

HÍGOR DE SOUZA RODRIGUES

**CLORETO DE SÓDIO: ADJUVANTE INSETICIDA OU INDUTOR DE  
CRESCIMENTO POPULACIONAL EM *Euschistus heros*?**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R696c  
2017  
Rodrigues, Hígor de Souza, 1993-  
Cloreto de Sódio : adjuvante inseticida ou indutor de  
crescimento populacional em *Euschistus heros*? / Hígor de Souza  
Rodrigues. – Viçosa, MG, 2017.  
viii, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Percevejo (Inseto). 2. *Euschistus heros*. 3. Inseticidas -  
Sal. 4. *Pentatomidae*. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Entomologia. Programa de Pós-graduação em  
Entomologia. II. Título.

CDD 22 ed. 595.754

HÍGOR DE SOUZA RODRIGUES

**CLORETO DE SÓDIO: ADJUVANTE INSETICIDA OU INDUTOR DE  
CRESCIMENTO POPULACIONAL EM *Euschistus heros*?**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2017

---

Edson Hirose

---

Flávio Gonçalves de Jesus

---

Khalid Haddi  
(Coorientador)

---

Eugênio Eduardo de Oliveira  
(Orientador)

# Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por guiar minha caminhada.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais Ledinéa de Souza Rodrigues e João Baptista Rodrigues de Lima por todo amor e educação que sempre me deram. Sempre terei vocês comigo.

Agradeço ao Departamento de Entomologia e à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de cursar meu mestrado e realizar este trabalho.

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

Agradeço ao Professor e Orientador Eugênio Eduardo de Oliveira pelos ensinamentos em fisiologia e toxicologia, confiança, dedicação, amizade, extrema competência e rigor nas orientações deste trabalho.

Agradeço ao Professor Raul Narciso C. Guedes pelo empréstimo de equipamentos e inseticidas do Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia.

Agradeço ao meu coorientador Khalid Haddi pela ajuda no planejamento dos bioensaios, execução das análises estatísticas, elaboração das figuras, apoio técnico e amizade.

Agradeço à equipe do Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados pelo apoio técnico, amizade e os momentos compartilhados no laboratório. Ao estagiário Mateus Campos (vulgo pão com salame) pela ajuda em todos os experimentos que compõem este trabalho e a amizade durante esses anos. Aos estagiários Hemerson Lourenço, Felipe Aiura, Sarah Miranda, Carolyne Espósito, Guilherme Malverde, Maria Victória Costa e João Vitor Fernandes pela ajuda na realização dos experimentos e na criação dos insetos.

Agradeço ao meu brother Wilson Rodrigues Valbon pela amizade ao longo desses longos anos e também pela ajuda com este nobre editor de texto chamado LyX.

Agradeço à equipe do Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia pelo apoio técnico e amizade.

Agradeço ao Dr. Edson Hirose (EMBRAPA Soja) pela recepção e apoio durante o período que estive em Goiânia para execução de experimentos durante o mestrado.

Agradeço aos meus grandes amigos Wilson R. Valbon e Vitor Zuim, pelos momentos de diversão, conversas e apoio.

Agradeço aos meus amigos de república Wilson R. Valbon, Wagner Barbosa e Fábio Pinto pelos momentos de diversão, conversas e principalmente por fazer de Viçosa um lar apesar das dificuldades.

Ao amigo Eder Henrique e família por todo cuidado e amizade durante o período que estive em Goiânia.

Muito obrigado por tudo!

# Resumo

RODRIGUES, Hígor de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro, 2017. **Cloreto de Sódio: adjuvante inseticida ou indutor de crescimento populacional em *Euschistus heros*?** Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira. Coorientador: Khalid Haddi.

A soja é uma das culturas representativas do agronegócio brasileiro. No entanto, durante o ciclo de desenvolvimento da cultura, vários fatores atuam como redutores de produtividade. Dentre estes fatores de redução de produtividade, o ataque de insetos-praga, com destaque para o percevejo-marrom da soja *Euschistus heros*, tem sido associados a elevadas perdas. Por estas razões, ferramentas de manejo se tornam necessárias para minimizar as perdas provocadas por *E. heros* e o uso adequado de inseticidas continua sendo a alternativa mais viável para este fim. Grupos de inseticidas de descobertas mais recentes (e.g, os neonicotinoides tendo imidaclopride como o exemplo mais evidente) têm sido muito usados atualmente visto sua eficiência e, principalmente, em decorrência da necessidade de substituição de classes de inseticidas mais antigas (i.e., organofosforados, carbamatos e organoclorados). Apesar da sua eficácia, estas novas moléculas quando em concentrações subletais podem propiciar modificações bioecológicas e alterações no padrão reprodutivo, na longevidade e no crescimento populacional de insetos. Adicionalmente ao uso de novas moléculas, muitos agricultores têm lançado mão do uso de adjuvantes inseticidas (e.g., cloreto de Sódio - NaCl) para potencializar a ação dos inseticidas. Entretanto, os efeitos decorrentes da adição destes adjuvantes ainda requerem maiores investigações. Em vista disso, esta dissertação foi conduzida com objetivo de avaliar os efeitos subletais de imidaclopride associado ao NaCl em adultos de *E. heros* bem como averiguar o impacto destas soluções inseticidas no comportamento reprodutivo desta espécie. Além destes fatores, a condução das investigações presentes nesta dissertação possibilitou estudar o impacto desta ferramenta (i.e., imidaclopride + NaCl) no comportamento reprodutivo e na dinâmica populacional de *E. heros*. Num primeiro momento, grupos de adultos de *E. heros* foram submetidos a concentrações subletais de imidaclopride (0,042; 0,126; 0,42 ou 1,26  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ , equivalente a respectivamente 1, 3, 10 e 30% da dose recomendada para utilização no campo, que é 4,2  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ ) com associação ou não a NaCl (0,5 % p/v). Com base nos nossos resultados, quando concentrações subletais desta calda inseticida contendo NaCl atingem adultos no início da vida, apesar do incremento observado na mortalidade, os sobreviventes a esta exposição são capazes de incrementar seu fitness reprodutivo, deixando maior número de ovos e ninfas ao longo da vida. Nesta dissertação, também se avaliou os efeitos da exposição subletal ninfal (i.e. 5º ínstar) ao imidaclopride mais NaCl na dinâmica populacional da praga. Nossos resultados demonstram que quando há exposição ninfal, as concentrações subletais de imidaclopride com ou sem associação de NaCl reduzem o potencial reprodutivo e a estimativa de crescimento populacional da espécie. Portanto, com base nos resultados, a aplicação de imidaclopride + NaCl é mais efetivo para o manejo de ninfas de 5º ínstar

do que para adultos de *E. heros*, visto que se bem conduzida, a aplicação destas caldas aumentam a toxicidade do inseticida além de reduzir crescimento populacional dos adultos que eventualmente sobrevivam a esta exposição na fase ninfal. Uma explicação potencial para estes resultados, porém ainda carente de maiores comprovações, seria eventuais desequilíbrios hormonais em ninfas com efeitos irreparáveis para a fase adulta.

# Abstract

RODRIGUES, Hígor de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Sodium Chloride: insecticidal adjuvant or inducer of population growth in *Euschistus heros*?** Advisor: Eugênio Eduardo de Oliveira. Co-advisor: Khalid Haddi.

Soybean is one of the most representative crops of Brazilian agribusiness. However, during the crop development cycle, several factors act as productivity reducers. In these productivity reduction factors, the insect-pest attack, with emphasis on the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*, has been associated with high losses. For these reasons, management tools have become necessary to minimize the losses caused by *E. heros* and the proper use of insecticides, and it remains a more viable alternative for this purpose. More recently discovered insecticide groups (eg, neonicotinoids tending imidacloprid as the most obvious example) have been widely used for their high efficiency and especially for the need to replace classes of insecticides and old ones (i.e. organophosphates, carbamates and endosulfan). Despite their effectiveness, these new molecules when in sublethal concentrations can provide bioecological modifications and changes on reproductive pattern, longevity and population growth of insects. In addition to the use of new molecules, many farmers have used the use of insecticidal adjuvants (e. g. sodium chloride - NaCl) to potentiate an action of insecticides. However, the results of adding these adjuvants also require further investigation. In view of this, this dissertation was conducted with the objective of evaluating the effects of NaCl associated imidacloprid in adults of *E. heros* as well as to investigate the impact of insecticidal solutions on the reproductive behavior of this species. In addition to the factors, the conduction this dissertation made possible of studying the impact of this tool (i. e. imidacloprid + NaCl) on a reproductive behavior and population dynamics of *E. heros*. At first, groups of adults of *E. heros* were submitted to sublethal concentrations of imidacloprid (0.042, 0.126, 0.42 or 1.26  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ , equivalent respectively to 1, 3, 10 and 30% of the recommended dose for use in the field, which is 4.2  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ ) with or without NaCl (0.5% w/v). Based on our results, when sublethal concentrations of this insecticidal liquid containing NaCl reach roots in early life, despite the observed increase in mortality, survivors of this exposure are able to increase their reproductive fitness, leaving more eggs and nymphs throughout the life. In this dissertation, the effects of the sublethal ninfal exposure (i.e., 5<sup>th</sup> instar) on imidacloprid plus NaCl in the population dynamics of the pest were also evaluated. Our results demonstrate that when there is nymphal exposure, the sublethal concentrations of imidacloprid with or without NaCl association reduce the reproductive potential and the population growth estimate of the species. Therefore, based on our results, the application of imidacloprid + NaCl is more effective for the management of nymphs of 5<sup>th</sup> instar than for adults of *E. heros*, since if well conducted, the application of these sprays increases the toxicity of the insecticide beyond of reducing the population growth of adults who eventually survive this exposure in the nymphal phase. A possible

explanation for these results, although more lacking of more proofs, would be possible hormonal imbalances in nymphs with irreparable effects for an adult phase.

# Sumário

<b>Introdução geral</b>	<b>1</b>
Referências . . . . .	2
<b>Toxicidade e mudanças no padrão sexual e reprodutivo promovido por imidaclopride associado a NaCl em <i>Euschistus heros</i></b>	<b>5</b>
1.1 Introdução . . . . .	8
1.2 Material e Métodos . . . . .	9
1.2.1 Coleta e criação dos insetos . . . . .	9
1.2.2 Bioensaio de concentração-mortalidade . . . . .	10
1.2.3 Exposição a doses subletais de imidaclopride . . . . .	10
1.2.4 Bioensaio de comportamento sexual . . . . .	11
1.2.5 Bioensaio de reprodução . . . . .	11
1.2.6 Análise estatística . . . . .	11
1.3 Resultados . . . . .	12
1.3.1 Bioensaio de concentração-mortalidade . . . . .	12
1.3.2 Bioensaio de comportamento sexual . . . . .	13
1.3.3 Bioensaio de reprodução . . . . .	15
1.4 Discussão . . . . .	21
1.5 Agradecimentos . . . . .	22
1.6 Referências . . . . .	23
<b>Crescimento populacional de <i>Euschistus heros</i> quando ninfas são subletalmente expostas a imidaclopride e NaCl</b>	<b>26</b>
2.1 Introdução . . . . .	29
2.2 Material e Métodos . . . . .	30
2.2.1 Coleta e criação dos insetos . . . . .	30
2.2.2 Exposição a doses subletais de imidaclopride . . . . .	30
2.2.3 Bioensaio de comportamento sexual . . . . .	31
2.2.4 Bioensaio de reprodução . . . . .	31
2.2.5 Bioensaio de matriz estruturada na idade . . . . .	31
2.2.6 Análise estatística . . . . .	32
2.3 Resultados . . . . .	32
2.3.1 Bioensaio de comportamento sexual . . . . .	32
2.3.2 Bioensaio de reprodução . . . . .	34
2.3.3 Bioensaio de matriz estruturada na idade . . . . .	39

## *Sumário*

2.4	Discussão . . . . .	40
2.5	Agradecimentos . . . . .	42
2.6	Referências . . . . .	42
	<b>Considerações finais</b>	<b>46</b>

# Introdução geral

A cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merrill, representa 22,64% das exportações de produtos agropecuários brasileiros (Brasil, 2017), o que a torna uma importante *commodity*. No entanto, seu desenvolvimento pode ser afetado por ataque de insetos-praga, dentre os quais se destacam o complexo de pentatomídeos. O percevejo-marrom da soja, *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Heteroptera: Pentatomidae), é o percevejo mais prevalentes e o maior causador de dano na cultura da soja nos últimos anos (Silva et al. 2011; Bueno et al. 2012, 2015; Sosa-Gomez et al. 2014; Tuelher et al. 2016). Por estas razões, há a necessidade de melhorar o manejo desta praga e o uso adequado de inseticidas ainda se constitui como o mais eficaz para o controle destas pragas (Ghimire and Woodward 2013; Guedes 2017). Todavia, o uso indiscriminado de inseticidas levam à perdas substanciais como o comprometimento de organismos não-alvo, seleção de populações resistentes e a ocorrência de potenciais surtos de pragas secundárias (Sosa-Gomez et al. 2001; Sosa-Gomez e Silva 2010; Guedes e Cutler 2014; Bueno et al. 2015; Haddi et al. 2016; Santos et al. 2016, Tuelher et al. 2017).

Nos últimos anos, neonicotinoides como imidaclopride tornaram-se os inseticidas mais usados no mundo e também para controlar *E. heros* no Brasil (Sosa-Gomez et al. 2009; Simon-Delso et al. 2015), principalmente devido a necessidade de substituição de classes inseticidas como organofosforados, carbamatos e organoclorados bem como devido a sua alta eficácia frente a diversas espécies de pragas agrícolas (Jeschke et al. 2013). Além do impacto letal que esses compostos propiciam a populações de diversas espécies, os efeitos subletais oriundos da exposição à essas moléculas podem desencadear diversas modificações bioecológicas como alteração na longevidade, fecundidade e fertilidade (Haynes 1988; Teodoro et al. 2005; Haddi et al. 2016; Santos et al. 2016; Tuelher et al. 2017). Embora algumas espécies reduzam sua taxa de reprodução e sobrevivência mediadas por exposição subletal a imidaclopride (Bao et al. 2009; Tan et al. 2012), alguns estudos são

contraditórios e associam ganhos reprodutivos advindos dessa exposição (Yu et al. 2010; Szczepaniec e Raupp 2013; Santos et al. 2016; Haddi et al. 2016; Tuelher et al. 2017).

Aliado a isso, a utilização de cloreto de sódio (NaCl, 0,5% p/v) misturado a caldas contendo inseticidas fosforados propicia a redução de 50% da dose inseticida a ser utilizada sem que haja perda da eficiência de controle (Corso 1990; Corso and Gazzoni 1998; Bueno et al. 2012). Entretanto, pouco se sabe das bases fisiológicas desse efeito sinérgico o que requer maiores investigações. A par dessas informações, a presente dissertação foi conduzida com os seguintes objetivos: (I) avaliar a toxicidade de imidaclopride associado ou não a NaCl em adultos de *E. heros*; (II) averiguar os potenciais distúrbios reprodutivos oriundos da exposição subletal dessa solução em adultos e o (III) impacto desta exposição subletal quando a mesma acontece em ninfas de 5º ínstar, avaliando principalmente o crescimento populacional dos adultos que sobreviveram a exposição subletal na fase ninfal.

## Referências

Bao, H., Liu, S., Gu, J., Wang, X., Liang, X., Liu, Z. (2009) Sublethal effects of four insecticides on the reproduction and wing formation of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science* 65, 170 – 174.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estatísticas de comércio exterior do agronegócio brasileiro. 2017. Disponível em: <agrostat.agricultura.gov.br/>. Acesso: em 15 mar. 2017.

Bueno, A. F., Bortolotto, O. C., Pomari-Fernandes, A., Franca-Neto, J. B. (2015) Assessment of a more conservative stink bug economic threshold for managing stink bugs in Brazilian soybean production. *Crop Protection* 71, 132 – 137.

Bueno, A. F. et al. In: *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*; Hoffmann-Campo, C. B., Corrêa-Ferreira, B. S., and Moscardi, F., Eds.; Brasília - DF: Embrapa, 2012.

Corso, I. C. (1990) Uso de sal de cozinha na redução da dose de inseticida para controle de percevejos da soja. (EMBRAPA-CNPQ. Comunicado Técnico, 45), 7p.

Corso, I., Gazzoni, D. (1998) Sodium chloride: an insecticide enhancer for controlling pentatomids on soybeans. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33, 1563 – 1571.

Ghimire, N., Woodward, R. T. (2013) Under- and over-use of pesticides: An international analysis. *Ecological Economics* 89, 73 – 81.

Guedes, R. N. C. (2017) Insecticide resistance, control failure likelihood and the First Law of Geography. *Pest Management Science* 73, 479 – 484.

Guedes, R. N. C., Cutler, G. C. (2014) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Management Science* 70, 690 – 697.

Guedes, R. N. C., Smagghe, G., Stark, J., Desneux, N. (2016) Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annual Review of Entomology* 61, 43–62.

Haddi, K., Mendes, M. V., Barcellos, M. S., Lino-Neto, J., Freitas, H. L., Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E. (2016) Sexual Success after Stress? Imidacloprid-Induced Hormesis in Males of the Neotropical Stink Bug *Euschistus heros*. *PLoS ONE* 11, 1–18.

Haynes, K. F. (1988) Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual Review of Entomology* 33, 149 – 168.

Jeschke, P., Nauen, R., Beck, M. E. (2013) Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 9464 – 9485.

Santos, M. F., Santos, R. L., Tomé, H. V. V., Barbosa, W. F., Martins, G. F., Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E. (2016) Imidacloprid-mediated effects on survival and fertility of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Journal of Pest Science* 89, 231 – 240.

Santos, M. F., Campos, M. R., Bravim, J. N., Oliveira, E. E., and Guedes, R. N. C. (2016) Non-targeted insecticidal stress on the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Crop Protection* 82, 10 – 16.

Silva, F., Calizotti, G., Panizzi, A. R. (2011) Survivorship and Egg Production of Phytophagous Pentatomids in Laboratory Rearing. *Neotropical Entomology* 40, 35 – 38.

Simon-Delso, N. et al. (2015) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 5 – 34.

Sosa-Gomez, D. R., Corrêa-Ferreira, B. S., Hoffmann-Campo, C. B., Corso, I. C., Oliveira, L. J., Moscardi, F., Panizzi, A. R., Bueno, A. F., Hirose, E., Roggia, S. *Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja*, Embrapa Soja, 2014. Sosa-Gomez, D. R., Corso, I., Morales, L. (2001) Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and metamidophos in the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). *Neotropical Entomology* 30, 317 – 320.

Sosa-Gomez, D. R., Silva, J. J. (2010) Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Parana, Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 45, 767 – 769.

Sosa-Gomez, D. R., Silva, J. J., Lopes, I. D. O. N., Corso, I. C., Almeida, A. M., Moraes, G. C. P., Baur, M. E. (2009) Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology* 102, 1209 – 1216.

Szczepaniec, A., Raupp, M. J. (2013) Direct and indirect effects of imidacloprid on fecundity and abundance of *Eurytetranychus buxi* (Acari: Tetranychidae) on boxwoods. *Experimental and Applied Acarology* 59, 307 – 318.

Tan, Y., Biondi, A., Desneux, N., Gao, X. W. (2012) Assessment of physiological sublethal effects of imidacloprid on the mirid bug *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Ecotoxicology* 21, 1989 – 1997.

Tuelher, E. S., Silva, E. H., Hirose, E., Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E. (2016) Competition between the phytophagous stink bugs *Euschistus heros* and *Piezodorus guildinii* in soybeans. *Pest Management Science* 72, 1837 - 1843.

Tuelher, E. S., Silva, E. H., Freitas, H. L., Namorato, F. A., Serrão, J. E., Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E. (2017) Chlorantraniliprole-mediated toxicity and changes in sexual fitness of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Journal of Pest Science*. doi 10.1007/s10340-016-0777-0.

Teodoro, A. V., Fadini, M. A., Lemos, W. P., Guedes, R. N. C., Pallini, A. (2005) Lethal and sub-lethal selectivity of fenbutatin oxide and sulfur to the predator *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae) and its prey, *Oligonychus ilicis* (Acari: Tetranychidae), in Brazilian coffee plantations. *Experimental & Applied Acarology* 36, 61 – 70.

Yu, Y., Shen, G., Zhu, H., Lu, Y. (2010) Imidacloprid-induced hormesis on the fecundity and juvenile hormone levels of the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, 238 – 242.

**Toxicidade e mudanças no padrão sexual e reprodutivo promovido por imidaclopride associado a NaCl em *Euschistus heros***

## Toxicidade e mudanças no padrão sexual e reprodutivo promovido por imidaclopride associado a NaCl em *Euschistus heros*

### Resumo

A crescente utilização de inseticidas é indispensável para assegurar a produção agrícola em todo o mundo. Neonicotinoides, com destaque para o imidaclopride, tem sido uma das principais moléculas utilizadas para controle de *Euschistus heros* nos campos de produção de soja. Este inseticida pode promover mortalidade ou resultar na alteração comportamental de organismos-alvo, principalmente quando encontram-se em dosagens subletais. Em adição, Cloreto de Sódio é utilizado como adjuvante na calda inseticida por muitos agricultores, mas seus efeitos letais e, principalmente, subletais não tem sido devidamente investigados. Por estas razões, a toxicidade e os potenciais distúrbios reprodutivos causados por dosagens subletais de imidaclopride associado a cloreto de sódio (NaCl) em *E. heros* foram alvos dessa investigação. Cloreto de Sódio (0,5% p/v) em associação a imidaclopride foi capaz de incrementar a toxicidade a *E. heros* em todas as dosagens subletais testadas. A concentração de 0,126  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  de imidaclopride (equivalente 3% da dose recomendada para utilização no campo, que é 4,2  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ ) influenciou negativamente o comportamento sexual de *E. heros* (tempo total de cópula, tempo médio de cópula e latência). Quando associado a NaCl, essa concentração foi capaz de reduzir o tempo médio de cópula dos casais tratados, todavia o número de vezes que esses casais copularam foi maior. Ainda em associação com NaCl, essa concentração inseticida foi capaz de reduzir a oviposição e a porcentagem de eclosão média diária de fêmeas de *E. heros*; apesar disso, o número de ovos e ninfas deixados ao longo da vida das fêmeas foi superior nas caldas que continham NaCl. Isso ocorre porque a ação atrativa em pequenas concentrações desse fagoarrestante pode fazer com que haja mais contato e/ou ingestão da molécula inseticida, podendo resultar no acréscimo de mortalidade. Além disso, NaCl em concentrações subletais de calda inseticida com imidaclopride pode potencializar a frequência de cópula em machos e influenciar no desenvolvimento ovariano nas fêmeas. Esses resultados sugerem uma hipótese para explicar o crescimento popu-

lacional de *E. heros* em campos de produção de soja e fornecem uma ferramenta para auxiliar o MIP (Manejo Integrado de Pragas) desta espécie na cultura.

**Palavras-chave:** Cloreto de Sódio, Inseticida, Pentatomidae

## Abstract

The increasing use of insecticides is indispensable for the increase in agricultural production worldwide. Neonicotinoids, especially imidacloprid, has been the main molecule used to control *Euschistus heros* in the soybean production fields. This insecticide can promote mortality or result in the behavioral change of target organisms, especially when they are in sublethal dosages. In addition, NaCl is used as an adjuvant in insecticidal sprays by many farmers, but its lethal and mainly sublethal effects have not been properly investigated. For these reasons, toxicity and potential reproductive disturbances caused by sublethal dosages of imidacloprid associated with sodium chloride (NaCl) in *E. heros* were the targets of this investigation. Sodium Chloride (0.5% w/v) in combination with imidacloprid was able to increase toxicity to *E. heros* at all sublethal dosages tested. The concentration of 0.126  $\mu\text{g a.i./cm}^2$  of imidacloprid (equivalent to 3% of the recommended dose for field use, which is 4.2  $\mu\text{g a.i./cm}^2$ ) negatively influenced the sexual behavior of *E. heros* (total copulation time, mean copulation and latency). When associated with NaCl, this concentration was able to reduce the average copulation time of the treated couples, however the number of times these couples copulated was greater. Also in association with NaCl, this insecticide concentration was able to reduce oviposition and the percentage of daily hatching of *E. heros* females; despite this, the number of eggs and nymphs left over the life of the females was higher in the NaCl containing sprays. This is because the attractive action in small concentrations of this phagemid may cause more contact and/or ingestion of the insecticidal molecule, which may result in an increase in mortality. In addition, NaCl in sublethal concentrations of insecticidal spray with imidacloprid may potentiate the frequency of mating in males and influence ovarian development in females. These results suggest a hypothesis to explain the population growth of *E. heros* in soybean production fields and provide a tool to assist the MIP (Integrated Pest Management) of this species in the crop.

**Key words:** Sodium Chloride, Insecticide, Pentatomidae

## 1.1 Introdução

A busca pelo aumento na produção de alimentos e de outros produtos agrícolas nos mais diversos setores faz com que haja um incremento na utilização de agroquímicos em todo o mundo, sendo o Brasil o principal consumidor desses insumos (Ghimire and Woodward 2013; Macfadyen et al. 2014). Dessa forma, o uso deliberado de inseticidas com o objetivo de reduzir populações de insetos-praga é indispensável. Todavia, quando utilizados indiscriminadamente, podem resultar em perdas irreparáveis para saúde humana e também para o agroecossistema como perda da biodiversidade, seleção de populações resistentes e surtos populacionais (Ghimire e Woodward 2013; Szczepaniec and Raupp 2013; Macfadyen et al. 2014; Guedes et al. 2016).

Neonicotinoides têm sido o grupo inseticida mais utilizado ao longo dos últimos anos principalmente devido a sua maior segurança de aplicação e ao banimento de classes inseticidas mais antigas (organofosforados, carbamatos, organoclorados) (Jeschke et al. 2013). No Brasil, essa molécula tornou-se a mais comum para controlar o percevejo *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) (Sosa-Gomez et al. 2009; Sosa-Gomez e Silva 2010), que atualmente é o percevejo-praga predominante nos campos de soja (Saluso et al. 2011; Panizzi et al. 2012). Entretanto, uma vez que essas moléculas são pulverizadas no ambiente, seus efeitos em pragas alvo podem conduzir a mortalidade direta prejudicando a funcionalidade de diferentes subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Oliveira et al. 2011; Jeschke et al. 2013; Casida and Durkin 2013) ou resultar em efeitos subletais que potencialmente podem interferir com a longevidade ou alterar comportamentos chave (por exemplo, alimentação, reprodução e locomoção) (Bao et al. 2009; Tan et al. 2012; Haddi et al. 2016; Santos et al. 2016; Zeng et al. 2016).

Nos campos brasileiros de produção de soja, há a prática rotineira de adicionar Cloreto de Sódio (NaCl) na calda inseticida. NaCl é um fagoarrestante a diversos grupos de insetos, incluindo insetos-praga e polinizadores, tem preferência por essa substância (Corso e Gazzoni 1998; Bonoan et al. 2016). Em associação com inseticidas, NaCl tem

comprovada eficácia na mortalidade de pentatomídeos-praga por potencializar a ação destes compostos (Corso 1990; Corso e Gazzoni 1998). Todavia, o impacto de caldas inseticidas que possuem NaCl tem sido negligenciados em organismos alvo como *E. heros*, principalmente quando refere-se a dosagens subletais desses compostos.

Insetos no início da idade adulta podem estar sujeitos a exposição de dosagens subletais de caldas inseticidas nos campos de produção que pode vir a afetar sua dispersão, sobrevivência e reprodução por toda a vida adulta. Aumento da longevidade, resistência a estresse biótico e abiótico e impactos no comportamento reprodutivo são alguns dos distúrbios que podem ser causados em insetos que sofrem algum estresse no início da vida adulta (Burger e Promislow 2004; Noguera et al. 2011; López-Martínez e Hahn 2012).

Dessa forma, os objetivos dessa investigação foram avaliar a toxicidade de imidaclopride associado ou não a NaCl em adultos de *E. heros* e averiguar os potenciais distúrbios reprodutivos provocados pela exposição subletal à estas soluções inseticidas.

## 1.2 Material e Métodos

### 1.2.1 Coleta e criação dos insetos

A colônia de *E. heros* estabelecida em laboratório foi proveniente de indivíduos obtidos de uma colônia já existente mantida na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF, Brasil). Indivíduos coletados em cultivos de soja no município de Tangará da Serra (Mato Grosso, Brasil) e de cultivos de soja de campos experimentais da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil) foram periodicamente introduzidos a colônia a fim de aumentar a variabilidade genética dos insetos utilizados no bioensaio. A colônia foi criada seguindo métodos previamente descritos (Borges et al. 2006; Silva et al. 2011) e mantida sob condições controladas ( $27 \pm 2$  °C,  $60 \pm 20\%$  de umidade relativa e fotoperíodo de 14 h).

### 1.2.2 Bioensaio de concentração-mortalidade

Os bioensaios de concentração-mortalidade seguiram métodos que foram adaptados a partir de estudos toxicológicos de *E. heros* em laboratório (Willrich et al. 2003, Snodgrass et al. 2005). Foi utilizado uma formulação comercial do inseticida neonicotinoide imidaclopride (grânulos dispersíveis em água a 700 g de ingrediente ativo (i.a.)/L; Bayer CropScience, São Paulo, Brasil) veiculado em água (destilada e deionizada) para revestir as paredes internas de frascos de vidro transparente de 250 mL. Foi adicionada uma alíquota de 2 mL em cada frasco de vidro e posteriormente foram colocados para secar em rotor.

Foram utilizadas quatro concentrações (0,042; 0,126; 0,42 e 1,26  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ , equivalente a respectivamente 1, 3, 10 e 30% da dose recomendada para utilização no campo, que é 4,2  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ ) com adição ou não de NaCl para avaliar a mortalidade de adultos recém-emergidos (< 24 h). No controle, os insetos foram expostos a água destilada e deionizada com adição ou não de NaCl. Dez repetições, cada uma com dez adultos recém-emergidos, foram utilizadas em cada concentração. A parte interna do topo de cada frasco foi revestida com Teflon PTFE (DuPont, Wilmington, DE, EUA) e fechado com um pedaço de organza e um elástico para evitar a fuga dos insetos. Insetos foram contados como mortos quando eram incapazes de andar o comprimento do seu corpo quando pinçadas com um pincel de cerda fina após uma exposição de 48 h ao inseticida.

### 1.2.3 Exposição a doses subletais de imidaclopride

Adultos machos e fêmeas recém-emergidos (< 24 h) de *E. heros* foram expostos separadamente durante 48 h ao resíduo seco de imidaclopride nas diferentes concentrações utilizadas no bioensaio de concentração-mortalidade. Após realizado este bioensaio e observado efeito no comportamento de cópula na concentração de 0,126  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ , foi realizado outro bioensaio de exposição subletal à esta concentração de interesse com adição ou não de NaCl, 0,5% p/v ou água destilada e deionizada com adição ou não desse sal na mesma concentração (controle). Após a exposição, fêmeas e machos foram mantidos separados em recipientes de plástico por 10 dias e alimentados *ad libidum* até atingirem a

maturidade sexual (a partir do 13<sup>o</sup> dia no estágio adulto).

#### **1.2.4 Bioensaio de comportamento sexual**

Após a maturação sexual, 20 a 25 casais virgens previamente expostos, como nas condições anteriores, foram destinados ao acasalamento. Todo comportamento foi gravado com auxílio de uma filmadora digital (HDR-XR520V, Sony, Tóquio, Japão) por 13 h. Após esse período, os casais foram separados e mantidos individualmente em placas de Petri. A análise da filmagem possibilitou avaliar o tempo até a primeira cópula, o número de cópulas, a duração média e a duração total de acasalamento para cada casal. O número de casais que não se acasalaram foi sempre inferior a 2% e seus resultados não foram utilizados na análise estatística.

#### **1.2.5 Bioensaio de reprodução**

Após o acasalamento, 20 a 25 casais da concentração de interesse, 0,126  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  com adição ou não de sal de cozinha (NaCl, 0,5% p/v) ou água destilada e deionizada com adição ou não de sal de cozinha na mesma concentração (controle), foram monitorados separadamente até a morte. O número total de ovos depositados e ninfas emergidas foram registrados diariamente até a morte de cada fêmea. Insetos foram contados como mortos quando eram incapazes de andar o comprimento do seu corpo quando pinçadas com um pincel de cerda fina.

#### **1.2.6 Análise estatística**

A mortalidade causada foi submetida a análises de covariância com a solução inseticida (imidaclopride ou imidaclopride com adição de NaCl) como variável independente e a concentração da solução inseticida como covariável. Análises de regressão linear complementar foram realizadas quando necessário (PROC REG, SAS Institute 2008). As premissas de normalidade e homogeneidade de variância foram verificadas e nenhuma

transformação de dados foi necessária (procedimento UNIVARIATE, SAS Institute 2008). Os parâmetros de comportamento de acasalamento foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) ou Kruskal-Wallis *one-way ANOVA on ranks* quando não foram satisfeitas as premissas de normalidade e homogeneidade. Todas as comparações múltiplas por pares, sempre que necessário, foram realizadas aplicando o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) utilizando SigmaPlot 12.5 (Systat Software, San José, CA, EUA). Os dados de fecundidade e fertilidade diária foram submetidos à análise de regressão para detectar tendências diárias que resultaram cada tratamento ao longo do tempo. O modelo de regressão foi escolhido com base na parcimônia, menores erros padrões e acentuados aumentos em  $R^2$  com a complexidade do modelo. Os modelos de regressão para cada tratamento foram considerados diferentes entre si se os limites de confiança de seus parâmetros não se sobrepuseram.

## 1.3 Resultados

### 1.3.1 Bioensaio de concentração-mortalidade

O modelo de análise de covariância para mortalidade causada por imidaclopride demonstrou significância para as fontes de variação bem como sua interação (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Análise de covariância para mortalidade causada por imidaclopride com ou sem sal de cozinha (NaCl) em adultos de *Euschistus heros*. (mostrado na Figura 1.1)

Fontes de variação	gl	F	P
Modelo	3	27,8	<0,0001*
Erro	46	-	-
Sal (S)	1	17,5	0,0001*
Concentração do inseticida (C)	1	61,3	<0,0001*
Interação S x C	1	8,5	0,005*

\*diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Os dados apresentados na Figura 1.1 permitem inferir que de acordo com o aumento da concentração inseticida houve maior porcentagem de mortalidade de *E. heros*. A adição de sal de cozinha à solução inseticida incrementou a mortalidade em todas as concentrações utilizadas (Figura 1.1). Mesmo em baixa concentração ( $0,42 \mu\text{g i.a./cm}^2$ , que corresponde apenas a 10% da dose de campo), a solução inseticida com adição de sal de cozinha causou cerca de 50% de mortalidade, enquanto a solução sem adição de sal

propiciou mortalidade próximo a 25% (Figura 1.1), evidenciando que este saborizante promove substancial efeito sinérgico à solução.

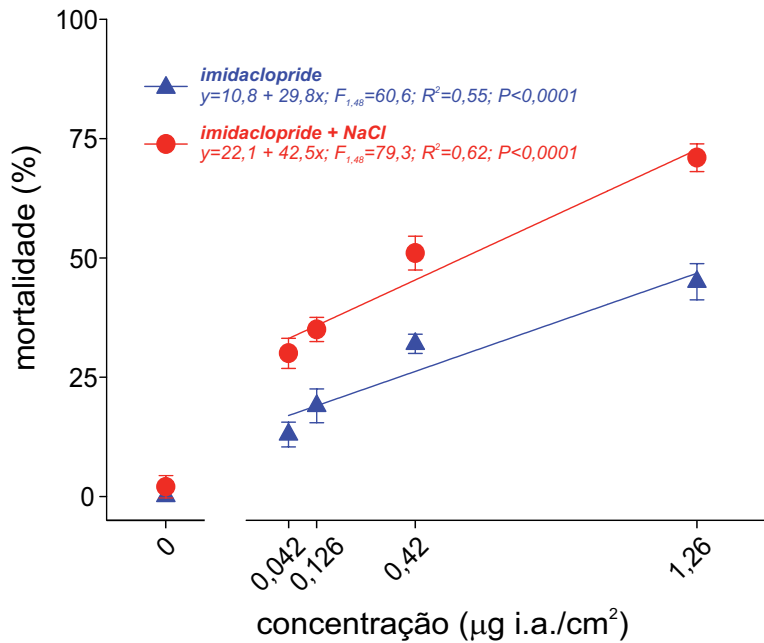


Figura 1.1: Toxicidade do resíduo seco de imidaclopride a adultos de *Euschistus heros*. Os símbolos representam a mortalidade média de 10 repetições e as barras verticais representam o erro padrão médio ( $\pm$  EP).

### 1.3.2 Bioensaio de comportamento sexual

No primeiro bioensaio de comportamento sexual, o impacto nos casais tratados com  $0,126 \mu\text{g i.a./cm}^2$  de imidaclopride foi maior que nas demais concentrações utilizadas (Figura 1.2). Reduções estatisticamente significativas foram encontradas para tempo total de cópula ( $F = 11,37$ ,  $gl = 4$ ,  $P < 0,001$ ) (Figura 1.2A) e tempo médio de cópula ( $F = 5,85$ ,  $gl = 4$ ,  $P < 0,001$ ) (Figura 1.2B) comparado aos demais tratamentos; houve ainda um retardamento do tempo até a primeira cópula comparado ao controle ( $H = 19,22$ ,  $gl = 4$ ,  $P < 0,001$ ) (Figura 1.2C). Para o número de vezes que o casal copulou não foi encontrada diferença estatística significativa (Figura 1.2D).

Munido desse resultado, o segundo bioensaio de comportamento sexual foi realizado para investigar os impactos da concentração de  $0,126 \mu\text{g i.a./cm}^2$  de imidaclopride com associação ou não de NaCl (Figura 1.3). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas para tempo total de cópula (Figura 1.3A) e tempo até a primeira cópula

(Figura 1.3C). Entretanto, para tempo médio de cópula, os casais tratados com solução inseticida que continha NaCl apresentaram um decréscimo significativo para aqueles tratados com soluções que não possuíam essa molécula potencializadora na calda ( $F = 8,50$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0,001$ ) (Figura 1.3B). Além do mais, os casais tratados com as soluções inseticidas que continham NaCl permitiram maior número de cópulas quando comparadas à solução contendo somente inseticida ( $H = 13,75$ ,  $gl = 3$ ,  $P = 0,003$ ) (Figura 1.3D).

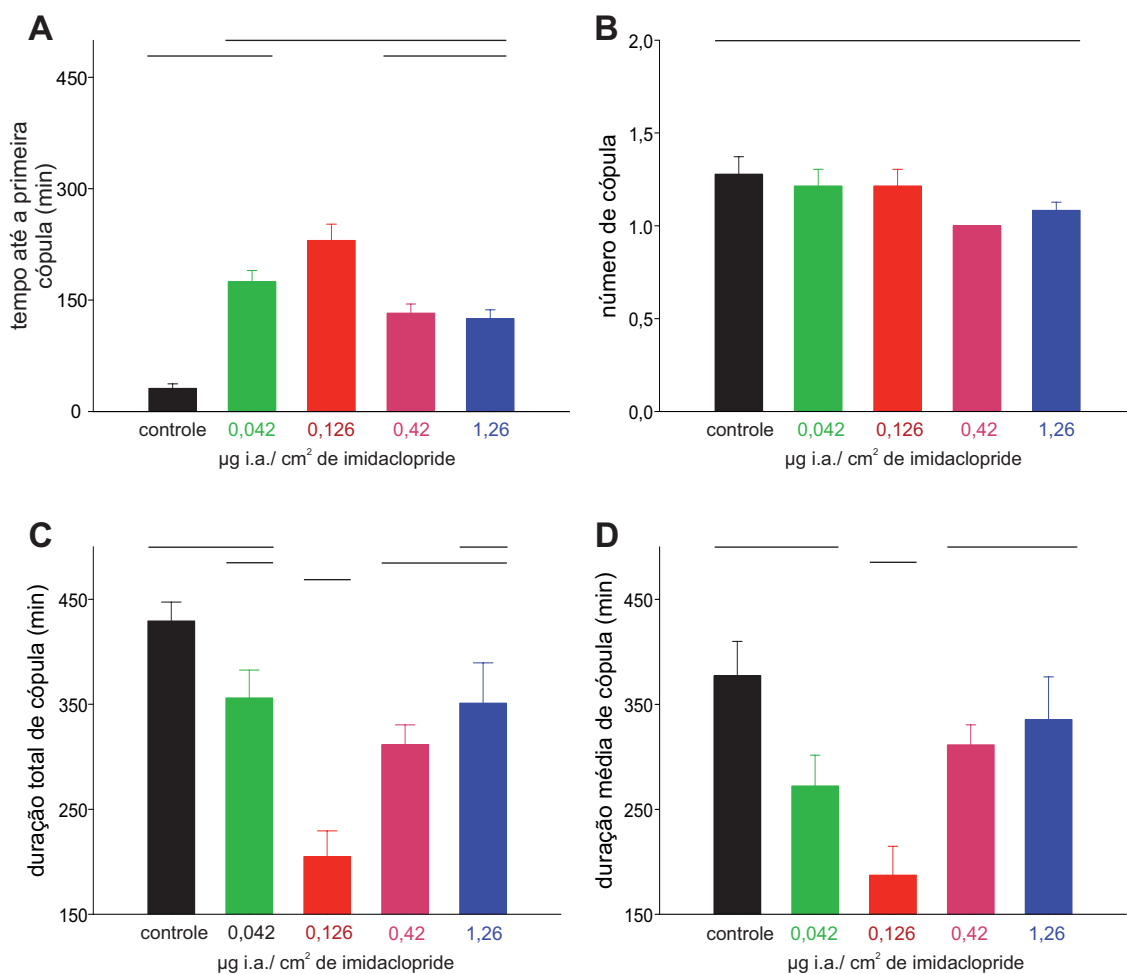


Figura 1.2: Exposição subletal de resíduo seco de imidaclopride ou água destilada em adultos de *Euschistus heros* e efeitos no comportamento de acasalamento. O tempo até a primeira cópula (A), número de cópula (B), duração total de cópula (C) e duração média de cópula (D) foram registrados. Casais de *E. heros* agrupados pela linha horizontal na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

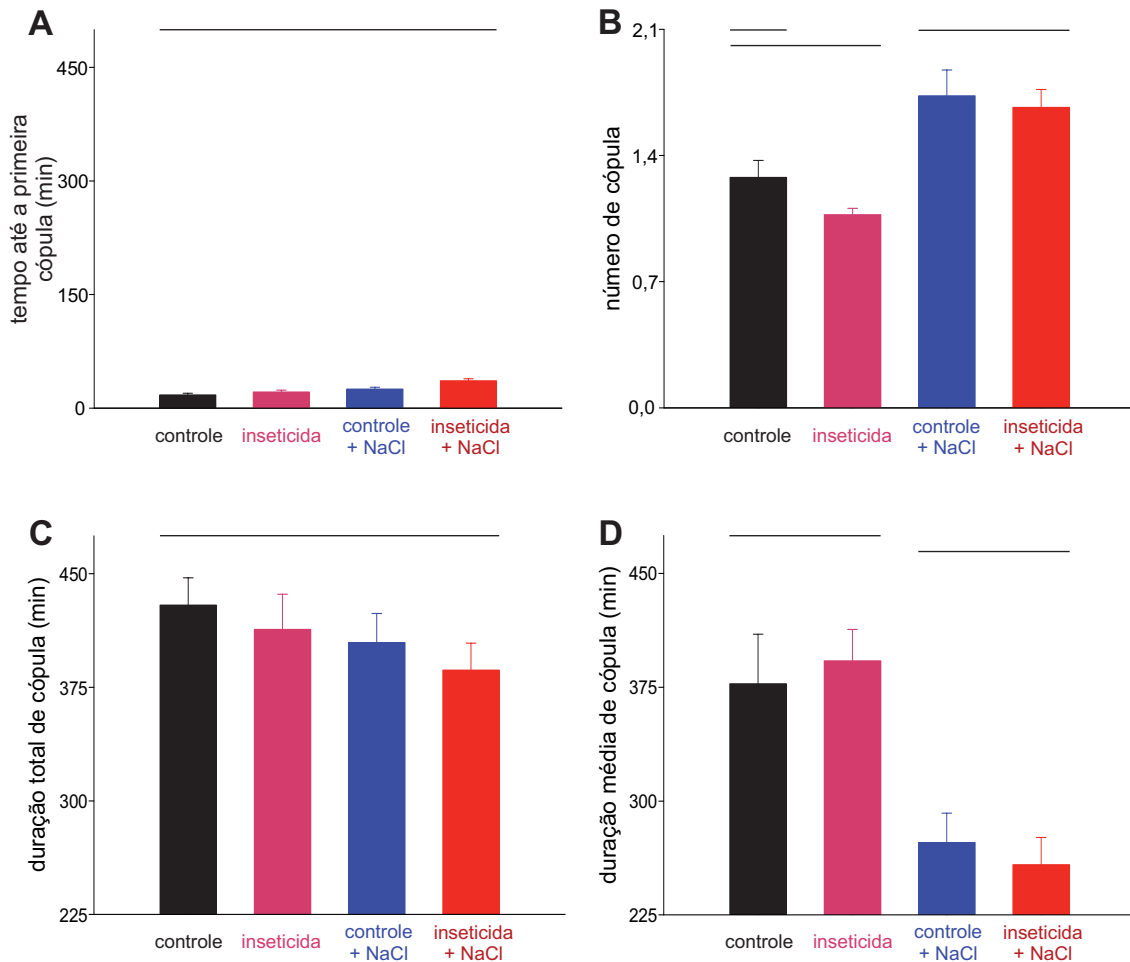


Figura 1.3: Exposição subletal de resíduo seco de imidaclopride ( $0,126 \mu\text{g i.a./cm}^2$ ) ou água destilada associados ou não a NaCl ( $0,05\% \text{ p/v}$ ) em adultos de *Euschistus heros* e efeitos no comportamento de acasalamento. O tempo até a primeira cópula (A), número de cópula (B), duração total de cópula (C) e duração média de cópula (D) foram registrados. Casais de *E. heros* agrupados pela linha horizontal na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 1.3.3 Bioensaio de reprodução

Entre os parâmetros de fecundidade e fertilidade diária, a exposição à concentração de  $0,126 \mu\text{g i.a./cm}^2$  de imidaclopride associado ou não a NaCl aumentou o número diário de ovos colocados por fêmea (Figura 1.4A, Tabela 1.2), porém reduziu o número diário de massa de ovos por fêmea (Figura 1.4B, Tabela 1.2) e o número diário de ninfas emergidas por fêmea (Figura 1.4C, Tabela 1.2). Em todos os parâmetros, casais tratados com soluções inseticidas que continham NaCl foram estatisticamente diferentes do controle (água destilada).

Apesar disso, apenas o NaCl na solução foi capaz de propiciar maior número de ovos

(Figura 1.5A, Tabela 1.3) e maior número de ninfas emergidas (Figura 1.5B, Tabela 1.3) ao longo da vida da fêmea.

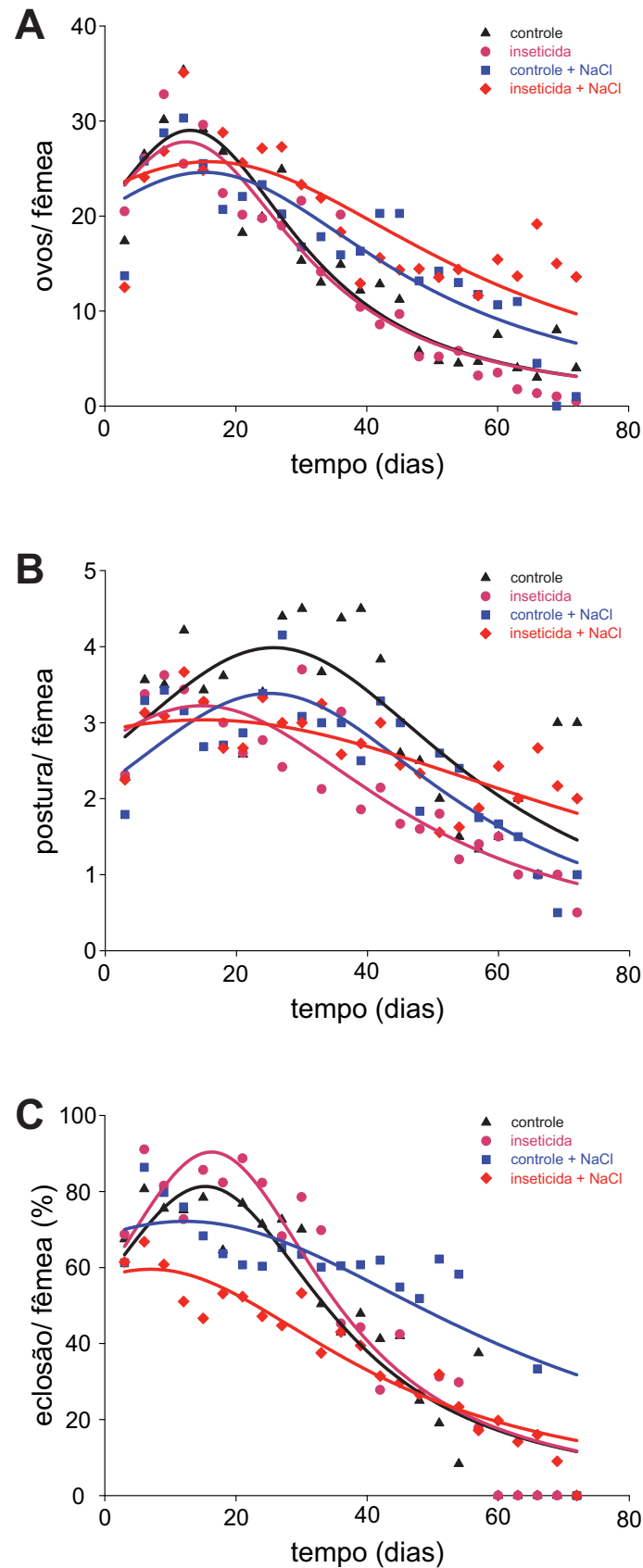


Figura 1.4: Exposição subletal de resíduo seco de imidaclopride ou água destilada associados ou não a NaCl (0,05% p/v) em adultos de *Euschistus heros* e efeitos na fecundidade (A-B) e na fertilidade (C). As linhas representam o ajuste da regressão não linear dos resultados diários de fecundidade e fertilidade. Os símbolos representam médias dos dados observados. Os parâmetros da equação são mostrados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Sumário das análises de regressão não-linear dos parâmetros de fecundidade e fertilidade de adultos de *Euschistus heros* mostrados na Figura 1.4.

Variável	Modelo	Tratamento	$a^*$	$b^*$	$x_0^*$	gl	F	P	$R^2$
Ovos/fêmea	$y = \frac{a}{1+(\frac{x-x_0}{b})^2}$	Água	29,2 (26,1 - 32,3)	20,0 (15,5 - 24,6) a	13,1 (9,9 - 16,3)	23	108,5	<0,0001	0,89
		Água + inseticida	27,9 (25,0 - 30,8)	20,1 (16,0 - 25,4) a	12,4 (9,1 - 15,9)	23	130,0	<0,0001	0,91
		Água + sal	24,9 (21,6 - 28,2)	31,8 (20,9 - 42,7) ab	15,7 (8,2 - 23,4)	23	41,3	<0,0001	0,76
		Inseticida + sal	25,4 (22,2 - 28,5)	48,7 (27,0 - 70,4) b	14,3 (-1,5 - 30,0)	23	15,6	<0,0001	0,54
Eclosão/fêmea	$y = \frac{a}{1+(\frac{x-x_0}{b})^2}$	Água	0,8 (0,7 - 0,9) a	22,5 (16,9 - 28,2) a	15,4 (11,7 - 19,2)	23	95,3	<0,0001	0,88
		Água + inseticida	0,9 (0,8 - 1,0) a	21,1 (16,5 - 25,7) a	16,4 (13,4 - 19,3)	23	119,0	<0,0001	0,90
		Água + sal	0,7 (0,6 - 0,8) ab	38,2 (20,9 - 55,4) ab	16,3 (5,3 - 27,3)	20	26,3	<0,0001	0,70
		Inseticida + sal	0,6 (0,5 - 0,6) b	37,8 (28,7 - 46,4) b	6,2 (-3,6 - 16,0)	23	110,9	<0,0001	0,90
Massa de ovos/fêmea	$y = \frac{a}{1+(\frac{x-x_0}{b})^2}$	Água	4,2 (3,6 - 4,8) a	27,0 (19,4 - 34,6)	25,9 (21,9 - 30,0)	20	35,4	<0,0001	0,75
		Água + inseticida	3,3 (2,9 - 3,6) ab	32,1 (23,2 - 41,1)	15,6 (9,3 - 21,9)	23	60,0	<0,0001	0,82
		Água + sal	3,4 (2,0 - 3,9) ab	30,8 (22,5 - 39,0)	25,1 (20,6 - 29,7)	23	40,5	<0,0001	0,76
		Inseticida + sal	3,0 (2,6 - 3,4) b	88,1 (27,1 - 149,2)	7,6 (-34,5 - 49,8)	23	10,2	0,0007	0,42

\*Parâmetros estimados. Valores seguidos por diferentes letras na coluna foram significativamente diferentes (baseados na não-sobreposição dos limites de confiança).

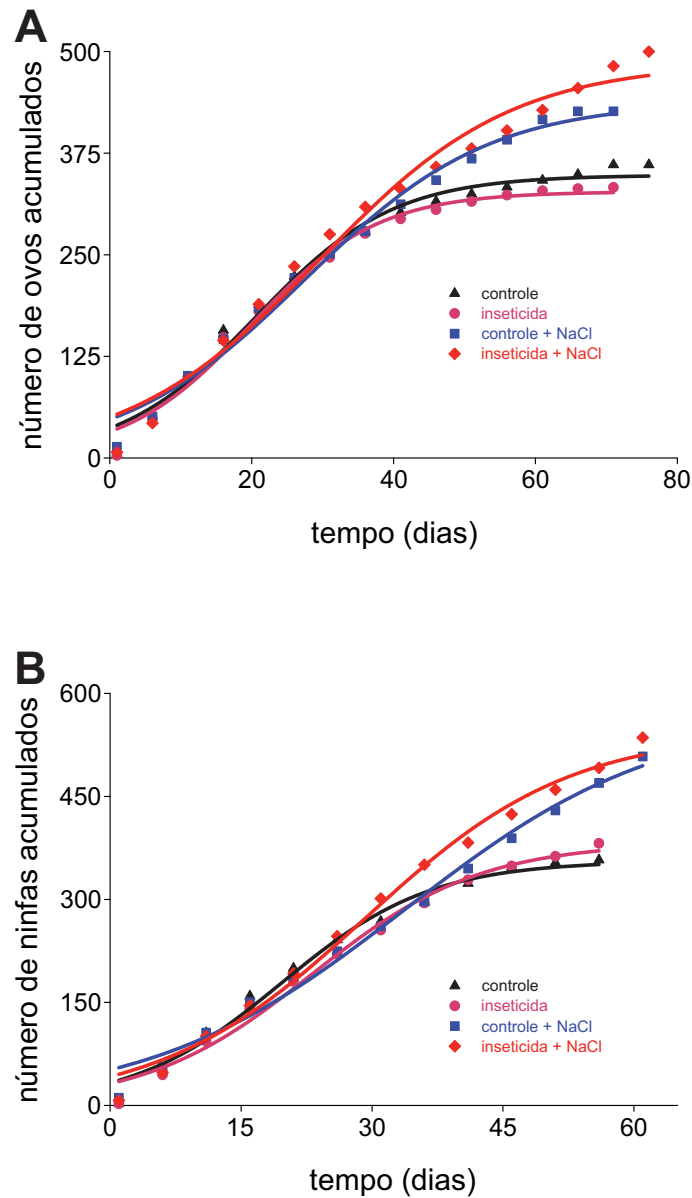


Figura 1.5: Exposição subletal de resíduo seco de imidaclopride ou água destilada associados ou não a NaCl (0,05% p/v) em adultos de *Euschistus heros* e efeitos na fecundidade acumulada (A) e na fertilidade acumulada (B). As linhas representam o ajuste da regressão não linear dos resultados diários de fecundidade e fertilidade. Os símbolos representam médias dos dados observados. Os parâmetros da equação são mostrados na Tabela 1.3.

Tabela 1.3: Sumário das análises de regressão não-linear dos parâmetros de fecundidade e fertilidade acumulados de adultos de *Euschistus heros* mostrados na Figura 1.5.

Variável	Modelo	Tratamento	$a^*$	$b^*$	$x_0^*$	gl	F	P	R <sup>2</sup>
Ovos	$y = \frac{a}{1+(\frac{e^{x-x_0}}{b})}$	Água	347,9 (332,1 - 363,8) a	9,6 (7,7 - 11,6)	20,6 (18,6 - 22,7) a	13	406,4	<0,0001	0,98
		Água + inseticida	327,6 (314,1 - 341,1) a	9,0 (7,4 - 10,6)	19,9 (18,1 - 21,6) a	12	521,2	<0,0001	0,99
		Água + sal	438,3 (407,0 - 469,6) b	13,0 (10,5 - 15,5)	27,4 (24,4 - 30,5) b	12	486,6	<0,0001	0,98
		Inseticida + sal	486,1 (443,6 - 528,6) b	13,6 (10,4 - 16,9)	29,4 (25,5 - 33,4) b	13	317,9	<0,0001	0,98
Ninfas	$y = \frac{a}{1+(\frac{e^{x-x_0}}{b})}$	Água	346,0 (330,5 - 381,4) a	8,6 (6,5 - 10,6) a	19,6 (17,2 - 22,0) a	9	329,0	<0,0001	0,98
		Água + inseticida	383,0 (351,7 - 414,3) a	9,6 (7,5 - 11,7) ab	23,2 (20,5 - 25,8) a	9	416,4	<0,0001	0,99
		Água + sal	572,0 (477,4 - 666,7) b	14,6 (11,1 - 18,2) b	33,8 (27,5 - 40,1) b	10	399,4	<0,0001	0,98
		Inseticida + sal	544,5 (492,3 - 596,8) b	11,8 (9,4 - 14,1) ab	29,2 (25,8 - 35,6) ab	10	515,2	<0,0001	0,99

\*Parâmetros estimados. Valores seguidos por diferentes letras na coluna foram significativamente diferentes (baseados na não-sobreposição dos limites de confiança).

## 1.4 Discussão

Os resultados deste estudo sugerem que NaCl em adição à dosagens subletais de imidaclopride é capaz de incrementar a mortalidade de *E. heros* quando expostos na fase inicial da vida adulta. Além disso, o estresse mediado pelo inseticida com ou sem a associação da molécula adjuvante nessa fase de vida altera o padrão de fertilidade e fecundidade deste artrópode.

Utilizado por agricultores para o controle de percevejos desde a década de 80, NaCl age como um fagoarrestante que, associado a caldas inseticidas de grupos de moléculas mais antigas, promovia maior eficácia de controle de pentatomídeos (Corso 1990; Corso e Gazzoni 1998). Aqui, demonstramos que esse efeito sinérgico também ocorre com dosagens subletais de classes inseticidas mais novas e que são amplamente utilizadas em campos de produção como o imidaclopride.

Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que áreas tratadas com baixas concentrações de NaCl são preferidas por *E. heros* (Corso 1990; Corso e Gazzoni 1998; Marcomini et al. 2016), que pode ser uma resposta dos neurônios que expressam os receptores Gr5a - que responde ao estímulo de baixas concentrações de NaCl - e/ou Gr66a - que resulta no comportamento de aversão à NaCl em insetos (Marella et al. 2006; Yarmolinsky et al. 2009). Essa resposta fisiológica pode induzir o maior contato com a molécula inseticida, refletindo assim em uma resposta comportamental modificando o hábito alimentar e conseqüentemente, ocorrendo uma maior ingestão de inseticida (Corso e Gazzoni 1998), que pode ser uma explicação para esse acréscimo na mortalidade.

Apesar de ser um efetivo método de redução de populações naturais de insetos em concentrações letais, imidaclopride em exposição subletal vem sendo amplamente investigada e associada a ganhos reprodutivos quando expostos a insetos adultos (Yin et al. 2008; Yu et al. 2010; Szczepaniec e Raupp 2013; Haddi et al. 2016; Santos et al. 2016). A concentração de 0,042  $\mu\text{g}$  i.a./L de imidaclopride é capaz de provocar alterações comportamentais e morfofisiológicas em machos e fêmeas de *E. heros* (Haddi et al. 2016; Santos et al. 2016), porém o efeito do NaCl associado à essa concentração não foi investigado. Nossa investigação testou diferentes dosagens subletais e a de 0,126  $\mu\text{g}$  i.a./L foi a que mais alterou o comportamento sexual dessa espécie. Dessa forma, esta dosagem foi in-

vestigada com adição de NaCl, molécula adjuvante que também propiciou mudanças nos padrões de fecundidade e fertilidade de *E. heros*.

Um resultado alarmante encontrado nesse estudo foi que, apesar da porcentagem de emergência de ninfas ser menor em soluções inseticidas com NaCl (Figura 1.4C), a presença do sal nesta solução propiciou uma maior oviposição o que representou um maior número total de ovos por fêmeas (Figura 1.5A) e maior número de ninfas emergidas (Figura 1.5B). Uma das prováveis causas desse incremento reprodutivo é que o NaCl potencializou a ação do imidaclopride tanto aumentando a frequência de cópula em machos quanto potencializando o desenvolvimento ovariano em fêmeas por ação hormonal, que proporcionou ganho reprodutivo aos casais expostos (Charpentier et al. 2014; Haddi et al. 2016; Santos et al. 2016).

Assim, nossos resultados mostraram que adultos recém-emergidos de *E. heros* expostos a dosagens subletais de imidaclopride com adição de NaCl superam o estresse inseticida e ainda incrementam seu fitness. Isso sugere uma possível hipótese que explicaria o rápido crescimento populacional de *E. heros* que está ocorrendo em campos de produção de soja, visto que a utilização de NaCl em caldas inseticidas é frequente nessas áreas. Além disso, esse estudo implica diretamente no manejo de *E. heros*, indicando que não é recomendado expor adultos à dosagens subletais de imidacloprid com adição de NaCl. Todavia, investigações que permitam maiores detalhes nos mecanismos fisiológicos envolvidos nesses processos, assim como a investigação de outras dosagens subletais com adição de NaCl e aplicação desses ensaios em campos de produção, se fazem necessários para preencher essa lacuna e elucidar quais processos estão envolvidos nessa mudança comportamental.

## 1.5 Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## 1.6 Referências

- Bao, H., Liu, S., Gu, J., Wang, X., Liang, X., Liu, Z. (2009) Sublethal effects of four insecticides on the reproduction and wing formation of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science* 65, 170 – 174.
- Bonoan, R. E., Tai, T. M., Rodriguez, M. T., Feller, L., Daddario, S. R., Czaja, R. A., O'Connor, L. D., Burruss, G., and Starks, P. T. (2016) Seasonality of salt foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Ecological Entomology*, doi: 10.1111/een.12375.
- Borges, M., Laumann, R., Silva, C., Moraes, M., Santos, H., Ribeiro, D. (2006) Metodologias de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera: Pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos 18 p.
- Bueno, A. F., Bortolotto, O. C., Pomari-Fernandes, A., Franca-Neto, J. B. (2015) Assessment of a more conservative stink bug economic threshold for managing stink bugs in Brazilian soybean production. *Crop Protection* 71, 132 – 137.
- Bueno, A. F. et al. In: *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*; Hoffmann-Campo, C. B., Corrêa-Ferreira, B. S., and Moscardi, F., Eds.; Brasília - DF: Embrapa, 2012.
- Burger, J. M. S., Promislow, D. E. L. (2004) Sex-Specific Effects of Interventions That Extend Fly Life Span. *Science of Aging Knowledge Environment* 2004, doi: 10.1126/sageke.2004.28.pe30
- Casida, J. E., Durkin, K. A. (2013) Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annual Review of Entomology* 58, 99 – 117.
- Celestino, D., Braoios, G. I., Ramos, R. S., Gontijo, L. M., Guedes, R. N. C. (2014) Azadirachtin-mediated reproductive response of the predatory pirate bug *Blaptostethus pallescens*. *BioControl* 59, 697 – 705.
- Charpentier, G., Louat, F., Bonmatin, J. M., Marchand, P. A., Vanier, F., Locker, D., Decoville, M. (2014) Lethal and Sublethal Effects of Imidacloprid, After Chronic Exposure, On the Insect Model *Drosophila melanogaster*. *Environmental Science and Technology* 48, 4096 – 4102.
- Corso, I. C. (1990) Uso de sal de cozinha na redução da dose de inseticida para controle de percevejos da soja. (EMBRAPA-CNPQSO. Comunicado Técnico, 45), 7p.
- Corso, I., Gazzoni, D. (1998) Sodium chloride: an insecticide enhancer for controlling pentatomids on soybeans. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33, 1563 – 1571.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J. M. (2007) The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology* 52, 81 – 106.
- Ghimire, N., Woodward, R. T. (2013) Under- and over-use of pesticides: An international analysis. *Ecological Economics* 89, 73 – 81.
- Guedes, R. N. C., Cutler, G. C. (2014) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Management Science* 70, 690 – 697.
- Guedes, R. N. C., Smagghe, G., Stark, J., Desneux, N. (2016) Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annual Review of Entomology* 61, 43–62.

Haddi, K., Mendes, M. V., Barcellos, M. S., Lino-Neto, J., Freitas, H. L., Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E. (2016) Sexual Success after Stress? Imidacloprid-Induced Hormesis in Males of the Neotropical Stink Bug *Euschistus heros*. *PLoS ONE* 11, 1–18.

Haynes, K. F. (1988) Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual Review of Entomology* 33, 149 – 168.

Jeschke, P., Nauen, R., Beck, M. E. (2013) Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 9464 – 9485.

Kim, D. S., Brooks, D. J., Riedl, H. (2006) Lethal and sublethal effects of abamectin, spinosad, methoxyfenozide and acetamiprid on the predaceous plant bug *Deraeocoris brevis* in the laboratory. *BioControl* 51, 465 – 484.

López-Martínez, G., Hahn, D. A. (2012) Short-term anoxic conditioning hormesis boosts antioxidant defenses, lowers oxidative damage following irradiation and enhances male sexual performance in the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *The Journal of Experimental Biology* 215, 2150 – 2161.

Macfadyen, S., Hardie, D. C., Fagan, L., Stefanova, K., Perry, K. D., DeGraaf, H. E., Holloway, J., Spafford, H., Umina, P. A. (2014) Reducing Insecticide Use in Broad-Acre Grains Production: An Australian Study. *PLoS ONE* 9, 1 – 13.

Marcomini, M. C., Cremonese, P. S. G., Neves, P. M. O. J. Efeito do NaCl no comportamento alimentar de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). *Encontro Anual de Iniciação Científica - Universidade Estadual de Londrina*. 2016.

Marella, S., Fischler, W., Kong, P., Asgarian, S., Rueckert, E., Scott, K. (2006) Imaging Taste Responses in the Fly Brain Reveals a Functional Map of Taste Category and Behavior. *Neuron* 49, 285 – 295.

Noguera, J. C., Lores, M., Alonso-Álvarez, C., Velando, A. (2011) Thrifty development: early-life diet restriction reduces oxidative damage during later growth. *Functional Ecology* 25, 1144 – 1153.

Oliveira, E. E., Schleicher, S., Büschges, A., Schmidt, J., Kloppenburg, P., Salgado, V. L. (2011) Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors in central nervous system neurons of the stick insect (*Carausius morosus*) by imidacloprid and sulfoximine insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 872 – 880.

Panizzi, A. R. (2013) History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. *Neotropical Entomology* 42, 119 – 127.

Panizzi, A. R., Bueno, A. F., Silva, F. A. C. In Soja: *Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga*; Hoffman-Campo, C. B., Corrêa-Ferreira, B. S., Moscardi, F., Eds.; EMBRAPA, 2012; Chapter Insetos que atacam vagens e grãos, pp 335–420.

Panizzi, A. R., Corrêa-Ferreira, B. S. (1997) Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. *Trends in Entomology* 1, 71–88.

Saluso, A., Xavier, L., Silva, F., Panizzi, A. R. (2011) An invasive pentatomid pest in Argentina: Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology* 40, 704 – 705.

Santos, M. F., Santos, R. L., Tomé, H. V. V., Barbosa, W. F., Martins, G. F., Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E. (2016) Imidacloprid-mediated effects on survival and fertility of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Journal of Pest Science* 89, 231 – 240.

- Santos, M. F., Campos, M. R., Bravim, J. N., Oliveira, E. E., and Guedes, R. N. C. (2016) Non-targeted insecticidal stress on the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Crop Protection* 82, 10 – 16.
- Silva, F., Calizotti, G., Panizzi, A. R. (2011) Survivorship and Egg Production of Phytophagous Pentatomids in Laboratory Rearing. *Neotropical Entomology* 40, 35 – 38.
- Simon-Delso, N. et al. (2015) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 5 – 34.
- Sosa-Gomez, D. R., Corrêa-Ferreira, B. S., Hoffmann-Campo, C. B., Corso, I. C., Oliveira, L. J., Moscardi, F., Panizzi, A. R., Bueno, A. F., Hirose, E., Roggia, S. *Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja*, Embrapa Soja, 2014.
- Sosa-Gomez, D. R., Corso, I., Morales, L. (2001) Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and metamidophos in the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). *Neotropical Entomology* 30, 317 – 320.
- Sosa-Gomez, D. R., Silva, J. J. (2010) Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Parana, Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 45, 767 – 769.
- Sosa-Gomez, D. R., Silva, J. J., Lopes, I. D. O. N., Corso, I. C., Almeida, A. M., Moraes, G. C. P., Baur, M. E. (2009) Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology* 102, 1209 – 1216.
- Szczepaniec, A., Raupp, M. J. (2013) Direct and indirect effects of imidacloprid on fecundity and abundance of *Eurytetranychus buxi* (Acari: Tetranychidae) on boxwoods. *Experimental and Applied Acarology* 59, 307 – 318.
- Tan, Y., Biondi, A., Desneux, N., Gao, X. W. (2012) Assessment of physiological sublethal effects of imidacloprid on the mirid bug *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Ecotoxicology* 21, 1989 – 1997.
- Teodoro, A. V., Fadini, M. A., Lemos, W. P., Guedes, R. N. C., Pallini, A. (2005) Lethal and sub-lethal selectivity of fenbutatin oxide and sulfur to the predator *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae) and its prey, *Oligonychus ilicis* (Acari: Tetranychidae), in Brazilian coffee plantations. *Experimental & Applied Acarology* 36, 61 – 70.
- Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., Ryba, N. J. (2009) Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell* 139, 234 – 244.
- Yin, J. L., Xu, H. W., Wu, J. C., Hu, J. H., Yang, G. Q. (2008) Cultivar and Insecticide Applications Affect the Physiological Development of the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). *Environmental Entomology* 37, 206 – 212.
- Yu, Y., Shen, G., Zhu, H., Lu, Y. (2010) Imidacloprid-induced hormesis on the fecundity and juvenile hormone levels of the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, 238 – 242.
- Zeng, X., He, Y., Wu, J., Tang, Y., Gu, J., Ding, W., Zhang, Y. (2016) Sublethal Effects of Cyantraniliprole and Imidacloprid on Feeding Behavior and Life Table Parameters of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 109, 1595 – 1602.

**Crescimento populacional de *Euschistus heros* quando ninfas são subletalmente expostas a imidaclopride e NaCl**

## Crescimento populacional de *Euschistus heros* quando ninfas são subletalmente expostas a imidaclopride e NaCl

### Resumo

Inseticidas, dependendo da sua forma de uso, são responsáveis pela redução de inimigos naturais e seleção de populações resistentes. Em lavouras de soja, *Euschistus heros* tem sido a principal praga, responsável por danos diretos e indiretos. Para seu controle, moléculas inseticidas neonicotinoides (por exemplo imidaclopride) tem sido amplamente utilizada, pois apresenta eficiência no controle de insetos adultos e segurança de aplicação. Adicionado a isso, muitos agricultores utilizam NaCl no preparo das caldas inseticidas visto que esta molécula potencializa a ação desses compostos. Todavia, os efeitos subletais dessas caldas são negligenciados, principalmente no que tange aos efeitos em fases jovens desse pentatomidae. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de elucidar os efeitos no comportamento reprodutivo e na dinâmica populacional de *E. heros* cujas ninfas foram subletalmente expostas a caldas inseticidas contendo imidaclopride e NaCl. Cloreto de Sódio (0,5% p/v) em associação com imidaclopride na concentração de 0,126  $\mu\text{g i.a./cm}^2$  (equivalente 3% da dose recomendada para utilização no campo, que é 4,2  $\mu\text{g i.a./cm}^2$ ) impactou negativamente o comportamento sexual de *E. heros*. Essa concentração associada a NaCl proporcionou um incremento no número de ovos depositados comparado com as soluções que não continham esse adjuvante. Todavia, todos os insetos tratados com inseticida associado ou não a NaCl sofreram drástica redução no número de ovos e na eclosão diária e acumulada ao longo da vida da fêmea. A estimativa de crescimento populacional foi reduzida com a exposição de ninfas à soluções inseticidas tanto na taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) quanto na taxa intrínseca de crescimento ( $r$ ) e no tempo de geração ( $T$ ). Houve ainda uma potencialização nesse decréscimo com o uso de NaCl em todas as concentrações subletais utilizadas. Dessa forma, este estudo sugere que a exposição de ninfas de 5º instar de *E. heros* a dosagens subletais de imidaclopride com adição ou não de NaCl reduz o potencial reprodutivo e a estimativa de crescimento populacional nesta espécie, informação importante para compor o plano de amostragem dessa espécie e auxiliar o MIP (Manejo Integrado de Pragas) na cultura da soja.

**Palavras chave:** Ninfas, Pentatomidadae, Neonicotinoide.

### **Abstract**

Insecticides, depending on their mode of use, are responsible for the reduction of natural enemies and the selection of resistant populations. In soybean fields, *Euschistus heros* has been the main pest, responsible for direct and indirect damage. For its control, neonicotinoid insecticidal molecules (e. g. imidacloprid) have been widely used, as it has efficiency in adult insect control and application safety. Many farmers use NaCl to prepare insecticides as this molecule enhances the action of these compounds. However, the sublethal effects of these sprays are neglected, especially in relation to the young phase effects of this pentatomidae. Thus, this study was conducted with the objective of elucidating the effects on the reproductive behavior and populational dynamic of *E. heros* whose nymphs were sublethally exposed to insecticidal sprays containing imidacloprid and NaCl. Sodium Chloride (0.5% w/v) in combination with imidacloprid at a concentration of  $0.126 \mu\text{g i.a./cm}^2$  (equivalent to 3% of the recommended dose for field use, which is  $4.2 \mu\text{g i.a./cm}^2$ ) negatively impacted the behavior sexual of *E. heros*. This concentration associated with NaCl provided an increase in the number of eggs deposited compared to solutions that did not contain this adjuvant. However, all the insects treated with or without insecticide associated with NaCl suffered a drastic reduction in the number of eggs and the daily and accumulated hatching throughout the life of the female. The population growth estimate was reduced with nymphs exposure to insecticidal solutions in both the net reproduction rate ( $R_0$ ) and the intrinsic rate of growth ( $r$ ) and generation time ( $T$ ). There was also a potentiation in this decrease with the use of NaCl in all the sublethal concentrations used. Thus, this study suggests that the exposure of nymphs of 5<sup>th</sup> instar of *E. heros* to sublethal dosages of imidacloprid with or without NaCl reduces the reproductive potential and the population growth estimate in this species, important information to compose the sampling plan for this species and to assist IPM (Integrated Pest Management) in the soybean crop.

**Key words:** Nymphs, Pentatomidadae, Neonicotinoid.

## 2.1 Introdução

O surto de pragas secundárias e o ressurgimento de pragas são reações ecológicas influenciadas principalmente pelo uso de inseticidas, que podem estar atrelados a redução de inimigos naturais e seleção de populações resistentes (Desneux et al. 2007; Guedes e Cutler 2014), comprometendo o controle sustentável de pragas. Quando usada adequadamente, essa ferramenta permite um eficaz controle de insetos, contribuindo para o aumento de rendimento na produção agrícola (Ghimire e Woodward 2013; Macfadyen et al. 2014; Guedes et al. 2016).

Em campos de produção de soja (*Glycine max*), diversos organismos são expostos a estresse inseticida. Do complexo de percevejos que ataca a cultura, *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) vem sendo o prevalente e passou do status de praga secundária para praga-chave (Panizzi e Corrêa-Ferreira 1997; Saluso et al. 2011; Panizzi et al. 2012; Panizzi 2013) e, conseqüentemente, é mais exposto à ação desses xenobióticos. Essa exposição tem sido mais frequente a inseticidas do grupo neonicotinoide, como imidaclopride, que atualmente são os mais utilizadas para controle de *E. heros* uma vez que moléculas mais antigas como organofosforados, carbamatos e endosulfan foram retiradas do mercado (Sosa-Gomez et al. 2009; Sosa-Gomez e Silva 2010; Jeschke et al. 2013).

Imidaclopride é uma molécula eficaz no controle adultos de *E. heros* (Sosa-Gomez et al. 2009; Santos et al. 2016). No entanto, quando adultos são expostos a dosagens subletais desse composto, há mudança nos padrões reprodutivos e na sobrevivência desse inseto-praga que podem permitir o aumento populacional (Santos et al. 2016; Haddi et al. 2016). Além disso, Cloreto de Sódio (NaCl) é um adjuvante usado nas soluções inseticidas que aumenta o potencial de mortalidade das formulações (Corso 1990; Corso e Gazzoni 1998), mas o efeito subletal de caldas inseticidas com NaCl é pouco investigado, principalmente no que se refere ao efeito dessas dosagens em fases jovens desse artrópode-praga.

Fases imaturas de inúmeras espécies de insetos sofrem ação de moléculas inseticidas, que podem provocar mudanças comportamentais e fisiológicas quando o indivíduo atinge a fase adulta (Kim et al. 2006; Yin et al. 2008; Santos et al. 2016; Celestino et al. 2014). Estágios ninfais de *E. heros* também estão expostos à essas dosagens subletais de caldas inseticidas no campo, porém ainda há carência de estudos (Santos et al. 2016)

para averiguar o impacto causado nessa fase de vida e o que isso reflete na dinâmica populacional desta espécie.

Mediante o exposto, as propostas dessa investigação são avaliar o comportamento reprodutivo e o crescimento populacional de *E. heros* expostos na fase ninfal à dosagens subletais de imidaclopride com associação ou não a NaCl.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Coleta e criação dos insetos

A colônia de *E. heros* estabelecida em laboratório foi proveniente de indivíduos obtidos de uma colônia já existente mantida na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF, Brasil). Indivíduos coletados em cultivos de soja no município de Tangará da Serra (Mato Grosso, Brasil) e de cultivos de soja de campos experimentais da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil) foram periodicamente introduzidos a colônia a fim de aumentar a variabilidade genética dos insetos utilizados no bioensaio. A colônia foi criada seguindo métodos previamente descritos (Borges et al. 2006; Silva et al. 2011) e mantida sob condições controladas ( $27 \pm 2$  °C,  $60 \pm 20\%$  de umidade relativa e fotoperíodo de 14 h).

### 2.2.2 Exposição a doses subletais de imidaclopride

Insetos de 5º ínstar (<48 h) foram expostos individualmente durante 48 h ao resíduo seco de imidaclopride em diferentes concentrações (0,042 e 0,126;  $\mu\text{g i.a./cm}^2$ , equivalente a respectivamente 1 e 3% da dose recomendada para utilização no campo, que é 4,2  $\mu\text{g i.a./cm}^2$ ) associado ou não a sal de cozinha (NaCl, 0,5% p/v) ou água destilada e deionizada associado ou não a sal de cozinha (NaCl, 0,5% p/v) (controle). As paredes internas de frascos de vidro de 20 mL foram revestidos com 550  $\mu\text{L}$  de solução. Após a exposição, os indivíduos foram mantidos separados em recipientes de plástico e alimentados *ad libidum* até a morte.

### **2.2.3 Bioensaio de comportamento sexual**

Após a maturação sexual (a partir do 13º dia no estágio adulto), 20 a 25 casais virgens previamente expostos no 5º ínstar foram destinados ao acasalamento. Todo comportamento foi gravado com auxílio de uma filmadora digital (HDR-XR520V, Sony, Tóquio, Japão) por 13 h. Após esse período, os casais foram separados e mantidos individualmente em placas de Petri. A análise da filmagem possibilitou avaliar o tempo até a primeira cópula, o número de acasalamentos, a duração média de cada acasalamento e a duração total de acasalamentos para cada casal. O número de casais que não se acasalaram foi sempre inferior a 2% e seus resultados não foram utilizados na análise estatística.

### **2.2.4 Bioensaio de reprodução**

Após o acasalamento, 20 a 25 casais de cada tratamento foram monitorados separadamente até a morte. O número total de ovos depositados e ninfas emergidas foram registrados após a morte de cada fêmea. Insetos foram contados como mortos quando eram incapazes de andar o comprimento do seu corpo quando pinçadas com um pincel de cerda fina.

### **2.2.5 Bioensaio de matriz estruturada na idade**

Utilizou-se um modelo matricial estruturado por idade de crescimento populacional para cada tratamento (0,042 e 0,126  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  de imidaclopride associado ou não a sal de cozinha (NaCl, 0,5%) ou água destilada e deionizada associado ou não a sal de cozinha (NaCl, 0,5% p/v). Todos os estágios de desenvolvimento de *E. heros* foram incluídos (ovo, ninfa e adulto). Indivíduos de 5º ínstar foram expostos a resíduo seco de inseticida como descrito anteriormente. A sobrevivência e a duração de cada estágio de desenvolvimento foram registrados, assim como a fertilidade das fêmeas que atingiram a fase adulta. Os dados obtidos foram utilizados para construir a matriz estruturada na idade usando o software PopTools 3.2.2 (Hood, 2010).

As matrizes de projeção resultante compreendem um conjunto de elementos que se referem à probabilidade de um indivíduo sobreviver e permanecer no mesmo estágio de vida ( $P_i$ ) e um conjunto de elementos que se referem à probabilidade de um indivíduo sobreviver e passar para o próximo estágio de vida ( $G_i$ ) (Keyfitz e Caswell, 2005). Essas probabilidades são calculadas com base na sobrevivência ( $\sigma_i$ ) e desenvolvimento ( $\gamma_i$ ) de cada estágio de vida ( $i$ ), tais que  $P_i = \sigma_i(1 - \gamma_i)$  e  $G_i = \sigma_i\gamma_i$  (Celestino et al. 2014; Vilca Mallqui et al. 2014). Esse procedimento permitiu estimar a taxa de crescimento populacional ( $r$ ), taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) e o tempo de geração ( $T$ ).

### 2.2.6 *Análise estatística*

Os parâmetros de comportamento de acasalamento foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) ou Kruskal-Wallis *one-way ANOVA on ranks* quando não foram satisfeitas as premissas de normalidade e homogeneidade. Todas as comparações múltiplas por pares, sempre que necessário, foram realizadas aplicando o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) utilizando SigmaPlot 12.5 (Systat Software, San José, CA, EUA). Os dados de fecundidade e fertilidade diária foram submetidos à análise de regressão para detectar tendências diárias que resultaram cada tratamento ao longo do tempo. O modelo de regressão foi escolhido com base na parcimônia, menores erros padrões e acentuados aumentos em  $R^2$  com a complexidade do modelo. Os modelos de regressão para cada tratamento foram considerados diferentes entre si se os limites de confiança de seus parâmetros não se sobrepuseram.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 *Bioensio de comportamento sexual*

Em todos os parâmetros de comportamento sexual avaliados, ninfas de 5º ínstar expostas a concentração de  $0,126 \mu\text{g i.a./cm}^2$  de imidaclopride com associação a NaCl sofreram maior impacto que as demais concentrações utilizadas (Figura 2.1). Para este tratamento,

reduções significativas foram observadas para o tempo até a primeira cópula ( $H = 21,76$ ,  $gl = 5$ ,  $P < 0,001$ )(Figura 2.1A), número de cópulas ( $H = 18,87$ ,  $gl = 5$ ,  $P = 0,002$ )(Figura 2.1B), tempo médio de cópula ( $H = 24,36$ ,  $gl = 5$ ,  $P < 0,001$ )(Figura 2.1C) e tempo total de cópula ( $F_{5,89} = 3,10$ ,  $P = 0,013$ )(Figura 2.1D), quando comparado ao controle. Para a concentração de  $0,042 \mu\text{g i.a./cm}^2$  de imidaclopride com associação ou não a NaCl, houve um acréscimo no tempo até a primeira cópula ( $H = 21,76$ ,  $gl = 5$ ,  $P < 0,001$ )(Figura 2.1A). Para os demais parâmetros não houve diferença significativa entre a concentração que representa 1% da dose de campo comparada ao controle.

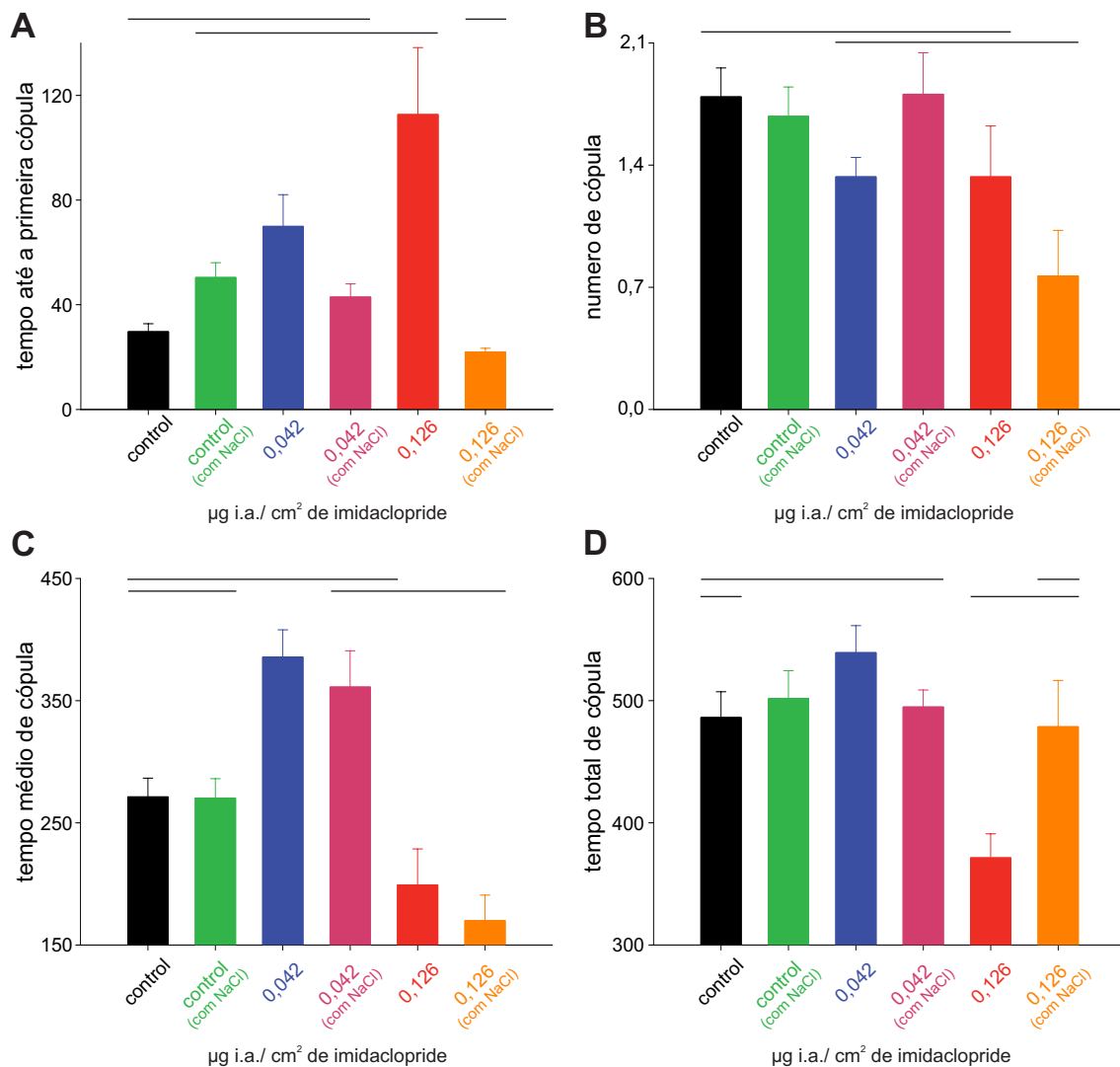


Figura 2.1: Exposição subletal de resíduo seco de imidaclopride ou água destilada associados ou não a NaCl (0,05% p/v) em ninfas de 5º ínstar de *Euschistus heros* e efeitos no comportamento de acasalamento. O tempo até a primeira cópula (A), número de cópula (B), duração total de cópula (C) e duração média de cópula (D) foram registrados. Casais de *E. heros* agrupados pela linha horizontal na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### **2.3.2 Bioensaio de reprodução**

A exposição à diferentes concentrações inseticidas com associação ou não de NaCl em ninfas de *E. heros* promoveu mudanças nos parâmetros reprodutivos (Figura 2.2, Tabela 2.1). Fêmeas expostas a maior concentração da solução inseticida, 0,126  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  de imidaclopride, depositaram menor número de ovos diariamente (Figura 2.2A, Tabela 1.2) e acumulado (Figura 2.3A, Tabela 2.2). No entanto, quando há associação do sal nesta solução, um aumento estatisticamente significativo da deposição de ovos é observado para ambas situações (Figura 2.2A, Tabela 1.2 e Figura 2.3A, Tabela 2.2, respectivamente).

Quando trata-se da porcentagem diária de emergência e do número total de ninfas emergidas, o tratamento de 0,042  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  de imidaclopride foi o único que não propiciou redução (Figura 2.2B, Tabela 1.2 e Figura 2.3B, Tabela 2.2, respectivamente). Além disso, quando trata-se do número total de ninfas, o mesmo fenômeno ocorrido com o número de ovos depositados veio a acontecer. A solução de 0,126  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  de imidaclopride com NaCl propiciou maior número de ninfas que a mesma solução sem o saborizante (Figura 2.3B, Tabela 2.2).

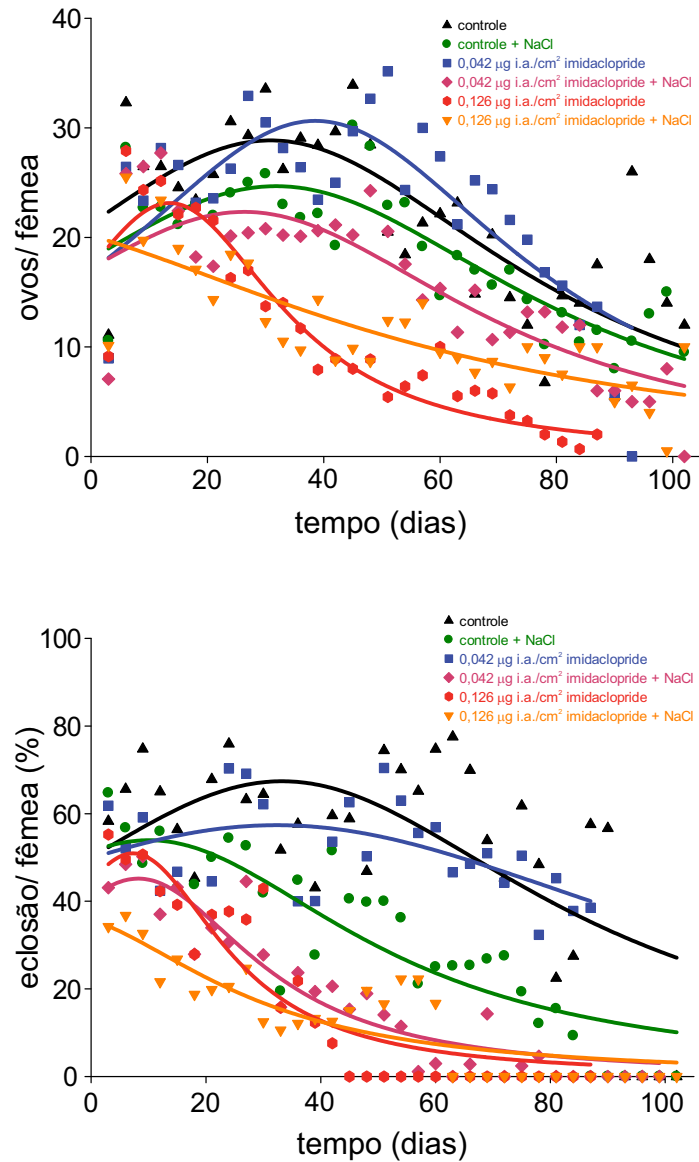


Figura 2.2: Exposição subletal de resíduo seco de imidaclopride ou água destilada associados ou não a NaCl (0,05% p/v) em ninfas de 5º ínstar de *Euschistus heros* e efeitos na fecundidade (A) e na fertilidade (B). As linhas representam o ajuste da regressão não linear dos resultados diários de fecundidade e fertilidade. Os símbolos representam médias dos dados observados. Os parâmetros da equação são mostrados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Sumário das análises de regressão não-linear dos parâmetros de fecundidade de *Euschistus heros* mostrados na Figura 2.2.

Variável	Modelo	Tratamento	$a^*$	$b^*$	$x_0^*$	gl	F	P	R <sup>2</sup>
Ovos/fêmea	$y = \frac{a}{1+(\frac{x-x_0}{b})^2}$	Água	29,2 (26,1 - 32,3) ab	51,6 (35,8 - 67,3) a	30,8 (22,3 - 39,3) a	31	19,9	<0,0001	0,53
		Água + sal**	24,7 (22,6 - 26,8) bc	52,6 (40,3 - 65,0) a	31,8 (25,3 - 38,3) a	31	36,5	<0,0001	0,68
		0,042 imida***	30,6 (27,3 - 33,9) a	42,9 (32,4 - 53,4) a	38,6 (33,6 - 43,6) a	28	28,6	<0,0001	0,65
		0,042 imida + sal	22,3 (19,9 - 24,8) c	48,1 (34,0 - 62,1) a	26,3 (17,9 - 34,8) a	31	37,7	<0,0001	0,69
		0,126 imida	23,1 (20,5 - 25,8) bc	23,1 (17,3 - 28,9) b	13,5 (9,3 - 17,7) b	26	85,8	<0,0001	0,86
		0,126 imida + sal	22,0 (2,6 - 41,4) abc	72,6 (41,3 - 103,8) a	-21,9 (-113,1 - 69,3) ab	31	27,7	<0,0001	0,62
Eclosão/fêmea	$y = \frac{a}{1+(\frac{x-x_0}{b})^2}$	Água	0,7 (0,6 - 0,8) a	56,4 (31,2 - 81,6) ab	33,2 (20,7 - 45,8) a	31	13,6	<0,0001	0,43
		Água + sal	0,5 (0,5 - 0,6) ab	44,1 (28,7 - 59,5) ab	10,0 (-5,3 - 25,4) ab	31	56,4	<0,0001	0,77
		0,042 imida	0,6 (0,5 - 0,6) a	83,0 (36,9 - 129,1) a	32,3 (16,7 - 47,9) a	24	4,4	<0,0001	0,21
		0,042 imida + sal	0,5 (0,4 - 0,5) b	24,5 (17,8 - 31,2) bc	8,2 (1,7 - 14,7) b	30	121,38	<0,0001	0,88
		0,126 imida	0,5 (0,4 - 0,6) ab	18,9 (12,2 - 25,6) c	7,3 (1,0 - 13,6) b	26	84,0	<0,0001	0,86
		0,126 imida + sal	0,4 (0,1 - 0,7) ab	33,3 (21,0 - 45,6) abc	-6,8 (-42,5 - 28,9) abc	31	45,2	<0,0001	0,76

\*Parâmetros estimados. Valores desses parâmetros seguidos por diferentes letras na coluna foram significativamente diferentes (baseados na não-sobreposição dos limites de confiança).

\*\*NaCl na solução na concentração de 0,5% (p/v). \*\*\*Solução de imidaclopride em  $\mu\text{g i.a./cm}^2$ .

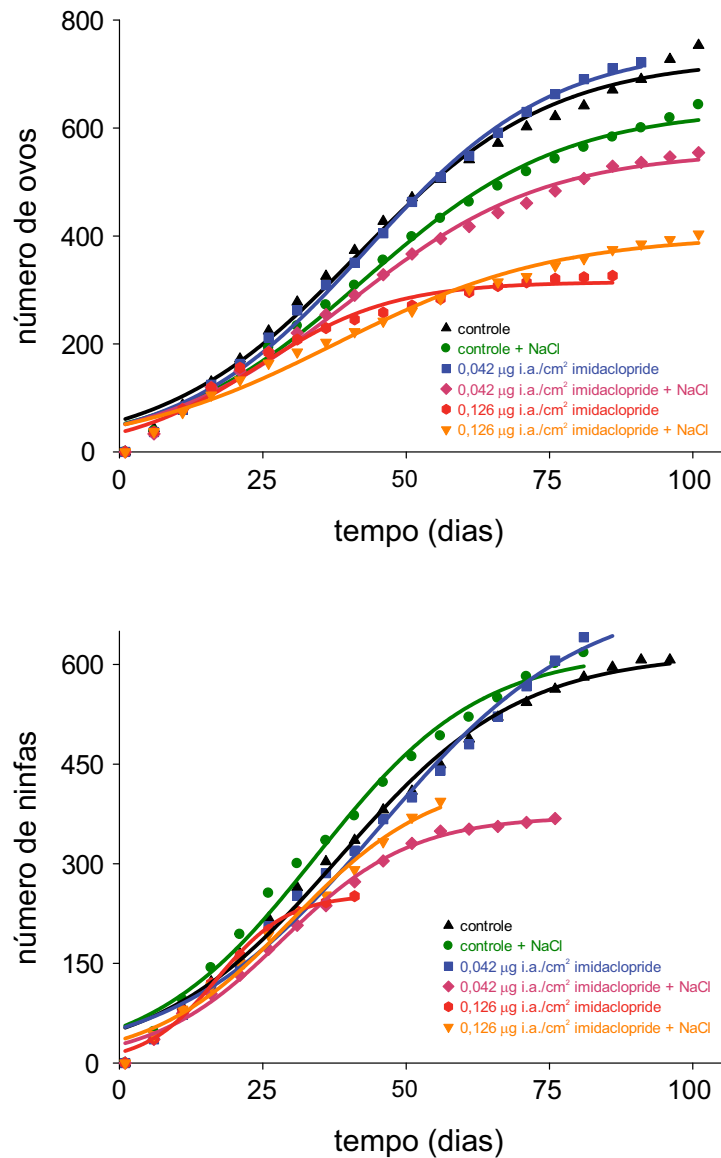


Figura 2.3: Exposição subletal de resíduo seco de imidaclopride ou água destilada associados ou não a NaCl (0,05% p/v) em ninfas de 5º instar de *Euschistus heros* e efeitos na fecundidade acumulada (A) e na fertilidade acumulada (B). As linhas representam o ajuste da regressão não linear dos resultados diários de fecundidade e fertilidade. Os símbolos representam médias dos dados observados. Os parâmetros da equação são mostrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Sumário das análises de regressão não-linear dos parâmetros acumulados de fecundidade de *Euschistus heros* mostrados na Figura 2.3.

Variável	Modelo	Tratamento	$a^*$	$b^*$	$x_0^*$	gl	F	P	R <sup>2</sup>
Ovos	$y = \frac{a}{1+(\frac{x-x_0}{b})^2}$	Água	728,6 (690,8 - 766,4) a	16,9 (14,5 - 19,3) a	41,4 (38,5 - 44,4) a	18	878,1	<0,0001	0,99
		Água + sal**	635,8 (606,3 - 665,3) b	17,3 (15,2 - 19,4) a	42,6 (39,9 - 45,2) a	18	1206,2	<0,0001	0,99
		0,042 imida***	751,0 (713,0 - 789,0) a	16,2 (14,4 - 18,0) a	43,2 (40,6 - 45,7) a	16	1491,2	<0,0001	0,99
		0,042 imida + sal	556,6 (530,5 - 582,7) c	17,1 (14,9 - 19,3) a	40,1 (37,4 - 42,9) a	18	1009,7	<0,0001	0,99
		0,126 imida	314,8 (298,9 - 330,8) e	11,7 (9,2 - 14,1) b	24,0 (21,4 - 26,7) b	15	357,4	<0,0001	0,98
		0,126 imida + sal	401,2 (372,3 - 430,1) d	19,1 (15,4 - 22,7) a	37,7 (33,4 - 42,1) a	18	450,8	<0,0001	0,98
Eclosão/fêmea	$y = \frac{a}{1+(\frac{x-x_0}{b})^2}$	Água	616,7 (588,8 - 644,7) a	15,8 (13,8 - 17,8) a	38,2 (35,8 - 40,7) ab	17	1049,9	<0,0001	0,99
		Água + sal	620,4 (577,4 - 663,3) a	14,4 (11,9 - 16,9) ab	34,2 (30,9 - 37,4) bc	14	597,2	<0,0001	0,99
		0,042 imida	707,4 (636,5 - 778,4) a	17,7 (14,6 - 20,8) a	45,2 (40,3 - 50,2) a	15	675,5	<0,0001	0,99
		0,042 imida + sal	371,5 (356,8 - 386,2) b	11,3 (9,8 - 12,7) b	28,4 (26,7 - 30,2) d	13	1069,9	<0,0001	0,99
		0,126 imida	253,1 (233,0 - 273,2) c	6,2 (4,7 - 7,8) c	17,0 (15,1 - 18,8) e	6	422,8	<0,0001	0,99
		0,126 imida + sal	431,6 (361,4 - 501,8) b	12,3 (9,0 - 15,6) ab	30,1 (24,7 - 35,6) cd	9	328,5	<0,0001	0,98

\*Parâmetros estimados. Valores desses parâmetros seguidos por diferentes letras na coluna foram significativamente diferentes (baseados na não-sobreposição dos limites de confiança).

\*\*NaCl na solução na concentração de 0,5% (p/v). \*\*\*Solução de imidaclopride em  $\mu\text{g i.a./cm}^2$ .

### 2.3.3 Bioensaio de matriz estruturada na idade

Com exposição no quinto ínstar, todas as soluções inseticidas com ou sem associação de NaCl reduziram o crescimento populacional de *E. heros*, cada uma com um resultado distinto para as 20 gerações projetadas (Figura 2.4). Apesar do controle e o controle com adição de NaCl apresentarem diferenças na taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) (39,13 e 52,95, respectivamente) e o sal propiciar um retardamento no tempo de geração ( $T$ ) (20,78) comparado ao controle (19,17), a curva dos dois modelos se sobrepõe (Tabela 2.3, Figura 2.4).

Diferentemente, quando as ninfas foram expostas a solução de 0,126  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  de imidaclopride com adição de NaCl, o crescimento populacional foi menor dentre todos os tratamentos (Tabela 2.3, Figura 2.4). Outro resultado intrigante desse bioensaio é o crescimento populacional para a concentração de 0,042  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  com adição de NaCl, que foi menor que a mesma solução sem a adição de NaCl e a solução na concentração de 0,126  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  sem adição de sal (Tabela 2.3, Figura 2.4). Esses resultados mostram a eficácia do NaCl como potencializador inseticida e promotor da redução populacional quando há exposição em ninfas de 5º ínstar de *E. heros*.

Tabela 2.3: Taxa de crescimento populacional ( $r$ ), taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) e tempo de geração ( $T$ ) de *Euschistus heros* expostos no 5º ínstar ninfal a concentrações subletais de imidaclopride associado ou não a NaCl com base na matriz estruturada por idade.

Tratamento	$r$	$R_0$	$T$
Água	0,19	39,13	19,17
Água + sal*	0,19	52,95	20,78
0,042 imida**	0,17	25,08	19,21
0,042 imida + sal	0,16	24,95	20,42
0,126 imida	0,16	24,69	19,83
0,126 imida + sal	0,13	16,26	20,79

\*NaCl na solução na concentração de 0,5% (p/v). \*\*Solução de imidaclopride em  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ .

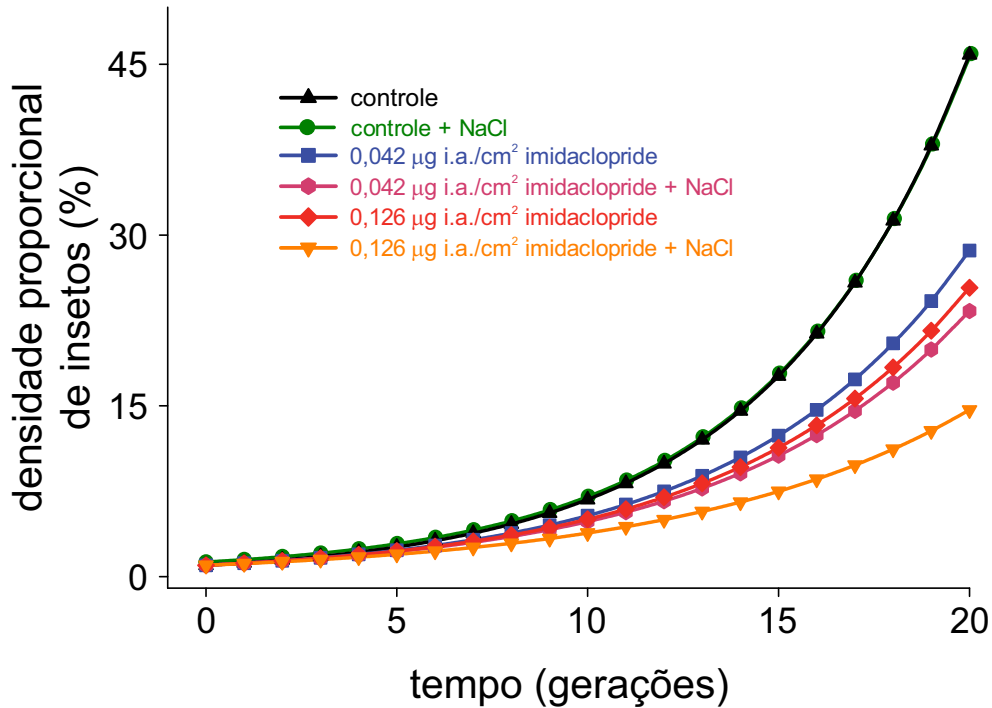


Figura 2.4: Projeção do crescimento populacional de *Euschistus heros* quando expostos a dosagens subletais de resíduo seco de imidaclopride ou água destilada associados ou não a NaCl (0,05% p/v) no 5º ínstar ninfal com base em um modelo de matriz estruturada por idade. A densidade populacional inclui todos os estádios de desenvolvimento da espécie (ovo, ninfa e adulto).

## 2.4 Discussão

Os resultados desse estudo sugerem que NaCl associado a concentrações subletais de imidaclopride (com base na dosagem de campo usada para controle de insetos adultos) reduzem o potencial reprodutivo de *E. heros* quando esta espécie é exposta no 5º ínstar ninfal. Além disso, essas soluções reduzem a estimativa de crescimento populacional por afetarem diretamente a sobrevivência e o desenvolvimento de cada estágio de vida deste artrópode.

Trabalhos anteriores já demonstraram a toxicidade de imidaclopride a ninfas de pentatomídeos e, além disso, essa molécula é reportada por afetar o comportamento alimentar e sobrevivência nesta família de insetos (Cock et al. 1996, Torres et al. 2004, Malaquias et al. 2014, Aigner et al. 2015, Qu et al. 2015, Fernandes et al. 2016). Ninfas possuem mais enzimas digestivas comparado a insetos adultos devido à alta demanda energética para seu desenvolvimento (Soyelu et al. 2007). Nesta investigação, imidaclopride pode ter influenciado na redução dessas enzimas devido suas propriedades anti-alimentares

e, conseqüentemente, na capacidade de ninfas de *E. heros* obterem recursos para seu desenvolvimento e no seu equilíbrio hormonal, afetando potencialmente a última ecdise e o *output* reprodutivo da espécie (Nauen et al., 1998, Gerami et al., 2005). Em adição, NaCl associado a molécula inseticida pode potencializar esses efeitos e resultar em um decréscimo mais acentuado nos parâmetros reprodutivos e na estimativa de crescimento populacional, visto que essa molécula fagocitante induz a permanência e maior contato desses indivíduos em áreas tratadas com inseticida (Corso 1990; Corso e Gazzoni 1998).

Dosagens subletais de imidaclopride provocam distúrbios reprodutivos e redução da taxa de crescimento populacional quando atingem estágios juvenis de subordens de hemipteros (Ayyanath et al. 2013, Qu et al. 2015, Rashki et al. 2015, Fernandes et al. 2016). Aqui, elucidamos que esse inseticida influencia negativamente esses fatores em *E. heros*, uma das mais importantes pragas agrícolas da subordem Heteroptera.

Houve severa redução na fertilidade e na fecundidade (Figura 2.2, Figura 2.3) da geração que sofreu exposição com NaCl associado ou não a concentrações subletais de imidaclopride, parâmetros mais importantes em estudos com concentrações subletais de agroquímicos devido a influência direta na demografia populacional (Stark et al., 2004, Biondi et al., 2013). De modo semelhante, estudos anteriores também relataram essa drástica redução na fecundidade e na fertilidade de hemipteros expostos a concentrações subletais de imidaclopride, comprometendo potencialmente sua dinâmica populacional (Lashkari et al., 2007, Boina et al., 2009, Bao et al., 2009). Na nossa investigação, esse fenômeno pode ser explicado pelo fato da solução inseticida estimular uma adaptação neuronal desses organismos expostos e isso implicar diretamente na estratégia reprodutiva de *E. heros* visto o estresse alimentar passado pelo indivíduo no último ínstar ninfal, que implica diretamente na dinâmica populacional (Agatz et al., 2013, 2014, Nyman et al., 2013). Todavia, pode haver um *trade-off* e nas gerações posteriores essa influência negativa ser revertida e proporcionar ganhos reprodutivos à espécie (Ayyanath et al. 2013).

Nossos resultados mostraram que o comportamento reprodutivo e a estimativa de crescimento populacional de *E. heros* é drasticamente reduzida quando expostos no 5º ínstar ninfal a concentrações subletais de imidaclopride associadas ou não a NaCl. Esse resultado é uma ferramenta importante para compor o MIP (Manejo Integrado de Pragas)

desta espécie, sugerindo que táticas de amostragem para a aplicação de calda inseticida com associação de NaCl no controle de *E. heros* em campos de produção considerem o número de ninfas de 5º ínstar, visto que há um significativo decréscimo populacional da espécie. Não obstante, estudos acerca do impacto dessas soluções na fisiologia desses processos e na dinâmica populacional desta espécie em campos de produção são necessárias para elucidar esse comportamento com as intempéres climáticas encontradas nesses ambientes. Além disso, estudos com gerações posteriores à F1 são necessários para que se elucide se existe um *trade-off* e essa perda reprodutiva seja revertida nesta espécie.

## 2.5 Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Agradeço aos estagiários Mateus Campos, Sarah Miranda e Carolyne Espósito pela enorme ajuda nos experimentos.

## 2.6 Referências

Agatz, A., Ashauer, R., Brown, C. D. (2014) Imidacloprid perturbs feeding of *Gammarus pulex* at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 648 – 653.

Agatz, A., Cole, T. A., Preuss, T. G., Zimmer, E., Brown, C. D. (2013) Feeding inhibition explains effects of imidacloprid on the growth, maturation, reproduction, and survival of *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 47, 2909 – 2917.

Aigner, J., Walgenbach, J., Kuhar, T. (2015) Toxicities of Neonicotinoid Insecticides for Systemic Control of Brown Marmorated Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae) in Fruiting Vegetables. *Journal of Agricultural and Urban Entomology* 31, 70 – 80.

Ayyanath, M. M., Cutler, G. C., Scott-Dupree, C. D., Sibley, P. K. (2013) Transgenerational Shifts in Reproduction Hormesis in Green Peach Aphid Exposed to Low Concentrations of Imidacloprid. *PLoS ONE* 8, 1–9.

Biondi, A., Zappalà, L., Stark, J. D., Desneux, N. (2013) Do Biopesticides Affect the Demographic Traits of a Parasitoid Wasp and Its Biocontrol Services through Sublethal Effects? *PLoS ONE* 8, 1 – 11.

Boina, D. R., Onagbola, E. O., Salyani, M., Stelinski, L. L. (2009) Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Management Science* 65, 870 – 877.

Borges, M., Laumann, R., Silva, C., Moraes, M., Santos, H., Ribeiro, D. (2006) Metodologias de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera: Pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos 18 p.

Celestino, D., Braoios, G. I., Ramos, R. S., Gontijo, L. M., Guedes, R. N. C. (2014) Azadirachtin-mediated reproductive response of the predatory pirate bug *Blaptostethus pallescens*. *BioControl* 59, 697 – 705.

Cock, A., Clercq, P., Tirry, L., Degheele, D. (1996) Toxicity of Diafenthiuron and Imidacloprid to the Predatory Bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology* 25, 476 – 480.

Corso, I. C. (1990) Uso de sal de cozinha na redução da dose de inseticida para controle de percevejos da soja. (EMBRAPA-CNPQSO. Comunicado Técnico, 45), 7p.

Corso, I., Gazzoni, D. (1998) Sodium chloride: an insecticide enhancer for controlling pentatomids on soybeans. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33, 1563 – 1571.

Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J. M. (2007) The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology* 52, 81 – 106.

Fernandes, M. E., Alves, F. M., Pereira, R. C., Aquino, L. A., Fernandes, F. L., Zanuncio, J. C. (2016) Lethal and sublethal effects of seven insecticides on three beneficial insects in laboratory assays and field trials. *Chemosphere* 156, 45 – 55.

Gerami, S., Jahromi, K., Ashouri, A., Rasoulilian, G., Heidari, A. (2005) Sublethal effects of imidacloprid and pymetrozine on the life table parameters of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 70, 779 – 785.

Ghimire, N., Woodward, R. T. (2013) Under- and over-use of pesticides: An international analysis. *Ecological Economics* 89, 73 – 81.

Guedes, R. N. C., Cutler, G. C. (2014) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Management Science* 70, 690 – 697.

Guedes, R. N. C., Smagghe, G., Stark, J., Desneux, N. (2016) Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annual Review of Entomology* 61, 43–62.

Haddi, K., Mendes, M. V., Barcellos, M. S., Lino-Neto, J., Freitas, H. L., Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E. (2016) Sexual Success after Stress? Imidacloprid-Induced Hormesis in Males of the Neotropical Stink Bug *Euschistus heros*. *PLoS ONE* 11, 1–18.

Jeschke, P., Nauen, R., Beck, M. E. (2013) Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 9464 – 9485.

Kim, D. S., Brooks, D. J., Riedl, H. (2006) Lethal and sublethal effects of abamectin, spinosad, methoxyfenozide and acetamiprid on the predaceous plant bug *Deraeocoris brevis* in the laboratory. *BioControl* 51, 465 – 484.

Lashkari, M. R., Sahragard, A., Ghadamyari, M. (2007) Sublethal effects of imidacloprid and pymetrozine on population growth parameters of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* on rapeseed, *Brassica napus* L. *Insect Science* 14, 207 – 212.

Macfadyen, S., Hardie, D. C., Fagan, L., Stefanova, K., Perry, K. D., DeGraaf, H. E., Holloway, J., Spafford, H., Umina, P. A. (2014) Reducing Insecticide Use in Broad-Acre Grains Production: An Australian Study. *PLoS ONE* 9, 1 – 13.

Malaquias, J. B., Ramalho, F. S., Omoto, C., Godoy, W. A. C., Silveira, R. F. (2014) Imidacloprid affects the functional response of predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) to strains of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) on Bt cotton. *Ecotoxicology* 23, 192 – 200.

Nauen, R., Tietjen, K., Wagner, K., Elbert, A. (1998) Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Pest Management Science* 52, 53 – 57.

Nyman, A. M., Hintermeister, A., Schirmer, K., Ashauer, R. (2013) The Insecticide Imidacloprid Causes Mortality of the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex* by Interfering with Feeding Behavior. *PLoS ONE* 8, 1 – 13.

Panizzi, A. R. (2013) History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. *Neotropical Entomology* 42, 119 – 127.

Panizzi, A. R., Bueno, A. F., Silva, F. A. C. In *Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga*; Hoffman-Campo, C. B., Corrêa-Ferreira, B. S., Moscardi, F., Eds.; EM-BRAPA, 2012; Chapter Insetos que atacam vagens e grãos, pp 335–420.

Panizzi, A. R., Corrêa-Ferreira, B. S. (1997) Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. *Trends in Entomology* 1, 71–88.

Qu, Y., Xiao, D., Li, J., Chen, Z., Biondi, A., Desneux, N., Gao, X., Song, D. (2015) Sublethal and hormesis effects of imidacloprid on the soybean aphid *Aphis glycines*. *Ecotoxicology* 24, 479 – 487.

Rashki, M., Talepour, F., Shirvani, A. (2015) Sub-lethal effect of combination of *Metarhizium anisopliae* and imidacloprid on life table of *Myzus persicae* (Hem.: Aphididae). *Journal of Crop Protection* 4, 577 – 587.

Saluso, A., Xavier, L., Silva, F., Panizzi, A. R. (2011) An invasive pentatomid pest in Argentina: Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology* 40, 704 – 705.

Santos, M. F., Santos, R. L., Tomé, H. V. V., Barbosa, W. F., Martins, G. F., Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E. (2016) Imidacloprid-mediated effects on survival and fertility of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Journal of Pest Science* 89, 231 – 240.

Silva, F., Calizotti, G., Panizzi, A. R. (2011) Survivorship and Egg Production of Phytophagous Pentatomids in Laboratory Rearing. *Neotropical Entomology* 40, 35 – 38.

Sosa-Gomez, D. R., Silva, J. J. (2010) Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Parana, Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 45, 767 – 769.

Sosa-Gomez, D. R., Silva, J. J., Lopes, I. D. O. N., Corso, I. C., Almeida, A. M., Moraes, G. C. P., Baur, M. E. (2009) Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology* 102, 1209 – 1216.

Soyelu, O., Akingbohunge, A., Okonji, R. (2007) Salivary glands and their digestive enzymes in pod-sucking bugs (Hemiptera: Coreoidea) associated with cowpea *Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* in Nigeria. *International Journal of Tropical Insect Science* 27, 40 – 47.

Stark, J. D., Banks, J. E., Vargas, R. (2004) How risky is risk assessment: The role that life history strategies play in susceptibility of species to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 732 – 736.

Torres, J. B., Ruberson, J. R. (2004) Toxicity of thiamethoxam and imidacloprid to *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) nymphs associated to aphid and whitefly control in cotton. *Neotropical Entomology* 33, 99 – 106.

Yin, J. L., Xu, H. W., Wu, J. C., Hu, J. H., Yang, G. Q. (2008) Cultivar and Insecticide Applications Affect the Physiological Development of the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). *Environmental Entomology* 37, 206 – 212.

## Considerações finais

A associação de NaCl a dosagens subletais de imidaclopride incrementa a mortalidade de *E. heros* na fase inicial de vida adulta. Apesar disso, esses insetos conseguem superar o estresse da calda inseticida com NaCl e aumentar o potencial reprodutivo, depositando um maior número de ovos e, conseqüentemente, obtendo maior número de ninfas durante toda a vida da fêmea.

A exposição de ninfas de 5º ínstar de *E. heros* a dosagens subletais de imidaclopride associado a NaCl ou não é capaz de reduzir drasticamente o potencial reprodutivo e a estimativa de crescimento populacional desses indivíduos.

Apesar de preliminar, este estudo traz uma implicação prática para o manejo de *E. heros*. Quando for realizada pulverização com NaCl na calda inseticida, a tomada de decisão deve levar em conta o número de indivíduos no último estágio ninfal, visto a eficácia de manejo comparada à adultos.