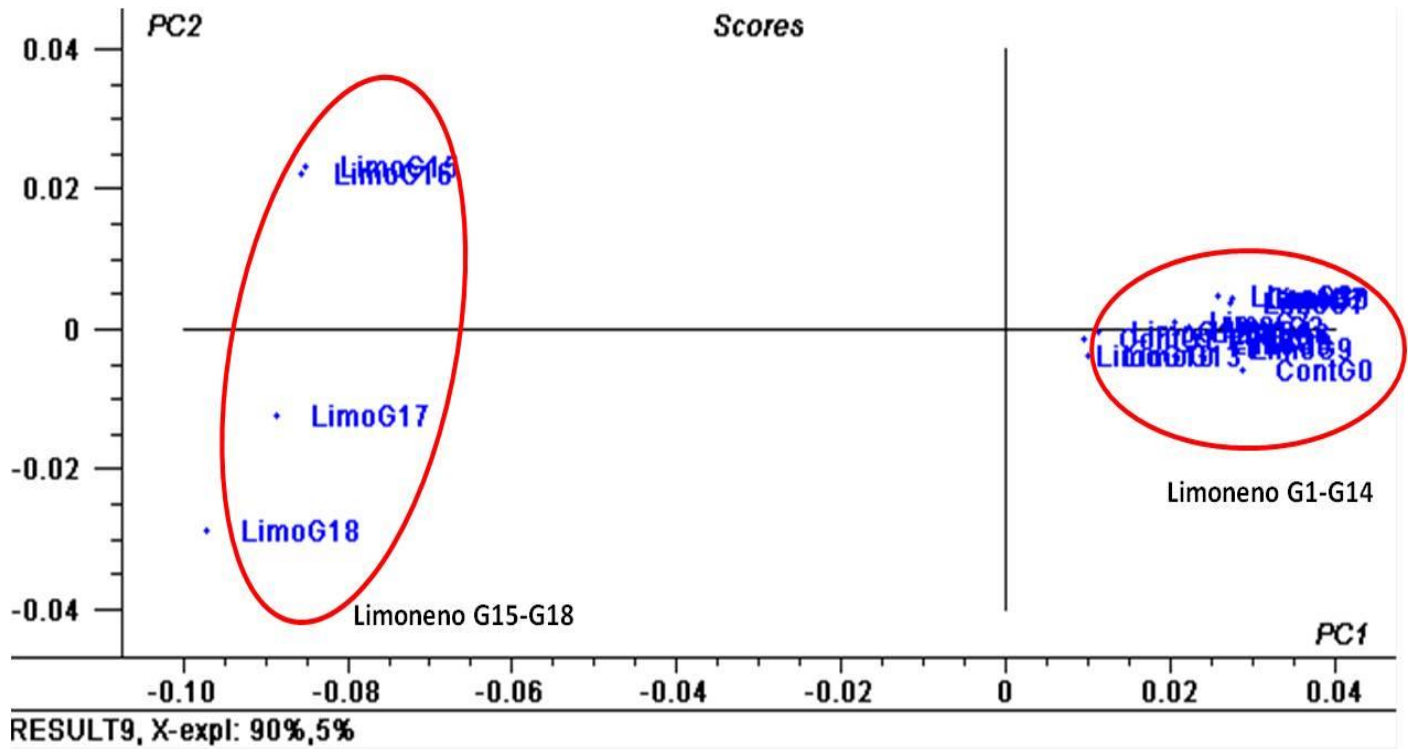


Fig 4. Análise de Componente Principal entre as gerações sucessivas de *Plutella xylostella* (L.), selecionado ao constituinte limoneno proveniente do óleo essencial de laranja amarga (*Citrus aurantium* L. var. *amara*).

CAPÍTULO 3

CAPACIDADE E ADAPTAÇÃO BIOLÓGICA DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) NO MANEJO DE RESISTÊNCIA COM ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS ¹

DONALD MANIGAT² & CLAUDIO A.G. CAMARA³

²Departamento de Agronomia, Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av.

Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE –Brasil.

³Departamento de Química, Produtos Naturais, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE –Brasil.

¹Manigat, D. & C.A.G. Camara. Capacidade e adaptação biológica de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) no manejo de resistência com óleos essenciais e seus constituintes majoritários. A ser submetido.

RESUMO - A capacidade defensiva do inseto contra algumas substâncias bioativas é avaliada através parâmetros relacionados com sua sobrevivência. Portanto, os insetos resistem à exposição de inseticidas por meio de mecanismos biológicos. Assim, este trabalho objetivou-se avaliar os requisitos adaptativos de sobrevivência de *P. xylostella* quando são selecionados aos constituintes majoritários Eugenol e Limoneno pertencentes aos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (Tumb) e *Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), respectivamente, comparados ao inseticida botânico comercial Azamax® e aos inseticidas sintéticos comerciais Decis® 25 EC e Lufenuron (Match 50 ® EC). Os recursos adaptativos foram avaliados através de parâmetros, como: i) tempo da duração de incubação de ovos, do período larval, pupal e duração de oviposição das fêmeas, ii) peso de pupas e larvas no estágio de 4º ínstar, iii) emergência de machos/fêmeas e razão sexual, iv) viabilidade de pupas, fecundidade e fertilidade de fêmeas, v) sobrevivência de fêmeas, vi) fatores biológicos de crescimento populacional, tais como: taxa líquida de reprodução (R_0), T = tempo médio entre gerações (T), taxa intrínseca de crescimento (R_m), tempo de duplicação da população (TD) e razão finita de aumento da população (λ). Os resultados mostraram que os formulados a base de óleos essenciais e inseticidas comerciais interferiram negativamente no peso das pupas, na duração de período larval, na duração de período pupal, fecundidade, fertilidade e longevidade na vida das fêmeas. No experimento sobre os fatores biológicos de crescimento populacional, observou-se que houve diferenças na taxa líquida de reprodução (R_0) e no tempo médio entre gerações (T). Os óleos essenciais e seus constituintes majoritários mostraram efeitos negativos na sobrevivência de *P. xylostella* através da resposta biológica de crescimento populacional.

PALAVRAS-CHAVE: Parâmetros biológicos, *Eugenia caryophyllata*, *Citrus aurantium*, crescimento populacional, taxa líquida, reprodução

BIOLOGICAL CAPACITY AND ADAPTATION OF *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) IN RESISTANCE MANAGEMENT WITH ESSENTIAL OILS AND THEIR MAJOR CONSTITUENTS

ABSTRACT – The insect's defensive capacity against some bioactive substances is generally measured by some adaptation parameters that relate to its survival. Therefore, insects resist exposure to insecticides through biological factors or mechanisms. Thus, this work aimed to evaluate the adaptive survival requirements in the resistance management of *P. xylostella* selected to the major constituents Eugenol and Limoneno belonging to the essential oils of *Eugenia caryophyllata* (Tumb) and *Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), respectively, compared with the commercial botanical insecticide Azamax®, the commercial synthetic insecticide Decis® 25 EC and the commercial synthetic insecticide Lufenuron (Match 50 ® EC). Thus, the adaptive requirements were evaluated through parameters such as: i) egg incubation time, larval and pupal period and female oviposition duration, ii) pupae and larvae weight in the 4th instar stage, iii) male/female emergence and sex ratio, iv) pupae viability, fecundity and fertility, v) female survival, vi) biological factors of population growth, such as: net reproduction rate (R_0), T = average time between generations (T), intrinsic growth rate (R_m), population doubling time (TD) and finite population increase ratio (λ). The results showed that the formulations based on essential oils and commercial insecticides interfered negatively on the pupae weight, on the duration of the larval period, on the duration of the pupal period, fecundity, fertility and longevity in the female's life. In the experiment on biological factors of population growth, it was observed that there were differences in the net reproduction rate (R_0) and in the average time between generations (T). The effects of essential oils and their major constituents on *P. xylostella* can be

measured through the biological response of population growth in the resistance management program.

KEY WORDS: Biological parameters; *Eugenia caryophyllata*, *Citrus aurantium*, population growth, net rate, reproduction

Introdução

A traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella* L.) é uma das pragas agrícolas de importância nas brássicas folhosas devido aos prejuízos econômicos que causam na produção e rendimento das espécies cultivadas (Zalucki *et al.* 2012). É cosmopolita e tem uma ampla distribuição geográfica, como também tem grande aptidão para desenvolver em ambientes diversificados (Badenes-Perez *et al.* 2004). Diversos métodos são utilizados para o manejo de *P. xylostella* nas brássicas folhosas, dentre eles podemos destacar como, controle químico, genético, biológico e uso de compostos ativos provenientes de plantas (Li *et al.* 2019). A utilização de inseticidas a base de metabólitos ativos em plantas no manejo de artrópodes-praga tem sido destacada na agricultura orgânica (Vasilev *et al.* 2019). Pavela (2012) e Silva *et al.* (2019) já observaram a toxicidade de óleos essenciais e efeitos fisiológicos sobre o desenvolvimento de *P. xylostella*, pois, os principais compostos dos óleos essenciais atuam com modo de ação diferente na mortalidade, também podem ter efeito fisiológico sobre o crescimento e a postura dos insetos. As grandes quantidades de componentes presentes nos óleos essenciais assumem um importante papel, pois como são vários compostos bioativos, estes podem variar simultaneamente por letalidade sobre as funções biológicas dos insetos (Qian *et al.* 2008). As populações de insetos resistentes surgem através de uso excessivo de um mesmo princípio ativo ou na pressão seletiva de inseticidas (Zhao *et al.* 2006). Existe uma coevolução de defesas entre os insetos fitófagos e as plantas há milhões de anos, essa dinâmica tem levado os insetos a desenvolverem diversos mecanismos contra os compostos ativos, isso reflete a capacidade de insetos para desviar os efeitos tóxicos de defensivos químicos (Jermy 1984, A Jongsma & Beekwilder 2011). Pois, a capacidade defensiva do inseto contra substâncias ativas se atribui com a ativação de alguns mecanismos bioquímicos ou fisiológicos que

atuam na degradação de moléculas ou compostos químicos em insetos tolerantes (Dawkar *et al.* 2013).

Portanto, uma determinada tolerância se identifica no inseto como um grau de modificação que cria uma impossibilidade de um composto ou inseticida interferir nas funções biológicas (Russell *et al.* 2011). Outro fator, os mecanismos de resistência geralmente levam uma modificação nos fatores bióticos do inseto, evitando ou reduzindo os efeitos adversos. O inseto pode alterar sua capacidade biológica para eliminar as substâncias tóxicas do seu organismo após um período de exposição (Wilson 2004). Como os inseticidas a base de metabólitos ativos em plantas apresentam efeitos agudos ou crônicos da toxicidade sobre os artrópodes, é importante destacar estudos voltados sobre a capacidade biológica e os custos associativos em resposta das principais consequências no ciclo vital e desenvolvimento (Jensen *et al.* 2016).

Assim, este trabalho objetivou-se avaliar os requisitos adaptativos de sobrevivência de *P. xylostella* quando são selecionados aos constituintes majoritários Eugenol e Limoneno pertencentes aos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (Tumb) e *Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), respectivamente, comparados ao inseticida botânico comercial Azamax®, inseticida sintético comercial Decis® 25 EC e Lufenuron (Match 50 ® EC).

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Investigação Química dos Inseticidas Naturais (LABIQIN) do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (PPGE) do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Insetos e Criação em Laboratório. Foi utilizada uma população de *P. xylostella* suscetível de referência a inseticidas químicos, criada desde 1998 e mantida no Laboratório de Investigação Química dos Inseticidas Naturais (LABIQIN) do PPGE da UFRPE na ausência de pressão de

seleção por inseticidas e alimentadas somente com folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga) orgânicas produzidas em casa de vegetação. A criação de *P. xylostella* foi mantida conforme as recomendações descritas por Torres *et al.* (2006), com algumas adaptações, multiplicada e mantida em sala climatizada: (Temperatura, T: 25 ± 2 °C); (Umidade Relativa, UR: $70 \pm 10\%$) e Fotoperíodo de 12 horas.

Os adultos de *P. xylostella* foram mantidos e confinados em gaiolas plásticas transparentes retangulares ou circulares (12 cm de diâmetro x 15 cm de altura) com abertura lateral fechada em tela de náilon para a ventilação. Dentro das gaiolas, foram oferecidos discos foliares de couve e cortada na medida de oito centímetros de diâmetro para que as fêmeas possam colocar as posturas, sobrepostos a um papel de filtro e este sobrepoõe esponjas umedecidas com água e dimensionada no interior de uma placa de Pétri. Para alimentar os adultos, uma solução de mel a 10% diluída em água foi oferecida e colocada em pedaços de algodão disponibilizados em copo plástico de 50 mL no interior das gaiolas de criação para favorecer o regime nutritivo dos adultos. Os discos foliares de couve contendo as posturas foram transferidos a cada 24 horas para recipientes plásticos retangulares (6,0 x 11 x 16 cm) com abertura na tampa, fechada com tecido voil para ventilação onde os ovos entraram na fase de incubação até a eclosão.

Após a eclosão dos ovos, folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga) produzidas em casa de vegetação própria foram oferecidas as larvas recém-eclodidas como alimento e trocadas diariamente incluindo a limpeza das gaiolas até a formação das pupas. Antes de alimentar as larvas, as folhas de couve foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 1%, enxaguadas três vezes em água corrente, a fim de evitar uma possível ação de contaminação por patógenos. As pupas foram coletadas e mantidas em tubos de ensaio cobertos com filme plástico PVC contendo pequenas perfurações para permitir trocas gasosas, que posteriormente foram transferidos em outras gaiolas para a emergência dos adultos.

Obtenção dos Óleos Essenciais, Compostos Majoritários e Inseticidas. Foram utilizados óleos essenciais (OEs) comerciais de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* (Tumb), Myrtaceae) e laranja amarga (*Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), Rutaceae), tais como os constituintes majoritários desses OEs Eugenol e Limoneno, todos foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil e FERQUIMA Ind. e Com. Ltda. Após a aquisição, todos os óleos essenciais e constituintes foram armazenados em ambiente adequado e/ou recomendado com o objetivo de manter a integridade química para o uso posterior. Os inseticidas comerciais, como o inseticida botânico Azamax® (12 g i.a./L C.E., E.I.D. Parry) com princípio ativo azadiractina, Decis® 25 EC (25 g i.a./L C.E., Bayer CorpScience) com princípio ativo deltametrina e Lufenuron (Match 50 i.a. g/L C.E, Syngenta S.A) que foram adquiridos em lojas autorizadas para a comercialização de produtos fitossanitários.

Seleção de Insetos aos Óleos Essenciais, Constituintes Majoritários e Inseticidas sintéticos. A metodologia adaptada e proposta por Iqbal & Wright (1997) foi empregada neste experimento para seleção de insetos aos formulados em condições de laboratório. Para iniciar a pressão de seleção, foi utilizada a população de *P. xylostella* suscetível de referência do estoque da criação de Laboratório de Investigação Química dos Inseticidas Naturais (LABIQIN). Foram utilizadas entre 1.500 a 2.300 larvas de terceiro ínstar de *P. xylostella* para iniciar a pressão de seleção em condições de laboratório, as larvas foram expostas com folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga) tratadas a partir da concentração média letal (CL₅₀) pré-determinada com formulados de óleos essenciais e/ou constituintes majoritários e inseticidas comerciais, as folhas de couve foram trocadas a cada 24 h, em seguida as larvas foram transferidas para outros recipientes de criação até completar o seu ciclo total. Cada formulado de óleos essenciais ou constituintes e inseticida comercial foram usados separadamente na exposição de larvas do terceiro ínstar de *P. xylostella* a pressão de seleção. Foram selecionadas 24, 22, 25, 22 números totais de gerações com Eugenol,

Eugenia caryophyllata (Tumb), Limoneno e *Citrus aurantium* L. var. *amara* (Engl), respectivamente, tais como os inseticidas comerciais de 16, 11, 14 números totais de gerações com Azamax®, Decis® 25 EC e Lufenuron, respectivamente, em condições de laboratório e mantida na sala climatizada: (Temperatura, T: 25 ± 2 °C); (Umidade Relativa, UR: $70 \pm 10\%$) e Fotoperíodo de 12 horas.

Capacidade e adaptação biológica de *P. xylostella* por sucessivas gerações, selecionados aos óleos essenciais, constituintes majoritários e inseticidas sintéticos. Para o experimento, a avaliação inicial foi realizada a partir da escolha aleatória do total de 110 ovos depositados no intervalo de 12h por fêmeas de *P. xylostella*. A metodologia adaptada e proposta por Abdel-Salam & Abdel-Baky (2001) foi empregada neste experimento para a estimativa dos fatores biológicos. Os ovos foram distribuídos por grupo de 10 em cada placa de Pétri. Para cada formulado, foram montadas onze (11) placas de Pétri com disco de papel filtro no fundo dos quais corresponderam ao número de repetições para cada tratamento. Após a eclosão dos ovos, folhas de couve (*Brassica oleraceae* cv. Manteiga) foram oferecidas as larvas recém-eclodidas como alimento e trocadas diariamente. Em seguida, as larvas foram acompanhadas até a formação de pupas. Foram avaliados: período de incubação de ovos, período e viabilidade de larvas, peso de larvas no estágio de 4º ínstar, período e viabilidade de pupas, peso de pupas após 24 horas de emergência, emergência de adultos e razão sexual.

Para o experimento de Tabela de Vida e Fertilidade de *P. xylostella*, a metodologia adaptada e proposta por Birch (1948) foi empregada para estimar e calcular conjuntamente as variáveis: sobrevivência, viabilidade, fecundação, fertilidade, tempo médio de geração (T), taxa de crescimento (λ), taxa líquida de reprodução (R0), taxa intrínseca de crescimento populacional (Rm) e tempo médio para duplicar a população inicial (TD) de *P. xylostella*. Após a emergência e sexagem dos adultos, foram separados 11 casais a cada tratamento e 11 repetições, no qual cada

casal foi colocado individualmente numa gaiola de criação. Dentro as gaiolas, foram disponibilizados discos foliares de couve e cortada na medida de cinco centímetros de diâmetro para que as fêmeas possam colocar as posturas, sobrepostos a um papel de filtro e este sobrepõe no algodão umedecido com água e dimensionado no interior de copo plástico descartável. Para alimentar os casais, uma solução de mel a 10% diluída em água foi oferecida e colocada em pedaços de algodão pendurado no interior das gaiolas de criação. Após a oviposição das fêmeas, a contagem dos ovos foi feita separadamente para cada gaiola. Os discos foliares de couve contendo as posturas foram retirados e transferidos a cada 24 horas em placas de Petri até a eclosão das larvas, mantida em sala climatizada: (Temperatura, T: 25 ± 2 °C); (Umidade Relativa, UR: $70 \pm 10\%$) e Fotoperíodo de 12 horas.

Os dados de fatores biológicos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk (W) e homogeneidade para a análise de variância (ANOVA) seguidas de teste Tukey a $p \leq 0,05$ por meio do Sistema SAS para Windows versão 9.00 (SAS Institute, 2001). Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis para avaliar diferenças entre os tratamentos.

Os dados de Tabela de Vida e Fertilidade foram analisados pelo modelo de Jackknife por meio do Sistema SAS para Windows versão 9.00 (SAS Institute, 2001). Quando não normalizar, os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$ ou arco seno de $\sqrt{(X/100)}$.

Resultados

Capacidade e adaptação biológica de *P. xylostella* por sucessivas gerações, selecionados aos óleos essenciais, constituintes majoritários e inseticidas sintéticos. Ao comparar os resultados da duração de incubação de ovos, do período larval e pupal, duração de oviposição em relação ao tratamento testemunha como referência para definir o período de crescimento de *P. xylostella*, verificou-se que há diferenças ($P < 0,05$) entre os insetos selecionados aos óleos essenciais de *E.*

caryophyllata, *C. aurantium* var. *amara*, tais como os constituintes majoritários Eugenol e Limoneno, os inseticidas comerciais Azamax®, Decis® 25 EC e Lufenuron ($F_{7,80} = 2,03$; $p = 0,041$). O maior período de incubação de ovos ($4,09 \pm 0,13$ dias) foi observado para o constituinte majoritário Limoneno e os menores períodos de incubação de ovos ($2,4 \pm 0,06$ e $2,6 \pm 0,09$ dias) foram observados para Azamax® e Decis® 25 EC, respectivamente (Tabela 1). Para o período larval, *E. caryophyllata* e Eugenol apresentaram maiores tempos ($12,44 \pm 0,33$ e $13,24 \pm 0,41$ dias), respectivamente, para o desenvolvimento de *P. xylostella* na fase imatura e Azamax® o menor tempo ($9,63 \pm 0,18$ dias) (Tabela 1). Na avaliação do período pupal, o inseticida comercial Decis® 25 EC levou o menor tempo ($3,13 \pm 0,21$ dias) até a fase de emergência dos adultos (Tabela 1). Entretanto, na avaliação do período de oviposição das fêmeas, o menor tempo de posturas ($6,72 \pm 0,54$ dias) foi observado para o óleo essencial de *C. aurantium* var. *amara* (Tabela 1).

Em relação aos efeitos dos óleos essenciais, os constituintes majoritários e os inseticidas comerciais sobre o peso de larvas no estágio de 4º ínstar (Fig 1 e 2), foram observados valores significativos, sendo que os insetos selecionados com Eugenol ($6,18 \pm 0,46$ mg) e Azamax® ($6,38 \pm 0,47$ mg) apresentaram uma diminuição no peso das larvas, Limoneno ($6,49 \pm 0,36$ mg), Lufenuron ($7,18 \pm 0,42$ mg) e Decis® 25 EC ($7,29 \pm 0,45$ mg) se comportaram como intermediários, mas *E. caryophyllata* ($8,27 \pm 0,55$ mg), *C. aurantium* var. *amara* ($9,49 \pm 0,26$ mg) não diferenciaram do tratamento testemunha ($9,45 \pm 0,26$ mg). Na avaliação dos efeitos dos produtos sobre o peso das pupas, foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos em relação à testemunha ($7,96 \pm 0,35$ mg) (Fig 3 e 4), foram observados que os insetos selecionados com Azamax® ($6,07 \pm 0,41$ mg) apresentaram uma diminuição no peso das pupas, Decis® 25 EC ($6,69 \pm 0,25$ mg), Eugenol ($6,78 \pm 0,46$ mg), Limoneno ($6,89 \pm 0,28$ mg) e *E. caryophyllata* ($7,03 \pm 0,6$ mg) se comportaram como intermediários, mas Lufenuron ($7,63 \pm 0,36$ mg), *C. aurantium* var. *amara* ($9,3 \pm 0,32$ mg) não diferenciaram da testemunha (Fig 3 e 4).

Verificou-se que não houve diferença ($P < 0,05$) na emergência de machos, fêmeas e razão sexual entre os insetos selecionados com os óleos essenciais de *E. caryophyllata*, *C. aurantium* var. *amara*, tais como os constituintes majoritários Eugenol e Limoneno, os inseticidas comerciais Azamax®, Decis® 25 EC e Lufenuron (Tabela 2).

Ao analisar a viabilidade de pupas, fecundidade e fertilidade das fêmeas, observou-se que houve diferenças ($P < 0,05$) entre os insetos selecionados com os óleos essenciais de *E. caryophyllata*, *C. aurantium* var. *amara*, tais como os constituintes majoritários Eugenol e Limoneno, os inseticidas comerciais Azamax®, Decis® 25 EC e Lufenuron ($F_{7,80} = 4,3$; $p = 0,013$; $F_{7,80} = 5,56$; $p < .0001$; $F_{7,80} = 2,07$; $p = 0,046$) (Tabela 3). Quando avaliou-se a viabilidade de pupas, observou-se que não ocorreram efeitos negativos nos números de pupas viáveis entre os tratamentos de insetos selecionados em relação à testemunha. Em relação à fecundidade das fêmeas, observou-se que houve diferenças ($P < 0,05$) no número médio de ovos por fêmea nos tratamentos de insetos selecionados com Decis® 25 EC ($72,9 \pm 17,68$), Azamax® ($76,72 \pm 21,85$), Lufenuron ($81,09 \pm 14,99$), *E. caryophyllata* ($101,36 \pm 14,21$), Eugenol ($102,36 \pm 21,62$) e Limoneno ($106,63 \pm 10,72$) quando comparar com a testemunha ($192,45 \pm 9,03$). Na fertilidade das fêmeas, observou-se que houve diferença ($P < 0,05$) no número médio de ovos eclodidos na pós-oviposição somente no tratamento de insetos selecionados com Azamax® ($30,47 \pm 5,4\%$) em relação à testemunha ($58,18 \pm 3,95\%$) (Tabela 3).

Ao analisar a sobrevivência de *P. xylostella* na fase imatura, observou-se que houve diferença ($P < 0,05$) no número de insetos sobrevividos até a fase adulta somente no tratamento de insetos selecionados com *C. aurantium* var. *amara* ($51,81 \pm 2,26\%$) comparado com a testemunha ($67,27 \pm 3,32\%$) ($F_{7,80} = 2,05$; $p = 0,0048$) (Fig 5).

Na avaliação de longevidade da fêmea, observou-se que houve diferenças ($P < 0,05$) no número médio de dias da fêmea após sua emergência nos tratamentos de insetos selecionados com

C. aurantium var. *amara* (5,75±1,79), Azamax® (6,5±1,33), *E. caryophyllata* (7,0±1,29), Eugenol (7,85±1,4) e Lufenuron (8,2±2,39) quando comparar com a testemunha (14,28±2,3) ($F_{7,80} = 1,09$; $p = 0,032$) (Fig 6).

De acordo com a metodologia utilizada no experimento para avaliar os fatores biológicos de crescimento populacional de *P. xylostella* quando selecionar aos óleos essenciais, seus constituintes majoritários e inseticidas comerciais, verificou-se que houve diferenças ($P < 0,05$) na taxa líquida de reprodução (R_0) para os insetos selecionados com Azamax® 25,59 (7,43 - 43,76) e Lufenuron 31,83 (20,40 - 43,27), também no tempo médio entre gerações (T) para Azamax® [15,50 (15,11 - 15,89) dias] e Decis® 25 EC [16,87 (16,56 - 17,17) dias] quando comparado com a testemunha mas não houve diferenças ($P < 0,05$) na taxa intrínseca de crescimento (R_m), no tempo de duplicação da população (TD) e na razão finita de aumento (λ). Entretanto, para os insetos selecionados com *E. caryophyllata* (101,36±14,21), Eugenol (102,36±21,62), Limoneno (106,63±10,72) e *C. aurantium* var. *amara*, observou-se que houve diferenças ($P < 0,05$) na taxa líquida de reprodução (R_0), no tempo médio entre gerações (T), na taxa intrínseca de crescimento (R_m), no tempo de duplicação da população (TD) e na razão finita de aumento (λ) em relação à testemunha (Tabela 4).

Discussão

Capacidade e adaptação biológica de *P. xylostella* por sucessivas gerações, selecionados aos óleos essenciais, constituintes majoritários e inseticidas sintéticos. Nossos resultados mostraram diferenças no período de crescimento, redução de peso, limitação da fecundade de *P. xylostella* ao ser selecionado com óleos essenciais de *E. caryophyllata*, *C. aurantium* var. *amara*, os constituintes majoritários Eugenol e Limoneno, os inseticidas comerciais Azamax®, Decis® 25 EC e Lufenuron, indicando que houve alteração no sistema biológico quando os insetos foram

submetidos a pressão seletiva. Os inseticidas, além de causarem a mortalidade e inibição de crescimento por efeitos letais, também são capazes de alterar diversos fatores biológicos dos insetos tais como, longevidade, viabilidade, peso, emergência dos adultos, razão sexual, fecundidade, fertilidade e os parâmetros de crescimento populacional (Steinbach *et al.* 2017, Wang *et al.* 2018, Barbosa *et al.* 2020).

Nossos resultados corroboram com as evidências de outros trabalhos que mostram os efeitos de inseticidas sobre a biologia de *P. xylostella* e outros artrópodes, tais como a longevidade, desenvolvimento, viabilidade larval e pupal, fecundidade, fertilidade e fatores de crescimento populacional (Cao & Han 2006, Murugan 2011, Zaka *et al.* 2014, Barbosa *et al.* 2020, Uesugi 2021). A partir dos resultados obtidos, podemos mencionar que tais limitações fazem com que seja necessária uma redução de algumas necessidades biológicas de *P. xylostella*, para que as gerações parentais possam criar um equilíbrio de sobrevivência mesmo sob a pressão de seleção aos inseticidas (Kliot & Ghanim 2012). Hafeez *et al.* 2019, ao analisar durante 10 gerações consecutivas sob pressão seletiva de *Spodoptera exigua* (Hübner) ao composto gossypol e o ingrediente ativo deltametrina, concluíram que os insetos expostos limitaram a fecundidade e também reduziram drasticamente a longevidade dos adultos após a emergência.

Entretanto, os efeitos letais provocados por inseticidas naturais à base de metabólitos de plantas e inseticidas comerciais aos artrópodes podem trazer outras consequências negativas, prejudicando de uma forma geral, tal como: retardar ou prolongar o desenvolvimento (El Hag *et al.* 1999), aumentar seu ciclo vital (Steinbach *et al.* 2017), causar deformações (Stamopoulos *et al.* 2007, Souza *et al.* 2021) e diminuir a fertilidade (Ajanta *et al.* 2010). Khan (2018), ao analisar os parâmetros biológicos de *Musca domestica* (L.) sob a pressão seletiva de espinosade após várias gerações, observou que houve uma redução na fertilidade e fecundidade, período longo de incubação de ovos e baixa taxa de emergência dos adultos, além de diferenças na taxa intrínseca de

crescimento populacional, taxa de crescimento e taxa líquida de reprodução. O autor concluiu que, tal observação deixa explícita que as mudanças nas funções biológicas em insetos ao expor a inseticidas podem ser uma estratégia para manter ou promover a dinâmica populacional.

Rharrabe *et al.* (2008), analisaram os efeitos do ingrediente ativo azadiractina sobre as larvas no estágio de 4º instar de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera). Durante análises em laboratório nas concentrações de 2 e 4 ppm, os autores concluíram que a azadiractina provocou o atraso no desenvolvimento, a perda de peso larval e inviabilidade pupal quando comparar com os insetos que não foram expostos. Outra observação relevante foi que os insetos que tiveram contato com azadiractina mostraram-se uma perda acentuada nos teores de proteína, glicogênio e lipídios, ou seja, precisavam gastar mais energia para completar os ínstars. Cao & Han (2006) estudaram o desempenho de *P. xylostella* ao inseticida hormonal tebufenozide na pressão de seleção e após 35 gerações consecutivas em condições de laboratório, observou-se uma influência negativa na reprodução. Embora o efeito sobre a reprodução tenha sido observado, segundo os autores, as fêmeas conseguiram evitar ampla atividade de cópula, esse comportamento deve ser pelo fato de estresse sofrido devido os efeitos do inseticida. Cai *et al.* (2016), avaliaram os efeitos biológicos de saponinas sobre as larvas no estágio de 2º instar de *P. xylostella* após uma exposição direta na concentração de CL₅₀, tiveram menor peso de pupas, durações no período de larva e pupa, redução na taxa de pupação, baixa emergência de adulto, fecundidade reduzida, mas durações nos períodos de larva e pupa. Tal efeito de redução de peso e aumento de ciclo, pode ser pela conversão da maioria dos alimentos em energia para metabolizar os compostos ou ingredientes ativos dos inseticidas.

As ações biológicas dos óleos essenciais sobre os artrópodes são múltiplas e podem variar com os mecanismos de bioatividade. Estudos demonstraram a interferência do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) na biologia e imunidade humoral de *Spodoptera*

frugiperda (Lepidoptera), aumentando a duração do período pupal e alterando os níveis de fenoloxidase e óxido nítrico na hemolinfa do inseto (Cruz *et al.* 2014). Ao testar os compostos fenólicos extraídos de *Alibertia intermedia* (Mart.) e *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum sobre o desempenho biológico de *P. xylostella*, Peres *et al.* (2017) evidenciaram algumas alterações na biologia do inseto e concluiu que os compostos fenólicos interferiram em todas as fases biológicas tais como no prolongamento da fase larval e pupal, baixa fecundidade nas fêmeas, menor taxa de eclosão dos ovos e surgimento de anormalidades morfológicas.

Contudo, as alterações biológicas em *P. xylostella* são resultados de exposição aos inseticidas. Além disso, os insetos podem diminuir ou interromper as fases, a metamorfose e o desenvolvimento ou mesmo entrar em diapausa, de acordo com suas necessidades biológicas (Banazeer *et al.* 2020, Bird *et al.* 2020).

A capacidade e adaptação biológica de *P. xylostella* são fatores fundamentais na sua dinâmica populacional e sobrevivência. Por isso, sob a pressão de seleção o inseto variou suas características biológicas (Kliot & Ghanim 2012, Banazeer *et al.* 2020, Chen *et al.* 2020). Assim, é extremamente importante conhecer as principais respostas biológicas dos insetos quando são expostos aos inseticidas. Desta maneira, o manejo de resistência de *P. xylostella* baseada na sua capacidade e adaptação biológica após ser selecionado com óleos essenciais e seus constituintes majoritários, pode ser uma estratégia importante para gerar conhecimentos na utilização de inseticidas naturais em programas de manejo integrado de pragas (MIP).

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa PROEX de estudo concedida à Donald Manigat, pelo financiamento da pesquisa (Processo #88882.183152/2018-01) e pela bolsa do Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) – CAPES-PRINT (Processo #88887.364426/2019-00).

Literatura Citada

- A Jongsma, M. & Beekwilder, J. 2011.** Co-evolution of insect proteases and plant protease inhibitors. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 12: 437-447.
- Abdel-Salam, A. H. & Abdel-Baky, N. F. 2001.** Life table and biological studies of *Harmonia axyridis* Pallas (Col., Coccinellidae) reared on the grain moth eggs of *Sitotroga cerealella* Olivier (Lep., Gelechiidae). *J. Appl. Entomol.*, 125: 455-462.
- Ajanta, B., Sharma, T. V. R. S., Shrawan, S. & Srivastava, R. C. 2010.** Effect of aqueous leaf extract of cloves (*Syzygium aromaticum*) on growth and development of tobacco caterpillar (*Spodoptera litura*). *Indian J. Agric. Sci.*, 80: 534-537.
- Badenes-Perez, F. R., Shelton, A. M. & Nault, B. A. 2004.** Evaluating trap crops for diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 97: 1365-1372.
- Banazeer, A., Shad, S. A. & Afzal, M. B. S. 2020.** Laboratory induced bifenthrin resistance selection in *Oxycarenus hyalinipennis* (Costa) (Hemiptera: Lygaeidae): stability, cross-resistance, dominance and effects on biological fitness. *Crop Prot.*, 132: 105107.
- Barbosa, M. G., Andre, T. P. P., Pontes, A. D. S., Souza, S. A., Oliveira, N. R. X. & Pastori, P. L. 2020.** Insecticide Rotation and Adaptive Fitness Cost Underlying Insecticide Resistance Management for *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.*, 49: 882-892.
- Birch, L.C. 1948.** The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *J Anim. Ecol.*, 17: 15-26.
- Bird, L. J., Drynan, L. J. & Walker, P. W. 2020.** Relative fitness and stability of resistance in a near-isogenic strain of indoxacarb resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.*, 76: 4077-4085.
- Cai, H., Bai, Y., Wei, H., Lin, S., Chen, Y., Tian, H. & Murugan, K. 2016.** Effects of tea saponin on growth and development, nutritional indicators, and hormone titers in diamondback moths feeding on different host plant species. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 131: 53-59.
- Cao, G. & Han, Z. 2006.** Tebufenozide resistance selected in *Plutella xylostella* and its cross-resistance and fitness cost. *Pest Manag. Sci.: formerly Pestic. Sci.*, 62: 746-751.

- Chen, W., Dong, Y., Saqib, H. S. A., Vasseur, L., Zhou, W., Zheng, L. & You, M. 2020.** Functions of duplicated glucosinolate sulfatases in the development and host adaptation of *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 119: 103316.
- Cruz, G. S., Wanderley-Teixeira, V., Oliveira, J. V., Correia, A. A., Breda, M. O., Alves, T. J. S. & Navarro, D. M. A. F. 2014.** Bioactivity of *Piper hispidinervum* (Piperales: Piperaceae) and *Syzygium aromaticum* (Myrtales: Myrtaceae) oils, with or without formulated Bt on the biology and immunology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 107: 144-153.
- Dawkar, V. V., Chikate, Y. R., Lomate, P. R., Dholakia, B. B., Gupta, V. S. & Giri, A. P. 2013.** Molecular insights into resistance mechanisms of lepidopteran insect pests against toxicants. *J. Proteome Res.*, 12: 4727-4737.
- El Hag, E. A., El Nadi, A. H. & Zaitoon, A. A. 1999.** Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). *Phytotherapy Res.*, 13: 388-392.
- Hafeez, M., Liu, S., Jan, S., Ali, B., Shahid, M., Fernández-Grandon, G. M. & Wang, M. 2019.** Gossypol-induced fitness gain and increased resistance to deltamethrin in beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Pest Manag. Sci.*, 75: 683-693.
- Iqbal, M. & Wright, D. J. 1997.** Evaluation of resistance, cross-resistance and synergism of abamectin and teflubenzuron in a multi-resistant field population of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull. Entomol. Res.*, 87: 481-486.
- Jensen, K., Ko, A. E., Schal, C. & Silverman, J. 2016.** Insecticide resistance and nutrition interactively shape life-history parameters in German cockroaches. *Sci. Rep.*, 6: 1-7.
- Jermey, T. 1984.** Evolution of insect/host plant relationships. *Am. Nat.*, 124: 609-630.
- Khan, H. A. A. 2018.** Spinosad resistance affects biological parameters of *Musca domestica* Linnaeus. *Sci. Rep.*, 8: 1-7.
- Kliot, A. & Ghanim, M. 2012.** Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.*, 68: 1431-1437.
- Li, Z., Furlong, M. J., Yonow, T., Kriticos, D. J., Bao, H. L., Yin, F. & Zalucki, M. P. 2019.** Management and population dynamics of diamondback moth (*Plutella xylostella*): planting regimes, crop hygiene, biological control and timing of interventions. *Bull. Entomol. Res.*, 109: 257-265.
- Pavela, R. 2012.** Efficacy of three newly developed botanical insecticides based on pongam oil against *Plutella xylostella* L. larvae. *J. Biopestic.*, 5: 62.

- Peres, L. L., Sobreiro, A. I., Couto, I. F., Silva, R. M., Pereira, F. F., Heredia-Vieira, S. C. & Mussury, R. M. 2017.** Chemical compounds and bioactivity of aqueous extracts of *Alibertia* spp. in the control of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Insects*, 8: 125.
- Qian, L., Cao, G., Song, J., Yin, Q. & Han, Z. 2008.** Biochemical mechanisms conferring cross-resistance between tebufenozide and abamectin in *Plutella xylostella*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 91: 175-179.
- Rharrabe, K., Amri, H., Bouayad, N. & Sayah, F. 2008.** Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored Prod. Res.*, 44: 290-294.
- Russell, R. J., Scott, C., Jackson, C. J., Pandey, R., Pandey, G., Taylor, M. C. & Oakeshott, J. G. 2011.** The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evol. Appl.*, 4: 225-248.
- SAS Institute 2001.** SAS/STAT User`s guide, version 8.2, TS level 2MO. SAS Institute. Inc., Cary, N.C.
- Silva, P. R. C., Camaroti, J. R. S. L., Almeida, W. A., Ferreira, E. C. B., Paiva, P. M. G., Barros, R. & Pontual, E. V. 2019.** *Schinus terebinthifolia* leaf extract is a larvicidal, pupicidal, and oviposition deterring agent against *Plutella xylostella*. *S. Afr. J. Bot.*, 127: 124-128.
- Souza, M. T., de Souza, M. T., Bernardi, D., de Melo, D. J., Zarbin, P. H. G. & Zawadneak, M. A. C. 2021.** Insecticidal and oviposition deterrent effects of essential oils of *Baccharis* spp. and histological assessment against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Sci. Rep.*, 11: 1-15.
- Stamopoulos, D. C., Damos, P. & Karagianidou, G. 2007.** Bioactivity of five monoterpenoid vapours to *Tribolium confusum* (du Val) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Stored Prod. Res.*, 43: 571-577.
- Steinbach, D., Moritz, G. & Nauen, R. 2017.** Fitness costs and life table parameters of highly insecticide-resistant strains of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) at different temperatures. *Pest Manag. Sci.*, 73: 1789-1797.
- Torres, A.L., A.L. Boiça Júnior, C.A.M. Medeiros & R. Barros. 2006.** Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia* 65: 447-457.
- Uesugi, R. 2021.** Historical changes in the lethal effects of insecticides against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pest Management Science*, 77: 3116-3125.
- Vasilev, P., Atanasova, D. & Andreev, R. 2019.** Efficacy of bioinsecticides against the hop aphid *Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera: Aphididae) under laboratory conditions. *Can. J. Agric. Crops*, 4: 130-135.

- Wang, Z. H., Gong, Y. J., Chen, J. C., Su, X. C., Cao, L. J., Hoffmann, A. A. & Wei, S. J. 2018.** Laboratory selection for resistance to sulfoxaflo and fitness costs in the green peach aphid *Myzus persicae*. *J. Asia Pac. Entomol.*, 21: 408-412.
- Wilson, T. G. 2004.** The molecular site of action of juvenile hormone and juvenile hormone insecticides during metamorphosis: how these compounds kill insects. *J. Insect Physiol.*, 50: 111-121.
- Zalucki, M. P., Shabbir, A., Silva, R., Adamson, D., Shu-Sheng, L. & Furlong, M. J. 2012.** Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string?. *J. Econ. Entomol.*, 105: 1115-1129.
- Zhao, J. Z., Collins, H. L., Li, Y. X., Mau, R. F. L., Thompson, G. D., Hertlein, M. & Shelton, A. M. 2006.** Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. *J. Econ. Entomol.*, 99: 176-181.

Tabela 1. Médias da duração de incubação de ovos, do período larval e pupal, duração de oviposição das fêmeas de *Plutella xylostella* (L.), submetidos aos óleos essenciais e seus constituintes, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial após sucessivas gerações em laboratório, mantidos em sala climatizada: (Temperatura, T: 25±2 °C); (Umidade Relativa, UR: 70 ± 10%) e Fotoperíodo de 12 horas.

^{1/} Formulados	^{2/} Período de Incubação (dias)	^{2/} Período Larval* (dias)	^{2/} Período Pupal (dias)	^{2/} Período de Oviposição (dias)
Azamax®	2,4 (±0,06) [d]	9,63 (±0,18) [d]	4,01 (±0,35) [bc]	7,0 (±0,68) [cd]
<i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>amara</i>	3,77 (±0,07) [ab]	11,17 (±0,13) [b]	4,96 (±0,15) [b]	6,72 (±0,54) [d]
Decis® 25 EC	2,63 (±0,09) [d]	11,32 (±0,16) [b]	3,13 (±0,21) [d]	9,72 (±1,07) [bc]
<i>Eugenia caryophyllata</i>	3,45 (±0,04) [bc]	12,44 (±0,33) [a]	3,43 (±0,27) [cd]	7,18 (±0,72) [cd]
Eugenol	3,45 (±0,04) [bc]	13,24 (±0,41) [a]	4,48 (±0,47) [bc]	8,81 (±0,65) [cd]
Limoneno	4,09 (±0,13) [a]	11,27 (±0,14) [b]	4,74 (±0,20) [b]	11,63 (±0,41) [b]
Lufenuron (Match 50 ® EC)	3,36 (±0,07) [c]	10,18 (±0,12) [cd]	5,0 (±0,13) [b]	10,0 (±0,75) [bc]
Testemunha	3,5 (±0,00) [bc]	10,54 (±0,08) [bc]	6,72 (±0,23) [a]	15,72 (±0,42) [a]

¹Óleos essenciais, constituintes majoritários, inseticidas comerciais e testemunha utilizados na seleção de *Plutella xylostella*; ²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a $p\text{-valor} \leq 0,05$; *Dados transformados para $\sqrt{x+0,5}$ ou ARSIN(SQRT(X/100)) estatisticamente.

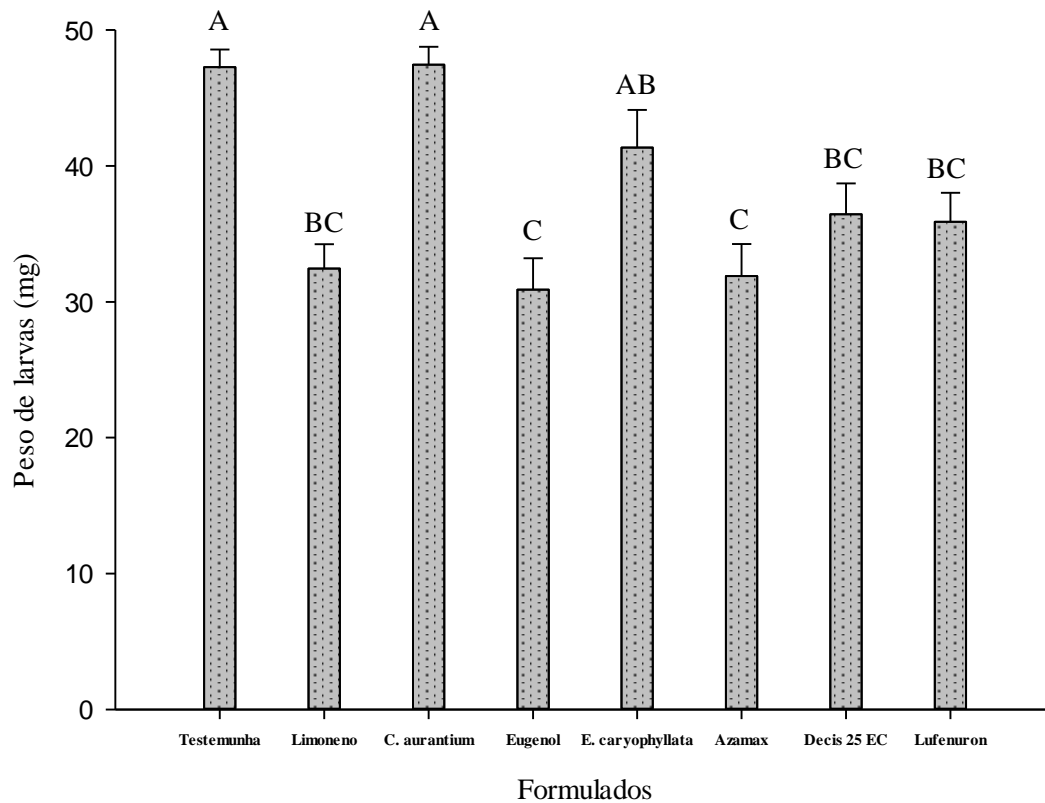


Fig 1. Médias de peso de larvas (n=5) no estágio de 4º ínstar de *Plutella xylostella* (L.), submetidos aos óleos essenciais e seus constituintes majoritários, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial após sucessivas gerações em laboratório, mantidos em sala climatizada: (Temperatura, T: 25 ± 2 °C); (Umidade Relativa, UR: $70 \pm 10\%$) e Fotoperíodo de 12 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a $p\text{-valor} \leq 0,05$.

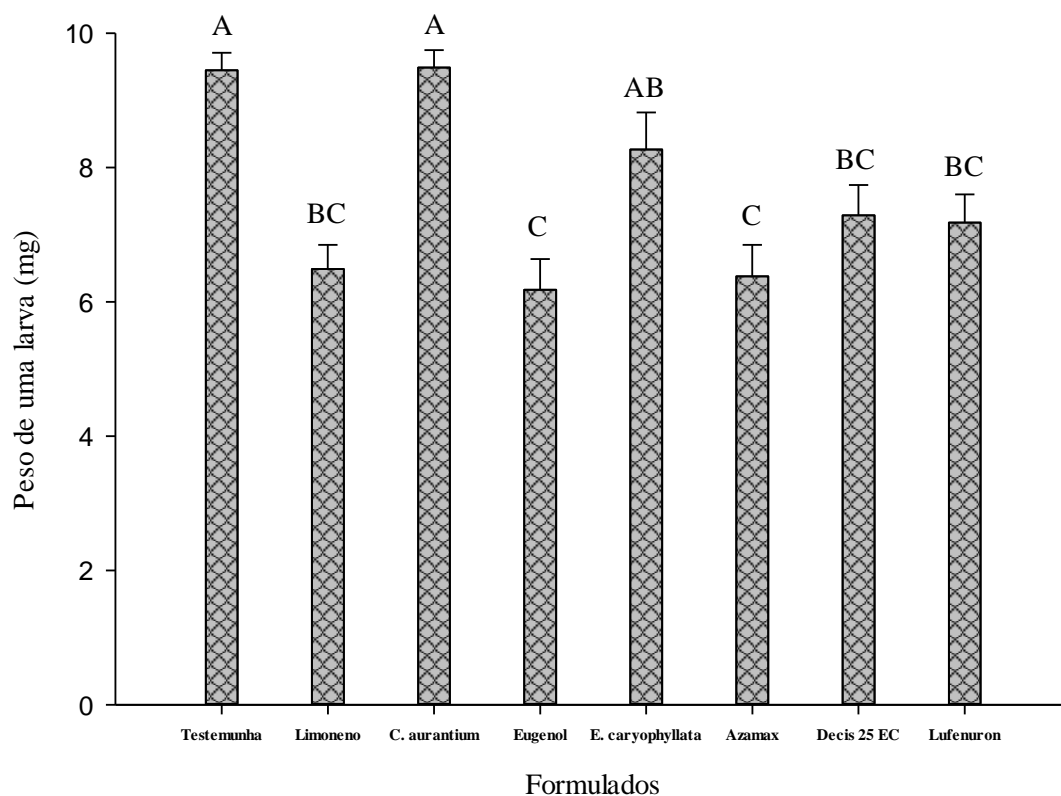


Fig 2. Médias de peso de uma larva (n=1) no estágio de 4º ínstar de *Plutella xylostella* (L.), submetidos aos óleos essenciais e seus constituintes majoritários, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial após sucessivas gerações em laboratório, mantidos em sala climatizada: (Temperatura, T: 25±2 °C); (Umidade Relativa, UR: 70 ± 10%) e Fotoperíodo de 12 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a p-valor ≤ 0,05.

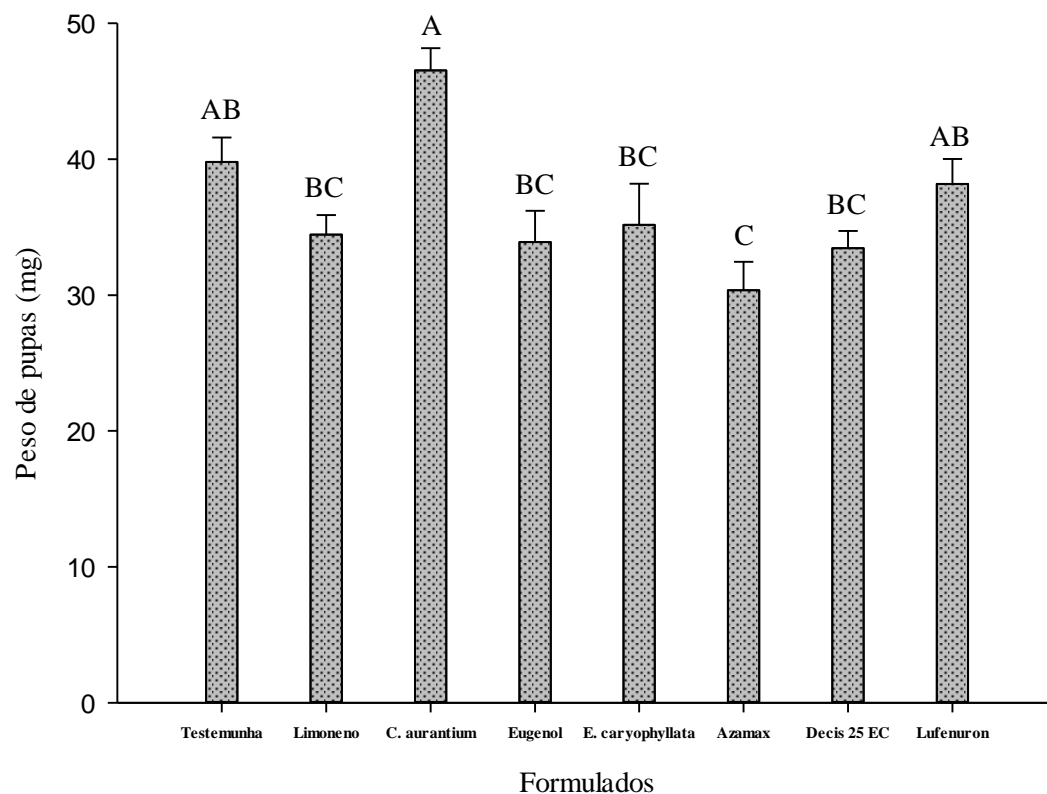


Fig 3. Médias de peso de pupas (n=5) de *Plutella xylostella* (L.), submetidos aos óleos essenciais e seus constituintes majoritários, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial após sucessivas gerações em laboratório, mantidos em sala climatizada: (Temperatura, T: 25±2 °C); (Umidade Relativa, UR: 70 ± 10%) e Fotoperíodo de 12 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a p-valor≤0,05.

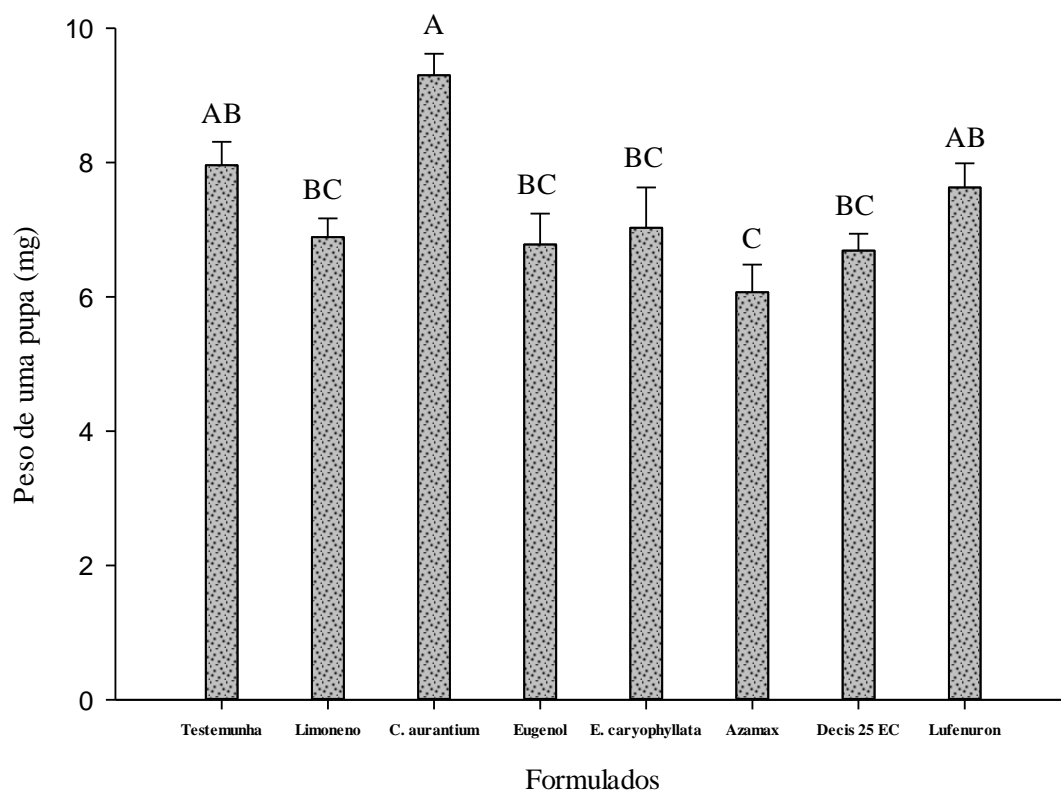


Fig 4. Médias de peso de uma pupa (n=1) de *Plutella xylostella* (L.), submetidos aos óleos essenciais e seus constituintes majoritários, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial após sucessivas gerações em laboratório, mantidos em sala climatizada: (Temperatura, T: 25±2 °C); (Umidade Relativa, UR: 70 ± 10%) e Fotoperíodo de 12 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a p-valor ≤ 0,05.

Tabela 2. Médias de emergência de machos, fêmeas e razão sexual de *Plutella xylostella* (L.), submetidos aos óleos essenciais e seus constituintes, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial após sucessivas gerações em laboratório, mantidos em sala climatizada: (Temperatura, T: 25±2 °C); (Umidade Relativa, UR: 70 ± 10%) e Fotoperíodo de 12 horas.

^{1/} Formulados	^{2/} Emergência de fêmeas (%)	^{2/} Emergência de machos (%)	^{2/} Razão sexual
Azamax®	46,49 (±5,2) [a]	37,75 (±5,12) [a]	57 (±9) [a]
<i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>amara</i>	48,03 (±6,14) [a]	33,21 (±3,63) [a]	60 (±9) [a]
Decis® 25 EC	53,93 (±4,15) [a]	38,33 (±4,15) [a]	64 (±7) [a]
<i>Eugenia caryophyllata</i>	51,27 (±4,58) [a]	36,13 (±6,0) [a]	53 (±8) [a]
Eugenol	52,61 (±5,17) [a]	34,08 (±5,12) [a]	51 (±7) [a]
Limoneno	53,38 (±4,79) [a]	34,45 (±5,15) [a]	56 (±8) [a]
Lufenuron (Match 50 ® EC)	50,43 (±4,5) [a]	38,87 (±5,53) [a]	59 (±8) [a]
Testemunha	50,64 (±5,45) [a]	33,0 (±4,72) [a]	57 (±9) [a]

^{1/}Óleos essenciais, constituintes majoritários, inseticidas comerciais e testemunha utilizados na seleção de *Plutella xylostella*; ^{2/}Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a p-valor≤0,05; *Dados transformados para $\sqrt{x+0,5}$ ou ARSIN(SQRT(X/100)) estatisticamente.

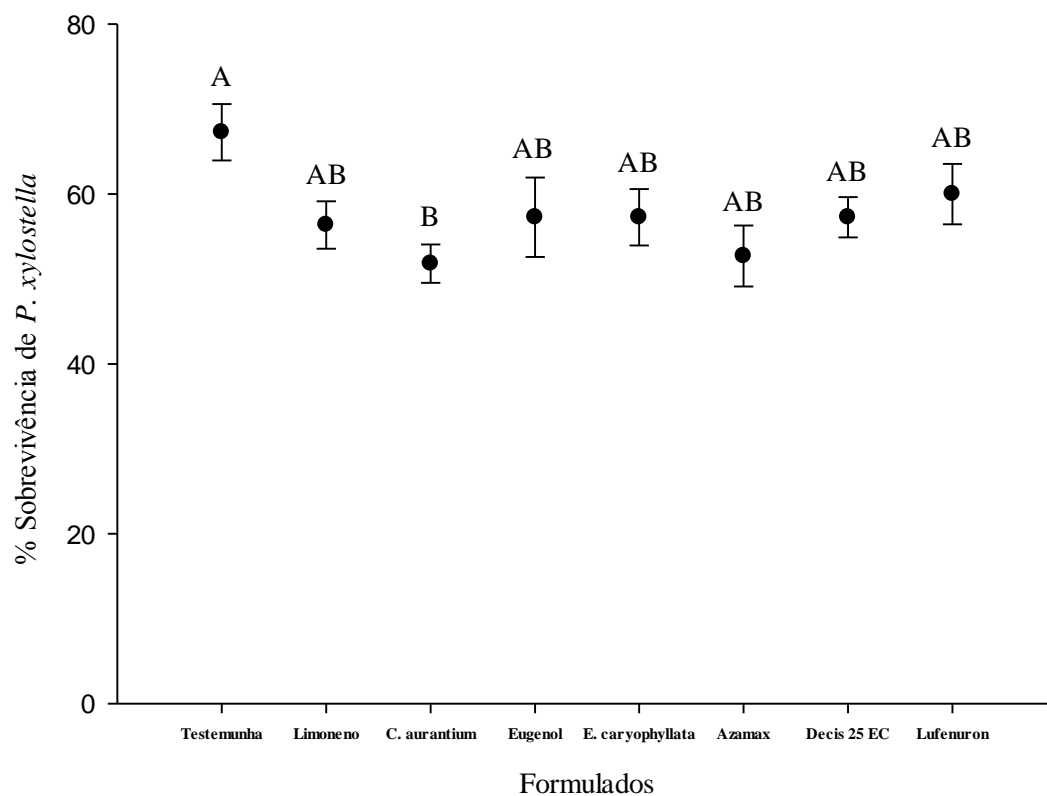


Fig 4. Taxa de sobrevivência (%) da fase imatura de *Plutella xylostella* (L.), submetidos aos óleos essenciais e seus constituintes majoritários, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial após sucessivas gerações em laboratório, mantidos em sala climatizada: (Temperatura, T: 25 ± 2 °C); (Umidade Relativa, UR: $70 \pm 10\%$) e Fotoperíodo de 12 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a $p\text{-valor} \leq 0,05$.

Tabela 3. Médias de viabilidade de pupas, fecundidade e fertilidade (fêmeas) de *Plutella xylostella* (L.), submetidos aos óleos essenciais e seus constituintes, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial após sucessivas gerações em laboratório, mantidos em sala climatizada: (Temperatura, T: 25±2 °C); (Umidade Relativa, UR: 70 ± 10%) e Fotoperíodo de 12 horas.

^{1/} Formulados	^{2/} Viabilidade de pupas (%)	^{2/} Fecundidade	^{2/} Fertilidade (%)
Azamax®	83,85 (±2,63) [a]	76,72 (±21,85) [b]	30,47 (±5,4) [b]
<i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>amara</i>	82,57 (±3,05) [a]	122,18 (±15,64) [ab]	43,53 (±3,43) [ab]
Decis® 25 EC	88,27 (±0,09) [a]	72,9 (±17,68) [b]	48,96 (±8,23) [ab]
<i>Eugenia caryophyllata</i>	82,72 (±3,47) [a]	101,36 (±14,21) [b]	47,94 (±5,04) [ab]
Eugenol	84,07 (±3,86) [a]	102,36 (±21,62) [b]	42,84 (±4,83) [ab]
Limoneno	83,42 (±3,56) [a]	106,63 (±10,72) [b]	46,77 (±4,39) [ab]
Lufenuron (Match 50 ® EC)	84,91 (±4,06) [a]	81,09 (±14,99) [b]	44,46 (±6,15) [ab]
Testemunha	91,58 (±2,24) [a]	192,45 (±9,03) [a]	58,18 (±3,95) [a]

¹Óleos essenciais, constituintes majoritários, inseticidas comerciais e testemunha utilizados na seleção de *Plutella xylostella*; ²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a $p\text{-valor} \leq 0,05$; *Dados transformados para $\sqrt{x+0,5}$ ou $\text{ARSIN}(\text{SQRT}(X/100))$ estatisticamente.

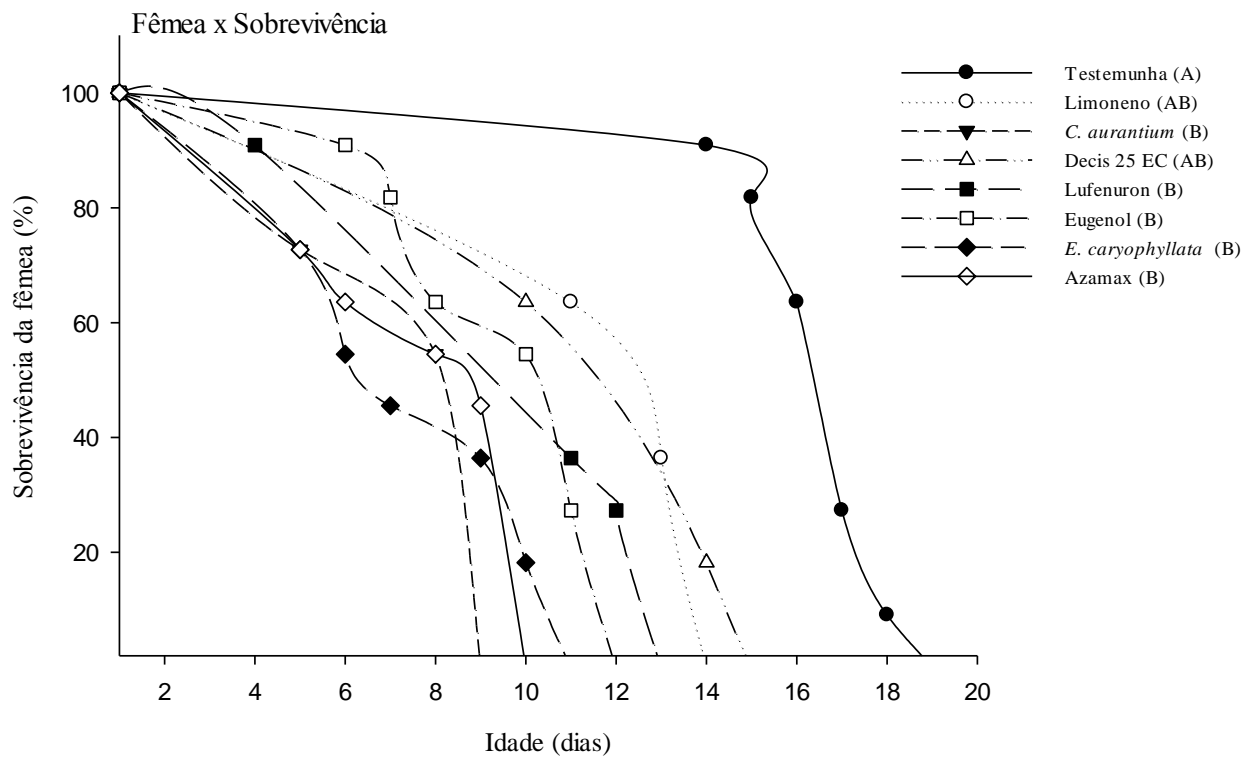


Fig 5. Curvas de longevidade (dias) de fêmeas de *Plutella xylostella* (L.), submetidos aos óleos essenciais e seus constituintes majoritários, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial após sucessivas gerações em laboratório, mantidos em sala climatizada: (Temperatura, T: 25 ± 2 °C); (Umidade Relativa, UR: $70 \pm 10\%$) e Fotoperíodo de 12 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a $p\text{-valor} \leq 0,05$.

Tabela 4. Fatores biológicos de crescimento populacional de *Plutella xylostella* (L.), submetidos aos óleos essenciais e seus constituintes, inseticida botânico comercial e inseticida sintético comercial após sucessivas gerações em laboratório, mantidos em sala climatizada: (Temperatura, T: 25±2 °C); (Umidade Relativa, UR: 70 ± 10%) e Fotoperíodo de 12 horas.

¹ /Formulados	² Ro	² T (dias)	² Rm	² TD (dias)	² λ
Azamax®	25,59 [c] (7,43 - 43,76)	15,50 [d] (15,11 - 15,89)	0,29 [a] (0,21 - 0,36)	2,33 [a] (1,55 - 3,10)	1,33 [a] (1,23 - 1,43)
<i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>amara</i>	39,11 [bc] (26,73 - 51,50)	18,39 [b] (18,08 - 18,69)	0,27 [a] (0,24 - 0,30)	2,51 [a] (2,26 - 2,77)	1,31 [a] (1,28 - 1,35)
Decis® 25 EC	36,89 [bc] (11,43 - 62,35)	16,87 [c] (16,56 - 17,17)	0,30 [a] (0,24 - 0,37)	2,21 [a] (1,66 - 2,75)	1,36 [a] (1,27 - 1,45)
<i>Eugenia caryophyllata</i>	39,20 [bc] (19,62 - 58,77)	18,19 [b] (17,95 - 18,42)	0,28 [a] (0,23 - 0,32)	2,45 [a] (2,05 - 2,86)	1,32 [a] (1,26 - 1,37)
Eugenol	31,32 [bc] (6,64 - 56,02)	20,38 [a] (19,47 - 21,29)	0,24 [a] (0,17 - 0,31)	2,77 [a] (1,78 - 3,76)	1,27 [a] (1,18 - 1,36)
Limoneno	39,14 [bc] (24,44 - 53,84)	19,29 [a] (18,87 - 19,71)	0,27 [a] (0,24 - 0,30)	2,48 [a] (2,17 - 2,80)	1,31 [a] (1,27 - 1,36)
Lufenuron (Match 50 ® EC)	31,83 [c] (20,40 - 43,27)	18,63 [b] (18,41 - 18,85)	0,27 [a] (0,24 - 0,30)	2,51 [a] (2,21 - 2,80)	1,31 [a] (1,27 - 1,35)
Testemunha	105,15 [ab] (51,13 - 159,18)	19,26 [ab] (18,61 - 19,90)	0,32 [a] (0,28 - 0,37)	2,09 [a] (1,76 - 2,42)	1,38 [a] (1,32 - 1,45)

¹Óleos essenciais, constituintes majoritários, inseticidas comerciais e testemunha utilizados na seleção de *Plutella xylostella*; ²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Jackknife; *Dados transformados para $\sqrt{x+0,5}$ ou ARSIN(SQRT(X/100)) estatisticamente; Ro= Taxa

líquida de reprodução; T= Tempo médio entre gerações de *Plutella xylostella*; Rm= Taxa intrínseca de crescimento; TD=Tempo de duplicação da população; λ = Razão finita de aumento.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de inseticidas naturais à base de metabólitos de plantas apresenta-se como uma alternativa no manejo de artrópodes-praga. Uma das evidências que mostra a sustentabilidade na utilização de inseticidas naturais é a capacidade de biodegradabilidade e com mínima ação de toxicidade sobre os mamíferos. Portanto, é importante entender os mecanismos de bioatividade em insetos e a natureza química das substâncias ativas provenientes do metabolismo secundário de plantas. Os insetos possuem grande capacidade de diminuir os efeitos deletérios de inseticidas através de metabolização ou detoxificação de compostos ou ingredientes ativos. Desse jeito, na exposição contínua de qualquer artrópode ao inseticida, pode surgir uma maior tolerância ou resistência geralmente associada à mudança genética. Uma modificação genética e adaptação biológica nos mecanismos de defesa dos insetos seria uma estratégia de diminuir a eficiência dos inseticidas. A utilização de inseticidas à base de metabólitos ativos em plantas no manejo de artrópodes-praga passa a ter ultimamente uma ampla utilização na agricultura orgânica ou familiar. Por isso, é fundamental o monitoramento da suscetibilidade ao longo do tempo, visando o manejo de resistência de uma determinada praga quando se utilizar um extrato, óleo essencial e composto puro. Os resultados da presente pesquisa demonstram que os insetos, em especial, *P. xylostella* pode desenvolver algum grau de tolerância ou resistência quando é exposta diretamente a um constituinte majoritário de um óleo essencial. Vale ressaltar que este estudo é um avanço nas táticas para evidenciar no futuro os níveis de ação que deveriam ser adotados dentro de uma perspectiva de manejo de resistência de *P. xylostella*.

No entanto, apesar dos resultados obtidos, outros estudos deverão ser realizados para corroborar com mais confirmações sobre a resistência ou maior tolerância de *P. xylostella* aos óleos essenciais e seus principais componentes. Em conclusão, podemos dizer que o trabalho é considerado como uma investigação preliminar e mesmo assim proporciona mais um entendimento sobre os mecanismos de defesa em artrópodes-praga contra os inseticidas naturais.