

BÁRBARA SOARES AMOROSO LIMA

**EFEITOS DE INSETICIDAS NO SISTEMA DIGESTÓRIO DE *Anticarsia gemmatalis*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E DE SEU PREDADOR *Podisus nigrispinus*
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Eduardo Serrão

Coorientador: Luis Carlos Martínez

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus

T

Lima, Bárbara Soares Amoroso, 1991-
L732e Efeitos de inseticidas no sistema digestório de *Anticarsia*
2023 *gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e de seu predador *Podisus*
nigrispinus (Heteroptera: Pentatomidae): / Bárbara Soares Amoroso Lima. -
Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (74 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês

Orientador: José Eduardo Serrão
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de
Biologia Geral, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.475>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Doenças e pragas - Controle; 2. Abamectina (Inseticida); 3.
Flupiradifurona (Inseticida); 4. Lagartas; 5. Percevejo (Inseto); I. Serrão, José
Eduardo II. Universidade Federal de Viçosa.. Departamento de Biologia Geral.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural III. Título

CDD 22. ed. 632.9517

Bibliotecário(a) responsável: EUZEBIO LUIZ PINTO CRB-6/3317


BÁRBARA SOARES AMOROSO LIMA

**EFEITOS DE INSETICIDAS NO SISTEMA DIGESTÓRIO DE *Anticarsia gemmatalis*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E DE SEU PREDADOR *Podisus nigrispinus*
(HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 06 de junho de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 BARBARA SOARES AMOROSO LIMA
Data: 09/08/2023 16:12:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Bárbara Soares Amoroso Lima
Autora

Documento assinado digitalmente
 JOSE EDUARDO SERRAO
Data: 09/08/2023 16:26:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

José Eduardo Serrão
Orientador

Aos meus pais, irmãos e ao Bento.

AGRADECIMENTOS

A Deus que é o centro da minha vida, onde deposito toda minha esperança.

Aos meus avós, que já partiram, mas me mostraram uma vida baseada na simplicidade, gratidão e acima de tudo, fé. Aos meus pais Janete e José Eduardo que se entregaram inteiramente pelos sonhos dos filhos. Tento ser o que me ensinaram pelos exemplos que sempre me deram. Amo vocês com toda minha força. Aos meus irmãos Sillas, Camilla e Nívea, que são minha riqueza, que preenchem minha vida, que sonham e vibram comigo em cada vitória. Aos tios e tias, primos e primas, pelas orações e todo apoio em minha caminhada de estudos, sei o quanto torcem por mim. Sou privilegiada por ter vocês como minha família.

Aos amigos de infância, aos de Viçosa, às companheiras de república, e a todos os outros, agradeço por termos partilhado tantos momentos felizes. À Bianca, minha companheira de jornada, que permanece em todas minhas fases, minha melhor amiga. À Franciele, que nos últimos anos foi “minha família”, dividindo o mesmo lar. Amo a amizade que construímos. Aos amigos do MUR, que se tornaram meu refúgio, que rezaram comigo e por mim, que me ensinaram mais sobre a fé, que fizeram da Capela nossa segunda casa. Todos vocês, amigos, estão nas minhas melhores lembranças.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular, agradeço todo apoio, conversas e tardes de café. Em especial ao Pedro, que nos últimos tempos, por tantas vezes, foi a maior e melhor companhia que eu poderia ter, seu jeito de ser tornou tudo mais fácil e alegre.

Ao Luis Carlos e Angélica, pela paciência e carinho comigo, por não medirem esforços para me ajudar na pesquisa desde o mestrado, vocês foram fundamentais.

A todos os funcionários da UFV e do DBG, que se empenham todos os dias para que tudo funcione na mais perfeita ordem.

Ao Professor José Eduardo Serrão, por orientar com maestria. Pela tamanha dedicação e paciência, pelo exemplo de profissional e ser humano. Sua atenção com cada orientado faz toda diferença nos nossos resultados. Foram seis anos de muito aprendizado.

A todos os professores e educadores que já tive. Minha profunda admiração e gratidão por vocês. Hoje compreendo o tamanho esforço diário para educar e ser referência de tantas virtudes para os alunos.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise pelo suporte técnico.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos.

Os meus mais sinceros agradecimentos a todos. Encerro essa jornada na UFV com muito orgulho e alegria.

RESUMO

LIMA, Bárbara Soares Amoroso, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2023. **Efeitos de inseticidas no aparelho digestivo de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e seu predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).** Orientador: José Eduardo Serrão.

A lagarta desfolhadora *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga da soja. O controle desse inseto enfrenta, entre outros desafios, a ocorrência de populações resistentes a diferentes inseticidas, sendo necessária a busca por novos agentes químicos. A abamectina é um inseticida neurotóxico que causa paralisia muscular e a flupiradifurona pertence ao novo grupo butenolidas, causando hiperexcitabilidade nos insetos. O presente estudo avaliou o potencial da abamectina e flupiradifurona no controle de lagartas *A. gemmatalis* e em seu predador *Podisus nigrispinus*. Para isso, fizemos a exposição das lagartas às concentrações previamente estabelecidas e a partir das análises estatísticas foram determinadas as concentrações letais (CL) de ambos os inseticidas. As curvas de sobrevivência foram estabelecidas a partir da exposição das lagartas às concentrações letais. O efeito anti-alimentar foi analisado a partir da exposição das lagartas às folhas de soja tratadas com CL₅₀. Os testes de histopatologia e citotoxicidade foram realizados após exposição das lagartas e de seu predador à dieta contaminada com concentração letal (CL₉₀). A abamectina é tóxica para a lagarta e causa efeito anti-alimentar diminuindo o consumo foliar e promovendo danos nas células do intestino médio, incluindo desorganização da borda estriada epitelial e das células caliciformes, formação de vacúolos autofágicos nas células digestivas, degeneração da matriz peritrófica, acúmulo de mitocôndrias de diferentes formas e fragmentos celulares liberados no lúmen do intestino que mostram ser indicativos de morte celular. Alterações na morfologia do epitélio intestinal das lagartas foram observadas como, presença de protrusões citoplasmáticas, vacuolização, degradação da borda estriada de acordo com os tempos de exposição. As lagartas expostas por 24 horas mostraram ter uma possível resposta de recuperação do tecido. No intestino do percevejo houve alteração do epitélio como desorganização, intensa vacuolização e condensação da cromatina nuclear das células digestivas. Maior quantidade de carboidratos nos trofócitos, maior diâmetro e quantidade de gotas lipídicas citoplasmáticas foram observados em percevejos expostos ao inseticida comparado ao controle. A quantidade de proteínas não diferiu em relação ao controle. Esses resultados mostram que a abamectina e a flupiradifurona são tóxicas para as lagartas reforçando seu potencial no controle dessa praga. Entretanto, os

efeitos causados pela flupiradifurona em seu predador, podem indicar baixa seletividade dessa substância.

PALAVRAS-CHAVE: Citotoxicidade. Controle de pragas. Efeito indireto. Histopatologia. Lagarta-da-soja. Predador. Sistema digestivo. Toxicidade.

ABSTRACT

LIMA, Bárbara Soares Amoroso, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2023. **Effects of insecticides on the digestive tract of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).** Adviser: José Eduardo Serrão.

The defoliator caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) is a soybean pest. The control of this insect faces, among other challenges, the occurrence of populations resistant to different insecticides, requiring the search for new chemical agents. Abamectin is a neurotoxic insecticide that causes muscle paralysis and flupyradifurone belongs to the new butenolides group, causing hyperexcitability in insects. The present study evaluated the potential of abamectin and flupyradifurone in the control of *A. gemmatalis* caterpillars and its predator *Podisus nigrispinus*. For this, we exposed the caterpillars to previously established concentrations and based on the statistical analyzes, the lethal concentrations of both insecticides were determined. Survival curves were established from exposure of caterpillars to lethal concentrations. The anti-feeding effect was analyzed from the exposure of caterpillars to soybean leaves treated with lethal concentration (LC50). Histopathology and cytotoxicity tests were performed after exposing the caterpillars and their predator to a diet contaminated with lethal concentration (LC90). Abamectin is toxic to the caterpillar and causes an anti-feeding effect by decreasing leaf consumption and promoting damage to midgut cells, including disorganization of the epithelial striated border and goblet cells, formation of autophagic vacuoles in digestive cells, peritrophic matrix degeneration, accumulation of mitochondria of different shapes and cell fragments released into the lumen of the intestine that are shown to be indicative of cell death. Changes in the morphology of the intestinal epithelium of the caterpillars were observed, such as the presence of cytoplasmic protrusions, vacuolation, degradation of the striated border according to the exposure times. Caterpillars exposed for 24 hours showed a possible tissue recovery response. In the bug's gut there was alteration of the epithelium such as disorganization, intense vacuolization and condensation of the nuclear chromatin of the digestive cells. Higher amount of carbohydrates in trophocytes, larger diameter and amount of cytoplasmic lipid droplets were observed in bugs exposed to the insecticide compared to the control. The amount of protein did not differ from the control. These results show that abamectin and flupyradifurone are toxic to caterpillars, reinforcing their potential to control this pest. However, the effects caused by flupyradifurone on its predator may indicate low selectivity of this substance.

KEYWORDS: Cytotoxicity. Pest control. Indirect effect. Histopathology. Soybean Caterpillar. Predator. Digestive system. Toxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2. OBJETIVO GERAL.....	14
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 1	20
CAPÍTULO 2	36
1. Introdução.....	39
2. Material e métodos	41
2.1. Insetos	41
2.2. Bioensaio de concentração–mortalidade	41
2.3. Bioensaio de tempo–mortalidade.....	42
2.4. Efeito anti-alimentar	42
2.5. Histopatologia.....	42
2.5.1. <i>Anticarsia gemmatalis</i>	42
2.5.2. <i>Podisus nigrispinus</i>	43
2.6. Histoquímica do corpo gorduroso.....	43
2.6.1. Detecção de Proteínas	43
2.6.2. Detecção de Polissacarídeos neutros e glicoconjugados.....	44
2.7. Citotoxicidade.....	44
2.8. Análise estatística	44
3. Resultados.....	45
3.1. Bioensaio de toxicidade/concentração–mortalidade.....	45
3.2. Bioensaio de tempo–mortalidade.....	45
3.3. Efeito anti-alimentar	46
3.4. Histopatologia do intestino médio de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	47
3.5. Citotoxicidade.....	50
3.6. Histopatologia do intestino e corpo gorduroso de <i>Podisus nigrispinus</i>	53
3.7. Citotoxicidade.....	54
4. Discussão	58
5. Conclusão	63
Referências Bibliográficas.....	64
CONCLUSÕES GERAIS	74

1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) popularmente conhecida como lagarta-da-soja, é uma espécie de clima tropical e subtropical com ampla distribuição, ocorrendo desde os Estados Unidos da América até a Argentina. No Brasil, sua distribuição abrange do sul de Goiás e Mato Grosso até Rio Grande do Sul (Abot et al., 1996; Sosa-Gómez, 2004).

As lagartas são capazes de causar danos que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. Dessa forma, o preenchimento das vagens e o desenvolvimento dos grãos são comprometidos devido à diminuição da área foliar responsável pela fotossíntese. As lagartas representam risco à produção mesmo em baixas densidades populacionais. Portanto, é importante o estudo de seu comportamento e método de controle (Praça et al., 2006; Silva et al., 2002).

Dentre os diversos inseticidas pesquisados para o controle de *A. gemmatalis*, destacam-se os reguladores de crescimento, pela sua seletividade a inimigos naturais e inseticidas agonistas de ecdisteróides (Silva et al., 2003), os inibidores naturais de proteases (Carlini & Grossi-De-Sá, 2002). No entanto, muitos desses inseticidas usados por décadas para controlar surtos populacionais de *A. gemmatalis* têm selecionado populações resistentes desse inseto (Abot et al., 1996; Baptista et al., 1995; Kuwar et al., 2015; Panizzi, 2013; Sosa-Gómez & Miranda, 2012; Sosa-Gómez & Omoto, 2012). Isto indica a necessidade de avaliar outros inseticidas que superem os problemas de resistência e garantam colheitas sustentáveis.

Abamectina é um inseticida e acaricida pertencente ao grupo químico das avermectinas que, junto das milbemicinas representam as lactonas macrocíclicas, os parasiticidas mais comercializados e utilizados para o controle de ácaros, mas não registrado para controle de *A. gemmatalis*. A abamectina é derivada da fermentação natural da bactéria *Streptomyces avermitilis* presente no solo (Agarwal, 1998; Campbell et al., 1983; Gerenutti & Souza Spinosa, 1997), é um modulador alostérico de canais de cloro mediados pelo glutamato e absorvido por via oral, dérmica e inalatória pelos artrópodes. Ela age como agonista do ácido gama amino butírico (GABA), aumentando a permeabilidade dos íons cloro causando paralisia muscular e eventual morte (Wislocki et al., 1989; Cully et al., 1994; Wolstenholme, 2012; Sparks & Nauen, 2015).

A flupiradifurona (FPF), pertencente ao grupo químico das butenolidas, é um pesticida neonicotinóide sistêmico de contato e ingestão que atua como agonista nos receptores nicotínicos de acetilcolina de insetos (nAChRs), causando hiperexcitabilidade, tremores, convulsões e morte (Nauen et al., 2015). Lançado sob o nome de 'Sivanto' pela Bayer AG

(Bayer AG, Crop Science Division, Monheimam Rhein, Germany) é altamente eficaz contra insetos sugadores, principalmente moscas-brancas e pulgões (Sparks & Nauen, 2015), mas não é registrado para controle de *A. gemmatalis*.

Os inseticidas nicotínicos são eficazes em baixas concentrações contra uma ampla variedade de pragas, o que representou 23% dos inseticidas comercializados em 2016. A flupiradifurona faz parte da “terceira geração” dos inseticidas nicotínicos desenvolvidos depois de 2010 (Umetsu & Shirai, 2020).

Os programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) são usados para controle de populações de pragas visando manter a sustentabilidade do agroecossistema. O sistema combina métodos biológicos, culturais, físicos e químicos mantendo os artrópodes mais próximos possível de seu equilíbrio biológico (Bueno & Bueno, 2012; Timprasert et al., 2014). No Brasil, programas de (MIP) incluem biopesticidas de origem vegetal e microbianos (Farder-Gomes et al., 2021) e o uso de agentes de controle biológico, como parasitóides e predadores eficientes contra *A. gemmatalis* (Castro et al., 2019; Bueno et al., 2020).

O gênero *Podisus* é representado por predadores com grande potencial para uso em programas de (MIP). São inimigos naturais generalistas com capacidade de sobreviverem e reproduzirem em sistemas florestais e agrícolas, regulando principalmente lagartas de lepidópteros. Esses percevejos produzem grande número de descendentes por geração, se estabelecem em diferentes temperaturas e períodos de escassez de presas, possuem um rápido desenvolvimento pós-embrionário e possuem relativa tolerância a inseticidas (Zanuncio et al., 1994; Zanuncio et al., 2011; Castro et al., 2012). Devido ao tamanho potencial, há grande interesse no uso desses organismos como agentes de controle biológico de insetos-pragas agrícolas (De Clercq et al., 2000; Torres & Boyd, 2009).

Podisus nigrispinus é um importante agente de controle biológico devido a sua agressividade e alta capacidade reprodutiva (De Clercq et al., 2000; Zanuncio et al., 1994) e são mais comuns em regiões neotropicais (Lemos et al., 2005; Pires et al., 2009). O potencial dessa espécie no controle biológico tem sido reportado para outras lagartas desfolhadoras além de *A. gemmatalis*, como: *Alabama argillacea*, *Spodoptera exigua*, e *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) (Zanuncio et al., 2016).

O intestino é o primeiro órgão a ter contato com as moléculas dos inseticidas ingeridos pelos insetos (Denecke et al., 2018). O trato digestório dos insetos pode ser dividido em três porções: intestino anterior, médio e posterior (Cruz-Landim & Cavalcante, 1999) sendo o intestino médio, a principal porção responsável pela digestão e absorção.

O intestino médio dos insetos é protegido do ambiente externo pela matriz peritrófica, enquanto os intestinos anterior e posterior têm uma camada cuticular. A matriz peritrófica é responsável por diversas funções como: prevenção de infecção microbiana, proteção do intestino médio contra danos mecânicos e compartimentação da digestão de alimentos. Além disso, é considerada a primeira barreira de proteção do intestino médio contra compostos tóxicos. Uma vez atravessada a matriz peritrófica, o composto é capaz de atingir as células do intestino médio podendo ocasionar perda de funções importantes para a sobrevivência do organismo (Denecke et al., 2018).

Outro órgão importante contra a ação dos inseticidas é o corpo gorduroso, responsável pela manutenção dos processos reprodutivos e do metabolismo energético dos insetos. Esse órgão também é responsável pela síntese de lipídeos, carboidratos e proteínas (Downer, 1985; Chapman, 1998; Arrese & Soulages, 2010), remoção de sais de cálcio, uratos e outros produtos nitrogenados da hemolinfa além de estimular secreção para maturação de ovos (Legaspi et al., 1996; Arrese & Soulages, 2010; Rodrigues et al., 2013). Além disso, é um órgão alvo para a ação dos principais hormônios dos insetos como: hormônio juvenil, ecdisona e neuro-hormônios (Roma et al., 2010).

As principais células do corpo gorduroso são os trofócitos, responsáveis pela síntese e armazenamento de proteínas e carboidratos. Além destas, ocorrem os enócitos, encontrados entre a membrana basal e a epiderme e são bem distintas dos trofócitos. Elas são responsáveis pela síntese de lipídeos, proteínas e hidrocarbonetos cuticulares (Arrese & Soulages, 2010; Roma et al., 2010; Martins et al., 2022).

Em agroecossistemas complexos como os da soja, com diversas espécies de insetos-praga ocorrendo simultaneamente, inseticidas como a abamectina e a flupiradifurona utilizados para o controle, respectivamente, de ácaros e insetos sugadores, podem contaminar insetos-praga mastigadores, como as lagartas de *Anticarsia gemmatalis*. Por isto, conhecer os efeitos desses inseticidas sobre esse inseto-praga e de seu inimigo natural *Podisus nigrispinus* é de fundamental importância em programas de manejo integrado de pragas da soja.

Além disso, a análise dos efeitos subletais deste inseticida no seu predador *P. nigrispinus*, através da exposição indireta, pode contribuir para o aumento da eficácia das estratégias de manejo integrado, minimizando os efeitos indiretos em organismos não-alvo, uma vez que, inseticidas seletivos são os mais indicados.

2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo avaliou o potencial da abamectina e flupiradifurona no controle de lagartas de *A. gemmatalis*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar mortalidade, o efeito tóxico, efeito anti-alimentar, histopatologia e citotoxicidade nas células do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* expostas através da alimentação à abamectina (capítulo 1). Avaliar mortalidade, o efeito tóxico, efeito anti-alimentar, histopatologia e citotoxicidade nas células do intestino médio de *A. gemmatalis*; avaliar histopatologia e citotoxicidade nas células do intestino médio e alterações na histoquímica do corpo gorduroso do percevejo *P. nigrispinus* expostos indiretamente à flupiradifurona (capítulo 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abot, A. R., Moscardi, F., Fuxa, J. R., Sosa-Gómez, D. R., & Richter, A. R. (1996). Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. *Biological Control*, 7(1), 126–130. <https://doi.org/10.1006/bcon.1996.0075>
- Agarwal, A. K. (1998). *Avermectin*. *Encyclopedia of Toxicology* (P. Wexler (ed.)).
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Baptista, G. C. de, Parra, J. R. P., & Haddad, M. de L. (1995). *Hueb ., 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) e ao percevejo verde, Nezara viridula (L ., 1758)*. 1–6.
- Bueno, A. de F., & Bueno, R. C. O. de F. (2012). Integrated pest management as a tool to mitigate the pesticide negative impact into the agroecosystem: the soybean example. *The Impact of Pesticides*, 165–190.
- Bueno, V. H. P., Parra, J. R. P., Bettiol, W., & Van Lenteren, J. C. (2020). Biological Control in Brazil. *Biological Control in Latin America and the Caribbean: Its Rich History and Bright Future, 1960*(October), 78–107. <https://doi.org/10.1079/9781789242430.0078>
- Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Albers-Schonberg, G., & Jacob, T. A. (1983). Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, 221(4613), 823–828.
- Carlini, C. R., & Grossi-De-Sá, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40(11), 1515–1539. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00240-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00240-4)
- Castro, A. A., Lacerda, M. C., Zanuncio, T. V., De S. Ramalho, F., Polanczyk, R. A., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2012). Effect of the insect growth regulator diflubenzuron on the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ecotoxicology*, 21(1), 96–103. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0769-z>
- Castro, B. M. de C. e., Martinez, L. C., Barbosa, S. G., Serrão, J. E., Wilcken, C. F., Soares, M. A., da Silva, A. A., de Carvalho, A. G., & Zanuncio, J. C. (2019). Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43074-0>
- Chapman, R. F. (1998). *The Insect: Structure and Function*. Cambridge: University Press.
- Cruz-Landim, C., & Cavalcante, C. V. (1999). Types of cells present in the midgut of the

- insects: a review. *Naturalia*, 24, 19–39.
- Cully, D. F., Vassilatis, D. K., Liu, K. K., Pares, P. S., Van Der Ploeg, L. H. T., Schaeffer, J. M., & Arena, J. P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. In *Nature* (Vol. 371, Issue 6499, pp. 707–711). <https://doi.org/10.1038/371707a0>
- De Clercq, P., Mohaghegh, J., & Tirry, L. (2000). Effect of host plant on the functional response of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biological Control*, 18(1), 65–70. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0808>
- Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., & Vontas, J. (2018). How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.005>
- Downer, R. G. H. (1985). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (G. A. Kerkut (ed.)).
- Farder-Gomes, C. F., Saravanan, M., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2021). Azadirachtin-based biopesticide affects the respiration and digestion in *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Toxin Reviews*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1892764>
- Fialho, M. do C. Q., Zanuncio, J. C., Neves, C. A., Ramalho, F. S., & Serrão, J. E. (2009). Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Annals of the Entomological Society of America*, 102(1), 119–127. <https://doi.org/10.1603/008.102.0113>
- Gerenutti, M., & Souza Spinosa, H. (1997). Avermectinas: revisão do uso e da ação sobre o SNC. *Biotemas*, 10(2), 7–27.
- Kuwar, S. S., Pauchet, Y., Vogel, H., & Heckel, D. G. (2015). Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 59, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.016>
- Lacerda, M. C., Ferreira, A. M., Zanuncio, T. V., Zanuncio, J. C., Bernardino, A. S., & Espindula, M. C. (2004). Development and reproduction of *Podisus distinctus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed on larva of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 64(2), 237–242. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842004000200008>
- Legaspi, J. C., O’Neil, R. J., & Legaspi, B. C. (1996). Trade-offs in body weights, egg loads,

- and fat reserves of field-collected *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*, 25(1), 155–164. <https://doi.org/10.1093/ee/25.1.155>
- Lemos, W. P., Serrão, J. E., Ramalho, F. S., Cola Zanuincio, J. C., & Lacerda, M. C. (2005). Effect of diet on male reproductive tract of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 65(1), 91–96. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842005000100012>
- Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Zanuincio, J. C., & Serrao, J. E. (2014). Comparative toxicity of six insecticides on the *Rhinoceros beetle* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Florida Entomologist*, 97(3), 1056–1062. <https://doi.org/10.1653/024.097.0308>
- Martins, G. F., Ramalho-ortigao, M., Schools, R. C., Foundation, M., & Surveillance, D. V. (2022). *Oenocytes in insects. August 2012*.
- Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M. E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W., Wölfel, K., Haas, M., Kunz, K., & Raupach, G. (2015). Flupyradifurone: A brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest Management Science*, 71(6), 850–862. <https://doi.org/10.1002/ps.3932>
- Panizzi, A. R. (2013). History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. *Neotropical Entomology*, 42(2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s13744-013-0111-y>
- Pires, E. M., Pinto, M. A., Soares, G. P., Santo, T. V., & Zanuincio, J. C. (2009). *Produção de percevejos predadores*. Gráfica Suprema Editora.
- Praça, L. B., da Silva Neto, S. P., & Monnerat, R. G. (2006). *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) BIOLOGIA, AMOSTRAGEM E MÉTODOS DE CONTROLE. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1818, 1–18.
- Rodrigues Carvalho, R. B., De Andrade, F. G., Levy, S. M., Moscardi, F., & Ferreira Falleiros, Â. M. (2013). Histology and Ultrastructure of the Fat Body of *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(2), 303–310. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000200016>
- Roma, G. C., Bueno, O. C., & Camargo-Mathias, M. I. (2010). Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*, 41(5), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.12.007>
- Silva, M. T. B. da, Costa, E. C., & Boss, A. (2003). Controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) com reguladores de crescimento de insetos. *Ciência Rural*, 33(4), 601–605. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782003000400002>
- Silva, F. B., Oliveira, M. G. A., Batista, R. B., Pires, C. V., Xavier, L. P., Piovesan, N. D.,

- Oliveira, J. A. De, José, I. C., & Moreira, M. A. (2002). Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (anticarsia. *Arq. Inst. Biol.*, *69*(1), 67–74.
- Sosa-Gómez, D. R. (2004). Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Genetics and Molecular Biology*, *27*(3), 378–384. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000300012>
- Sosa-Gómez, D. R., & Miranda, J. E. (2012). Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, *56*(3), 359–362. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262012005000050>
- Sosa-Gómez, D. R., & Omoto, C. (2012). Resistência a Inseticidas e outros Agentes de Controle em Artrópodes Associados à Cultura da Soja. *Soja-Manejo Integrado de Insetos e Outros Artrópodes-Praga, May 2014*, 673–724.
- Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *121*, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Timprasert, S., Datta, A., & Ranamukhaarachchi, S. L. (2014). Factors determining adoption of integrated pest management by vegetable growers in Nakhon Ratchasima Province, Thailand. *Crop Protection*, *62*, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.008>
- Torres, J. B., & Boyd, D. W. (2009). Zoophytophagy in predatory hemiptera. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *52*(5), 1199–1208. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000500018>
- Umetsu, N., & Shirai, Y. (2020). Development of novel pesticides in the 21st century. *Journal of Pesticide Science*, *45*(2), 54–74. <https://doi.org/10.1584/JPESTICS.D20-201>
- Wislocki, P. G., Grosso, L. S., & Dybas, R. A. (1989). *Environmental aspects of abamectin use in crop protection*. Springer, New York, NY.
- Wolstenholme, A. J. (2012). Glutamate-gated chloride channels. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(48), 40232–40238. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406280>
- Zanuncio, J., Alves, J. B., Zanuncio, T. V., & Garcia, J. F. (1994). Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *Forest Ecology and Management*, *65*(1), 65–73. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(94\)90258-5](https://doi.org/10.1016/0378-1127(94)90258-5)
- Zanuncio, J. C., Ferreira, A. M. R. M., Tavares, W. S., Torres, J. B., Serrão, J. E., & Zanuncio, T. V. (2011). Rearing the Predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) with

Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) Pupa on *Eucalyptus grandis* in the Field. *American Journal of Plant Sciences*, 02(03), 449–456. <https://doi.org/10.4236/ajps.2011.23052>

Zanuncio, J. C., Mourão, S. A., Martínez, L. C., Wilcken, C. F., Ramalho, F. S., Plata-Rueda, A., Soares, M. A., & Serrão, J. E. (2016). Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Scientific Reports*, 6(September 2015), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep30261>

CAPÍTULO 1

ABAMECTIN INDUCES MORTALITY, INHIBITS FOOD CONSUMPTION, AND CAUSES HISTOLOGICAL CHANGES IN THE MIDGUT OF THE VELVETBEAN CATERPILLAR *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Journal of Pest Science. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10340-023-01642-4>

Bárbara Soares Amoroso Lima¹, Francelina Aparecida Duarte Rocha², Angelica Plata-Rueda², José Cola Zanuncio², Jamile Fernanda Silva Cossolin¹, Luis Carlos Martínez¹, José Eduardo Serrão^{1*}

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil

²Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil



Abamectin induces mortality, inhibits food consumption, and causes histological changes in the midgut of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

Bárbara Soares Amoroso Lima¹ · Francelina Aparecida Duarte Rocha² · Angelica Plata-Rueda^{2,4} · José Cola Zanuncio² · Jamile Fernanda Silva Cossolin¹ · Luis Carlos Martínez^{1,3} · José Eduardo Serrão¹

Received: 8 February 2023 / Revised: 3 May 2023 / Accepted: 25 May 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

Anticarsia gemmatalis is a defoliator caterpillar of soybean that can be controlled by chemical and biological agents. However, resistant populations of this insect have been reported, which requires research to identify control alternatives. Abamectin acts by contact and ingestion, affecting the muscles and nervous system of insects. However, its effect on other organs has not been evaluated. The present study aimed to evaluate the side effects of oral exposure to abamectin in *A. gemmatalis* caterpillars. Abamectin is lethal to *A. gemmatalis* with $LC_{50/72\text{ h}} = 96$ (74–125) mg a.i. L^{-1} . The survival of caterpillars exposed to different lethal concentrations of this insecticide decreases from 99.9% untreated, to 65.1%, 42.6%, 16.8%, and 0% with the $LC_{25/72\text{ h}}$, $LC_{50/72\text{ h}}$, $LC_{75/72\text{ h}}$, and $LC_{90/72\text{ h}}$, respectively. Abamectin reduced leaf consumption by *A. gemmatalis*, indicating an anti-feeding effect. In addition, the insecticide damaged the midgut cells of *A. gemmatalis*, and caused the degeneration of the peritrophic matrix, disorganization of epithelial striated border, accumulation of mitochondria with different shapes, increased autophagy and release of cell fragments into the midgut lumen. The goblet cells also underwent striated border disorganization in insects exposed to abamectin. The results indicate that abamectin reduces survival and digestive processes of *A. gemmatalis* after oral exposure and may be an important tool for controlling this pest.

Keywords Anti-feeding effect · Cytotoxicity · Digestive system · Histopathology · Pest control · Toxicity · Velvetbean caterpillar

Introduction

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) is a defoliator pest of soybean *Glycine max* L. (Fabales: Fabaceae), which reduces biomass, growth, and photosynthetic capacity, thus compromising crop yield (Panizzi

Communicated by Orlando Campolo.

✉ José Eduardo Serrão
jeserrao@ufv.br

Bárbara Soares Amoroso Lima
barbara.amoroso@ufv.br

Francelina Aparecida Duarte Rocha
francelina.rocha@ufv.br

Angelica Plata-Rueda
rplatar@unal.edu.co

José Cola Zanuncio
zanuncio@ufv.br

Jamile Fernanda Silva Cossolin
jamilafcossolin@gmail.com

Luis Carlos Martínez
lcmartinez@udenar.edu.co

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, Campus Universitário Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

² Departamento de Entomologia, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

³ Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pasto, Colombia

⁴ Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología, Bogotá, Colombia

2013). Integrated pest management (IPM) programs, including biological control agents (Castro et al. 2019a) and botanical biopesticides (Farder-Gomes et al. 2022), are used to control *A. gemmatalis* (Fiaz et al. 2018a). However, populations of *A. gemmatalis* resistant have been reported (Homrich et al. 2008; Bernardi et al. 2012; Sparks and Nauen 2015).

The use of synthetic chemical insecticides is still the main method for controlling *A. gemmatalis* in soybean crops. The insecticides used include neurotoxic cyclodienes, organophosphates and pyrethroids, and insect growth regulators (Panizzi 2013; Castro et al. 2021). However, populations resistant to these insecticide groups already exist (Sosa-Gómez and Miranda 2012; Panizzi 2013). Besides, those chemicals are harmful to humans (Mansour and Mossa 2011; Saillenfait et al. 2015) and non-target insects, including crop pollinators (Arthidoro de Castro et al. 2020; Carneiro et al. 2022). Thus, it is necessary the search for new control alternatives against *A. gemmatalis* to conciliate the best toxicological profile, reduce costs in crops, and minimize environmental contamination. Abamectin is an insecticide and acaricide that belongs to the avermectin chemical group of the macrocyclic lactones, derived from the natural fermentation of the soil bacteria *Streptomyces avermitilis* (Campbell et al. 1983). This insecticide acts by contact and ingestion (Cully et al. 1994; Sparks and Nauen 2015), which affects the muscle and nervous systems of insects (Martínez et al. 2019). It acts as an allosteric modulator of glutamate-mediated chloride channels and agonist of gamma-aminobutyric acid, thus increasing permeability to chloride ions, reducing locomotion, paralysis and causing the death of the insect (Wislocki et al. 1989; Cully et al. 1994; Wolstenholme 2012; Sparks and Nauen 2015). Despite the lack of reports about the use of abamectin against *A. gemmatalis*, this insecticide is used effectively to control other lepidopteran pests, including *Helicoverpa armigera* Hübner (Noctuidae) (Vojoudi et al. 2011), *Leucoptera coffeella* Guérin-Ménéville (Lyonetiidae) (Matiello et al. 2010) and *Phyllocnistis citrella* Stainton (Gracillariidae) (Paiva 2011).

Abamectin has been used in IPM programs due to its high specificity to target pests and selectivity to biological control agents (Hidayani et al. 2005; Paiva 2011). In this context, abamectin is non-phytotoxic, presents rapid degradation, low environmental persistence (Wislocki et al. 1989; Cabrera et al. 2013), and low risk for non-target organisms.

Several neurotoxic insecticides that act by ingestion have side effects on certain organs, including the digestive tract (Arthidoro de Castro et al. 2020; Santos Junior et al. 2020; Castro et al. 2021; Plata-Rueda et al. 2022). The midgut is the main organ for digestion and absorption of nutrients (Terra and Ferreira 2020) and a potential target for insecticides when insects ingest contaminated food (Denecke et al. 2018).

Effects of xenobiotics with insecticidal activity have been reported on the digestive tract *A. gemmatalis*, including tebufenozide (Fiaz et al. 2018b), chlorpyrifos (Plata-Rueda et al. 2020), and chlorantraniliprole (Castro et al. 2021), however histopathological changes caused by abamectin in the midgut, in addition to the anti-feeding effect on *A. gemmatalis*, have not yet been elucidated.

In order to verify if abamectin is toxic and causes side effects to *A. gemmatalis* caterpillars, the present study aimed to evaluate the toxicity, anti-feeding effect, histopathology, and cytotoxicity in the midgut of *A. gemmatalis* fed on abamectin to improve knowledge for the development of new chemicals to control this pest.

Materials and methods

Insects

Anticarsia gemmatalis individuals were obtained from the Laboratory of Biological Control of Insects, at the Federal University of Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brazil). *Anticarsia gemmatalis* adults were kept in screened wooden cages (30 × 30 × 30 cm) covered with plastic mesh containing a paper sheet as oviposition site, kept at 25 ± 2 °C, 70 ± 10% relative humidity, 12:12 h (light:dark) photoperiod, and fed daily on liquid diet (650 mL water, 20 g honey, 50 g sugar, 1.05 g ascorbic acid, 1.05 g nipagin, and 350 mL beer; Greene et al. 1976) soaked in a cotton ball in the cage floor. Egg masses were collected every 2 days and transferred to a 1 L polystyrene container. After hatching, the *A. gemmatalis* caterpillars were fed on artificial diet consisting of 10 g agar, 15.6 g yeast, 25 g wheat germ, 25 g soy protein, 31.2 g beans, 12.5 g casein, and 2.5 mL of vitamin solution (1.2% ascorbic acid, 0.03% calcium pantothenate, 0.015% niacin, 0.008% riboflavin, 0.004% thiamine and 0.004% HCl) (Greene et al. 1976). Third-instar caterpillars of *A. gemmatalis* were used in the bioassays, following the standardized toxicological method to evaluate the effects of insecticides recommended by the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC; test No. 020) (IRAC Susceptibility Test Methods 020 2009) on Noctuidae pests.

Concentration-mortality bioassay

The insecticide abamectin (Kraft®, 36 g L⁻¹ active ingredient, Cheminova A/S, Harboore, Denmark) was diluted in distilled and deionized water (ddH₂O) to obtain a stock solution, from which six dilutions were prepared from the field recommended concentration for control of soybean pest (175, 351, 703, 1400, 2810, and 5620 mg a.i. L⁻¹) to assess toxicity, build the dose–response curve and estimate the lethal concentrations LC_{25/72 h}, LC_{50/72 h}, LC_{75/72 h}, and

LC_{90/72 h}. Control was performed with ddH₂O. For each dilution, 1 μ L was placed daily on 0.5 g artificial diet, also replaced daily. Three replicates with 30 *A. gemmatalis* caterpillars were individualized in Petri dishes (90 mm in diameter) and fed on artificial diet, following a randomized experimental design. The number of dead caterpillars was recorded during a 72 h period.

Time-mortality bioassay

Procedures and exposure conditions were the same as aforementioned for the concentration-mortality bioassay. *Anticarsia gemmatalis* caterpillars were individualized in Petri dishes and exposed by ingestion to the lethal abamectin concentrations equivalent to the LC_{25/72 h}, LC_{50/72 h}, LC_{75/72 h}, and LC_{90/72 h}, estimated from the concentration-mortality bioassay. Control was performed with ddH₂O. The number of live caterpillars was recorded every 6 h, for 72 h. Three replicates of 10 individualized caterpillars were used per abamectin lethal concentration, following a randomized design.

Anti-feeding effect

The exposure of *A. gemmatalis* to abamectin was performed by the caterpillar feeding method, using treated soybean leaves (Plata-Rueda et al. 2020). Squares of soybean leaves (20 \times 20 mm) were sterilized with 5% sodium hypochlorite, washed three times in ddH₂O, and air dried. Then, the squares of soybean leaves were immersed for 5 s (Plata-Rueda et al. 2020, 2022) in a solution of the estimated LC₅₀ and LC₉₀ of abamectin, air dried for 5 min at room temperature and transferred, individually, to Petri dishes containing a caterpillar that had been previously starved for 24 h. After 6 h of exposure to the caterpillar, each soybean leaf was photographed with a digital camera (D40, 18–55 mm lens, Nikon Corporation, Tokyo, Japan), 15 cm macro focus, natural and fluorescent light (SB-700 Nikon Corporation, Japan). The images were analyzed using a digital analysis software system, UTHSCSA Image Tool v. 2.0 (University of Texas, Austin, TX, USA). The leaf area consumed by each caterpillar was measured in mm² with pixels based on the RGB histogram (red 700 nm, green 546.1 nm, and blue 435.8 nm). Fifteen replicates per abamectin concentration (LC₅₀ and LC₉₀) and control were performed in a completely randomized design.

Histopathology

Twenty 24 h starved *A. gemmatalis* caterpillars were fed on a diet with the estimated LC₅₀ concentration of abamectin. Each caterpillar was individualized in a Petri dish and fed on 0.5 g artificial diet containing 1 μ L of abamectin

LC_{50/72 h} or ddH₂O as control (Plata-Rueda et al. 2020; Castro et al. 2021). After feeding for 1.5, 3, 6, 12, and 24 h, the caterpillars (n=4 each time) were cryoanesthetized at -4 °C, for 5 min, dissected in insect saline solution (0.1 M NaCl + 0.2 M KH₂PO₄ + 0.2 M Na₂HPO₄), and the midgut was transferred to Zamboni's fixative solution (Stefanini et al. 1967), for 12 h, at 5 °C. Then, the samples were dehydrated in a graded ethanol series (70%, 80%, 90%, and 95%) and embedded in glycol methacrylate resin (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). 3 μ m thick sections were obtained on a rotatory microtome, stained with hematoxylin and eosin (HE), and analyzed with an Olympus BX-60 light microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Cytotoxicity

Caterpillars of *A. gemmatalis* were exposed to abamectin on contaminated diet with the estimated lethal concentration LC₅₀, as aforementioned, and cryoanesthetized at -4 °C. The midgut was dissected and transferred to 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 containing 0.2 M sucrose for 4 h, at room temperature. The samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 2 h, washed with the buffer, dehydrated in a graded ethanol series (70%, 80%, 90%, and 99%) and embedded in LR White resin (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, USA). Ultrathin sections (70–90 nm thick) were obtained with a diamond knife in a Sorvall MT2-BMT2-B ultramicrotome (Sorvall Instruments, Wilmington, USA), stained with 1% aqueous uranyl acetate and lead citrate (Reynolds 1963) and examined with a Zeiss Libra 120 transmission electron microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Statistics

Concentration-mortality data were submitted to Probit analysis to estimate the concentration-mortality curve, using the PROC PROBIT procedure of the SAS program v. 9.0 (SAS Institute, Campus Drive Cary, NC, USA). The time-mortality data were submitted to survival analysis with Kaplan–Meier estimators (log-rank-test), using the Origin Pro v.9.1 software system (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Data from *A. gemmatalis* caterpillars that survived until the end of the experiment were treated as censored. Anti-feeding data were transformed into arcsine to fit the assumptions of normality and homoscedasticity, and the anti-feeding effect was submitted to one-way analysis of variance (One-way ANOVA), and the means were compared post-hoc with Tukey's honestly significant difference (HSD) test, at 5% of significance level.

Table 1 Lethal concentration of abamectin (Kraft®, 36 g L⁻¹ active ingredient) against *Anticarsia gemmatilis* caterpillars, after 72 h of exposure, obtained from probit analysis (d.f.=5, slope=1.96±0.25, intercept=1.990)

Insects	Lethal concentration	Estimated concentration (mg a.i. L ⁻¹)	Confidential limits 95% (mg a.i. L ⁻¹)	χ^2 (<i>p</i> value)
90	LC ₂₅	43	29–58	1.39 (0.84)
90	LC ₅₀	96	74–125	
90	LC ₇₅	213	160–315	
90	LC ₉₀	435	298–777	

The chi-square (χ^2) value refers to the goodness of fit test at $p > 0.05$

Results

Concentration-mortality bioassay

The concentration-mortality model used was adequate ($p > 0.05$), demonstrating that abamectin was toxic to *A. gemmatilis* with LC_{50/72 h} = 96 (74–125 mg a.i. L⁻¹) (Table 1). Mortality in the control group was less than 1%.

Time-mortality bioassay

The survival of *A. gemmatilis* caterpillars exposed to different lethal concentrations of abamectin for 72 h of evaluation varied significantly (log-rank test $\chi^2 = 39.18$, d.f. = 4, $p < 0.001$), decreasing from 99.9% in untreated to 65.1%

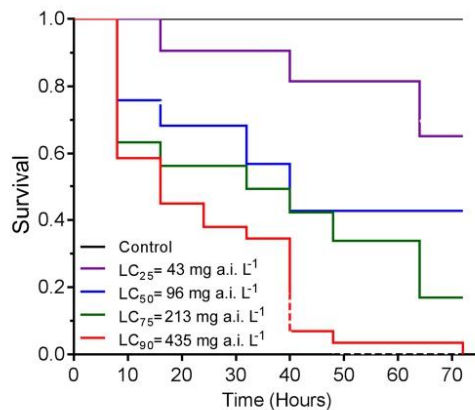


Fig. 1 Survival curves of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars exposed to different lethal concentrations of abamectin (Kraft®, 36 g active ingredient L⁻¹) and subjected to survival analysis, using the Kaplan-Meier estimators ($p < 0.001$)

(LC_{25/72 h}), 42.6% (LC_{50/72 h}), 16.8% (LC_{75/7 h}), and 0% (LC_{90/72 h}) (Fig. 1).

Anti-feeding effect

The anti-feeding effect on *A. gemmatilis* caterpillars treated with abamectin LC₅₀ and LC₉₀ concentrations reveals that the consumed area of soybean leaves ($F_{2,14} = 18.30$, $p < 0.001$) decreases from 431 ± 32 mm², in untreated, to 246 ± 27 and 235 ± 18 mm², in insects exposed to LC₅₀ and LC₉₀ of abamectin, respectively ($F_{2,14} = 18.30$, $p < 0.001$; Fig. 2).

Histopathology

The midgut of *A. gemmatilis* in the control presented a single layered epithelium with goblet and digestive cells with well-developed striated borders and the lumen with evident peritrophic matrix (Fig. 3A). The goblet cells were characterized by a deep cavity with striated border and a basal nucleus (Fig. 3B). The columnar digestive cells presented apical surface with striated border, cytoplasm with some granules and vacuoles and spherical or elongated nucleus with decondensed chromatin (Fig. 3B).

Histopathological changes in the midgut epithelium of *A. gemmatilis* were observed 1.5 h after oral exposure to LC₅₀ of abamectin. The cytoplasm of the digestive cells revealed an apparent increase in the amount of vacuoles,

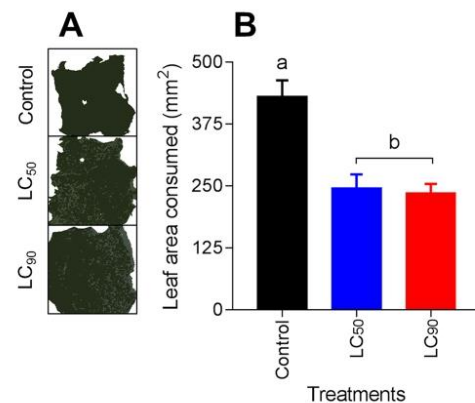


Fig. 2 Anti-feeding effect caused by abamectin on *Anticarsia gemmatilis* caterpillars. **A** Leaf sections (20×20 mm) treated with distilled-deionized water (control) and insecticide (LC₅₀ and LC₉₀) submitted to color binarization (white and green) to quantify the area consumed. **B** Leaf area (mean ± SE) consumed by *A. gemmatilis* after exposure to abamectin (LC₅₀ and LC₉₀) and water (control). Bars with different letters differ significantly by the Tukey's mean separation test ($p < 0.05$)

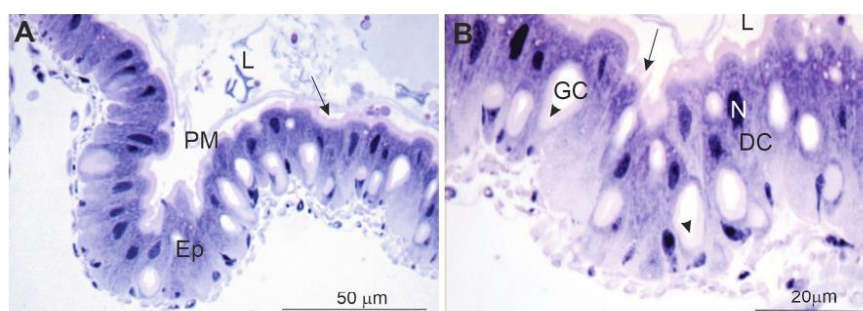


Fig. 3 Histological section of the midgut of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars (hematoxylin–eosin stained), from the untreated group. **A** Monolayer of midgut epithelium (Ep) lined internally by peritrophic matrix (PM), well-developed striated border (arrow), and intestinal

lumen (L). **B** Digestive cells (DC) with striated border (arrow) and nucleus with decondensed chromatin (N), and goblet cells (GC) with internal striated border (arrowheads)

and the striated border was disorganized in some portions (Fig. 4A, B). Cell fragments, some with the nucleus, were released into the gut lumen (Fig. 4A). The nucleus of the digestive cells presented some clusters of condensed chromatin, and the peritrophic matrix was disorganized, with granular aspect (Fig. 4B). The goblet cells presented disruption of the striated border and an acidophilic spherical structure inside their cavity (Fig. 4B).

After 3 h of exposure to abamectin, an extensive portion of the midgut epithelium was irregular and presented a disorganized striated border (Fig. 4C). The digestive cells exhibited increased number of vacuoles in the cytoplasm (Fig. 4D). Numerous apical protrusions and cell fragments were released into the lumen (Fig. 4C, D). The goblet cells presented a more degraded striated border and evident formation of spherical structures released into the cell cavity (Fig. 4D).

At 6 h of insecticide exposure, the midgut epithelium exhibited a strong irregular architecture (Fig. 4E), digestive cells with high cytoplasm vacuolization, nucleus rich in condensed chromatin, increased apical protrusions and cell fragments released into the gut lumen (Fig. 4E). The apical striated border and the peritrophic matrix were disorganized (Fig. 4E, F). The goblet cells had a degraded striated border and a spherical structure in the cavity (Fig. 4F).

Anticarsia gemmatilis caterpillars that fed for 12 h on LC₅₀ abamectin exhibited disorganized midgut epithelium and disorganized striated border, digestive cells that were highly vacuolated and large cell fragments released to the lumen (Fig. 5A, B). The goblet cells displayed a strongly degraded striated border (Fig. 5B).

After 24 h of exposure to LC₅₀ of abamectin, the midgut epithelium remained intensely disorganized, with digestive cells rich in cytoplasm vacuoles, fragments released into the lumen (Fig. 5C, D). The goblet cells presented a

degraded striated border and spherical structure in the cavity (Fig. 5D).

Cytotoxicity

Digestive cells of *A. gemmatilis* caterpillars from untreated group presented an apical surface with well-developed microvilli (Fig. 6A). Mitochondria, vacuoles, and granules were observed in the apical cytoplasm (Fig. 6A). In the basal portion, a labyrinth was formed by plasma membrane infoldings associated with mitochondria (Fig. 6B). The nucleus evidenced the predominance of decondensed chromatin, with some clusters of condensed chromatin and a well-developed nucleolus (Fig. 6B). The goblet cells presented an internal cavity rich in microvilli (Fig. 6C) and the basal cytoplasm with vacuoles, nucleus with evident nucleolus and some clusters of condensed chromatin (Fig. 6D).

Caterpillars orally exposed for 3 h to LC₅₀ abamectin exhibited changes in the midgut digestive cells, including microvilli disorganization, cytoplasm rich in granules, autophagic vacuoles with membranous content (Fig. 7A) and partially empty glycogen deposits (Fig. 7B). The digestive cell nucleus presented clusters of condensed chromatin (Fig. 7B). The goblet cells presented disorganized microvilli in the cavity, besides an apparent increase in the amount of mitochondria in the perinuclear (Fig. 7C) and basal regions (Fig. 7D).

After 6 h of oral exposure to LC₅₀ of abamectin, the midgut of *A. gemmatilis* exhibited digestive cells with cytoplasm rich in vacuoles, granules and mitochondria (Fig. 8A). The basal labyrinth associated with mitochondria had some granules, while the nucleus presented several clusters of condensed chromatin (Fig. 8B). The goblet cell presented cavity surfaces with strong microvilli disorganization (Fig. 8C),

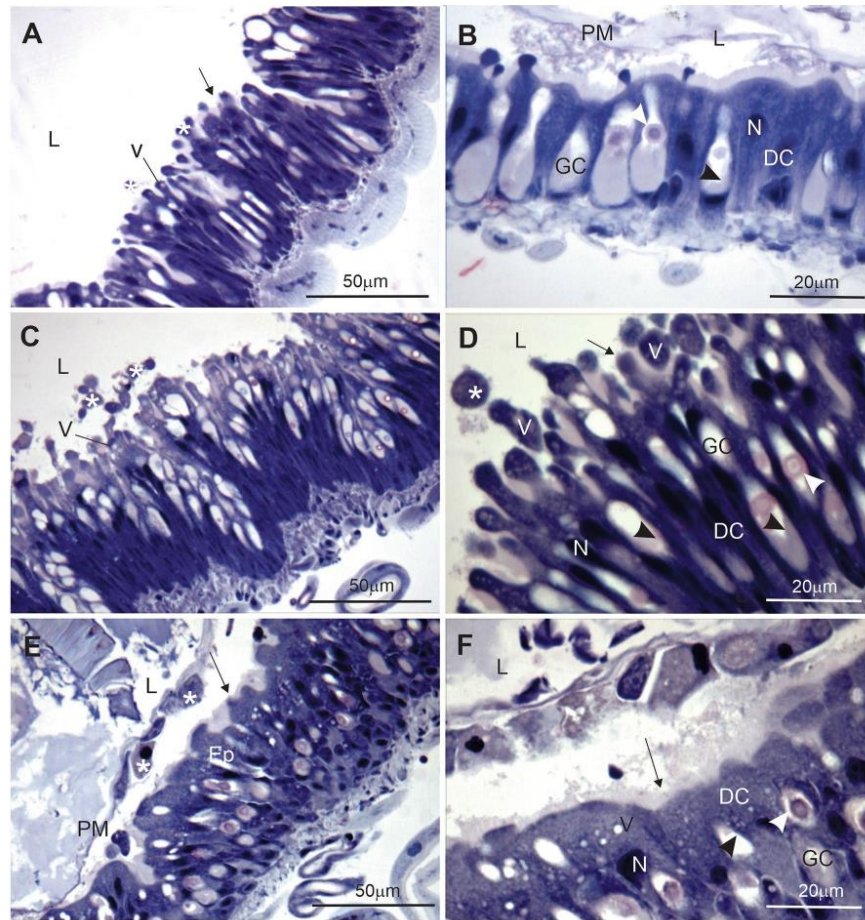


Fig. 4 Histological sections of the midgut of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars exposed by ingestion to LC_{50} abamectin after 1.5 h (A, B), 3 h (C, D) and 6 h (E, F). A Epithelium with release of cell fragments towards the lumen, degradation of the striated border, and presence of vacuoles. B Detail of the epithelium showing disorganized peritrophic matrix, digestive cells with nucleus. In the goblet cells, the internal striated border began to degrade, and a spherical acidophilic structure was formed. C Cell fragments in the lumen and vacuoles. D Detail of the epithelium with intense vacuolization and cell fragmentation, degraded striated border, digestive cells with nucleus, and goblet cells with border degradation and formation of a spheri-

cal structure in the cytoplasm. E Disorganized epithelium with cell fragmentation in the lumen and disorganized peritrophic matrix. F Striated border in the beginning of disorganization, high vacuolization, digestive cells with highly condensed nucleus, goblet cells with degraded internal striated border, and internal structure in the cavity. Hematoxylin and eosin stained. Arrows—degraded striated border, black arrowhead—degrading striated border, DC digestive cells, Ep epithelium, GC goblet cells, L lumen, N nucleus, PM peritrophic matrix, V vacuoles/vacuolization, white arrowhead—spherical acidophilic structure, white asterisks—cell fragments

basal cytoplasm rich in autophagic vacuoles with membranous content and the nucleus with clusters of condensed chromatin (Fig. 8D).

After 24 h of insecticide exposure, the apical region of the digestive cell became rich in granules, autophagic vacuoles

and mitochondria (Fig. 9A). The nucleus presented some cluster of condensed chromatin, and the perinuclear cytoplasm with mitochondria (Fig. 9B). The surface of the goblet cell cavity exhibited almost completely degraded microvilli,

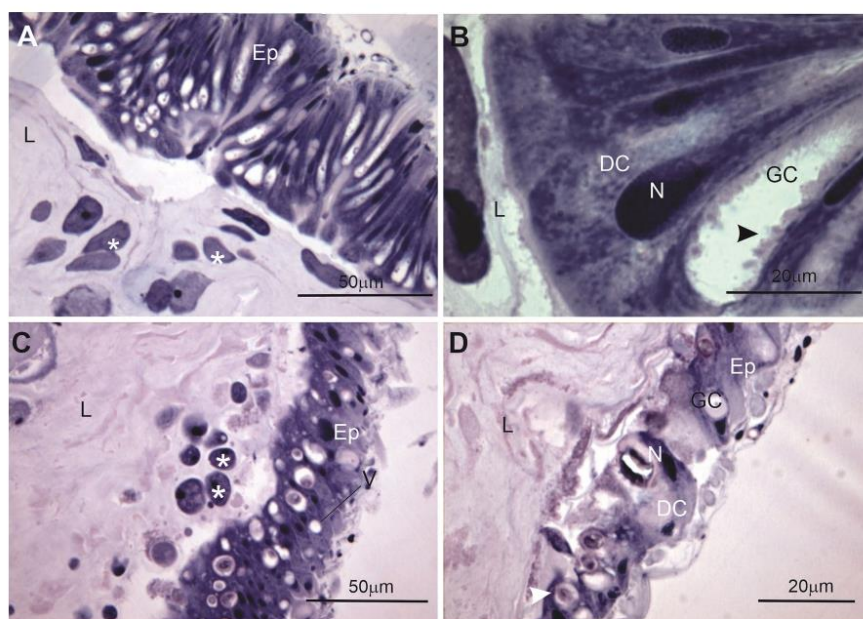


Fig. 5 Histological sections of the midgut of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars exposed by ingestion to LC_{50} abamectin, after 12 h (**A, B**) and 24 h (**C, D**). **A** Highly irregular epithelium (Ep) and cell fragments in the midgut lumen (white asterisk) released into the lumen (L). **B** Detail of nucleus (N) of digestive cells (DC) and goblet cells (GC) with disorganized striated border (black arrowhead). **C** Strong

disorganization of the digestive epithelium (Ep), intense vacuolization (V), and cell fragmentation (white asterisks) in the lumen (L). **D** Detail of the intense disruption of the digestive epithelium (Ep). Goblet cells (GC) with acidophilic spherical structure (white arrowhead) formed in their cytoplasm and digestive cells (DC) with nucleus (N). Hematoxylin and eosin stained

the cytoplasm with mitochondria (Fig. 9C) and the basal portion rich in mitochondria (Fig. 9D).

Discussion

The toxicity, survival, anti-feeding, and histopathological effects on the midgut of *A. gemmatilis* caused by abamectin (Kraft®, 36 g L⁻¹, Cheminova A/S, Harboore, Denmark) were determined from bioassays, under laboratory conditions. Abamectin is toxic to *A. gemmatilis* caterpillars and has a strong effect through oral exposure. The insecticide causes mortality in *A. gemmatilis*, at relatively low concentrations ($LC_{50}=96$ mg L⁻¹ and $LC_{90}=435$ mg L⁻¹), and in a concentration-dependent manner, as observed in *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) (Martínez et al. 2019). *Anticarsia gemmatilis* caterpillars exposed to abamectin exhibits low mobility, followed by paralysis and death, symptoms that are consistent with the effect caused by avermectins with action mode as glutamatergated chloride channel allosteric modulators (Sparks and

Nauen 2015). The toxicity of abamectin has been demonstrated in insect pests, such as *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) (Lietti et al. 2005), *Plutella xylostella* Linnaeus (Plutellidae) (Monnerat et al. 2000; Oliveira et al. 2011), and *R. palmarum* (Martínez et al. 2019), which indicates its potential use in agricultural pest control. In general, abamectin causes toxicity on *A. gemmatilis* caterpillars, and mortality increases at higher concentrations of the insecticide.

Significant temporal variations in the survival of *A. gemmatilis* caterpillars are observed after consumption of food contaminated with abamectin. This indicates that the insecticide crosses the midgut wall and is transported by the hemolymph thus, reaching the target receptors. The results obtained here indicate that periods between 6 and 72 h of oral exposure to abamectin induce mortality in *A. gemmatilis*, which is associated with the rapid neurotoxic action of this insecticide (Martínez et al. 2019). Variations in the survival of *A. gemmatilis* depending on the lethal concentrations applied may be associated with the amount of insecticide necessary to induce acute or chronic toxicity, according

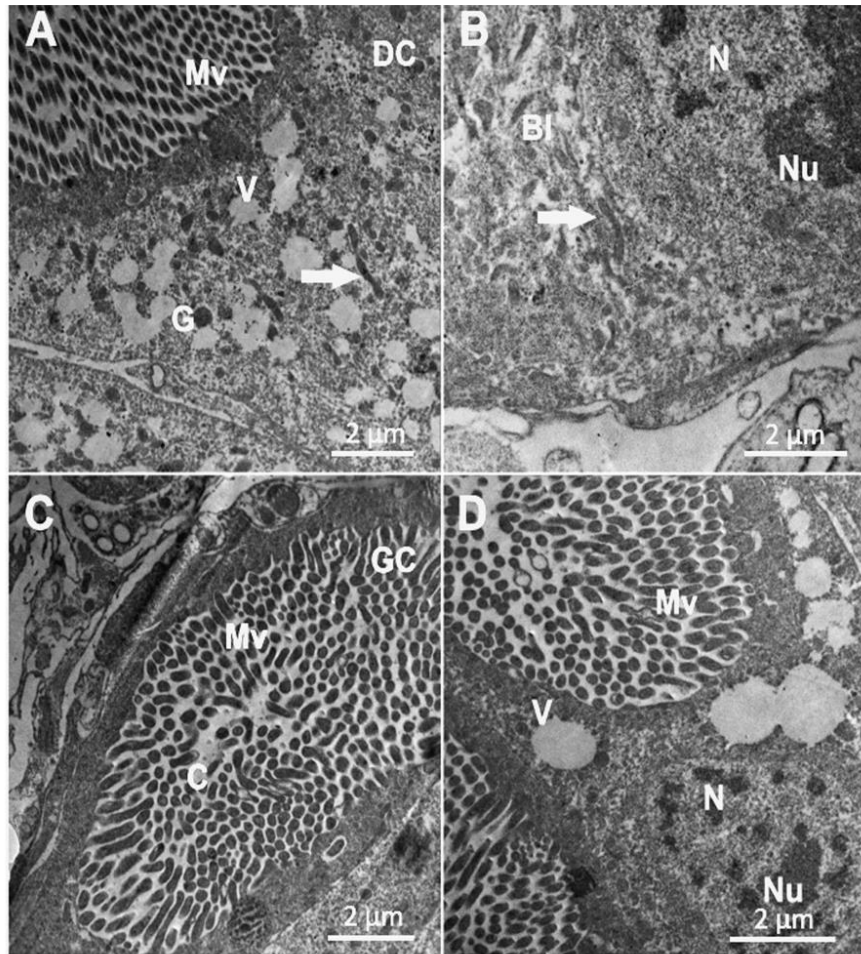


Fig. 6 Transmission electron micrographs of digestive cells (DC) and goblet cells (GC) from the untreated midgut of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars. **A** Apical region with well-developed microvilli (Mv), granules (G), and mitochondria (arrow). **B** Basal region of digestive cells presenting basal labyrinth (Bl) with associated mitochondria

(arrow) and nucleus (N) with evident nucleolus (Nu). **C** Goblet cell exhibiting evident cavity (C) with microvilli (Mv). **D** Basal region of the goblet cell showing part of the cavity with microvilli (Mv), vacuoles (V) and nucleus (N) with evident nucleolus (Nu)

to the exposure mode of the insect (Martínez et al. 2019). Therefore, low survival compromises the insect physiology, particularly altering the detoxification processes during the insecticide exposure (Rharrabe et al. 2007). Although the effects of abamectin on development, life cycle and fecundity of the insects remain unknown, our data reveal the acute effect of abamectin on *A. gemmatilis* by oral exposure, with possible population reduction during the first days, which is

crucial in crop protection against high infestations. The low survival rate of *A. gemmatilis* in short periods of exposure suggests that abamectin causes adverse effects on caterpillars and may be a potential alternative to control this insect.

Anticarsia gemmatilis presents low consumption of abamectin-treated soybean leaves, which suggests an anti-feeding effect. Insecticides with anti-feeding effects play an important role in phytophagous insects, causing negative

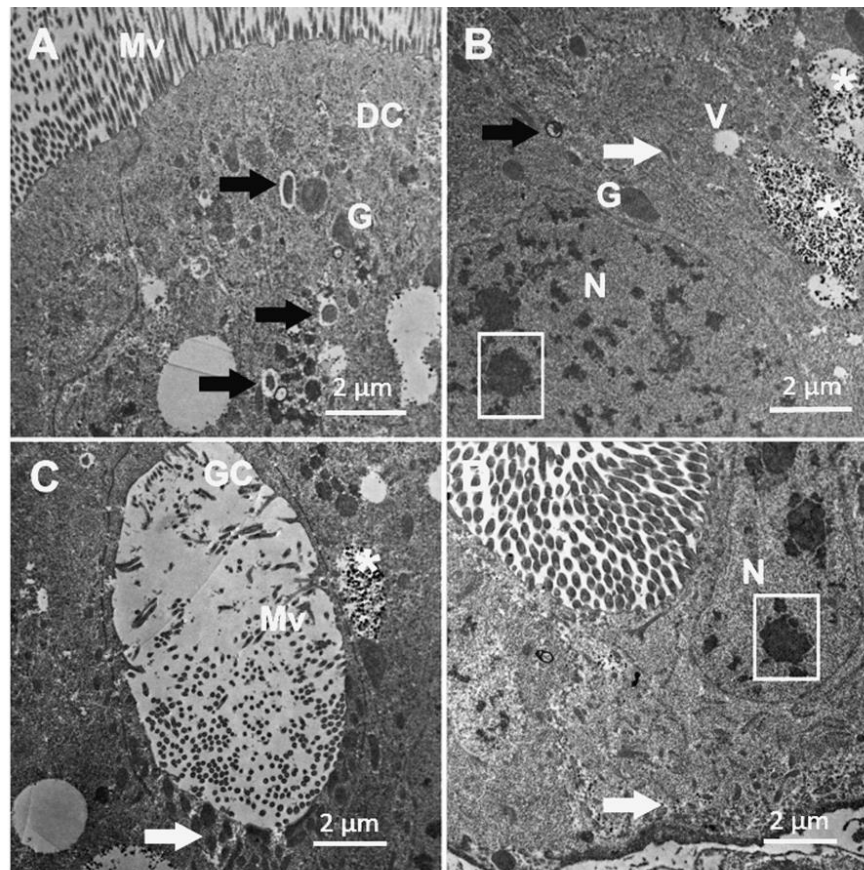


Fig. 7 Transmission electron micrographs of midgut of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars that consumed LC_{50} of abamectin, after 3 h of exposure. **A** Digestive cell (DC) showing microvilli (Mv) with onset of degradation, presence of granules (G) and formation of autophagic vacuoles (black arrows). **B** Basal region of the digestive cell with autophagic vacuoles (black arrow), vacuole (V), glycogen reserve

(asterisks), mitochondria (white arrow), and nucleus (N) with formation of condensed chromatin clusters (square). **C** Goblet cell (GC) with degrading microvilli (Mv), accumulating mitochondria (arrow) and glycogen reserve (asterisk). **D** Basal region of the goblet cell with numerous mitochondria (arrow) and nucleus (N) with cluster of condensed chromatin (square).

responses, such as feeding inhibition, damage to the midgut, and reduced nutrient absorption (Farder-Gomes et al. 2022). Here, the high feeding inhibition caused by the LC_{50} and LC_{90} of abamectin suggests that the intoxication effect on *A. gemmatalis* is cumulative. Anti-feeding effect occurs in *A. gemmatalis* caterpillars orally exposed to the insecticides chlorpyrifos (Plata-Rueda et al. 2020) and azadirachtin (Farder-Gomes et al. 2022), and in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to deltamethrin (Vinha et al. 2021). The low foliar consumption by caterpillars exposed to different lethal concentrations of

abamectin may be due to deleterious effects on the midgut during the digestion of contaminated food, which inhibits the production of digestive enzymes, disrupts energy metabolism and reduces the detoxification response. Thus, abamectin control *A. gemmatalis*, besides reducing the damage caused to the plant by the caterpillars after the first hours of insecticide ingestion (Plata-Rueda et al. 2020; Farder-Gomes et al. 2022). Reduced food consumption by caterpillars may also be due to the neurotoxic action of abamectin, which impairs insect locomotion and, consequently, reduces defoliation activity due to the gradual paralyzing effect of

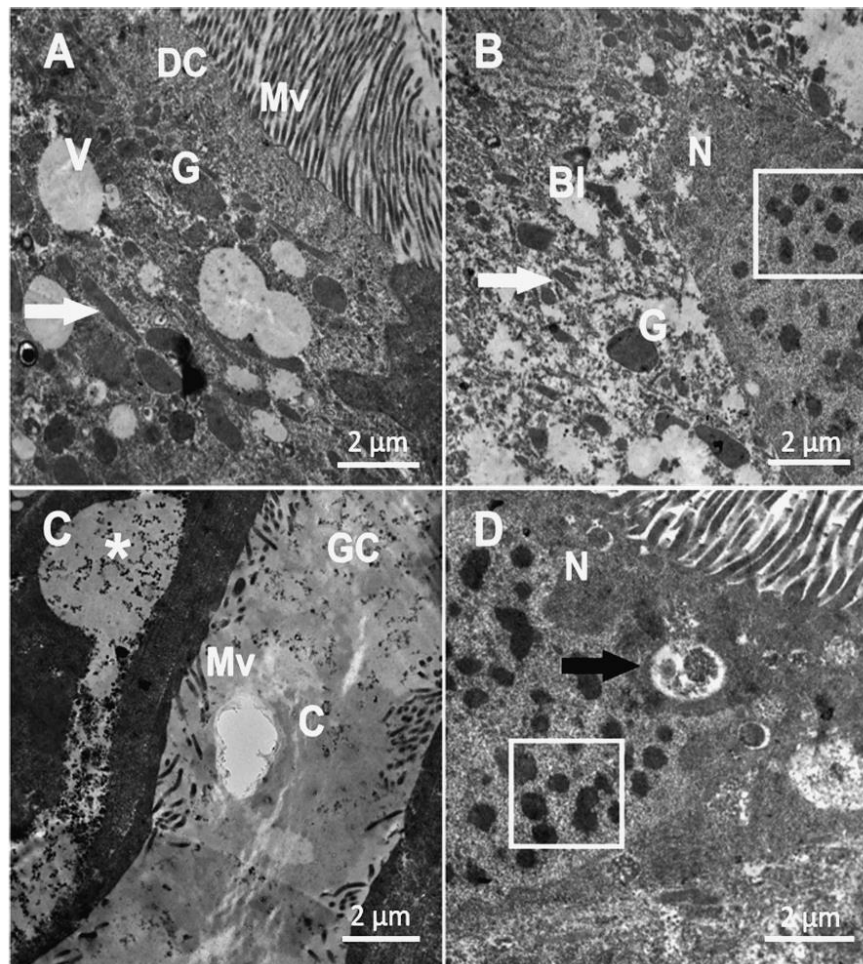


Fig. 8 Transmission electron micrographs of the midgut of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars that ingested LC₅₀ abamectin after 6 h of exposure. **A** Apical region of the digestive cell (DC) with granules (G), vacuoles (V), abundant mitochondria (arrow) and degrading microvilli (Mv). **B** Basal region presenting nucleus (N) with clumps

of condensed chromatin (square), basal labyrinth (Bl) with mitochondria (arrow) and granules (G). **C** Goblet cell (GC) with emphasis on degraded microvilli (Mv) in the cavity (C) and glycogen reserve (asterisk). **D** Basal region with autophagic vacuoles (black arrow) and nucleus (N) with condensed chromatin clusters (square)

of the insecticide (Strong and Brown 1987; Wislocki et al. 1989).

The changes caused by abamectin in the midgut epithelium of *A. gemmatilis*, such as degradation of the peritrophic matrix and striated border, cytoplasmic vacuolization, and autophagy, in both the goblet and digestive cells, indicate a harmful effect on the gut functions. The peritrophic matrix undergoes disorganization and gradual

degradation, according to the exposure period. The peritrophic matrix is a noncellular chitinous structure that protects the midgut epithelium (Lehane and Billingsley 2012; Denecke et al. 2018). It is the first barrier to protect the midgut against toxins, by delaying the contact of digestive cells with toxins or pathogens, preventing microbial infections and mechanical damage, as well as compartmentalizing digestion (Denecke et al. 2018; Hegedus et al. 2019; Terra

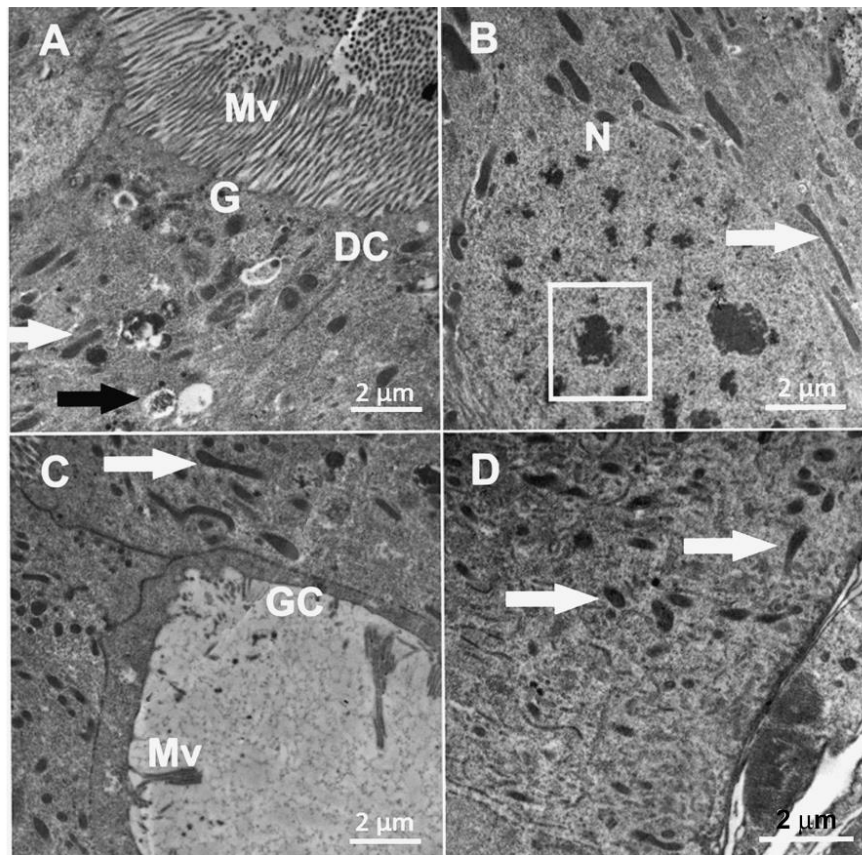


Fig. 9 Transmission electron micrographs of the midgut of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars that consumed LC₅₀ abamectin, after 24 h of exposure. **A** Digestive cell (DC) showing apical region with granules (G), autophagic vacuoles (black arrow), abundant mitochondria (white arrow) and microvilli (Mv). **B** Basal region presenting nucleus

(N) with clumps of condensed chromatin (square), and cytoplasm with mitochondria (arrow). **C** apical region of the goblet cell (GC) with degraded microvilli (Mv) and mitochondria (arrow). **D** Basal region rich in mitochondria (arrows)

and Ferreira 2020). The damage caused by abamectin to the peritrophic matrix may have facilitated the arrival of the insecticide in the midgut epithelial cells, which impairs the caterpillar's digestion, since cell functions may be compromised. Thus, the damage caused to the peritrophic matrix may explain the effects on *A. gemmatalis* midgut in the first hours after abamectin exposure, including the disorganization in the striated border of the digestive and goblet cells, which has also been reported in the midgut cells of *A. gemmatalis* exposed to squamocin (Fiaz et al. 2018a), tebufenozide (Fiaz et al. 2018b), chlorantraniliprole (Castro et al. 2019a, b) and chlorpyrifos (Plata-Rueda et al. 2020).

Digestive cells are responsible for the secretion of digestive enzymes, the components of the peritrophic matrix, and nutrient absorption (Chiang et al. 1986; Lehane and Billingsley 2012). These functions are optimized by the occurrence of the striated border formed by microvilli, which increases the surface of these cells (Serrão and Cruz-Landim 1995). Once the striated border is damaged, these cell functions are compromised.

In goblet cells, the cell surface increase in the cavity provided by the striated border enhances the active transport of potassium ions from the hemolymph to the lumen and the absorption of nutrients (Gomes et al. 2013), besides

contributing to the passage of food through the digestive tract (Castro et al. 2019a, b). The disorganization and degradation of this striated border caused by abamectin in *A. gemmatalis* may negatively affect the functions of the goblet cells. After the first hours of exposure to the insecticide, a spherical and acidophilic structure is formed in the cavity of some goblet cells. There is no description of this structure in the literature, and it was not detected by transmission electron microscopy.

The apical protrusions, increased granules and vacuoles in the cytoplasm of digestive cells, as well as the release of cell fragments into the midgut lumen, observed in *A. gemmatalis* caterpillars orally exposed to abamectin, may be responses involved in the renewal of cytoplasm content (Cruz-Landim et al. 1996), apocrine secretion (Cristofolletti et al. 2001; Martínez et al. 2019; Santos Junior et al. 2020) or cell death (Clarke 1990; Tettamanti et al. 2007; Azevedo et al. 2009). Apoptosis induction caused by abamectin has been reported in Sf9 cell line from *Spodoptera frugiperda* (Huang et al. 2011), rat hepatocytes (Maioli et al. 2013), human gastric cell line MGC803 (Zhu et al. 2019), and respiratory organs in carps (Feng et al. 2023).

Autophagy is primarily a cellular defense event against oxidative stress (Chen et al. 2009; Perez-Perez et al. 2014), which may represent a mechanism for cell life span extension (Madedo et al. 2015). However, it has also been associated with cell death primarily characterized by high cytoplasm vacuolization (Clarke 1990; Taatjes et al. 2008). The high vacuolization of digestive cells was also observed in the midgut of *A. gemmatalis* mediated by *Bt* (Castro et al. 2019a) and chlorantraniliprole (Castro et al. 2021), *Podisus nigrispinus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) exposed to permethrin (Martínez et al. 2018), and *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) with spinosad (Lopes et al. 2018) and fipronil (Da Silva Cruz et al. 2010).

Autophagy is also considered a defense mechanism against oxidative stress caused by the accumulation of reactive oxygen species (Perez-Perez et al. 2014), thus increasing the cell life span (Madedo et al. 2015), which has been reported in insects exposed to insecticides (Carneiro et al. 2022). The results obtained here may indicate autophagy as a response of digestive cells to reduce the damage caused by exposure to abamectin. The accumulation of mitochondria with different shapes in the cells of caterpillars treated with abamectin may be related to autophagy, due to oxidative stress probably induced by the insecticide. Oxidative stress and the production of reactive oxygen species directly affect the mitochondrial respiratory chain. This may generate even more reactive oxygen species, which is critical for inducing apoptosis (Wang et al. 2016; Farder-Gomes et al. 2021). Mitochondria may control cell survival and death through a balanced homeostasis mainly regulated through mitochondrial fission and fusion (Abate et al. 2020). Several

components required in mitochondrial fission and fusion that imply changes in organelle ultrastructure are also essential for apoptosis, autophagy and necrosis. Thus, mitochondria are vital mediators of many apoptotic programs (Burke 2017; Bloemberg and Quadraltero 2019; Abate et al. 2020). In addition, the occurrence of depleting glycogen stores indicates the mobilization of the reserve necessary for cell defense by mitochondria, since glycogen is the main mitochondrial energy source (Alberts et al. 2015). Thus, the increase in mitochondria with ultrastructural changes and the mobilization of glycogen may indicate responses to prevent cell death. The cutting layer can influence in this case, however the difference between the organelles untreated and treated are clear.

In the initial periods of exposure of *A. gemmatalis* to LC₅₀ of abamectin, high vacuolization may indicate autophagy, but as exposure time increases, the apoptotic pathway may be activated, due to the irreversible damage caused (such as pyknosis). It suggests the coexistence of both autophagic and apoptotic pathways (González-Polo et al. 2005; Nikolettou et al. 2013), such as the necrotic and apoptotic pathways (Zeiss 2003; Qusti et al. 2007).

Insecticides, such as chlorpyrifos (Plata-Rueda et al. 2020), tebufenozide (Fiaz et al. 2018b) and chlorantraniliprole (Castro et al. 2019a, b), present results for *A. gemmatalis* similar to those obtained here with abamectin, at higher lethal concentrations, though. It indicates that abamectin has potential to be used in the control of this pest, at low concentrations, which reduces costs and environmental and social impacts.

Conclusions

The results demonstrate that abamectin is toxic to *A. gemmatalis*, inhibits feeding and induces histopathological changes in the midgut of this insect, which corroborates that it is an alternative to control this pest.

Author contributions

BSAL and JES: Conceptualization, investigation, formal analysis, writing original draft, review and editing. BSAL and LCM: Data curation, writing original draft FADR, APR and JFSC: formal analysis and data curation. JCZ: writing original draft, review and editing. JES: funding acquisition and supervision. The authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements Authors are grateful to the Nucleus of Microscopy and Microanalysis—UFV for technical assistance and to Eneida Sacramento, for proofreading the English version of this manuscript.

Fundings This study was funded by the Brazilian research agencies ‘Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)’ (Grant No. 303243/2022-8), ‘Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)’ (Grant No. 001), and ‘Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)’ (Grant Nos. 02367-18; 00856-19).

Availability of data and materials The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Code availability This article does not use software for application.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Consent to participate This article does not contain any studies with human participants.

Consent for publication This article does not contain any studies with human participants.

References

- Abate M, Festa A, Falco M et al (2020) Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Semin Cell Dev Biol* 98:139–153. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.022>
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2015) *The molecular biology of the cell*, 6th edn. Garland Science, New York
- Arthidoro de Castro MB, Martínez LC, Cossolin JFS, Serra RS, Serrão JE (2020) Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere* 248:126075. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126075>
- Azevedo DO, Neves CA, Santos Mallet JRD, Gonçalves TCM, Zanuncio JC, Serrão JE (2009) Notes on midgut ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *J Med Entomol* 46:435–441. <https://doi.org/10.1603/033.046.0304>
- Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger GU, Head G, Omoto C (2012) Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Manag Sci* 68:1083–1091. <https://doi.org/10.1002/ps.3271>
- Bloemberg D, Quadrilatero J (2019) Autophagy, apoptosis, and mitochondria: molecular integration and physiological relevance in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 317:111–130. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00261.2018>
- Burke PJ (2017) Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer. *Trends Cancer* 3:857–870. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.10.006>
- Cabrera JA, Menjivar RD, Dababat AFA, Sikora RA (2013) Properties and nematocidal performance of avermectins. *J Phytopathol* 161:65–69. <https://doi.org/10.1111/jph.12014>
- Campbell WC, Fisher MH, Stapley EO et al (1983) Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* 221:823–828. <https://doi.org/10.1126/science.6308762>
- Carneiro LS, Martínez LC, Oliveira AH, Cossolin JFS, Resende MTCS, Gonçalves WG, Medeiros-Santana L, Serrão JE (2022) Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. *Sci Total Environ* 815:152847. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152847>
- Castro BMC, Martínez LC, Barbosa SG et al (2019a) Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Sci Rep* 9:6667. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43074-0>
- Castro BMC, Martínez LC, Plata-Rueda A, Soares MA, Tavares WS, Serrão JE, Zanuncio JC (2019b) Chlorantraniliprole degenerates microvilli goblet cells of the *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. *Chemosphere* 229:525–528. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.041>
- Castro BMC, Martínez LC, Plata-Rueda A et al (2021) Exposure to chlorantraniliprole reduces locomotion, respiration, and causes histological changes in the midgut of velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemosphere* 263:128008. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128008>
- Chen Y, Azad MB, Gibson SB (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ* 16:1040–1052. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.49>
- Chiang AS, Yen DF, Peng WK (1986) Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Coryca cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 47:333–339. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(86\)90104-7](https://doi.org/10.1016/0022-2011(86)90104-7)
- Clarke PGH (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181:195–213. <https://doi.org/10.1007/BF00174615>
- Cristofoletti PT, Ribeiro AF, Terra WR (2001) Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J Ins Physiol* 47:143–155. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00098-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00098-6)
- Cruz-Landim C, Serrão JE, Silva-de-Moraes RLM (1996) Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees. *Cytobios* 1996:95–104
- Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK et al (1994) Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371:707–711
- Da Silva Cruz A, Da Silva-Zacarin ECM, Bueno OC, Malaspina O (2010) Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell Biol Toxicol* 26:165–176. <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9126-x>
- Denecke S, Swevers L, Douris V, Vontas J (2018) How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochem Mol Biol* 103:22–35. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.005>
- Farder-Gomes CF, Fernandes KM, Bernardes RC, Bastos DSS, Martins GF, Serrão JE (2021) Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). *Sci Total Environ* 774:145679. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145679>
- Farder-Gomes CF, Saravanan M, Martínez LC, Plata-Rueda A, Zanuncio JC, Serrão JE (2022) Azadirachtin-based biopesticide affects

- the respiration and digestion in *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Toxin Rev* 41:466–475. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1892764>
- Feng H, Zhou P, Liu F, Zhang W, Yang H, Li X, Dong J (2023) Abamectin causes toxicity to the carp respiratory system by triggering oxidative stress, inflammation, and apoptosis and inhibiting autophagy. *Environ Sci Pollut Res* 30:55200–55213. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26166-3>
- Fiaz M, Martínez LC, Costa MS et al (2018a) Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicol Environ Saf* 156:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.080>
- Fiaz M, Martínez LC, Plata-Rueda A, Gonçalves WG, Shareef M, Zanuncio JC, Serrão JE (2018b) Toxicological and morphological effects of tebufenozide on *Anticarsia gemmatalis*. *Chemosphere* 212:337–345. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.088>
- Gomes FM, Carvalho DB, Machado EA, Miranda K (2013) Ultrastructural and functional analysis of secretory goblet cells in the midgut of the lepidopteran *Anticarsia gemmatalis*. *Cell Tiss Res* 352:313–326. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1563-4>
- González-Polo RA, Boya P, Pauleau AL et al (2005) The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* 118:3091–3102. <https://doi.org/10.1242/jcs.02447>
- Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J Econ Entomol* 69:487–488. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>
- Hegedus DD, Toprak U, Erlandson M (2019) Peritrophic matrix formation. *J Insect Physiol* 117:103898. <https://doi.org/10.1016/j.jinsp.2019.103898>
- Hidayani P, Rauf A, Ridland PM, Hoffmann AA (2005) Pesticide applications on Java potato fields are ineffective in controlling leafminers, and have antagonistic effects on natural enemies of leafminers. *Int J Pest Manag* 51:181–187. <https://doi.org/10.1080/09670870500189044>
- Homrich MS, Passaglia LMP, Pereira JF, Bertagnolli PF, Pasquali G, Zaidi MA, Altosaar I, Bodanses-Zanettini MH (2008) Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. *Genet Mol Biol* 31:522–531. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000300020>
- Huang JF, Tian M, Lv CJ, Li HY, Muhammad RH, Zhong GH (2011) Preliminary studies on induction of apoptosis by abamectin in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line. *Pestic Biochem Physiol* 100:256–263. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.04.010>
- Lehane M, Billingsley P (2012) *Biology of the insect midgut*, 1st edn. Springer, Berlin
- Lietti MMM, Botto E, Alzogaray RA (2005) Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop Entomol* 34:113–119. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2005000100016>
- Lopes MP, Fernandes KM, Vaner H, Tomé V (2018) Spinosad-mediated effects on the walking abilities, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers. *Pest Manag Sci* 74:1311–1318. <https://doi.org/10.1002/ps.4815>
- Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G (2015) Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest* 125:85–93. <https://doi.org/10.1172/JCI73946>
- Maioli MA, de Medeiros HCD, Guelfi M, Trinca V, Pereira FV, Mingatto FE (2013) The role of mitochondria and biotransformation in abamectin-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol in Vitro* 27:570–579. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.017>
- Mansour SA, Mossa ATH (2011) Adverse effects of exposure to low doses of chlorpyrifos in lactating rats. *Toxicol Ind Health* 27:213–224. <https://doi.org/10.1177/0748233710384054>
- Martínez LC, Plata-Rueda A, Neves GS, Gonçalves WG, Zanuncio JC, Bozdoğan H, Serrão JE (2018) Permethrin induces histological and cytological changes in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Chemosphere* 212:629–637. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.134>
- Martínez LC, Plata-Rueda A, Rodríguez-Dimaté FA et al (2019) Exposure to insecticides reduces populations of *Rhynchophorus palmarum* in oil palm plantations with bud rot disease. *Insects* 10:1–12. <https://doi.org/10.3390/insects10040111>
- Matiello JB, Santinato, Almeida S et al (2010) *Cultura de café no Brasil: manual de recomendações*, 2nd edn. Rio de Janeiro: MAPA/Procafé; Varginha: Fundação Procafé
- Monnerat RG, Bordat D, Branco MC, França FH (2000) Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner e inseticidas químicos sobre a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) e seus parasitóides. *An Soc Entomol Bras* 29:723–730. <https://doi.org/10.1590/s0301-8059200000400012>
- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1833:3448–3459. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
- Oliveira AC, Siqueira HÁA, Oliveira JV, Silva JE, Mchereff-Filho M (2011) Resistance of Brazilian diamondback moth populations to insecticides. *Sci Agric* 68:154–159. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000200004>
- Paiva PEB (2011) Abamectina em citros: 30 anos de uso. *Citric Atual* 84:18–21
- Panizzi AR (2013) History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotrop Entomol* 42:119–127. <https://doi.org/10.1007/s13744-013-0111-y>
- Perez-Perez ME, Zaffagnini M, Marchand CH, Crespo JL, Lemaire SD (2014) The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy* 10:1953–1964. <https://doi.org/10.4161/auto.34396>
- Plata-Rueda A, Menezes CHM, Cunha WS, Alvarenga TM, Barbosa BF, Zanuncio JC, Martínez LC, Serrão JE (2020) Side-effects caused by chlorpyrifos in the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemosphere* 259:127530. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127530>
- Plata-Rueda A, Fiaz M, Brugger BP, Canas V, Coelho RP, Zanuncio JC, Martínez LC, Serrão JE (2022) Lemongrass essential oil and its components cause effects on survival, locomotion, ingestion, and histological changes of the midgut in *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Toxin Rev* 41:208–217. <https://doi.org/10.1080/15569543.2020.1861468>
- Qusti SY, Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB (2007) Cysteine-mediated excitotoxic neuronal death is an apoptosis-necrosis continuum. *J Appl Anim Res* 32:7–12. <https://doi.org/10.1080/09712119.2007.9706837>
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
- Rharrabe K, Alla S, Maria A, Sayah F, Lafont R (2007) Diversity of detoxification pathways of ingested ecdysteroids among phytophagous insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 65:65–73. <https://doi.org/10.1002/arch.20191>
- Saillenfait AM, Ndiaye D, Sabaté JP (2015) Pyrethroids: exposure and health effects—an update. *Int J Hyg Environ Health* 218:281–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.01.002>
- Santos Junior VC, Martínez LC, Plata-Rueda A, Fernandes FL, Tavares WS, Zanuncio JC, Serrão JE (2020) Histopathological and cytotoxic changes induced by spinosad on midgut cells of the non-target predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* 238:124585. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124585>

- Serrão JE, Cruz-Landim C (1995) The striated border of digestive cells in adult stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios* 83:229–235
- Sosa-Gómez DR, Miranda JE (2012) Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). *Rev Bras Entomol* 56:359–362. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262012005000050>
- Sparks TC, Nauen R (2015) IRAC: mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic Biochem Physiol* 121:122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Stefanini M, Martino C, Zamboni L (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216:173–174. <https://doi.org/10.1038/216173a0>
- Strong L, Brown TA (1987) Avermectins in insect control and biology: a review. *Bull Entomol Res* 77:357–389. <https://doi.org/10.1017/S0007485300011846>
- Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC (2008) Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol* 129:33–43. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0356-9>
- Terra WR, Ferreira C (2020) Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. *Arthrop Struct Dev* 56:100931. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.100931>
- Tettamanti G, Grimaldi A, Casartelli M et al (2007) Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell Tissue Res* 330:345–359. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0449-8>
- Vinha GL, Plata-rueda A, Soares MA, Zanon JC, Serrão JE, Martínez LC (2021) Deltamethrin-mediated effects on locomotion, respiration, feeding, and histological changes in the midgut of *Spodoptera frugiperda* caterpillars. *Insects* 12:483. <https://doi.org/10.3390/insects12060483>
- Vojoudi S, Saber M, Hejazi MJ, Talei-Hassanloui R (2011) Toxicity of chlorpyrifos, spinosad and abamectin on cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and their sublethal effects on fecundity and longevity. *Bull Insectol* 64:189–193
- Wang X, Martínez MA, Wu Q, Martínez-Larranaga MR, Anadón A, Zonghui Y (2016) Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Crit Rev Toxicol* 46:876–899. <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1223014>
- Wislocki PG, Grosso LS, Dybas RA (1989) Environmental aspects of abamectin use in crop protection. Springer, New York
- Wolstenholme AJ (2012) Glutamate-gated chloride channels. *J Biol Chem* 287:40232–40238. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406280>
- Zeiss CJ (2003) The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 40:481–495. <https://doi.org/10.1354/vp.40-5-481>
- Zhu S, Zhou J, Zhou Z, Zhu Q (2019) Abamectin induces apoptosis and autophagy by inhibiting reactive oxygen species-mediated PI3K/AKT signaling in MGC803 cells. *J Biochem Mol Toxicol* 33:e22336. <https://doi.org/10.1002/jbt.22336>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DIRETOS DA FLUPIRADIFURONA EM *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E INDIRETOS EM SEU PREDADOR *Podisus nigrispinus* DALLAS (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)

Bárbara Soares Amoroso Lima¹, Francelina Aparecida Duarte Rocha², Angelica Plata-Rueda², José Cola Zanuncio², João Victor de Oliveira Motta¹, Laryssa Lemos da Silva¹, Halina Schultz², Pedro Henrique Ambrosio Nere¹, Luis Carlos Martínez¹, José Eduardo Serrão^{1*}

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil

²Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil

RESUMO

LIMA, Bárbara Soares Amoroso, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho, 2023. **Efeitos diretos da flupiradifurona nos sistemas digestório de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e seu predador *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae).** Orientador: José Eduardo Serrão.

Uma das principais pragas da cultura da soja é a *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), controlada por produtos naturais e sintéticos, alguns dos quais têm induzido resistência em algumas populações do inseto, sendo necessária a busca por novos inseticidas. A flupiradifurona é um inseticida neurotóxico, agonista da acetilcolina, responsável por causar hiperexcitabilidade e morte. O objetivo foi avaliar a toxicidade, seu efeito anti-alimentar, histopatológico e sua citotoxicidade no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* e os efeitos indiretos no seu predador *Podisus nigrispinus* mediados pela flupiradifurona. Os resultados mostraram que *A. gemmatalis* foi suscetível a flupiradifurona sendo letal na $CL_{50} = 5,10 \text{ g L}^{-1}$. A sobrevivência das lagartas diminuiu gradualmente com a concentração. O inseticida causou efeito anti-alimentar nas lagartas, danos no intestino com o tempo de exposição, como desorganização do epitélio, danos na borda estriada, matriz peritrófica, nas células caliciformes, fragmentação e protrusão de células no lúmen, formação de vacúolos autofágicos nas células digestivas. A flupiradifurona causou efeitos colaterais em seu predador por intoxicação indireta com $CL_{90} = 22,85 \text{ g L}^{-1}$. No intestino de *P. nigrispinus*, houve desorganização do epitélio, borda estriada e matriz peritrófica e alta vacuolização. Foram detectadas alterações significativas na quantidade de polissacarídeos do corpo gorduroso dos percevejos que consumiram lagartas contaminadas por flupiradifurona se comparado ao controle, porém a quantidade de proteínas se manteve normal. As gotículas lipídicas aumentaram em diâmetro e quantidade. Essas alterações indicam mobilização de reservas de energia para o processo de desintoxicação celular. Os resultados indicam efeito indireto nesse organismo não-alvo. Flupiradifurona é tóxica para lagartas de *A. gemmatalis*, afetando sua sobrevivência, consumo alimentar e causando danos ao intestino médio, sugerindo o uso alternativo deste composto para controle químico dessa praga. Os efeitos indiretos causados em seu predador devem ser melhor investigados para avaliar a seletividade do inseticida a organismos não-alvo.

PALAVRAS-CHAVE: Citotoxicidade. Corpo gorduroso. Efeito indireto. Histopatologia. Lagarta-da-soja. Percevejo predador. Sistema digestivo. Toxicidade.

ABSTRACT

LIMA, Bárbara Soares Amoroso, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2023. **Direct effects of flupyradifurone on the digestive systems of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae).**

Advisor: José Eduardo Serrão.

One of the main pests of soybeans is *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), controlled by natural and synthetic products, some of which have induced resistance in some insect populations, requiring the search for new insecticides. Flupyradifurone is a neurotoxic insecticide, acetylcholine agonist, responsible for causing hyperexcitability and death. The objective was to evaluate the toxicity, its anti-feeding effect, histopathological and cytotoxicity in the midgut of *A. gemmatalis* caterpillars and the indirect effects on its predator *Podisus nigrispinus* mediated by flupyradifurone. The results showed that *A. gemmatalis* was susceptible to flupyradifurone being lethal at $LC_{50} = 5.10 \text{ g L}^{-1}$. The survival of caterpillars gradually decreased with concentration. The insecticide caused an anti-feeding effect on caterpillars, damage to the intestine with exposure time, such as disorganization of the epithelium, damage to the striated border, peritrophic matrix, to goblet cells, fragmentation and protrusion of cells into the lumen, formation of autophagic vacuoles in cells digestive. Flupyradifurone caused side effects in its predator by indirect intoxication with $LC_{90} = 22.85 \text{ g L}^{-1}$. In the midgut of *P. nigrispinus*, there was disorganization of the epithelium, striated border and peritrophic matrix and high vacuolation. Significant alterations were detected in the amount of polysaccharides in the fat body of bed bugs that consumed caterpillars contaminated with flupyradifurone compared to the control, but the amount of proteins remained normal. Lipid droplets increased in diameter and quantity. These changes indicate mobilization of energy reserves for the cellular detoxification process. The results indicate an indirect effect on this non-target organism. Flupyradifurone is toxic to *A. gemmatalis* caterpillars, affecting their survival, food consumption and causing damage to the midgut, suggesting the alternative use of this compound for chemical control of this pest. The indirect effects caused on its predator should be further investigated to assess the selectivity of the insecticide to non-target organisms

KEYWORDS: Cytotoxicity. Digestive system. Fat body. Histopathology. Indirect effect. Predator. Bedbug. Soybean caterpillar. Toxicity.

1. Introdução

A soja está entre as principais commodities cultivadas no mundo (Oliveira & Schneider, 2016). No Brasil, uma das pragas mais importantes dessa cultura é a lagarta *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), responsável por causar desfolhamento intenso e em situações severas, a destruição completa das plantas, gerando perdas econômicas consideráveis (da Silva Júnior et al., 2020; Panizzi, 2013; Praça et al., 2006).

O controle de insetos-pragas nas culturas é um dos maiores desafios na agricultura e o controle químico, ainda, é o método mais utilizado (Mateos Fernández et al., 2022). O uso de inseticidas químicos pode afetar severamente a biodiversidade, a saúde humana, o ar, solo e água, além de aumentar populações de pestes secundárias e acarretar surgimento de populações de insetos resistentes (Nicholson, 2007; Tudi et al., 2021).

Por isto, existe a tendência de substituição de inseticidas antigos ou de amplo espectro para combater populações resistentes de determinadas pragas e seus efeitos nocivos em organismos não-alvos, de modo a atender os princípios do manejo integrado de pragas (MIP) e as exigências regulatórias toxicológicas e ambientais (Nauen et al., 2015; Sparks & Nauen, 2015).

Os principais grupos de inseticidas utilizados no controle de *A. gemmatalis* são os piretróides, organofosforados, inibidores de biossíntese de quitina, carbamatos, ciclodienos e bio-inseticidas (Castro et al., 2019, 2021; Haase et al., 2015; Panizzi, 2013). No entanto, muitos destes inseticidas usados no controle da *A. gemmatalis* tem apresentado baixa eficácia e relatos de populações resistentes desta praga (Panizzi, 2013; Sosa-Gómez & Omoto, 2012). Dentre eles se encontram lambda-cialotrina, clorantraniliprole, além dos microbianos AgMNPV e *Bacillus thuringiensis* (Abot et al., 1996; Baptista et al., 1995; Sosa-Gómez & Miranda, 2012).

A flupiradifurona é um pesticida sistêmico, que age por contato e ingestão, atua como agonista nos receptores nicotínicos de acetilcolina de insetos, semelhante aos neonicotinóides. Este inseticida é altamente eficaz contra insetos sugadores, principalmente moscas-brancas e pulgões (Sparks & Nauen, 2015).

Os inseticidas usados em programas de manejo integrado de pragas (MIP), devem ser eficientes contra insetos-pragas, mas também ter baixa toxicidade aos organismos não-alvo, como insetos predadores, parasitoides e polinizadores (Torres & Bueno, 2018). Além disso, mesmo que usados nas concentrações indicadas pelos fabricantes, os inseticidas podem provocar efeitos subletais em organismos não-alvo, prejudicando seu desenvolvimento, sistema imunológico, reprodução e sobrevivência (Desneux et al., 2007).

Podisus nigrispinus (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) é inimigo natural de *A. gemmatalis* (Zanuncio et al., 2016) com hábito alimentar zoofitófago, que pode se alimentar de substratos vegetais na ausência de presas (Evangelista Júnior et al., 2004). Essa espécie ataca inúmeros insetos-praga incluindo larvas de lepidópteros e coleópteros em ecossistemas agrícolas e silviculturais (De Clercq et al., 2000; Zanuncio et al., 1994).

Devido ao potencial de uso de *P. nigrispinus* como predador no MIP de lagartas, os efeitos indiretos dos agroquímicos nessa espécie têm sido avaliados. A capacidade predatória e a reprodução de *P. nigrispinus* diminuíram após consumir lagartas de *Spodoptera frugiperda* contaminadas com óleo de neem (*Azadirachta indica*) (Campos et al., 2014). A reprodução desse predador diminuiu quando alimentado com lagartas de *A. gemmatalis* tratadas com folhas de soja expostas a diflubenzuron (Castro et al., 2012). Estes e outros estudos destacam a importância da avaliação dos químicos usados nos programas de controle pois podem afetar organismos não-alvo como, abelhas (Carneiro et al., 2020, 2022), parasitóides (De La Cruz et al., 2017), joaninhas (De Armas et al., 2020; Pasini et al., 2021) e percevejos (Martínez et al., 2019; Santos Junior et al., 2020; Silva et al., 2020).

A flupiradifurona tem ação neurotóxica e após ser ingerida pelo inseto, atinge o intestino médio, principal órgão responsável por desempenhar funções especializadas como, regeneração e proliferação celular, absorção de nutrientes e detoxificação de componentes tóxicos (Cruz-Landim & Cavalcante, 1999; Denecke et al., 2018; Terra & Ferreira, 2020). Por isso, a investigação dos efeitos dos inseticidas no intestino depois da digestão é de fundamental importância porque podem afetar a fisiologia do inseto (Arthidoro de Castro et al., 2020; Plata-Rueda et al., 2021; Terra & Ferreira, 2020).

O corpo gorduroso, alvo secundário dos inseticidas é um dos órgãos mais importantes para os processos de manutenção e reprodução do inseto (Roma et al., 2010). Este órgão é responsável por detoxificar, produzir e armazenar de lipídeos, carboidratos e proteínas (Arrese & Soulages, 2010). Danos causados no corpo gorduroso podem afetar vários processos fisiológicos do inseto. Assim, o conhecimento dos mecanismos de ação tóxica da flupiradifurona no corpo gorduroso de lagartas desfolhadoras e de seus predadores pode contribuir para aumentar a eficácia desses produtos e melhorar as estratégias de manejo dessas lagartas.

O objetivo foi avaliar a toxicidade, o efeito anti-alimentar, histopatológico e citotóxico da flupiradifurona no intestino médio das lagarta de *A. gemmatalis* e seus efeitos indiretos no intestino médio e corpo gorduroso do seu predador *P. nigrispinus*.

2. Material e métodos

2.1. Insetos

Espécimes de *A. gemmatalis* foram obtidos da criação estoque mantida no Laboratório de Controle Biológico de Insetos do Instituto de Biologia Aplicada à Agricultura e Pecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Adultos de *A. gemmatalis* foram criados em gaiolas de madeira (30 × 30 × 30 cm) cobertas com malha plástica revestida internamente por folha de papel almaço para oviposição, alimentados diariamente com dieta líquida (Greene et al., 1976) embebida em algodão e mantidos a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ umidade relativa, fotoperíodo de 12:12 h (claro: escuro). A cada dois dias, as massas de ovos depositadas no papel foram removidas e transferidas para recipiente de 1 L de poliestireno. Após a eclosão, as lagartas de *A. gemmatalis* foram alimentadas com dieta artificial composta de 10 g de ágar, 15,6 g de levedura de cerveja, 25 g de germe de trigo, 25 g de proteína de soja, 31,2 g de feijão, 12,5 g de caseína e 2,5 mL de solução vitamínica (1,2% de ácido ascórbico, 0,03% pantotenato de cálcio, 0,015% de niacina, 0,008% de riboflavina, 0,004% de tiamina e 0,004% de HCl) (Greene et al., 1976). Lagartas de terceiro ínstar de *A. gemmatalis* foram utilizadas nos bioensaios seguindo o método toxicológico padrão para avaliação de inseticidas sobre noctuídeos recomendados pelo Comité de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC; teste No. 020) (IRAC Susceptibility Test Methods 020, 2009).

Adultos de *P. nigrispinus* foram obtidos da criação massal do Laboratório de Controle Biológico do Instituto de Biologia Aplicada à Agricultura e Pecuária (Bioagro, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil), mantidos à 25 ± 2 °C, umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e 12 h fotofase. Esses insetos foram alimentados com pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) e folhas de *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex. Maiden) *ad libitum*.

2.2. Bioensaio de concentração–mortalidade

A solução estoque do inseticida flupiradifurona (Sivanto Prime® 200 SL) Bayer CropScience Co. Ltd (Monheim am Rhein, Alemanha) foi obtida a partir da diluição deste inseticida em água destilada e deionizada (ddH₂O) em seis concentrações (1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 g L⁻¹) para avaliação da sua toxicidade e construção da curva de concentração–mortalidade para estimar as concentrações letais responsáveis por causar mortalidade em 25% (CL₂₅), 50% (CL₅₀), 75% (CL₇₅) e 90% (CL₉₀) das populações de *A. gemmatalis*. O controle foi realizado com ddH₂O e para cada concentração foi acrescentado 1 µL diariamente sobre 0,5 g de dieta artificial, também repostada diariamente (Castro et al., 2021). Três repetições de 10 lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta artificial foram individualizadas em placas de

Petri (90 mm em diâmetro) seguindo um delineamento experimental inteiramente casualizado. O número de lagartas mortas foi registrado diariamente por 72 h.

2.3. Bioensaio de tempo–mortalidade

Os procedimentos e condições de exposição foram os mesmos descritos acima para o bioensaio de concentração–mortalidade. Lagartas de *A. gemmatalis* individualizadas em placas de Petri foram expostas por ingestão à flupiradifurona nas CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅ e CL₉₀ estimadas no bioensaio de concentração–mortalidade. O controle foi realizado com ddH₂O. O número de lagartas vivas foi registrado a cada 6 h por 48 h, utilizando três repetições com 10 lagartas individualizadas por concentração da flupiradifurona, seguindo um delineamento inteiramente ao acaso.

2.4. Efeito anti-alimentar

Lagartas de *A. gemmatalis* foram expostas à flupiradifurona após consumir folhas de soja tratadas com esse produto (Plata-Rueda et al., 2020). Fragmentos das folhas de soja (20 × 20 mm) foram esterilizados com 5% de hipoclorito de sódio, lavados três vezes com água destilada e secos no ambiente, foram imersos por 5 s em solução de flupiradifurona nas concentrações estimadas, CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅ e CL₉₀. Após a secagem em temperatura ambiente por 5 min, fragmentos de folhas de soja foram ofertados para lagartas mantidas individualizadas em placas de Petri contendo uma lagarta que foi previamente mantida em jejum por 24 h. Cada folha de soja foi fotografada após 6 h de exposição à lagarta, com câmera fotográfica digital (D40, lente 18-55 mm, Nikon Corporation, Tóquio, Japão) com foco macro de 15 cm, sob luz natural e fluorescente (SB -700 Nikon Corporation, Japão). As imagens foram avaliadas usando o software de análise digital UTHSCSA Image Tool v. 2.0 (Universidade do Texas, Austin, TX, EUA). A área foliar consumida pelas lagartas foram medidas em mm² com pixels baseados em histograma RGB (vermelho, 700 nm; verde, 546,1 nm; azul, 435,8 nm). Quinze repetições por concentração da flupiradifurona (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅ e CL₉₀) e controle foram realizadas em um delineamento inteiramente casualizado.

2.5. Histopatologia

2.5.1. *Anticarsia gemmatalis*

Vinte lagartas de *A. gemmatalis* individualizada em placa de Petri (9 cm diâmetro), foram alimentadas com 0,5 g de dieta contaminada à CL₅₀ estimada da flupiradifurona (1 µL), depois de 24 h de jejum (Castro et al., 2021; Plata-Rueda et al., 2020). Após alimentação por

1,5, 3, 6, 12, e 24 h, as lagartas (n = 4 por tempo) foram crioanestesiadas a -4 °C por 5 min, o intestino médio foi dissecado em solução salina para insetos (0,1 M NaCl+ 0,2 M KH₂PO₄+ 0,2 M Na₂HPO₄) e transferido para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12 h a 5 °C. A seguir as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e embebidas em historesina (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). Seções com 3 µm de espessura do intestino médio das lagartas foram obtidas em micrótomo rotativo, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

2.5.2. *Podisus nigrispinus*

Cinco lagartas de *A. gemmatalis* foram expostas por ingestão à CL₉₀ estimada de flupiradifurona, depois de 24 h de jejum. Cada lagarta foi individualizada em placa de Petri (9 cm diâmetro) e alimentada com 0,5 g de dieta artificial contendo 1 µL da CL₉₀ de flupiradifurona ou água como controle. Após 1 hora de consumo, as lagartas foram transferidas para as placas de Petri (9 cm diâmetro) contendo um único percevejo adulto por placa, mantidos em jejum por de 24 horas. Cada percevejo foi alimentado com uma lagarta recém alimentada com a CL₉₀ de flupiradifurona ou lagarta sem exposição como controle (Castro et al., 2021; Plata-Rueda et al., 2020). Após alimentação por 6 horas, os percevejos foram crioanestesiados a -4 °C por 5 min. O intestino médio e o corpo gorduroso foram dissecados em solução salina para insetos (0,1 M NaCl+ 0,2 M KH₂PO₄+ 0,2 M Na₂HPO₄) e transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12 h a 5 °C. A seguir as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e embebidas em historesina (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). Seções com 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

2.6. Histoquímica do corpo gorduroso

Algumas secções histológicas do corpo gorduroso dos percevejos foram submetidas aos testes histoquímicos descritos a seguir, analisadas e fotografadas em microscópio Olympus BX 60.

2.6.1. Detecção de Proteínas

As amostras histológicas foram incubadas em mercúrio bromofenol (100 mL de ácido acético 2%; 0,05 g de azul de bromofenol; 1,5 g de cloreto de mercúrio) por 2 h e 15 min. Em

seguida foram lavadas com ácido acético 0,5% por 10 min e em água corrente por 15 min, montadas e analisadas.

2.6.2. Detecção de Polissacarídeos neutros e glicoconjugados

Na técnica de PAS (periodic acid-schiff) as amostras histológicas foram imersas em ácido periódico (0,4%) por 30 min, lavadas rapidamente em água destilada e transferidas para reativo de Schiff (Lillie, 1965) por 1 h no escuro, lavadas em água corrente por 30 min, montadas e analisadas.

2.7. Citotoxicidade

Lagartas de terceiro instar de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta tratada com flupiradifurona à CL_{50} estimada e os percevejos alimentados com as lagartas tratadas à CL_{90} , ambos como descrito na histopatologia. As lagartas e os percevejos foram crioadestesiados à $-4^{\circ}C$, os intestinos médios de ambos e apenas o corpo gorduroso dos percevejos foram dissecados e transferidos para glutaraldeído (2,5%) tamponado com cacodilato de sódio (0,2 M, pH 7,2 contendo 0,2 M de sacarose) por 4 h em temperatura ambiente. Essas amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 h, lavadas em tampão, desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 99%) e embebidas em resina LR White (London Resin Company Ltd.). Seções ultrafinas (70-90 nm de espessura) do corpo gorduroso foram obtidas com navalha de diamante em ultramicrotomo Sorvall MT2-BMT2-B (Sorvall Instruments, Wilmington, DE, USA), contrastadas com acetato de uranila aquosa 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.8. Análise estatística

Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos à análise Probit para obter a curva de concentração-mortalidade usando o procedimento PROC PROBIT do programa SAS v. 9.0 (SAS Institute, Campus Drive Cary, NC, USA). Os dados do bioensaio tempo-mortalidade foram submetidos à análise de sobrevivência com os estimadores por Kaplan-Meier (log-rank-test) usando o software Origin Pro v.9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Os dados das lagartas de *A. gemmatalis* sobreviventes até o final do experimento foram tratados como censurados. Os dados do efeito anti-alimentar foram submetidos à análise de variância unidirecional (One-way ANOVA) e as médias comparadas

post-hoc pelo teste de diferença significativa honestamente (HSD) de Tukey no nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1. Bioensaio de toxicidade/concentração–mortalidade

O modelo de concentração–mortalidade utilizado foi adequado ($P > 0,05$), mostrando que flupiradifurona foi tóxica para *A. gemmatalis* na $CL_{50} = 5,10$ (3,38-6,83) $g L^{-1}$ (Tabela 1). A mortalidade no grupo controle foi menor que 1%.

Tabela 1. Concentrações letais de flupiradifurona contra *Anticarsia gemmatalis* após 72 horas de exposição obtida da análise probit (g.l. = 5, slope \pm SE = $1,969 \pm 0,31$, intercepto = 1,394).

N.º de lagartas	Concentrações letais	Concentração estimada ($g L^{-1}$)	Intervalo de confiança ao 95% ($g L^{-1}$)	χ^2 (Valor- p)
150	CL_{25}	2,32	1,16 – 3,48	0,38 (0,98)
150	CL_{50}	5,10	3,38 – 6,84	
150	CL_{75}	11,23	8,49 – 15,60	
150	CL_{90}	22,85	16,32 – 39,07	

3.2. Bioensaio de tempo–mortalidade

A sobrevivência das lagartas de *A. gemmatalis* expostas às diferentes concentrações letais de flupiradifurona durante as 48 h de avaliação diferiram (teste de log-rank $\chi^2 = 10,78$, g.l.= 1, $P < 0,001$), diminuindo de 99,9% no controle, para 64,8%, 57%, 25,1% e 12,8% com as CL_{25} , CL_{50} , CL_{75} e CL_{90} , respectivamente (Fig. 1).

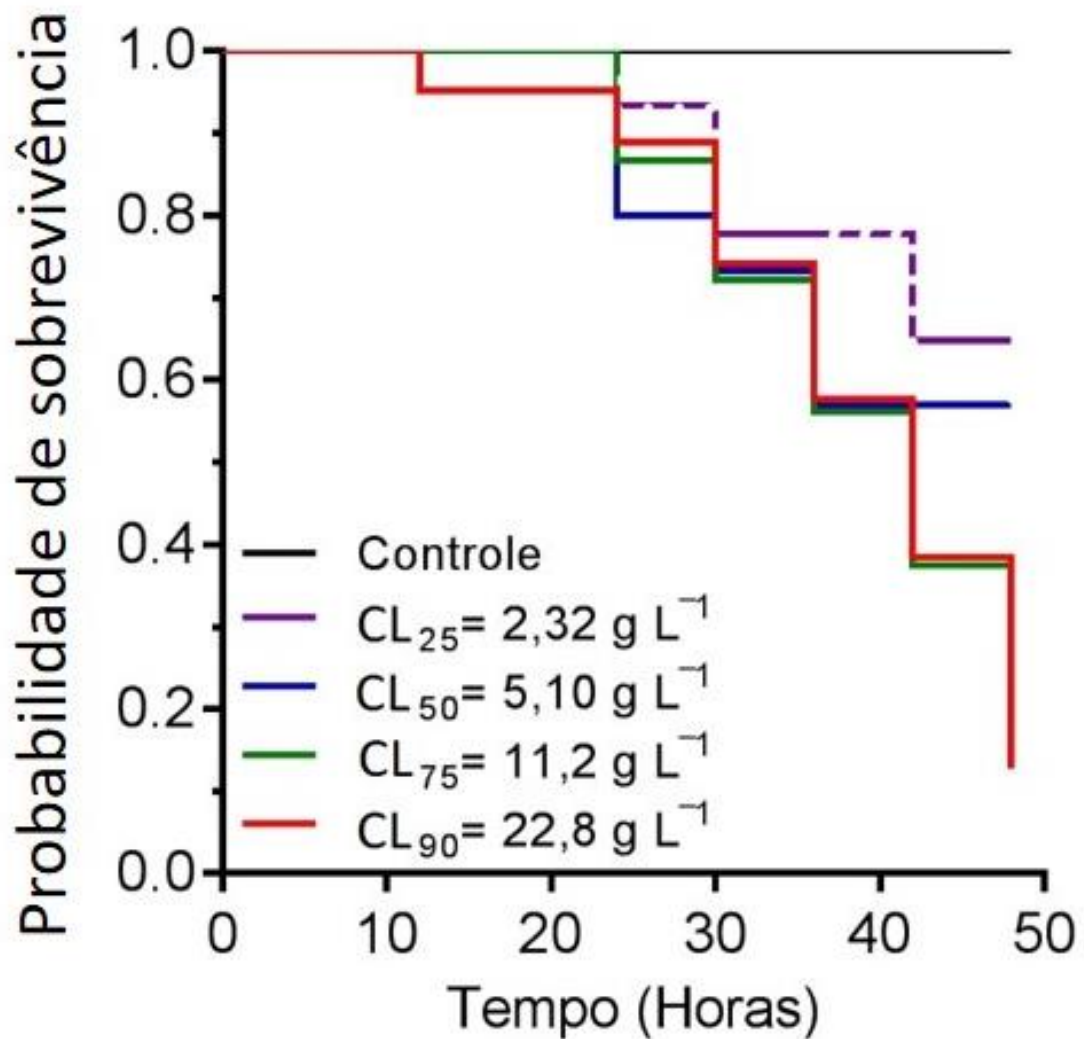


Figura 1. Curvas de sobrevivência de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* expostas a diferentes concentrações letais (CL) de flupiradifurona, submetidas à análise de sobrevivência usando o estimador Kaplan–Meier (teste de log-rank, $\chi^2 = 10,78$; $P < 0,001$).

3.3. Efeito anti-alimentar

A área foliar consumida por lagartas de *A. gemmatalis* foi menor em folhas de soja ($F_{2,14} = 34,38$ $P < 0,001$), diminuindo de 43,26 mm² no controle para 4,79 mm² na CL₉₀ de flupiradifurona (Fig. 2).

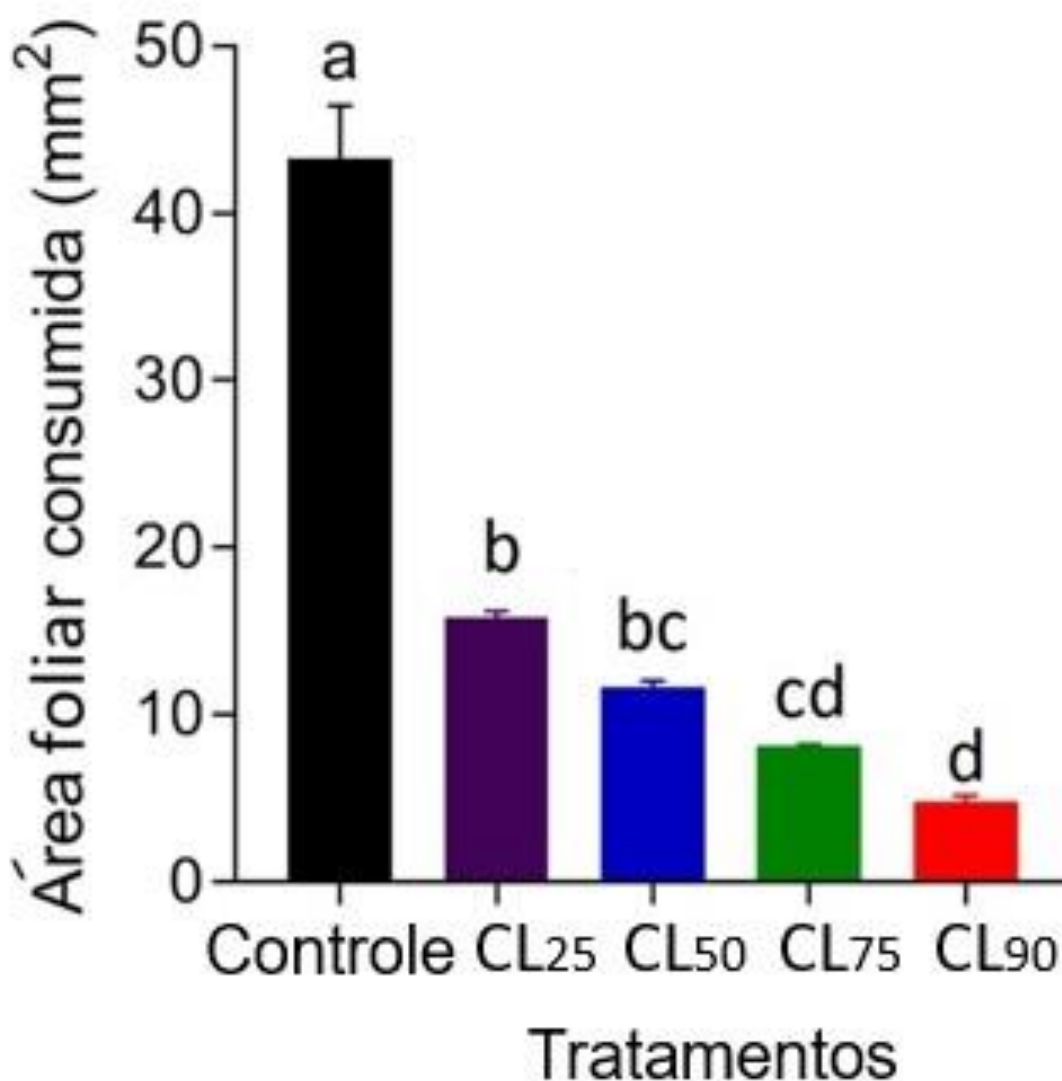


Figura 2. Área foliar da folha de soja (média \pm SE) consumida por lagartas de *Anticarsia gemmatilis* após exposição à flupiradifurona (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅ e CL₉₀) e água (controle). Barras com letras diferentes diferem pelo teste de separação de médias de Tukey ($P < 0,05$).

3.4. Histopatologia do intestino médio de *Anticarsia gemmatilis*

O epitélio do intestino médio das lagartas controle encontrava-se com uma camada simples de células digestivas colunares e caliciformes, borda estriada bem desenvolvida e matriz peritrófica evidente no lúmen (Fig. 3A). As células caliciformes continham uma cavidade interna com borda estriada e núcleo basal (Fig. 3A) e as células digestivas, borda estriada apical, núcleo com cromatina descondensada e citoplasma com alguns vacúolos (Fig. 3A).

O epitélio das lagartas expostas à CL₅₀ de flupiradifurona estavam com lesões histopatológicas diferindo do controle (sem lesão) e com vacuolização do epitélio depois de 1.5

h de exposição ao tratamento e início de desorganização celular com liberação de alguns fragmentos no lúmen (Fig. 3B). A matriz peritrófica se manteve íntegra (Fig. 3B).

Após 3 h de exposição à flupiradifurona, o epitélio do intestino médio encontrava-se desorganizado com células digestivas alongadas e grumos de cromatina condensada no núcleo (Fig. 3C). A borda estriada tinha rupturas em algumas regiões e protruções apicais com liberação de fragmentos celulares para o lúmen (Fig. 3C). Nas células caliciformes a borda estriada estava desorganizada (Fig. 3C).

Os danos observados com 6 h de exposição ao inseticida foram mais evidentes que nos tempos anteriores. O epitélio encontrava-se desorganizado, com protruções apicais e fragmentos celulares contendo núcleo liberados no lúmen (Fig. 3D). O citoplasma das células digestivas estava com intensa vacuolização e núcleo com cromatina condensada (Fig. 3D). As células caliciformes encontravam-se com sua borda estriada interna danificada e a matriz peritrófica ausente (Fig. 3D).

Depois de 12 horas de exposição à flupiradifurona o epitélio intestinal permaneceu desorganizado com ruptura da borda estriada em algumas regiões e matriz peritrófica ausente (Fig. 3E). Fragmentos celulares contendo núcleos foram liberados no lúmen, o citoplasma das células digestivas apresentou vacuolização e os núcleos mostraram alta condensação da cromatina (Fig. 3E). A borda estriada interna das células caliciformes apresentou sinais de degradação (Fig. 3E).

Com 24 h de exposição à CL_{50} do inseticida, o epitélio do intestino médio estava desorganizado com células alongadas, mas a borda estriada estava presente na maior parte de sua extensão (Fig. 3F). As protruções apicais em direção ao lúmen e os fragmentos celulares estavam em menor quantidade em relação aos tempos de exposição anteriores (Fig. 3F). Os núcleos das células digestivas mostraram predomínio de cromatina condensada e a borda estriada interna das células caliciformes extremamente desorganizada (Fig. 3F). A matriz peritrófica foi observada em determinadas partes ao longo do intestino médio.

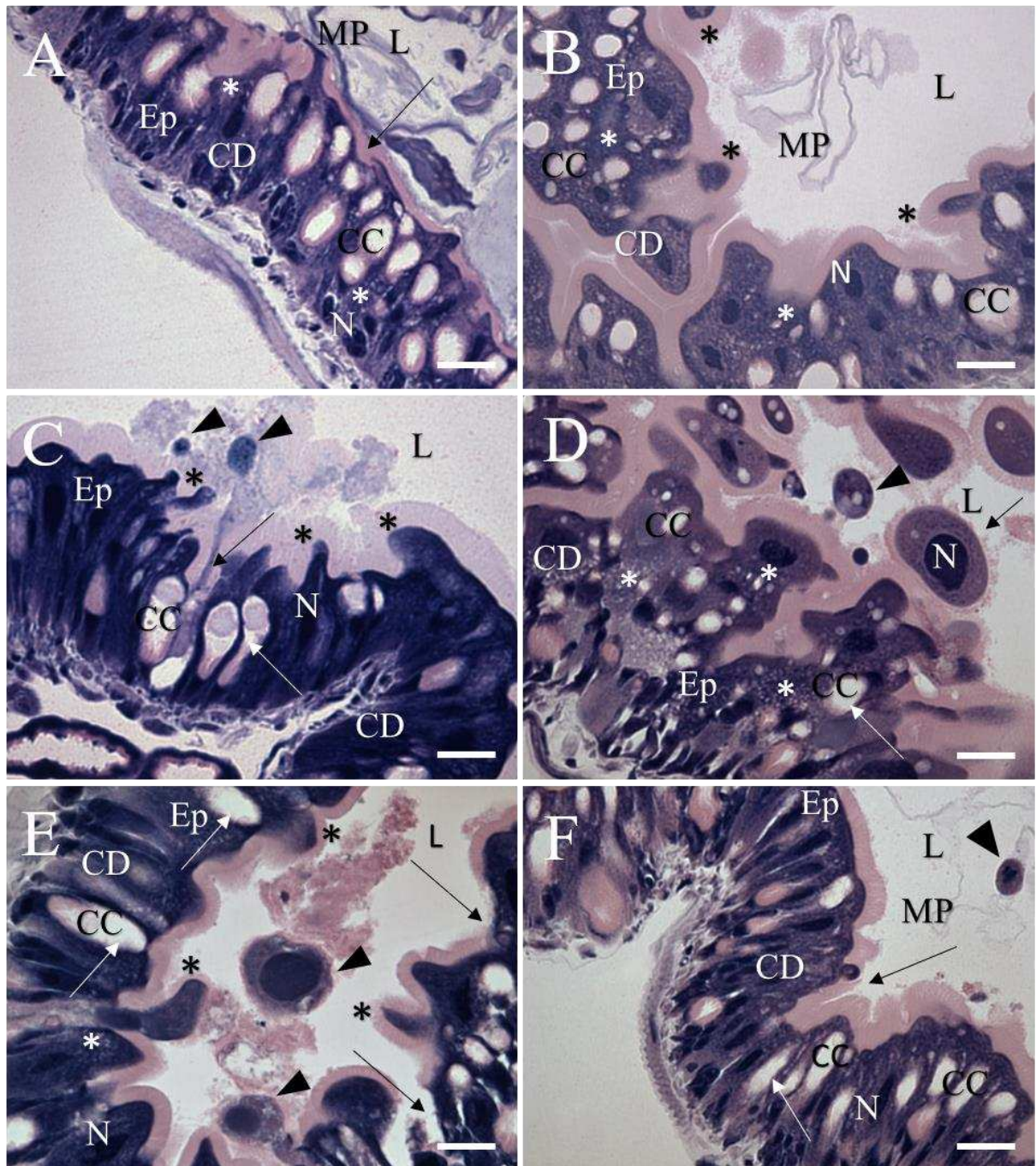


Figura 3. Micrografias de luz do intestino médio de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com flupiradifurona à CL₅₀ por 1,5h (B), 3h (C), 6h (D), 12h (E), 24h (F). [A]: grupo controle. Epitélio do intestino médio (Ep) internamente revestido pela matriz peritrófica (MP), borda estriada bem evidente (seta), células digestivas (CD) com núcleo evidente (N) e células caliciformes (CC), lúmen (L) e alguns vacúolos (asteriscos). [B]: epitélio desorganizado com vacuolização, protrusões citoplasmáticas (asterisco preto) em direção ao lúmen e fragmentos de matriz peritrófica. [C]: epitélio desorganizado com rupturas na borda estriada (seta preta), protrusões citoplasmáticas, células digestivas com núcleo de cromatina condensada. Células caliciformes com borda estriada degradada (seta branca), fragmentos celulares (ponta de seta) no lúmen. [D]: epitélio desorganizado com alta vacuolização, fragmentos celulares contendo núcleo e borda estriada danificada. Células digestivas com alta vacuolização, células caliciformes com danos na borda estriada. [E]: epitélio com borda estriada danificada e fragmentos celulares (ponta de seta) e protrusões

citoplasmáticas em direção ao lúmen. Células digestivas com núcleo com cromatina condensada e vacuolização. Células caliciformes com borda estriada danificada. [F]: epitélio alongado com borda estriada e matriz peritrófica. Células digestivas com cromatina condensada no núcleo e células caliciformes com danos na borda estriada. Lúmen com fragmentos celulares. Barras = 20 μ m.

3.5. Citotoxicidade

As microvilosidades das células digestivas do intestino médio das lagartas no controle estavam com superfície bem desenvolvidas, presença de mitocôndrias no citoplasma apical e vacúolos (Fig. 4A). As dobras da membrana plasmática formaram um labirinto na porção basal das células digestivas, com predominância de cromatina descondensada no núcleo, alguns grumos de cromatina e nucléolo bem desenvolvido (Fig. 4C). As microvilosidades das células caliciformes encontravam-se evidentes e o citoplasma com alguns vacúolos (Fig. 4B). Presença de vacúolos, mitocôndrias e núcleo com nucléolo evidente na porção basal da célula do intestino médio (Fig. 4D).

As células do intestino médio das lagartas apresentaram alterações após 1,5 horas de exposição à flupiradifurona. A região apical das células digestivas mostrou vacúolos autofágicos, muitas mitocôndrias e reservas de glicogênio (Fig. 5A). Na região basal das células digestivas observou-se aumento na vacuolização, presença de mitocôndrias, e vacúolos autofágicos com conteúdo membranoso (Fig. 5C). As microvilosidades da borda estriada das células caliciformes encontravam-se degradadas (Fig. 5B) e a região basal com labirinto bem desenvolvido associado à mitocôndrias e grumos de cromatina condensada no núcleo (Fig. 5D).

Depois das 24 h da ingestão do inseticida, o citoplasma apical e perinuclear das células digestivas das lagartas encontravam-se ricos em mitocôndrias e vacúolos autofágicos (Fig. 6A, 6C). A célula caliciforme mostrou alta desorganização das microvilosidades e cavidade com fragmentos celulares e de borda estriada (Fig. 6B e 6D).

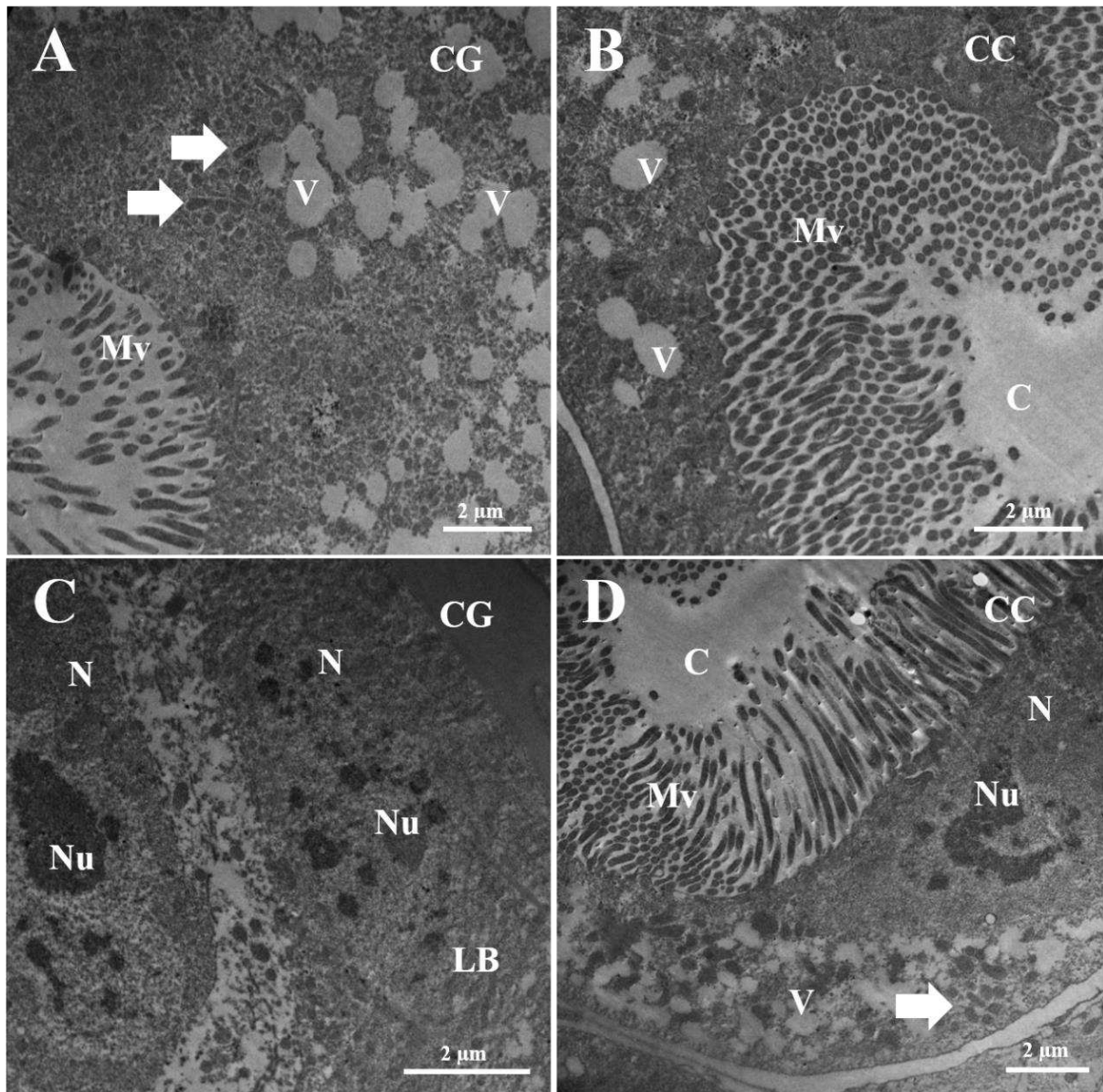


Figura 4. Micrografias eletrônicas de transmissão de células digestivas (CD) e células caliciformes (CC) do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) no controle. [A]: região apical com microvilosidades bem desenvolvidas (Mv), mitocôndrias (seta) de lagartas do grupo controle. [B]: região apical da célula caliciforme com cavidade evidente (C) com microvilosidades bem desenvolvidas e alguns vacúolos. [C]: região basal das células digestivas mostrando núcleo (N) com nucléolo evidente (Nu) e labirinto basal (LB). [D]: região basal da célula caliciforme com microvilosidades em parte da cavidade e presença de vacúolos, mitocôndrias e núcleo com nucléolo evidente.

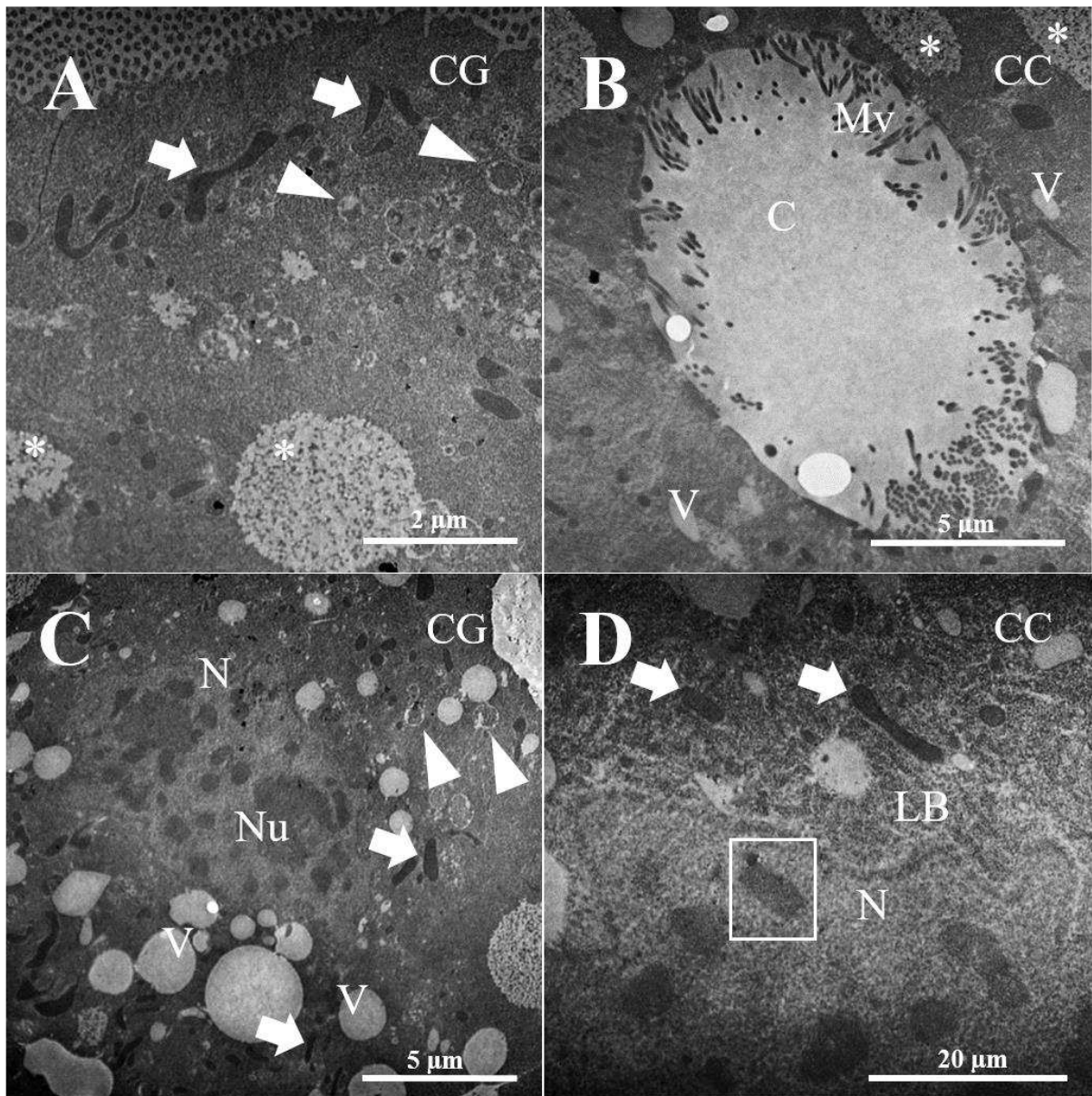


Figura 5. Micrografias eletrônicas de transmissão do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) expostas por ingestão à CL₅₀ de flupiradifurona depois de 1,5 horas de exposição. [A]: região apical da célula digestiva (CD) com formação de vacúolos autofágicos (cabeça de seta) e muitas mitocôndrias (seta). [B]: célula caliciforme (CC) com microvilosidades em degradação (Mv), vacúolos, reserva de glicogênio (asterisco). [C]: região basal da célula digestiva com núcleo (N), nucléolo (Nu), grumos de cromatina (quadrados), mitocôndrias e vacúolos autofágicos. [D]: região basal da célula caliciforme com núcleo e grumos de cromatina e mitocôndrias associadas à lâmina basal (LB).

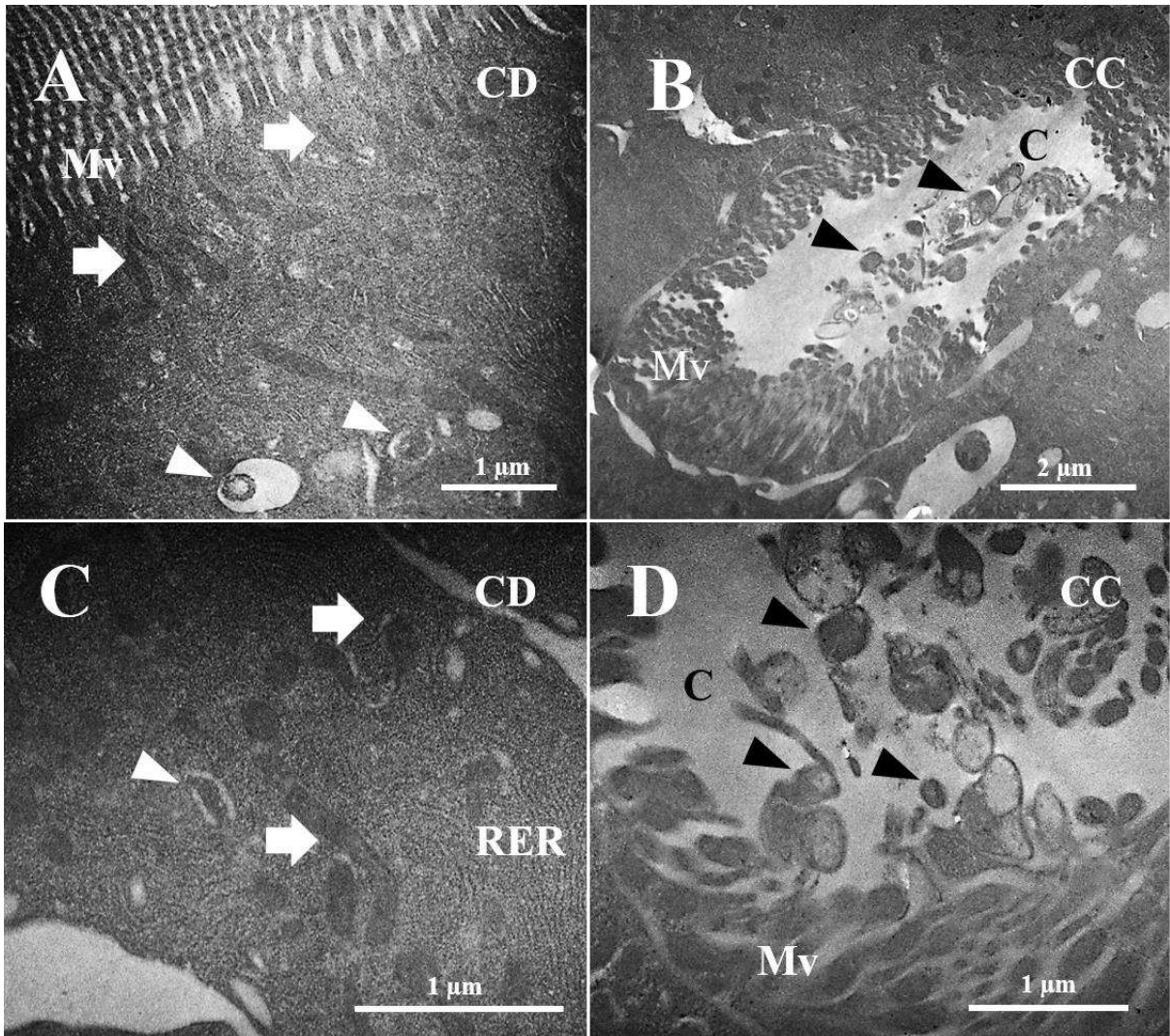


Figura 6. Micrografias eletrônicas de transmissão de intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) expostas por ingestão à CL_{50} de flupiradifurona depois de 24 horas de exposição. [A]: região apical da célula digestiva (CD) com microvilosidades (Mv), mitocôndrias (seta) e vacúolos autofágicos (cabeça de seta branca). [B]: célula caliciforme (CC) mostrando microvilosidades em degradação e cavidade (C) e presença de resíduos de material citoplasmático e parte da borda estriada (cabeça de seta preta). [C]: região basal da célula digestiva com vacúolos autofágicos, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (RER). [D]: célula caliciforme resíduos de material citoplasmático e microvilosidades no interior da cavidade.

3.6. Histopatologia do intestino e corpo gorduroso de *Podisus nigrispinus*

A região basal do epitélio intestinal de *P. nigrispinus* alimentado com lagartas de *A. gemmatalis* sem exposição ao inseticida, encontrava-se revestido por uma camada simples de células digestivas e a presença de células regenerativas formando ninhos espalhados na região basal (Fig. 7A). A região apical do epitélio evidenciou borda estriada bem desenvolvida e as células digestivas colunares apresentaram núcleo com predomínio de cromatina descondensada (Fig. 7A). O epitélio e a borda estriada do intestino médio de *P. nigrispinus* alimentados com

lagartas previamente tratadas com flupiradifurona à CL₉₀, encontravam-se com suas arquiteturas desorganizadas, citoplasma altamente vacuolizado e condensação de cromatina no núcleo (Fig. 7B).

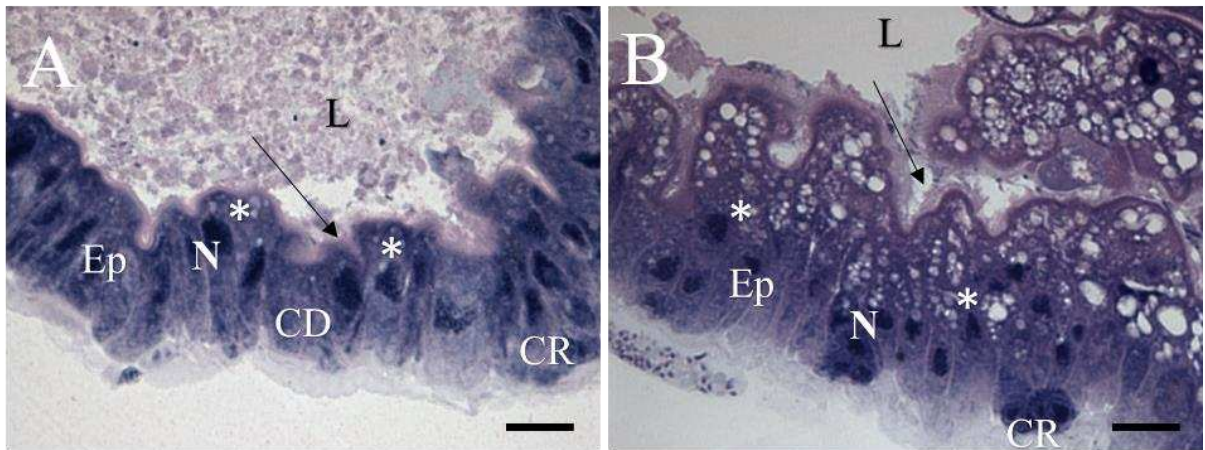


Figura 7. Micrografias de luz do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) 6 horas após predação de lagartas expostas previamente com flupiradifurona à CL₉₀. [A]: epitélio (Ep) do intestino médio do grupo controle com camada simples de células digestivas (CD) com núcleo evidente (N), ninho de células regenerativas (CR), borda estriada bem desenvolvida (seta), alguns vacúolos (asteriscos) e lúmen (L). [B]: epitélio desorganizado, borda estriada com danos e vacúolos. Células digestivas com cromatina condensada no núcleo e ninhos de células regenerativas. Barras = 20 μm.

O corpo gorduroso de *P. nigrispinus* encontrava-se com trofócitos desenvolvidos, com pequenas gotas lipídicas no citoplasma e núcleo bem desenvolvido (Fig. 8A). Os enócitos do corpo gorduroso estavam com citoplasma basófilo homogêneo e cromatina descondensada no núcleo (Fig. 8 A).

Os trofócitos do corpo gorduroso de *P. nigrispinus* alimentados com lagartas de *A. gemmatalis* tratadas com flupiradifurona à CL₉₀ estavam com gotas lipídicas aumentadas em quantidade e tamanho (8B). O teste de PAS (periodic acid-shiff) evidenciou depósitos de polissacarídeos no citoplasma dos trofócitos e apresentaram aumento significativo quando comparados ao controle (8C e 8D).

Podisus nigrispinus alimentados, tanto com lagartas contaminadas com inseticida como aquelas do controle tratadas com mercúrio de bromofenol continham quantidades semelhantes de grânulos de proteínas no citoplasma dos trofócitos das células do intestino médio (8E e 8F).

3.7. Citotoxicidade

As microvilosidades das células digestivas do intestino médio de *P. nigrispinus* encontravam-se evidentes, com o citoplasma apical e perinuclear rico em mitocôndrias (Fig.

9A), predomínio de cromatina condensada no núcleo e a presença de grumos de cromatina (Fig. 9B).

Podisus nigrispinus alimentados com lagartas de *A. gemmatilis* tratadas com flupiradifurona na CL_{50} tinham muitos vacúolos autofágicos com fragmentos membranosos no citoplasma apical das células digestivas (Fig. 9C e Fig. 9D).

Os trofócitos das células do corpo gorduroso dos percevejos no controle continham também gotas lipídicas bem marcadas não diferindo daqueles trofócitos de percevejos alimentados com lagartas contaminadas com inseticida (Fig. 10A e 10B).

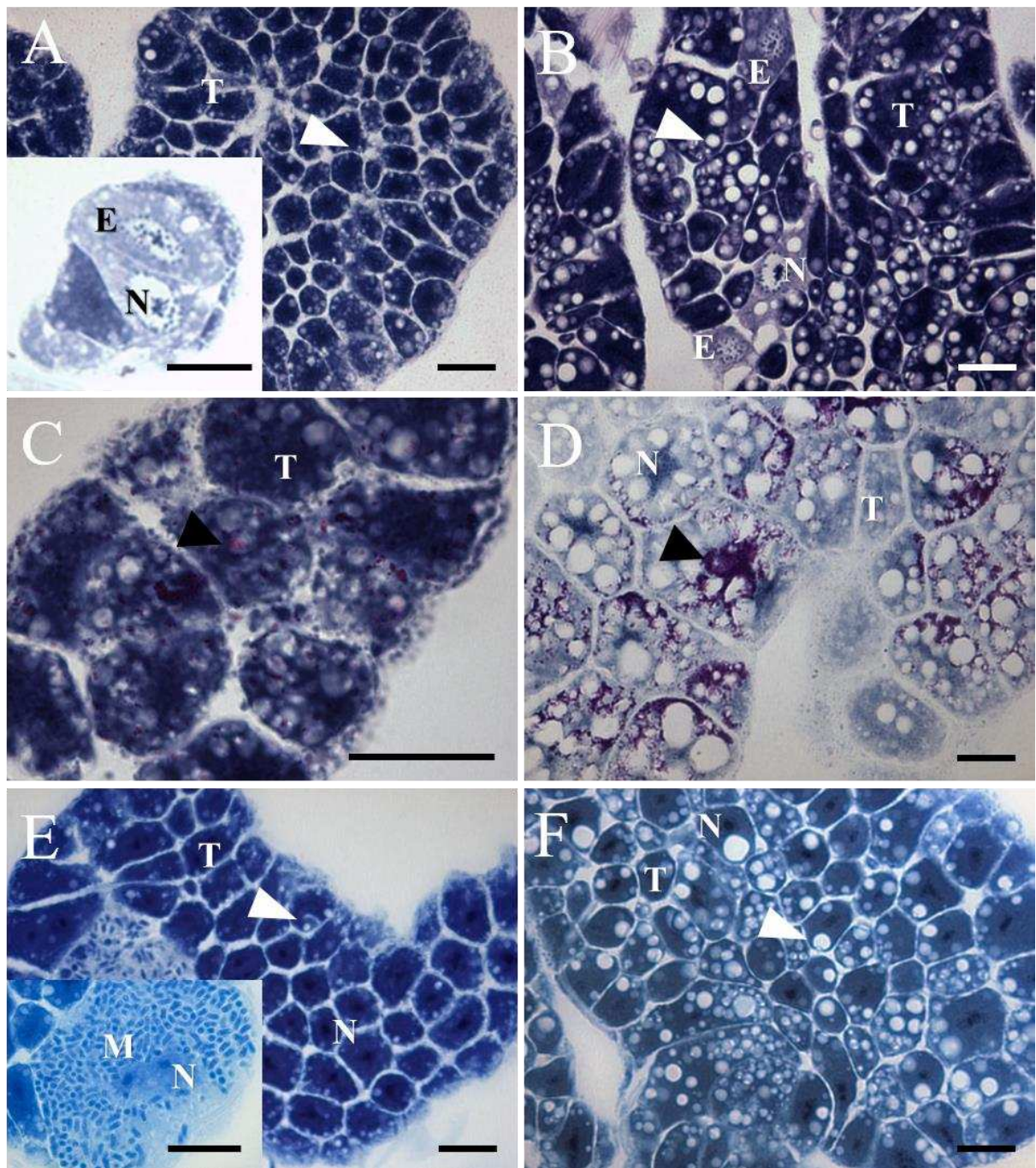


Figura 8. Micrografias de luz do corpo gorduroso de *P. nigrispinus*. [A]: corpo gorduroso do controle com trofócitos (T) gotas lipídicas (ponta de seta), enócito (E) e núcleo. [B]: corpo gorduroso de percevejos tratados com trofócitos (T), enócitos e grandes gotas lipídicas. [C]: tratamento de PAS no corpo gorduroso do controle. Marcações em rosa indicando presença de polissacarídeos (ponta de seta preta). [D]: tratamento de PAS no corpo gorduroso do tratamento com inseticida. Ponta de seta preta indica polissacarídeos em maior concentração. [E]: tratamento de mercúrio de bromofenol no corpo gorduroso do controle. Núcleos evidentes e gotas lipídicas. Em evidência: possíveis micetócitos (M) com presença de bactérias e núcleo evidente. [F]: tratamento de mercúrio de bromofenol no corpo gorduroso do tratamento com inseticida. Trofócitos, gotas lipídicas e núcleo evidente. Barras = 20 μ m.

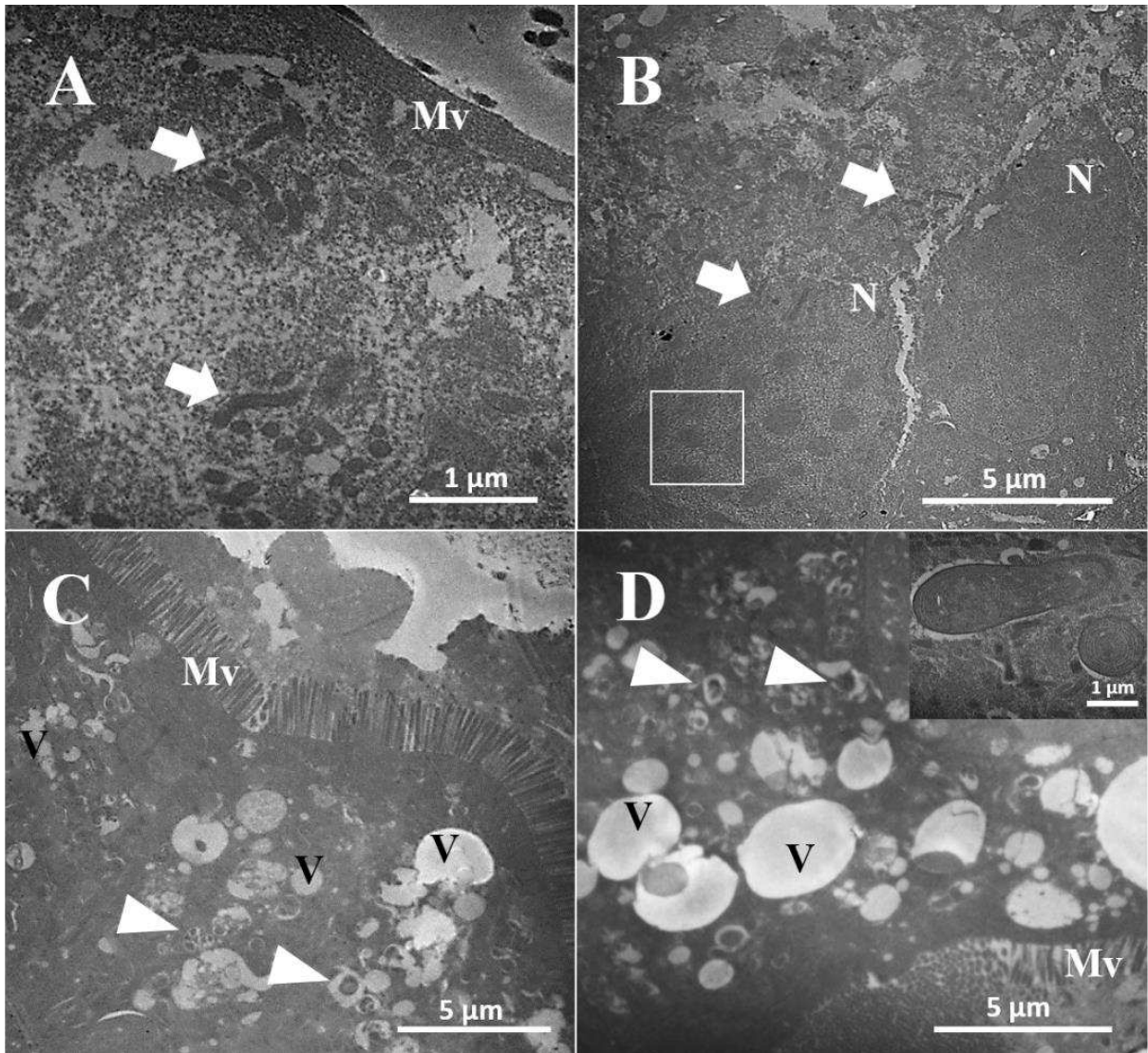


Figura 9. Micrografias eletrônicas de transmissão de intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) alimentados com lagartas de *A. gemmatalis* tratadas previamente com flupiradifurona na CL_{50} . [A]: região apical com microvilosidades (Mv), mitocôndrias (seta) - Controle [B]: região perinuclear com mitocôndrias (seta), núcleo (N) com grumos de cromatina (quadrado) - Controle [C]: região apical com microvilosidades, alta vacuolização (V), vacúolos autofágicos (cabeça de seta branca). [D]: região apical com vacúolos, vacúolos autofágicos e em destaque, autofagossomos.

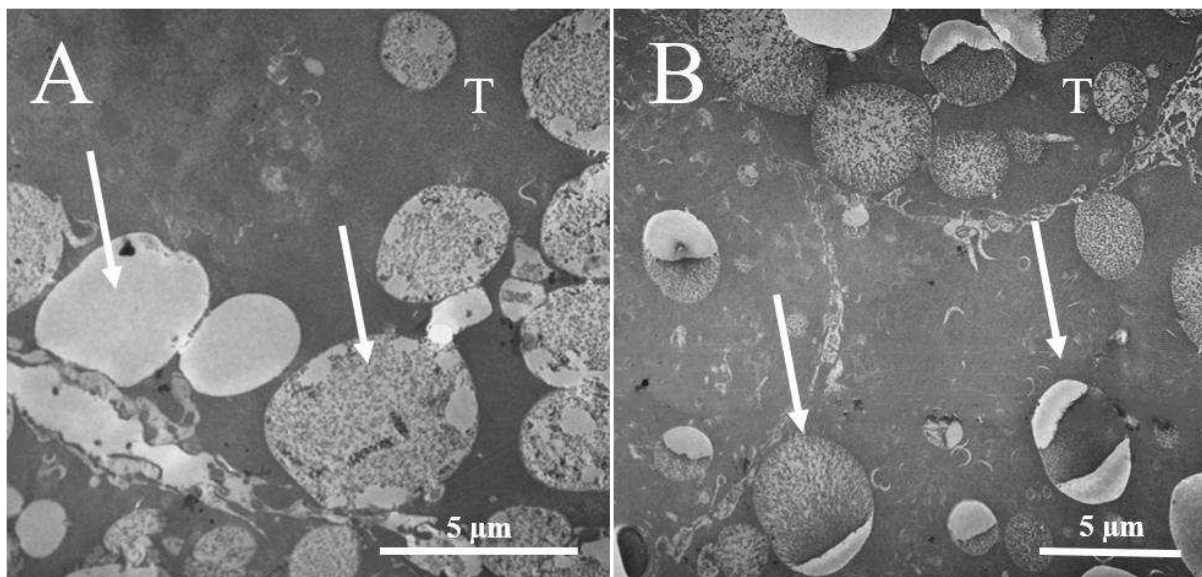


Figura 10. Micrografias eletrônicas de transmissão de corpo gorduroso de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) alimentados com lagartas de *A. gemmatalis* tratadas previamente com flupiradifurona na CL_{50} . [A]: trofócito (T) com gotas lipídicas (setas) do controle. [B]: trofócito com gotas lipídicas do tratamento com inseticida.

4. Discussão

A flupiradifurona é tóxica para lagartas *A. gemmatalis* por ingestão ($CL_{50} = 5,10 \text{ g L}^{-1}$), causando mortalidade de acordo com a concentração letal. Resultados similares foram descritos para *A. gemmatalis* expostas a outros pesticidas, como clorraniliprole (Castro et al., 2021), tebufenozide (Fiaz et al., 2018) e clorpirifós (Plata-Rueda et al., 2020). A toxicidade da flupiradifurona contra as lagartas e o aumento da mortalidade nas maiores concentrações reforçam sua eficácia para controlar essa praga.

As variações no tempo letal com as diferentes concentrações do inseticida podem estar associados com o método de aplicação utilizado (Martinez et al., 2018), a quantidade de inseticida necessária para induzir neurotoxicidade aguda (Fiaz et al., 2018, Benelli et al. 2018), e os mecanismos de detoxificação de cada inseto (Rharrabe et al., 2007). A elevada mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis* submetidas as diferentes concentrações do inseticida flupiradifurona indica que esse inseticida é eficaz em reduzir populações desta praga, podendo ser utilizado em programas de manejo de populações desta praga em condições de campo.

O baixo consumo das folhas tratadas com flupiradifurona sugere efeito anti-alimentar do inseticida nas lagartas, o que pode ter sido causado pelo seu modo de ação. Flupiradifurona causa hiperexcitabilidade impedindo que o inseto se alimente, o que reduz a desfolhadora (Nauen et al., 2015). A inibição alimentar em lagartas, normalmente é detectada por quimiorreceptores nas sensilas das peças bucais do inseto, como observado em larvas de quinto ínstar de *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) expostas à azadiractina

(Qin et al., 2020). Este estudo identificou genes na sensila de *S. litura* que detectam compostos químicos tóxicos e podem ser explorados por técnicas moleculares para aumentar a eficácia de controle de lagartas desfolhadoras prolongando o tempo de uso da flupiradifurona.

O resultado encontrado para as concentrações letais estudadas indicam que a ingestão da flupiradifurona pode causar efeitos deletérios no intestino médio de lagartas, afetando a atividade das enzimas responsáveis pela digestão, podendo inibir a absorção de nutrientes e causar morte por inanição. Efeito semelhante foi observado para o artrópode aquático, *Gammarus pulex* (Linnaeus, 1758) (Amphipoda: Gammaridae) que teve seu consumo alimentar inibido após ingerir alimento tratado com flupiradifurona (Huang et al., 2022). Inseticidas a base de óleo essencial de capim-limão, tebufenozide e azadiractina também causaram efeito semelhante de inibição alimentarem lagartas de *A. gemmatilis* (Plata-Rueda et al., 2021; Fiaz et al., 2018; Farder-Gomes et al., 2021).

As alterações histopatológicas e ultraestruturais causadas no intestino médio de *A. gemmatilis* expostas à flupiradifurona como degradação da matriz peritrófica e borda estriada, desorganização epitélio desorganizado, vacuolização citoplasmática, condensação de cromatina, protusões apicais e fragmentação celular no lúmen do órgão, são características de morte celular por apoptose (Hacker, 2000; Kerr et al., 1972; Taatjes et al., 2008).

Apoptose é uma forma de morte celular programada ou “suicídio celular” que atua na remoção de células infectadas, transformadas ou danificadas, durante o desenvolvimento do organismo e homeostase dos tecidos (Franzetti et al., 2012; Ulukaya et al., 2011). Morfologicamente a apoptose pode ser identificada por perda de volume celular, condensação de cromatina, protrusões citoplasmáticas e formação de corpos apoptóticos (Hacker, 2000). A atividade apoptótica é mediada por proteases responsáveis pela clivagem de componentes do citoesqueleto, lâminas nucleares e de proteínas de adesão célula-célula que ligam as células às suas vizinhas. Isso possibilita a separação da célula apoptótica das suas vizinhas, facilitando sua remoção (Alberts, 2017; Ndozangue-Touriguine et al., 2008). Esse fenômeno pode explicar a desorganização do epitélio, a perda da borda estriada e a condensação nuclear das células do intestino médio de lagartas de *A. gemmatilis*. Os fragmentos celulares liberados no lúmen do intestino, podem ser corpos apoptóticos originados durante a reorganização da actina e fosforilação da miosina (Ndozangue-Touriguine et al., 2008). Danos intestinais semelhantes foram descritos em *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (Vinha et al., 2021) expostas à deltametrina, *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Aphidae) expostas à imidacloprido (Carneiro et al., 2022) e larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) expostas à piriproxifen (Fiaz et al., 2019).

O rompimento da matriz peritrófica e da borda estriada sugere mudanças na fisiologia do intestino, uma vez que a primeira é responsável por proteger o intestino contra patógenos, toxinas e danos mecânicos e a segunda, por sua vez, aumenta a superfície de contato das células permitindo uma maior absorção de nutrientes (Denecke et al., 2018; Hegedus et al., 2019). Danos à essas estruturas podem ser, inclusive, uma das causas do efeito anti-alimentar das lagartas.

As intensidades das alterações histopatológicas variam com os tempos de exposição. As lagartas de *A. gemmatalis* expostas por via oral por 24 horas ao inseticida flupiradifurona tiveram alterações histológicas amenas no intestino médio se comparada aos demais tempos de avaliação. No entanto, a presença de vacúolos autofágicos, o aumento de mitocôndrias na região basal, a intensa desorganização e degradação da borda estriada interna das células caliciformes nas amostras ultraestruturais avaliadas, indicam uma provável reação das células do intestino médio para proteger e recuperar o tecido afetado pela flupiradifurona (Perez-Perez et al., 2014). A autofagia faz parte do processo de sobrevivência da célula atuando em processos variados que vão desde o controle de crescimento da célula até a sua morte programada, envolvendo degradação de componentes celulares disfuncionais e pode ocorrer em resposta a estresse metabólico ou ambiental, como o inseticida (Hacker, 2000; Maiuri et al., 2007 (Bloemberg & Quadri, 2019; Perez-Perez et al., 2014; Scherz-Shouval & Elazar, 2011).

As células digestivas produzem enzimas importantes no processo de biotransformação de xenobióticos, promovendo detoxificação do organismo, além de secretar enzimas digestivas no lúmen e absorver nutrientes (Caccia et al., 2019; Cioffi, 1979; Lehane & Billingsley, 2012). Essas enzimas englobam três famílias principais: carboxilesterase, citocromo P450, e glutathione S-transferase (Zoh et al., 2021; Zou et al., 2014). Resultado semelhante foi observado para *A. mellifera*, que teve seu intestino recuperado após oito dias de exposição ao neonicotinoide tiametoxan (Catae et al., 2014). Isto indica que após sofrer danos nas primeiras horas de exposição ao inseticida, o intestino médio de *A. gemmatalis* pode se recuperar pela atividade dessas enzimas, a depender do tempo de exposição ao produto.

Os danos na borda estriada interna das células caliciformes podem ter prejudicado a absorção de nutrientes e o processo digestivo (Gomes et al., 2013; Harvey et al., 2009), pois essas células em noctuídeos atuam no transporte de potássio (K^+) da hemolinfa para o lúmen e de cálcio (Ca^+) das células digestivas adjacentes (Gomes et al., 2013). Os resíduos de material citoplasmático na cavidade interna das células caliciformes do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* após 24 h de exposição ao inseticida confirmam o processo autofágico.

As células caliciformes do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* podem ter expelido detritos celulares, como mecanismo de desintoxicação, funcionando como um local de armazenamento intermediário ou espaço de entrega, antes da remoção de detritos para o lúmen (Gomes et al., 2013). Resultados semelhantes foram também reportados em estudos com *A. gemmatalis* expostas à tefufenozide (Fiaz et al., 2018).

A desorganização do epitélio, danos na borda estriada, aumento significativo na vacuolização e presença de autossomos no intestino médio de *P. nigripinus* nas amostras histopatológicas confirmam o processo autofágico (Romanelli et al., 2014). A vacuolização é um dos primeiros mecanismos da célula em processo de autofagia (Hacker, 2000) e podem envolver a formação de autofagossomos, que são vesículas de dupla camada que sequestram porções do citoplasma e organelas e são degradadas após a fusão com os lisossomos para impedir que outros órgãos sejam atingidos (Tettamanti et al., 2007). O intestino de *P. nigripinus* alimentados com lagartas tratadas com imidaclopride à CL₅₀, em diferentes tempos (30 min, 1h, 3h e 6h) tiveram resultados semelhantes (Martínez et al., 2019a). Outros parâmetros de danos também foram reportados em *P. nigripinus* alimentados com presa contaminada com óleo de neem (Campos et al., 2014) e diflubenzuron (Castro et al., 2012). Portanto, embora a flupiradifurona seja eficiente no controle de pragas, ela pode não ser seletiva para insetos benéficos, o que requer mais análises.

O aumento na quantidade e no diâmetro das gotas lipídicas do corpo gorduroso tratado de *P. nigripinus* indicam uma resposta de detoxificação. Proteínas, lipídeos e carboidratos são fontes importantes de energia durante a vida de um inseto, especialmente durante processos como muda, atividade muscular como locomoção e voo, desenvolvimento reprodutivo e biotransformação de produtos tóxicos (Arrese and Soulages, 2010; Thompson, 2003). Sob condições de estresse, o metabolismo energético do inseto é afetado e as demais funções como mobilização lipídica e proteica, também podem se comprometer afetando o uso, estoque e síntese (Sak et al., 2006; Arrese and Soulages, 2010; Yucel and Kayis, 2019). Esse aumento também pode indicar uma resposta ao estresse oxidativo induzido pelo inseticida, já que está diretamente relacionada com a peroxidação lipídica de membrana pela ação das espécies reativas de oxigênio (Gokce et al., 2009; Yucel & Kayis, 2019).

Além disso, altos níveis de lipídeos encontrados no corpo gorduroso dos percevejos podem ser um indicativo da transferência de substâncias tóxicas das lagartas para os predadores por meio da alimentação e acúmulo no corpo gorduroso (Arrese & Soulages, 2010). Lagartas expostas à flupiradifurona na CL₉₀ por pouco tempo foram capazes de elevar os níveis de lipídeos para os processos de biotransformação. Isto se deve a ingestão de lipídeos do conteúdo

liquefeito produzido durante a digestão extra-oral, absorvendo os nutrientes da presa para seu sistema digestivo (Cohen, 1995, 1998).

A quantidade de polissacarídeos nos trofócitos dos percevejos alimentados com lagartas contaminadas pelo inseticida foi maior que no controle, indicando a necessidade deste predador acumular glicogênio para obter prontamente energia para uso imediato. A glicose é armazenada no corpo gorduroso em uma forma polimérica, o glicogênio, pode ser prontamente degradado sob demanda para ser usado como combustível glicolítico (Arrese & Soulages, 2010). Assim, os altos níveis de polissacarídeos nas lagartas podem ter sido ingeridos pelos percevejos e acumulados no seu corpo gorduroso.

Os níveis de proteínas nos percevejos não diferiram entre os tratamentos, indicando que a exposição a flupiradifurona não alterou as reservas proteicas deste predador, o que pode ser atribuído ao fato desses animais requererem alta energia em condições de estresse pela exposição ao inseticida. Essa demanda de energia poderia levar o inseto a um estímulo de catabolismo proteico, diminuindo seus níveis de proteínas, já que o corpo gorduroso é o principal local onde enzimas de detoxificação são produzidas (Li et al., 2019). Isto difere dos resultados obtidos com vespas *Pimpla turionellae* que aumentou o catabolismo proteico, diminuindo os níveis de proteínas no organismo, o que indica sua utilização no processo de detoxificação (Sal et al. 2006). Portanto, era esperado que seus níveis de proteínas de *P. nigrispinus* diminuíssem, mas isto não ocorreu, provavelmente, porque as proteínas produzidas para o processo de biotransformação não superaram os níveis daquelas em catálise.

O corpo gorduroso de *P. nigrispinus* alimentados com lagartas contaminadas pela flupiradifurona permaneceram com seus enócitos inalterados se comparado ao controle. Nos Heteroptera, os enócitos são claramente distintos das demais células do corpo gorduroso, têm origem ectodérmica e exercem papel importante na detoxificação e proteção contra substâncias tóxicas (Lycett et al., 2006; Martins et al., 2022). Essas células, também, podem estar ligadas a síntese de feromônio, lipídeos, proteínas e de hidrocarbonetos que compõem a cutícula (Arrese & Soulages, 2010; Zülfikaroğlu et al., 2022). Abelhas solitárias *Tetrapedia diversipes* (Hymenoptera: Apidae) expostas ao imidacloprido e africanas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) expostas oralmente ao tiametoxan e ao fungicida picoxistrobin tiveram seus enócitos alterados no corpo gorduroso (Assis et al., 2022; Domingues et al., 2020). Essas alterações nos enócitos abelhas se comparado ao *P. nigrispinus* podem indicar que os enócitos de *P. nigrispinus* são resistentes à ação da flupiradifurona.

As células diferenciadas do corpo gorduroso de *P. nigrispinus*, aparentemente hospedaram bactérias. Essas células são consideradas diferenciações funcionais dos trofócitos,

modificações estruturais resultantes de uma adaptação a uma determinada atividade específica como os micetócitos, cromotócitos e urócitos (Dean et al., 1985; Roma et al., 2010). Os micetócitos são células que contêm microrganismos procarióticos simbióticos, como a bactéria *Blattabacterium cuenoti* que nas baratas são responsáveis por sintetizar aminoácidos importantes e ainda participa da reciclagem do nitrogênio proveniente do ácido úrico (Arrese & Soulages, 2010; Roma et al., 2010; Zülfikaroğlu et al., 2022). Os micetócitos são encontrados em organismos que comem alimentos de baixa qualidade e dietas desbalanceadas, sintetizando alguns nutrientes como aminoácidos ou vitamina B (Arrese & Soulages, 2010; Skowronek et al., 2021). Embora ainda não tenha sido descrito na literatura para Heteroptera, é plausível sugerir que, esse tipo de célula também desempenhe essas funções no organismo do predador zoofitófago *P. nigrispinus*.

5. Conclusão

A flupiradifurona é tóxica para *A. gemmatalis*, inibe consumo alimentar e induz mudanças negativas histológicas e ultraestruturais no intestino do inseto médio desse inseto. Por meio da exposição indireta, este inseticida também causa alterações no intestino e na histoquímica no corpo gorduroso do seu predador natural *P. nigrispinus*. Os efeitos da flupiradifurona mostram sua eficácia contra a lagarta, porém causa danos ao seu predador natural, indicando baixa seletividade. É de suma importância que novas tecnologias em inseticidas sejam exploradas, de modo a se obter uma resposta de controle eficaz e reduzir os danos causados aos insetos não-alvo como os inimigos naturais, além de gerenciar a resistência a outras pragas. Por isto, flupiradifurona deve ser utilizada com cautela nos programas de manejo integrado em agroecossistemas com populações naturais de *P. nigrispinus*.

Referências Bibliográficas

- Abot, A. R., Moscardi, F., Fuxa, J. R., Sosa-Gómez, D. R., & Richter, A. R. (1996). Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. *Biological Control*, 7(1), 126–130. <https://doi.org/10.1006/bcon.1996.0075>
- Alberts, B. (2017). *Tradução*: (6th Editio). W.W.Norton & Company. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781315735368>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Arthidoro de Castro, M. B., Martinez, L. C., Cossolin, J. F. S., Serra, R. S., & Serrão, J. E. (2020). Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere*, 248. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126075>
- Assis, J. C. de, Domingues, C. E. da C., Tadei, R., Inês da Silva, C., Soares Lima, H. M., Decio, P., & Silva-Zacarin, E. C. M. (2022). Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810). *Environmental Pollution*, 304(March). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119140>
- Baptista, G. C. de, Parra, J. R. P., & Haddad, M. de L. (1995). Hueb ., 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) e ao percevejo verde, *Nezara viridula* (L ., 1758). 1–6.
- Benelli, G., et al., 2018. High toxicity of camphene and c-element from *Wedelia prostrata* essential oil against larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental science and pollution research international*, 25 (11), 10383–10391.
- Bloemberg, D., & Quadrilatero, J. (2019). Autophagy, apoptosis, and mitochondria: Molecular integration and physiological relevance in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 317(1), C111–C130. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00261.2018>
- Caccia, S., Casartelli, M., & Tettamanti, G. (2019). The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and Tissue Research*, 377(3), 505–525. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03076-w>
- Campos, A. P., Boiça Junior, A. L., & Ribeiro, Z. A. (2014). Indirect effect of neem oil on *Podisus nigrispinus* (Hemiptera, Pentatomidae): Biology and predatory capacity. *Revista Ceres*, 61(5), 652–659. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201461050008>

- Carneiro, L. S., Martínez, L. C., Gonçalves, W. G., Santana, L. M., & Serrão, J. E. (2020). The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *189*(May 2019), 109991. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>
- Carneiro, L. S., Martinez, L. C., Oliveira, A. H. de, Cossolin, J. F. S., Resende, M. T. C. S. de, Gonçalves, W. G., Medeiros-Santana, L., & Serrão, J. E. (2022). Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. *Science of the Total Environment*, *815*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152847>
- Castro, A. A., Lacerda, M. C., Zanuncio, T. V., De S. Ramalho, F., Polanczyk, R. A., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2012). Effect of the insect growth regulator diflubenzuron on the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ecotoxicology*, *21*(1), 96–103. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0769-z>
- Castro, B. M. de C. e., Martinez, L. C., Barbosa, S. G., Serrão, J. E., Wilcken, C. F., Soares, M. A., da Silva, A. A., de Carvalho, A. G., & Zanuncio, J. C. (2019). Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43074-0>
- Castro, B. M. de C. e., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Soares, M. A., Wilcken, C. F., Zanuncio, A. J. V., Fiaz, M., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2021). Exposure to chlorantraniliprole reduces locomotion, respiration, and causes histological changes in the midgut of velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemosphere*, *263*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128008>
- Catae, A. F., Roat, T. C., De Oliveira, R. A., Ferreira Nocelli, R. C., & Malaspina, O. (2014). Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microscopy Research and Technique*, *77*(4), 274–281. <https://doi.org/10.1002/jemt.22339>
- Chapman, R. F. (1998). *The Insect: Structure and Function*. Cambridge: University Press.
- Cioffi, M. (1979). The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue and Cell*, *11*(3), 467–479. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(79\)90057-0](https://doi.org/10.1016/0040-8166(79)90057-0)
- Cohen, A. C. (1995). Extra-oral digestion in predaceous terrestrial Arthropoda. *Annual Review of Entomology*, *40*, 85–103. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.000505>
- Cohen, A. C. (1998). Solid-to-liquid feeding: The inside(s) story of extra-oral digestion in

- predaceous Arthropoda. *American Entomologist*, 44(2), 103–117.
<https://doi.org/10.1093/ae/44.2.103>
- Cruz-Landim, C., & Cavalcante, C. V. (1999). Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia*, 24, 19–39.
- da Silva Júnior, N. R., Vital, C. E., de Almeida Barros, R., Faustino, V. A., Monteiro, L. P., Barros, E., de Oliveira, E. E., de Oliveira Ramos, H. J., & de Almeida Oliveira, M. G. (2020). Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 103(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1002/arch.21631>
- De Armas, F. S., Dionei Grutzmacher, A., Edson Nava, D., Antonio Pasini, R., Rakes, M., & de Bastos Pazini, J. (2020). Non-target toxicity of nine agrochemicals toward larvae and adults of two generalist predators active in peach orchards. *Ecotoxicology*, 29(3), 327–339. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02177-5>
- De Castro, A. A., Corrêa, A. S., Legaspi, J. C., Guedes, R. N. C., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2013). Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere*, 93(6), 1043–1050.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.075>
- De Clercq, P., Mohaghegh, J., & Tirry, L. (2000). Effect of host plant on the functional response of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biological Control*, 18(1), 65–70. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0808>
- De La Cruz, R. A., Zanuncio, J. C., Lacerda, M. C., Wilcken, C. F., Fernandes, F. L., Tavares, W. D. S., Soares, M. A., & Sediyaama, C. S. (2017). Side-effects of pesticides on the generalist endoparasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10462-3>
- Dean, R. L., Locke, M., & Collins, J. V. (1985). Structure of fat body. In-Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology,. Eds. GA Kerkut & LI Gilbert.
- Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., & Vontas, J. (2018). How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.005>
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52, 81–106.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Domingues, C. E. da C., Inoue, L. V. B., Silva-Zacarin, E. C. M. da, & Malaspina, O. (2020). Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than

- newly emerged bees. *Environmental Pollution*, 266, 115267. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115267>
- Evangelista Júnior, W. S., Gondim Junior, M. G. C., Torres, J. B., & Marques, E. J. (2004). Fitofagia de *Podisus nigrispinus* em algodoeiro e plantas daninhas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(5), 413–420. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2004000500002>
- Farder-Gomes, C. F., Saravanan, M., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2021). Azadirachtin-based biopesticide affects the respiration and digestion in *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Toxin Reviews*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1892764>
- Fiaz, M., Martínez, L. C., Plata-rueda, A., Gonçalves, W. G., Linhares, D., Souza, L. De, Cossolin, F. S., Eduardo, P., Rodrigues, G., Martins, G. F., & Serrão, J. E. (2019). *Pyriproxyfen*, a juvenile hormone analog, damages midgut cells and interferes with behaviors of *Aedes aegypti* larvae. 1–21. <https://doi.org/10.7717/peerj.7489>
- Fiaz, M., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., Shareef, M., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2018). Toxicological and morphological effects of tebufenozide on *Anticarsia gemmatalis*. *Chemosphere*, 212, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.088>
- Franzetti, E., Huang, Z. J., Shi, Y. X., Xie, K., Deng, X. J., Li, J. P., Li, Q. R., Yang, W. Y., Zeng, W. N., Casartelli, M., Deng, H. M., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q., Tettamanti, G., Cao, Y., & Feng, Q. (2012). Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, 17(3), 305–324. <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0675-0>
- Gokce, F., Kalender, S., Durak, D., Demir, F., & Kalender, Y. (2009). Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 1903–1908. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.001>
- Gomes, F. M., Carvalho, D. B., Machado, E. A., & Miranda, K. (2013). Ultrastructural and functional analysis of secretory goblet cells in the midgut of the lepidopteran *Anticarsia gemmatalis*. *Cell and Tissue Research*, 352(2), 313–326. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1563-4>
- Greene, G. L., Leppla, N. C., & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. *Journal of Economic Entomology*, 69(4), 487–488. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>
- Haase, S., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*, 7(5), 2230–

2267. <https://doi.org/10.3390/v7052230>
- Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res. Cell Tissue Res*, *301*, 5–17.
- Harvey, W. R., Boudko, D. Y., Rheault, M. R., & Okech, B. A. (2009). NHEVNAT: An H⁺ V-ATPase electrically coupled to a Na⁺:nutrient amino acid transporter (NAT) forms an Na⁺/H⁺ exchanger (NHE). *Journal of Experimental Biology*, *212*(3), 347–357. <https://doi.org/10.1242/jeb.026047>
- Hegedus, D. D., Toprak, U., & Erlandson, M. (2019). Peritrophic matrix formation. *Journal of Insect Physiology*, *117*(November 2018), 103898. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103898>
- Huang, A., Mangold-Döring, A., Focks, A., Zhang, C., & Van den Brink, P. J. (2022). Comparing the acute and chronic toxicity of flupyradifurone and imidacloprid to non-target aquatic arthropod species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *243*(May). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113977>
- IRAC Susceptibility Test Methods 020. (2009). *IRAC Susceptibility Test Methods 020*.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & A. R. Currie. (1972). Apoptosis: A Basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, *4*(26), 239–257.
- Lehane, M., & Billingsley, P. (2012). *Biology of the Insect Midgut* (M. Lehane & P. Billingsley (eds.); 1st ed.). Springer Science & Business Media.
- Li, S., Yu, X., & Feng, Q. (2019). Fat body biology in the last decade. *Annual Review of Entomology*, *64*, 315–333. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-112007>
- Lillie, R. D. (1965). *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry* (Issue 3rd Ed.). McGrawhill Book Co.
- Lycett, G. J., McLaughlin, L. A., Ranson, H., Hemingway, J., Kafatos, F. C., Loukeris, T. G., & Paine, M. J. I. (2006). *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin. *15*(December 2005), 321–327. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2586.2006.00647.x>
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(9), 741–752. <https://doi.org/10.1038/nrm2239>
- Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Colares, H. C., Campos, J. M., Dos Santos, M. H., Fernandes, F. L., ... & Zanuncio, J. C. (2018). Toxic effects of two essential oils and their constituents on the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Bulletin of entomological research*, *108*(6), 716-725.

- Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., Freire, A. F. P. A., Zanuncio, J. C., Bozdoğan, H., & Serrão, J. E. (2019). Toxicity and cytotoxicity of the insecticide imidacloprid in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *167*(October 2018), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.124>
- Martins, G. F., Ramalho-ortigao, M., Schools, R. C., Foundation, M., & Surveillance, D. V. (2022). *Oenocytes in insects. August 2012*
- Mateos Fernández, R., Petek, M., Gerasymenko, I., Juteršek, M., Baebler, Š., Kallam, K., Moreno Giménez, E., Gondolf, J., Nordmann, A., Gruden, K., Orzaez, D., & Patron, N. J. (2022). Insect pest management in the age of synthetic biology. *Plant Biotechnology Journal*, *20*(1), 25–36. <https://doi.org/10.1111/pbi.13685>
- Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M. E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W., Wölfel, K., Haas, M., Kunz, K., & Raupach, G. (2015). Flupyradifurone: A brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest Management Science*, *71*(6), 850–862. <https://doi.org/10.1002/ps.3932>
- Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J., & Bréard, J. (2008). Cytoskeleton and apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, *76*(1), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.03.016>
- Nicholson, G. M. (2007). *Editorial Fighting the global pest problem : preface to the special Toxicon issue on*. 1–19.
- Oliveira, G. de L. T., & Schneider, M. (2016). The politics of flexing soybeans: China, Brazil and global agroindustrial restructuring. *Journal of Peasant Studies*, *43*(1), 167–194. <https://doi.org/10.1080/03066150.2014.993625>
- Panizzi, A. R. (2013). History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. *Neotropical Entomology*, *42*(2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s13744-013-0111-y>
- Pasini, R. A., Rakes, M., Castilhos, R. V., Silva de Armas, F., de Bastos Pazini, J., Zantedeschi, R., & Grützmacher, A. D. (2021). Residual action of five insecticides on larvae and adults of the neotropical predators *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) and *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology*, *30*(1), 44–56. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02314-0>
- Perez-Perez, M. E., Zaffagnini, M., Marchand, C. H., Crespo, J. L., & Lemaire, S. D. (2014). The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy*, *10*(11), 1953–1964. <https://doi.org/10.4161/auto.34396>
- Plata-Rueda, A., Fiaz, M., Brügger, B. P., Cañas, V., Coelho, R. P., Zanuncio, J. C., Martínez,

- L. C., & Serrão, J. E. (2021). Lemongrass essential oil and its components cause effects on survival, locomotion, ingestion, and histological changes of the midgut in *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Toxin Reviews*, 1–10.
- Plata-Rueda, A., Menezes, C. H. M. de, Cunha, W. dos S., Alvarenga, T. M., Barbosa, B. F., Zanuncio, J. C., Martínez, L. C., & Serrão, J. E. (2020). Side-effects caused by chlorpyrifos in the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemosphere*, 259. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127530>
- Praça, L. B., da Silva Neto, S. P., & Monnerat, R. G. (2006). *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, amostragem e métodos de controle. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1818, 1–18.
- Qin, D., Zhang, P., Zhou, Y., Liu, B., Xiao, C., Chen, W., & Zhang, Z. (2020). Antifeeding effects of azadirachtin on the fifth instar *Spodoptera litura* larvae and the analysis of azadirachtin on target sensilla around mouthparts. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 103(4), 1–12. <https://doi.org/10.1002/arch.21646>
- Rharrabe, K., Alla, S., Maria, A., Sayah, F., & Lafont, R. (2007). Diversity of detoxification pathways of ingested ecdysteroids among phytophagous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 65(2), 65-73.
- Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208–212 (1963).
- Roma, G. C., Bueno, O. C., & Camargo-Mathias, M. I. (2010). Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*, 41(5), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.12.007>
- Romanelli, D., Casati, B., Franzetti, E., & Tettamanti, G. (2014). A Molecular View of Autophagy in Lepidoptera. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/902315>
- Sak, O., Uçkan, F., & Ergin, E. (2006). Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Belgian Journal of Zoology*, 136(1), 53–58.
- Santos Junior, V. C. dos, Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Fernandes, F. L., Tavares, W. de S., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2020). Histopathological and cytotoxic changes induced by spinosad on midgut cells of the non-target predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere*, 238, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124585>

- Scherz-Shouval, R., & Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: Physiology and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.007>
- Silva, C. T. S., Wanderley-Teixeira, V., Cruz, G. S., Cunha, F. M., & Teixeira, Á. A. C. (2020). Immune and nutritional responses of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) nymphs sprayed with azadirachtin. *Austral Entomology*, 59(1), 215–224. <https://doi.org/10.1111/aen.12432>
- Skowronek, P., Wójcik, Ł., & Strachecka, A. (2021). Fat body—multifunctional insect tissue. *Insects*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/insects12060547>
- Sosa-Gómez, D. R., & Miranda, J. E. (2012). Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 56(3), 359–362. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262012005000050>
- Sosa-Gómez, D. R., & Omoto, C. (2012). Resistência a Inseticidas e outros Agentes de Controle em Artrópodes Associados à Cultura da Soja. *Soja-Manejo Integrado de Insetos e Outros Artrópodes-Praga, May 2014*, 673–724.
- Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Stefanini, M., Martino, C. de, & Zamboni, L. (1967). No Fixation of Ejaculated Spermatozoa for Electron MicroscopyTitle. *Nature*, 216, 173–174.
- Taatjes, D. J., Sobel, B. E., & Budd, R. C. (2008). Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(1), 33–43. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0356-9>
- Terra, W. R., & Ferreira, C. (2020). Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. *Arthropod Structure and Development*, 56, 100931. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.100931>
- Tettamanti, G., Grimaldi, A., Casartelli, M., Ambrosetti, E., Ponti, B., Congiu, T., Ferrarese, R., Rivas-Pena, M. L., Pennacchio, F., & Eguileor, M. De. (2007). Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell and Tissue Research*, 330(2), 345–359. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0449-8>
- Thompson, S. N. (2003). Trehalose - The Insect “Blood” Sugar. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 31, Issue 03). [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(03\)31004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(03)31004-5)

- Torres, J. B., & Bueno, A. de F. (2018). Conservation biological control using selective insecticides – A valuable tool for IPM. *Biological Control*, 126(April), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.012>
- Torres, J. B., Silva-Torres, C. S. A., & Barros, R. (2003). Relative effects of the insecticide thiamethoxam on the predator *Podisus nigrispinus* and the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* in nectaried and nectariless cotton. *Pest Management Science*, 59(3), 315–323. <https://doi.org/10.1002/ps.640>
- Tudi, M., Ruan, H. D., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., & Chu, C. (2021). Tudi2021.Pdf. *Environmental Research and Public Health*, 18(1112), 1–23.
- Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*, 29(6), 468–480. <https://doi.org/10.1002/cbf.1774>
- Vinha, G. L., Plata-rueda, A., Soares, M. A., Zanuncio, C., Serr, E., & Carlos, L. (2021). Feeding , and Histological Changes in the Midgut of *Spodoptera frugiperda* Caterpillars. *Insects*, 12, 483.
- Yucel, M. S., & Kayis, T. (2019). Imidacloprid induced alterations in oxidative stress, biochemical, genotoxic, and immunotoxic biomarkers in non-mammalian model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 54(1), 27–34. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1530545>
- Zanuncio, J., Alves, J. B., Zanuncio, T. V., & Garcia, J. F. (1994). Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *Forest Ecology and Management*, 65(1), 65–73. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(94\)90258-5](https://doi.org/10.1016/0378-1127(94)90258-5)
- Zanuncio, J. C., Mourão, S. A., Martínez, L. C., Wilcken, C. F., Ramalho, F. S., Plata-Rueda, A., Soares, M. A., & Serrão, J. E. (2016). Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Scientific Reports*, 6(September 2015), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep30261>
- Zoh, M. G., Gaude, T., Prud'homme, S. M., Riaz, M. A., David, J. P., & Reynaud, S. (2021). Molecular bases of P450-mediated resistance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the mosquito *A. aegypti*. *Aquatic Toxicology*, 236(February). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105860>
- Zou, C. S., Cao, C. W., Zhang, G. C., Wang, Z. Y., & Zhu, Y. C. (2014). Purification, characterization, and sensitivity to pesticides of carboxylesterase from *Dendrolimus*

superans (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Journal of Insect Science*, 14(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu122>

Zülfikaroğlu, T., Turgay-İzzetoğlu, G., Yikilmaz, M. S., & İzzetoğlu, S. (2022). Demonstrating the general structure and cell types of the fat body in *Blatta orientalis* (Oriental Cockroach). *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 51(1), 23–35. <https://doi.org/10.1111/ahe.12748>

CONCLUSÕES GERAIS

A abamectina é tóxica para *A. gemmatalis* promovendo inibição alimentar, mudanças histológicas e ultraestruturais no intestino médio levando à apoptose, sendo assim, uma promissora alternativa de inseticida contra essa praga. A flupiradifurona é tóxica nas concentrações letais, induz inibição alimentar, alterações histológicas e ultraestruturais no intestino médio da lagarta, reforçando seu potencial controlador dessa praga. A flupiradifurona promoveu alterações no intestino de seu predador natural *P. nigrispinus* evidenciando sinais de autofagia. As gotas lipídicas e o teor de polissacarídeos sofreram alterações no corpo gorduroso dos percevejos, evidenciando os efeitos em organismos não-alvos através da exposição indireta. Os efeitos indicam baixa seletividade desse inseticida ressaltando a importância de mais estudos sobre seus efeitos em insetos não-alvos.