

MARCOS VINÍCIUS MENDES

**TOXICIDADE E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS NO  
PERCEVEJO-MARROM-DA-SÓJA DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO  
POR CONTATO A IMIDACLOPRIDE**

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: 27 de fevereiro de 2015.

---

Nelsa Maria Pinho Guedes

---

Eliseu José Guedes Pereira

---

Haddi Khalid  
(Coorientador)

---

Eugênio Eduardo de Oliveira  
(Orientador)

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

T

M538t  
2015  
Mendes, Marcos Vinícius, 1991-  
Toxicidade e alterações comportamentais no  
percevejo-marrom-da-soja decorrentes da exposição por contato  
a imidaclopride / Marcos Vinícius Mendes. – Viçosa, MG, 2015.  
ix, 29f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Percevejo (Inseto) - Controle. 2. *Euschistus heros* -  
Comportamento. 3. *Euschistus heros* - Reprodução.  
4. Pesticida -Toxicologia. 5. Soja - Doenças e pragas - Controle.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 595.754

# Agradecimentos

A Deus, pela vida.

Aos meus pais, à minha família, em especial minha irmã Tereza Mendes e meu cunhado Antônio Tiago, pela confiança, apoio em todos os anos de minha vida.

A todos os meus amigos. Aos que conheci durante o mestrado, aos que me acompanham desde a infância e ainda aos que conheci durante a graduação e estarão para sempre ao meu lado. Um agradecimento especial a Felipe Couto e Tiago Toledo, pela convivência, paciência e principalmente por terem sido minha família.

Ao Prof. Eugênio E. de Oliveira pela orientação, paciência e credibilidade nesses dois últimos anos.

Ao Dr. Khalid Haddi pela colaboração, apoio, disponibilidade e companheirismo em todo o trabalho.

Ao Prof. Raul Guedes pelo carinho e por ceder equipamentos e infraestrutura para a realização deste trabalho e ainda a todos os colegas do Laboratório Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Insetos.

À Capes, Fapemig, CNPQ e Funarbe pelo financiamento dos estudos e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade.

A todos do Laboratório de Neurofisiologia e Neurobiologia de Invertebrados, em especial à Caique Hudson, e Gabryele Ramos pela ajuda na execução dos experimentos e coleta de dados.

E por último, mas não menos importante, aos percevejos, que tem grande participação e relevância nesse trabalho.

# Conteúdo

Lista de Tabelas . . . . .	v
Lista de Figuras . . . . .	vi
Resumo . . . . .	vii
Abstract . . . . .	viii
1. Introdução . . . . .	1
2. Materiais e métodos . . . . .	3
3. Resultados . . . . .	8
4. Discussão . . . . .	11
Conclusões gerais . . . . .	16
Referências . . . . .	17

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Toxicidade de imidaclopride no percevejo-marron-da-soja *Euchistus heros* em adultos, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> instar. Os valores das concentrações letais (CL) foram estimados baseados nos bioensaios de concentração-mortalidade usando análise de Probit. Concentrações são expressas em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  i.a.

**Tabela 2.** Porcentagem de *E. heros* com dificuldade de locomoção e estado normal, expostos a doses letais e subletais do inseticida imidaclopride. Dificuldade de locomoção = somatório das porcentagens de indivíduos com os comportamentos: Caminhanado Lentamente e Caminhando Após Estímulo.

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Tempo de latência (A) e tempo de corte (B) em adultos recém emergidos de *E. heros* exposto à concentração subletal do inseticida neonicotinóide imidaclopride (0,01% dose de campo recomendada) por 48 horas. Tempo de latência (OneWay Anova,  $P = 0,433$ ). Tempo de corte (Tukey's HSD Test,  $P = 0,017$ ).

**Figura 2.** Número (A) e tempo de cópula (B) em adultos recém emergidos de *E. heros* exposto à dose subletal do inseticida neonicotinóide imidaclopride (0,01% dose de campo recomendada) por 48 horas. Número de cópulas (OneWay Anova,  $P = 0,656$ ). Tempo de cópula (Tukey's HSD Test,  $P = 0,030$ ).

**Figura 3.** Mortalidade de machos (A) e fêmeas de adultos (B) recém emergidos de *E. heros* exposto à dose subletal do inseticida neonicotinóide imidaclopride (0,01% dose de campo recomendada) por 48 horas ao longo de 90 dias após o acasalamento.

**Figura 4.** Número de posturas (A) e ovos depositados (A) por dia por fêmeas de adultos recém emergidos de *E. heros* exposto à dose subletal do inseticida neonicotinóide imidaclopride (0,01% dose de campo recomendada) por 48 horas ao longo de 90 dias após o acasalamento.

**Figura 5.** Número total de ovos depositados (A) e o número total de indivíduos emergidos (B) por fêmeas de adultos recém emergidos de *E. heros* exposto à dose subletal do inseticida neonicotinóide imidaclopride (0,01% dose de campo recomendada) por 48 horas ao longo de 90 dias após o acasalamento.

# Conteúdo

## Resumo

MENDES, Marcos Vinícius, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Toxicidade e alterações comportamentais no percevejo-marron-da-soja decorrentes da exposição por contato a imidaclopride.** Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira. Coorientador: Haddi Khalid.

*Euschistus heros* tem se destacado como um dos percevejos que mais causa danos em cultivos de soja no Brasil. Estes insetos podem causar vários danos à plantação, pois são fitófagos e utilizam de um estilete que possuem no aparelho bucal para sugar seiva da planta, afetando o desenvolvimento e a qualidade da semente, podendo ainda transmitir microrganismos. O controle desta praga, ainda baseia-se fortemente no uso extensivo de inseticidas de ação neurotóxica como organofosforados e, mais recentemente, neonicotinóides e piretróides. Estudos sobre a toxicidade de neonicotinóides (aplicados isoladamente ou em mistura) em *E. heros* já tem sido objeto de investigações. Entretanto, estudos com o objetivo de compreender os efeitos colaterais da exposição subletal de inseticidas a *E. heros* ainda são completamente negligenciados. Doses subletais de neonicotinóides e piretróides são conhecidas por causar perturbações em padrões comportamentais chaves em insetos, que consequentemente podem conduzir a desordens na dinâmica populacional destes animais. Portanto, este trabalho foi conduzido com os objetivos de avaliar a toxicidade do imidaclopride e uma possível potencialização desta toxicidade mediante adição de sal de cozinha, bem como averiguar distúrbios reprodutivos e comportamentais causados por exposição subletal de *E. heros* a este inseticida. Neste contexto adultos sexualmente imaturos de *E. heros* foram expostos a concentrações subletais de imidaclopride e os comportamentos locomotores e de acasalamento bem como, parâmetros reprodutivos deste animais foram avaliados. As curvas de concentração-mortalidade obtidas dos bioensaios para todos os instares estudados e demonstraram que o inseticida apresenta maior toxicidade ao às ninfas de 4º instar quando na presença do sal de cozinha. Os estudos envolvendo distúrbios comportamentais antes e depois do acasalamento demonstraram que fêmeas tratadas, quando acasaladas com machos não-tratados, tiveram um menor tempo de corte um maior tempo de cópula, mostrando que possíveis essas alterações podem ser resposta da exposição à doses subletais de imidaclopride, alterações tais que podem acarretar a longo prazo, em

um queda na taxa reprodutiva desses indivíduos. Quanto aos estudos sobre a desempenho reprodutivo, apesar de um aumento no tempo de cópula, essas fêmeas tratadas que foram acasaladas com machos não-tratados apresentaram uma queda no número de posturas por dia e a ausência de um pico de oviposição. Quando comparados quanto ao número de ovos colocados por dia todos os indivíduos tratados com doses subletais de imidaclopride possuíram uma queda no número de ovos colocados por dia, todos os tratamentos com a presença de dose subletal de inseticida tiveram alterações, sendo que os tratamentos em que fêmeas e machos foram tratados e quando somente fêmeas foram tratadas tiveram um pico de oviposição significativamente menor e com certo atraso na ocorrência quando comparados ao controle. Esses resultados mostram a necessidade de mais estudos acerca das alterações causadas por doses subletais de inseticida em pentatomídeos e também em outros insetos. A compreensão minuciosa de como as exposições subletais a inseticidas alteram padrões comportamentais de insetos contribui, em última análise, para um manejo de praga mais eficiente.

## Abstract

MENDES, Marcos Vinícius, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Toxicity and behavioral changes in brown stink bug from exposure by imidacloprid contact.** Advisor: Eugênio Eduardo de Oliveira. Co-advisor: Haddi Khalid.

*Euschistus heros* has emerged as one of the bugs that causes more damage to soybean crops in Brazil. These insects can cause various crop damage because they are phytophagous and use of a stylus having their mouthparts to suck sap of the plant, affecting the development and seed quality, and may transmit microorganisms. The control of this pest, still relies heavily on the extensive use of neurotoxic insecticides such as organophosphates and, more recently, neonicotinoids and pyrethroids. Studies on the toxicity of neonicotinoid (used alone or in mixture) in *E. heros* has been the object of investigations. However, studies in order to understand the side effects of sublethal exposure to insecticides *E. heros* are still quite neglected. Sublethal doses of pyrethroids and neonicotinoids are known to cause disturbances in key insect behavioral patterns, which in turn can lead to disorders in the population dynamics of these animals. Therefore, this study was conducted with the objective to evaluate the toxicity of imidacloprid, a possible potentiation of this toxicity by adding table salt and determine reproductive and behavioral disorders caused by sublethal exposure of *E. heros* to this insecticide. In this context sexually immature adults of *E. heros* were exposed to sublethal concentrations of imidacloprid and locomotor behavior and mating and reproductive parameters, this animals were evaluated. The curves of concentration-mortality for all the studied instars and demonstrated that the insecticide presents higher toxicity to the 4th instar nymphs in the presence of table salt. Studies involving behavioral disturbances before and after mating treated females showed that when mated with untreated males have a shorter cutting time a longer coupling, showing potential responses of physiological changes caused by sublethal doses imidacloprid, such changes that may result in a decrease in the reproductive rate of these individuals, changes in the morphology of the reproductive system of males and females can influence throughout the life cycle. As for studies on reproductive performance, despite an increase in mating time, these treated females that were mated with untreated males showed a drop in the number of eggs per day

and the absence of a peak of oviposition. When compared to the number of eggs laid per day all subjects treated with sublethal doses of imidacloprid owned a drop in the number of eggs laid per day, all treatments with the presence of sublethal dose of insecticide had changes, the treatments that females and males were treated and when only females were treated peaked significantly lower oviposition and with some delay in the occurrence compared to controls. These results show the need for more studies about the changes caused by sublethal doses of insecticide in pentatomids and also in other insects. A thorough understanding of how to sublethal exposure to pesticides alter behavioral patterns of insects contributes ultimately to a more efficient pest management.

# 1. Introdução

A cultura da soja (*Glycine max L.*) tem apresentado várias problemas com ataque de pragas durante todo o ciclo. Dentre as diversas pragas, um pentatomídeo tem se destacado como uma dos principais causadores de injúrias ao desenvolvimento e produtividade da cultura, o *Euschistus heros* (Fabr., 1974) (Gallo *et al.*, 2002). Incidências dessa praga tem aumentado nos últimos anos, reduzindo a produtividade das lavouras ou diminuindo a quantidade e/ou a qualidade dos grãos (Panizzi *et al.*, 2014).

O percevejo-marrom-da-soja, como é conhecido popularmente (Panizzi, 2004), durante o desenvolvimento, apresenta cinco ecdises até o inseto atingir a fase adulta (Costa lima, 1940) e mede aproximadamente 13 mm de comprimento (11 a 15 mm). Enquanto adulto apresenta coloração marrom-escura ou avermelhada. Possui dois prolongamentos laterais no protórax em forma de espinhos pontiagudos e uma mancha branca típica em forma de “meia-lua” na extremidade do escutelo, o que facilita a identificação. Os ovos podem ser amarelos, verde-claros ou beges e são normalmente depositados em massas de 6 a 15 unidades, dispostas em duas ou três fileiras paralelas (Degrande e Vivan, 2009).

O hábito de se alimentar diretamente dos grãos afeta o rendimento e a qualidade das sementes. O ataque constante destes insetos diminui ainda o número de sementes e, em menor escala, o número de vagens por planta e o número de sementes por vagem de soja. A transmissão de microrganismos como, por exemplo, a inoculação de fungos pelos pentatomídeos, também pode ocorrer juntamente com os danos diretos causados nas sementes de soja (Panizzi e Slansky,1985).

Uns dos inseticidas mais utilizados atualmente são os neonicotinóides. Foram desenvolvidos nos anos 90 e são registrados para o uso em uma ampla variedade de culturas e muito eficazes contra insetos sugadores (Fairbrother *et al.*, 2014). Este grupo de inseticida possui moléculas relativamente pequenas e são altamente solúvel em água. Após a absorção pela planta, este composto e os seus metabólitos circulam (principalmente através do xilema) ao longo de tecidos de plantas e proporcionam um período de proteção contra uma série de insetos (Nauen e Elbert, 2003;. Magalhães *et al.*, 2008). São neurotoxinas sintéticas que atuam como agonistas dos receptores

de acetilcolina e possuem a capacidade de alterar as funções normais do sistema nervoso de insetos (Matsuda *et al.*, 2001). No Brasil, a aplicação de neonicotinóides tem aumentado consideravelmente nos últimos anos porque esses compostos foram utilizados para substituir as aplicações de inseticidas com ação a longo prazo. Os neonicotinóides tornaram-se os inseticidas mais comuns utilizados para controlar o percevejo-marrom-da-soja, *E. heros* (Sosa-Gómez *et al.*, 2006).

No entanto, a sustentabilidade do uso de neonicotinóides é fortemente dependente de seu uso adequado. O uso inadequado desses compostos tem posto em risco a saúde humana e causado problemas ambientais. Conseqüentemente, tem sido crescente o interesse no desenvolvimento de estratégias alternativas para o manejo de insetos-praga (Kogan, 1998). Aplicações indiscriminadas de inseticidas podem levar a perda de biodiversidade, alterações no funcionamento da biota local, a seleção de populações resistentes ao inseticida, ressurgimento e/ou surtos de pragas de insetos, e grande mortalidade de organismos não-alvo, incluindo os seres humanos (Quarcoo *et al.*, 2014). Na última década, as preocupações em relação ao destino ambiental e efeitos destes compostos, incluindo persistência no solo, efeitos sobre as espécies polinizadoras e outros organismos não-alvo, foram associadas com a generalizada utilização destes pesticidas sintéticos (Goulson, 2013).

Os estudos acerca dos efeitos de pesticidas em invertebrados têm aumentado cada vez mais em todo o mundo (Thompson, 2003). Estudos demonstrando os potenciais impactos negativos sobre organismos não-alvo levou a grande preocupação sobre o seu impacto ambiental (Goulson, 2013). Os efeitos subletais sobre a fisiologia e comportamento de insetos expostos a esses compostos tem atraído grande atenção de pesquisadores recentemente (Guedes e Cutler, 2014).

Durante muito tempo, o método para estimar os efeitos secundários dos produtos químicos para artrópodes foi determinar uma dose letal (DL<sub>50</sub>) ou concentração letal (CL<sub>50</sub>) estimada (Croft, 1990). Porém com o aumento na demanda pelo uso desses produtos e o aumento nos estudos sobre os efeitos de tais no ambiente (Ferrari, 1986) tem-se uma grande necessidade de maiores estudos acerca de efeitos não letais. Os efeitos subletais são definidos como efeitos fisiológicos e/ou comportamentais em indivíduos expostos a concentrações menos elevadas de um composto tóxico (Guedes e Cutler, 2014). Estes efeitos podem desencadear uma série de alterações

em características de história de vida chaves para o organismo, tais como: tempo de vida, a taxa de desenvolvimento, reprodução e outros (Desneux *et al.*, 2004, 2006; Biondi *et al.*, 2012; Planes *et al.*, 2013; Saber e Abedi, 2013; Bengochea *et al.*, 2014). Tendo consequências, sem dúvida, importantes ao nível populacional dos indivíduos expostos (Stark e Banks, 2003; Stark *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2012; Biondi *et al.*, 2013).

Para inseticidas sistêmicos, os efeitos subletais podem até ser mais prejudiciais do que efeitos letais sobre os inimigos naturais (Zotti *et al.*, 2013; Gontijo *et al.*, 2014). Efeitos subletais podem comprometer a ecologia de indivíduos que são importantes para o equilíbrio de ecossistemas naturais ou manejados (Biondi *et al.*, 2012, 2013).

É interessante destacar que além da recomendação dos diversos inseticidas utilizados para controlar estes percevejos pragas, alguns trabalhos tem apontado que a adição de sal de cozinha (0,5%) à calda de organofosforados propicia uma redução de 50% da dose do inseticida, sem que ocorra prejuízo da eficiência de controle (Avila, 2014). O sal de cozinha (NaCl) é potencializador do efeito de inseticidas em pentatomídeos e ainda podem controlar essas pragas dos grãos (Corso e Gazzoni, 1998), podendo ainda ter um efeito atrativo dos insetos na planta, levando-os a estarem em contato com o inseticida por maior tempo (Corso, 1990). Porém, o efeito sinérgico da adição do sal de cozinha ainda requer estudos que venham a esclarecer como ocorre esse fenômeno e o porquê dele acontecer somente para alguns grupos de inseticidas.

Frente a todas essas informações, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito do inseticida imidaclopride sobre *E. heros* e ainda avaliar os efeitos da exposição por contato ao inseticida em concentrações subletais na reprodução e ciclo de vida desses insetos.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Os insetos**

A colônia inicial de *E. heros* foi estabelecida a partir de 1200 ovos cedidos pelo Laboratório de Semioquímicos, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília,

Distrito Federal, Brasil). A colônia foi iniciada a partir desses indivíduos e criada em condições controladas ( $27 \pm 2$  ° C,  $75 \pm 5\%$  de umidade relativa, com um L: D fotoperíodo de 14:10 h) para prevenir diapausa. Todos os estádios de desenvolvimento de *E. heros* foram conduzidos baseados em métodos anteriormente estabelecidos (Borges , 2008; Silva *et al.*, 2008). Para aumentar a variabilidade genética indivíduos dos insetos utilizados nos experimentos, foram recolhidos exemplares em campo de fazendas de soja na região de Tangará da Serra (Mato Grosso, Brasil), de campos experimentais de soja na Universidade Federal de Viçosa na cidade de Viçosa (Minas Gerais, Brasil) e rotineiramente introduzidos na população do laboratório.

## **2.2. O inseticida**

O inseticida utilizado neste trabalho foi imidaclopride em formulação comercial, um inseticida neonicotinóide (grânulos solúveis em água a 700 g ingrediente ativo (i.a.)/ litro; Bayer CropScience, São Paulo, SP, Brasil), tendo os cálculos de dosagem subletais sendo baseados na dose de campo recomendada (750mg de inseticida/200l de calda).

## **2.3. Toxicidade e efeito subletal**

Para definir a concentração considerada subletal para *E. heros* foram realizados experimentos de toxicidade em indivíduos adultos e ninfas de 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> instar. Grupos de 10 insetos recém-emergidos (com no máximo 24 horas de ecdise do instar respectivo) eram acondicionados em frascos de vidros (250ml , EME Equipment, Paulicéia, SP, Brasil). As paredes internas destes frascos eram previamente recobertos com 2 ml de solução inseticida (concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 a 3 vezes a concentração recomendada para aplicação a campo [3,75 mg de inseticida/L de calda] e deixadas secar homoganeamente. Os frascos foram secos com o auxílio de um rotor, com circulação de ar através de um ventilador, com o tempo médio de secagem 2h para cada experimento. Após a secagem, foi colocada uma camada de teflon na borda superior dos frascos para evitar a fuga dos indivíduos, a vedagem dos frascos

foi feita com organza (8X8cm) fixada com um elástico. Os insetos depositados em cada um dos frascos foram avaliados após 1 hora de exposição e posteriormente a cada 6 horas num período de 48 horas, após este período foram avaliados somente a cada 24 horas (72 - 96 horas). Em cada uma das avaliações foram descritos a mortalidade e os comportamentos dos insetos no momento da avaliação. Um controle utilizando somente água destilada e deionizada foi utilizada. Foram realizados 10 repetições de cada tratamento, totalizando 800 insetos (100 insetos em cada uma dos concentrações testadas).

#### **2.4. Adição de sal**

Foi realizado posteriormente outro experimento afim de avaliar a influencia da adição de sal na ação de inseticida. O experimento foi conduzido de forma semelhante ao realizado anteriormente para definir a toxicidade e dose subletal. As concentrações de inseticida foram acrescidas de 0,50 g de sal de cozinha (NaCl) a cada 100 ml da solução de inseticida. Como controle foram utilizados um tratamento contendo água (destilada e deionizada) + sal de cozinha, no mesmo volume ao dos experimentos então realizados e outra somente água (destilada e deionizada). O mesmo número de insetos foi utilizado nesse experimento. Os insetos tratados foram avaliados após 1 hora de exposição e posteriormente avaliados após 24 e 48 horas de exposição. A cada avaliação foram descritos a mortalidade e os comportamentos realizados pelos insetos no momento da avaliação.

#### **2.5. Análise comportamental**

Para avaliar as alterações comportamentais decorrentes da exposição subletal à imidaclopride, em todas as avaliações dos experimentos foram anotados os comportamentos observados no momento da análise. Os comportamentos foram categorizados em: estado normal, posição soerguida, caminhando lentamente, caminhando após estímulo, tremulação das patas, imóvel e morto. Após uma análise parcial dos resultados os comportamentos com maior porcentagem de alteração foram analisados

por estatística descritiva, sendo eles: caminhando lentamente e caminhando após estímulo. Os mesmos foram então reunidos e categorizados como dificuldade na locomoção.

## 2.6 Comportamento de acasalamento

Os bioensaios seguiram métodos que foram adaptados de estudos realizados com percevejos em frascos de vidro (Willrich *et al.*, 2003, Snodgrass *et al.*, 2005). Machos e fêmeas recém emergidas (<24h) foram coletados na criação de laboratório e eram expostos ou a dosagem subletal (0.042 µg de i.a/cm<sup>2</sup>, equivalente a 1% da concentração recomendada para aplicação a campo) de imidaclopride ou a água destilada (controle). A exposição seguiu os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Quatro tratamentos com imidaclopride foram estabelecidos: ♀ e ♂ tratados, ♀ tratadas e ♂ não-tratados, ♀ não-tratadas e ♂ tratados, ♀ e ♂ não-tratados. 20 casais para cada tratamento foram utilizados. Após o período de exposição (48h), os insetos foram depositados em potes forrados com papel para controlar a umidade, contendo uma mistura de vagens frescas de feijão verde (*Phaseolus vulgaris* L.), sementes de soja seca (*Glycine max* L.), amendoim sem casca (*Arachis hypogaea* L.) e sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.), com suprimentos reabastecidos a cada 3 dias, sendo observados, efetuado a troca de alimento e limpeza do pote de criação. No décimo dia após a exposição ao inseticida, os insetos foram depositados em placas de Petri de vidro (13,5cm diâmetro) forradas com papel filtro limpo colados por meio de solução de cola (30%) com água (70%). Os indivíduos foram separados em casais de acordo com os tratamentos descritos acima e filmados por 13 horas. Os seguintes parâmetros foram observados: tempo de latência, tempo de corte, tempo de cópula, número de cópulas. Ao todo foram 25 repetições para cada tratamento, totalizando 200 indivíduos utilizados em todos os experimentos.

## 2.6. Sobrevivência e desempenho reprodutivo

A fim de avaliar as alterações decorrentes da exposição a concentração subletal de imidaclopride na reprodução e ciclo de vida desses organismos, foram separados

outros 80 casais (20 para cada tratamento descrito acima). Tanto a exposição ao inseticida como o período que antecedeu a cópula e o período que os casais ficaram juntos foi semelhantes aos descritos acima. Somente os casais que copularam pelo menos uma vez ao longo das 13 horas foram utilizados no experimento. Após as filmagens os casais foram novamente separados e colocados individualmente em placas de Petri de poliestireno (9,2cm diâmetro) forradas com papel para controlar a umidade, contendo vagens frescas de feijão verde (*Phaseolus vulgaris* L.), sementes de soja seca (*Glycine max* L.), amendoim sem casca (*Arachis hypogaea* L.) e sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) e um corte de TNT (3x3 cm) como local de oviposição. Os suprimentos eram reabastecidos a cada 3 dias , sendo observados, efetuado a troca de alimento e limpeza do pote de criação. Todos os indivíduos foram acompanhados diariamente e observados quanto à mortalidade, posturas e ovos colocados por dia, e ainda por emergência de imaturos. Os indivíduos foram considerados mortos quando não reagem quando estimulados com um pincel. Diariamente eram contados e anotados o número de posturas e o numero total de ovos colocados por cada fêmea em todos os tratamentos. Os ovos colocados eram depositados em formas de gelo e separados por indivíduo, tendo um local de deposição dos ovos correspondente para cada inseto, separados também por dia. As formas foram demarcadas e vedadas com papel insulfime. Diariamente contava-se para cada fêmea, o número de imaturos emergidos, após a contagem as ninfas eram descartadas.

## **2.7. Análise estatística**

As curvas de concentração-mortalidade foram estimadas nos experimentos realizados na primeira parte deste trabalho, obtidas usando o procedimento PROC PROBIT (Instituto SAS, 2008). Os comportamentos foram analisados por meio de estatística descritiva observando o comportamento mais relevante em cada tratamento ao longo do período de exposição. Os resultados do estudos do comportamento de acasalamento foram analisados pelo teste Anova One Way , seguidos do teste Tukey's HSD quando necessário, no software SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA, EUA). Os resultados do bioensaio de sobrevivência foram submetidos a análise de sobrevivência efetuada usando os estimadores de Kaplan-Meier (Log mé-

todo de classificação) com 12,0 SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA, EUA). Análises de regressão foram realizadas para reconhecer as tendências da fecundidade e fertilidade resultados diários de cada tratamento através do tempo. As premissas de normalidade e homogeneidade de variância foram verificadas, e nenhuma transformação de dados foi necessários (PROC UNIVARIATE, SAS Institute, 2008).

### **3. Resultados**

#### **3.1. Bioensaios de concentração-mortalidade**

O modelo de análise de regressão do tipo Probit foi adequado para os resultados de concentração-mortalidade ( $\chi^2 < 3,0$  e  $P > 0,05$ ). Os resultados dos bioensaios de concentração-mortalidade são apresentados na Tabela 1. Quando comparados os testes realizados com ou sem adição de sal, pôde-se constatar que ninfas de 4<sup>o</sup> instar são mais suscetíveis à ação do inseticida quando na presença de sal (razão de  $CL_{50} - \text{Inseticida} / CL_{50} - \text{Inseticida} + \text{Sal} = 3,45$ ), para adultos e ninfas de 5<sup>o</sup> os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa na adição de sal ao inseticida.

### 3.2. Análise comportamental de *E. heros* sob exposição ao imidaclopride

A cada avaliação, os insetos foram avaliados quanto à mortalidade total em cada tratamento a ainda aos seguintes comportamentos: Estado normal, Posição Soerguida, Caminhando Lentamente, Caminhando após estímulo, Tremulação das patas, Imóvel e Morto. De todos os comportamentos observados nos indivíduos, os que mais se mostraram relevantes: caminhando lentamente e caminhando após estímulo (concentrações maiores) e estado normal (concentrações menores). Este resultado mostra uma maior influência da ação do inseticida na locomoção de *E. heros*. Assim, após a análise descritiva dos comportamentos observados pode-se constatar que indivíduos de 4<sup>o</sup> instar tiveram uma maior dificuldade de locomoção após 24 horas na concentração 0,01 X da dose de campo (53%), quando na adição de sal a porcentagem de indivíduos com dificuldade de locomoção foi ainda maior (66%), ainda que numa concentração menor que a anterior, de 0,003X da dose recomendada, o mesmo se repetiu em 48 horas. Para o 5<sup>o</sup> instar, o mesmo ocorreu nas concentrações de 0,01X (72%) e com adição de sal 0,003X (62%) em 24 horas, para 48 horas, porém não houve diferença no comportamento quando comparados ao controle. Para adultos a concentração que mais atingiu o comportamento de locomoção após 24 horas foi de 0,03X da dose campo recomendada e com adição de sal foi para 0,1X (67%), já após 48 horas o mesmo se repetiu, mas somente para insetos tratados somente com o inseticida, quando o sal foi adicionado o tratamento mais eficiente para alterar esse comportamento foi de 0,03X (63%). Após essas análises pode-se perceber ação de doses subletais do inseticida, afetando a capacidade de locomoção desses pentatomídeos e ainda mais afetados quando o sal de cozinha é adicionado à mistura. A porcentagem de indivíduos considerados normais foi descrita a fim de mostrar a discrepância na porcentagem de indivíduos que tiveram sua locomoção afetada pelo inseticida com aqueles que continuaram a se locomover normalmente, tendo para esse comportamento somente as maiores porcentagem nos controles.

Após a definição da concentração subletal do inseticida imidaclopride através dos bioensaios de concentração-mortalidade para adultos foram observados os efeitos subletais em machos e fêmeas recém emergidos antes e depois do acasalamento, seus efeitos na reprodução e ciclo de vida desses indivíduos.

### 3.3. Comportamento de acasalamento

No estudo de comportamento de acasalamento, não houve diferença significativa no tempo de latência (One Way Anova,  $P = 0,433$ ), como observado na Figura 1.A. Entretanto, diferenças significativas foram encontradas no tempo de corte (One Way Anova,  $P = 0,017$ ) (Figura 1.B), onde fêmeas tratadas acasaladas com machos-não tratados tem um menor tempo de corte.

Os adultos ainda foram avaliados quanto ao número e tempo de cópula. Não houve diferença significativa no número de cópulas (OneWay Anova,  $P = 0,656$ ) em nenhum dos tratamentos estudados, como mostra a Figura 2.A. Houve uma diferença significativa no tempo total das cópulas (OneWay Anova,  $P = 0,030$ ), onde fêmeas tratadas com doses subletais de imidaclopride quando acasaladas com machos não-tratados demonstrou um tempo maior de cópula quando comparadas com os outros tratamentos (Figura 2.B).

### 3.4 Sobrevivência

Os indivíduos foram avaliados quanto à mortalidade num período de 10 dias após a exposição, sendo mantidos sob condições normais de laboratório até atingirem a maturidade sexual antes do acasalamento para estudos posteriores. A partir dessa análise pode-se constatar que machos expostos ou não ao inseticidas tratados tiveram mortalidade média de 23 %. Já fêmeas tratadas tiveram mortalidade de média 35% e fêmeas não-tratadas tiveram mortalidade média de 18% durante esse período. Entretanto, esta diferença não se manteve no período total de avaliação (90 dias), conforme demonstrado na Figura 3A. Resultados similares também foram observados para machos, Figura 3B.

### 3.5 Desempenho reprodutivo

Como demonstrado na Figura 4.A, diferenças significativas foram observadas no número de posturas depositadas por fêmeas por dia. Fêmeas quando acasaladas com machos tratados, independente de estarem ou não sob o efeito de doses subletais do inseticida demonstraram uma queda no número médio de posturas ao

longo do tempo. Estas fêmeas também mostraram um retardo no pico de posturas quando comparadas com fêmeas não-tratadas acasaladas com machos não-tratados. O pico de fêmeas tratadas (aproximadamente aos 61 dias) e fêmeas não-tratadas (aproximadamente aos 50 dias), ambas acasaladas com machos tratados tiveram um retardo significativo no pico de oviposição das posturas.

Já na Figura 4.B pode-se observar as divergências no número total de ovos depositados por fêmeas ao longo dos meses de análise do experimento, onde casais de machos e fêmeas não-tratados tem uma diferença significativa quando comparados aos tratamentos com a presença do inseticida. O tratamento contendo fêmeas tratadas acasaladas com machos não-tratados se mostrou mais eficiente no número total de ovos que os demais tratamentos contendo inseticida, porém não na mesma escala observadas para indivíduos em condições normais.

Fêmeas não-tratadas quando acasaladas apresentaram uma queda significativa no número de ovos colocados e não apresentaram um pico de oviposição ao longo do período estudado (Figura 5A). Os ovos colocados por fêmeas em todos os tratamentos avaliados foram avaliados quanto a emergência de ninfas. Na Figura 5.B temos o total de indivíduos emergidos, porém não houve diferença entre a quantidade total de ninfas emergidas ao longo dos meses de experimento nos quatro tratamentos estudados.

## 4. Discussão

A primeira parte deste trabalho avalia a toxicidade do inseticida imidaclopride e os efeitos da adição de cloreto de sódio (NaCl) no percevejo-marrom-da soja, *E. heros* foram observados decorrentes a exposição dos insetos a esses compostos. As evidências obtidas nesse estudo dão uma perspectiva maior sobre como baixas concentrações desses compostos podem atuar nos organismos-alvo e possivelmente proporcionar uma diminuição na quantidade de produtos depositados no ambiente.

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram a susceptibilidade desses organismos também a doses subletais, o que pode facilitar o manejo de tais organismos em campo. Os efeitos subletais encontrados reportam que essas respostas foram encontrados em funções fisiológicas importantes dos insetos, tais como locomoção e reprodução, alterando significativamente as funções vitais desses indivíduos.

Os distúrbios encontrados aqui no comportamento locomotor dos insetos podem estar relacionados à ação desses inseticidas no sistema nervoso dos percevejos. Trabalhos anteriores haviam sugerido que *E. heros* tinham capacidade de dispersão limitada e populações geograficamente distantes o que pode ser ainda mais afetado na presença de inseticida (Sosa-Gómez *et al.*, 2004). Com base nessas evidências, os autores sugerem que *E. heros* não dispersar bem como outras espécies de percevejos (McDermott e McDonald, 1993), tendo como base os resultados dos estudos aqui realizados pode-se inferir que esses indivíduos estariam mais sujeitos aos efeitos do inseticida ainda que em doses subletais, não necessitando de doses muito elevadas para o declínio de populações consideradas pragas.

O efeito do inseticida se mostrou diferente nos instares estudados, sendo os insetos de instares mais jovens os menos afetados com o efeito do inseticida. Trabalhos prévios demonstraram que doses subletais de inseticidas pode aumentar o stress e comprometer o sistema fisiológico ou por outro lado alterar o comportamento dos insetos (Boucias *et al.*, 1996, Hiromori e Nishigaki, 2001 e Quintela e McCoy, 1998). O conhecimento das formas jovens permite a identificação de alterações na fisiologia dos indivíduos e seu estudo reveste-se de grande importância taxonômica, ecológica e econômica, aponta Brailovsky *et al.*, (1992). Como esses insetos, quando em fase juvenil, necessitam de mais energia e ainda não possuem um organismo completamente preparado para as diversas alterações ambientais e possíveis injúrias, tendo como prioridade outros fatores, sendo assim um alvo mais vulnerável à ação do inseticida (Calow e Sibly, 1990). Estudos realizados por Cock *et al.* (1996), relatam resultados similares para quinto estágio e adultos de *P. maculiventris* através da exposição tópica e ingestão de imidacloprid. Além disso, esses autores encontraram maior toxicidade do imidacloprid para *P. maculiventris* no quinto instar por ingestão que por contato residual que apoia os resultados encontrados neste estudo, trazendo especulações de que adultos e ninfas de quinto instar estariam mais suscetíveis somente quando em contato por ingestão.

Este trabalho estudou as consequências da adição de cloreto de sódio à mistura do inseticida. De acordo com Gazzoni (1994), a adição de sal de cozinha (NaCl) na proporção de 0,5% aos inseticidas monocrotofós e endosulfan, nos tratamentos mantiveram as mesmas funções biológicas sobre as pragas. Pesquisas mostram que

o cloreto de sódio não tem ação atrativa sobre os percevejos, mas afeta o comportamento desses insetos, fazendo com que eles permaneçam mais tempo nas áreas tratadas com sal (efeito arrestante), expondo-se, conseqüentemente, por um período maior ao produto aplicado (Corso e Gazzoni, 1998; Niva e Panizzi, 1996). Corso, (1990) observou um resultado bastante expressivo, quando as doses desses inseticidas, reduzidas em 70% e misturadas ao sal de cozinha, tiveram desempenho praticamente igual às doses mais elevadas dos mesmos. O estudo de Corso, (1990) usou outro grupo de inseticidas, no entanto, é interessante conhecer os efeitos do sal em adição a outros compostos. Adição de cloreto de sódio mostrou-se significativa no combate ao percevejo em ninfas de 4<sup>o</sup> instar, isso pode ter sido influenciado pois, esses insetos estão fase de formação de todos o seu organismo, toda morfologia e comportamento desses indivíduos são mais frágeis que em instares mais próximos à fase adulta, portanto eles estariam mais suscetíveis ao contato com o inseticida. Estudos anteriores com outros pentatomídeos mostram que quanto menor o instar mais suscetível pode ser o inseto à ação do inseticida, isso pode ocorrer devido a menor capacidade de desintoxicação (Wilkinson, 1976; Picanço *et al.*, 1997), devido a ação de atração do sal, esses insetos podem ter tido um contato prolongado com o inseticida e assim tido um aumento na mortalidade dos insetos desse instar.

Uma segunda etapa desse trabalho estuda as alterações comportamentais decorrentes da exposição de doses subletais de imidaclopride no comportamento reprodutivo e ciclo de vida de *E. heros*. Apresentamos aqui, resultados que apontam uma influência de doses subletais de imidaclopride no processo fisiológicos e comportamentais dos insetos submetidos a esses produtos.

Avaliando o comportamento reprodutivo, pôde-se constatar que fêmeas tratadas quando acasaladas com machos não-tratados apresentam um menor tempo de corte e conseqüentemente maior tempo de cópula. Parâmetros como duração e frequência do comportamento de acasalamento têm influência direta sobre o sucesso reprodutivo de insetos (Rodrigues *et al.*, 2009), inseticidas podem causar desvios nos atos de acasalamento de insetos pragas e de inimigos naturais (Claver *et al.*, 2003).

Em situações em que os organismos são expostos a alguns inseticidas, respostas bioquímicas e fisiológicas podem ser esperadas. Uma dessas respostas é a desintoxicação ou o metabolismo do inseticida por enzimas. A degradação do inseticida

pode ocorrer por vários processos nos quais o produto metabólico é convertida numa forma não-tóxica ou mesmo eliminadas rapidamente do corpo do inseto (Beckel *et al.*, 2006). No entanto, este processo requer energia e os recursos para os processos fisiológicos são realocados para desintoxicação. Uma vez que as fêmeas e machos não tem alimentação durante este ensaio, a falta de energia não pode ser substituída. Assim, pode-se inferir que as fêmeas precisam de mais energia para reprodução, que pode ser a partir de compostos nutricionais de secreção do macho. Embora o efeito sobre a reprodução não possa ser concluída, a longa duração da cópula pode aumentar o sucesso reprodutivo em que *E. heros* pode ser associado com o aumento da transferência de compostos nutricionais e material seminal durante o acasalamento (Tram e Wolfner, 1999). Os machos quando tratados sozinhos, tiveram um tempo reduzido de cópula. Uma hipótese é que esses machos poderiam sofrer alterações na produção de espermatozóide e no processo de transferência para a fêmea (Rodrigues *et al.*, 2009). A exposição ao inseticida e o processo de desintoxicação provável também pode afetar a alocação de energia para o material nutritivo, ejaculação e esperma produzido. Muitos estudos experimentais têm demonstrado que custos de produção de esperma e ejaculação podem ser consideráveis (Dewsbury, 1982; Nakatsumu e Kramer, 1982; Van Voorhies, 1992; Pauku e Kotiaho, 2005).

O número de cópulas não mostrou diferença estatística entre os tratamentos, porém grande parte dos indivíduos copulou mais de uma vez com um tempo menor de duração, sugerindo que um ou alguns acasalamentos não são suficiente para as fêmeas obterem o material nutritivo necessário para obter o sucesso reprodutivo (Ridley, 1990), além da obtenção de um maior ganho de material genético e nutricional (Reynolds, 1996).

Trabalhos recentes apontam efeitos de doses subletais deste inseticida na oogenese, sobre as fibras musculares do trato reprodutivo, ou alterações do estado hormonal das fêmeas têm sido sugeridos como possíveis causas de mudanças na oviposição (Charpentier *et al.*, 2014), o que pode resultar num aumento na taxa reprodutiva. Neste estudo não encontramos diferença no número total de ovos colocados pelas fêmeas nos diferentes tratamentos, porém foi possível observar uma alteração no número de posturas colocadas por dia onde fêmeas tratadas que foram acasaladas com machos não-tratados tiveram uma maior taxa de posturas por dia, quando compa-

rados com outros tratamentos com a presença do inseticida. Observou-se também uma alteração no número de ovos colocados, onde fêmeas não-tratadas copuladas com machos tratados demonstram uma menor taxa de oviposição por dia, quando comparadas com os outros tratamentos e o controle, sugerindo uma importância na fisiologia do macho na taxa de oviposição. Essas alterações na taxa de posturas e ovos diários das fêmeas de *E. heros* pode ser o resultado de efeitos compensatórios para a sobrevivência reduzida causada por efeitos colaterais de imidaclopride. Um tempo de vida mais curto tem sido relatado em pragas de insetos que foram expostas a doses subletais de inseticida (Lee *et al.*, 1998; 2000; Tan *et al.*, 2012; Vilca *et al.*, 2014), porém não foi encontrada diferença na mortalidade neste trabalho.

Santos *et al.* (2015), mostra não somente um desenvolvimento mais rápido do ovário (maior área folicular e maior comprimento ovaríolo) em fêmeas expostas a imidaclopride, mas também uma maior fecundidade e fertilidade das fêmeas expostas a doses subletais. Tais alterações nas respostas reprodutivas podem refletir as mudanças no estado hormonal dessas fêmeas, como já foi hipotetizado por Charpentier *et al.*, (2014). As concentrações subletais de inseticidas também pode causar mudanças a nível de célula no inseto que podem repercutir em consequências na reprodução dos mesmos (Braeckman *et al.*, 1997). Um maior o número de células danificadas no desenvolvimento inicial de fêmeas de *E. heros* expostas com inseticida podem indicar efeitos colaterais que comprometem a sobrevivência de *E. heros*, mas também suscitam efeitos compensatórios na reprodução (Santos *et al.*, 2015).

Esses resultados encontrados aqui podem dar uma maior perspectiva sobre uma potencial ligação entre a exposição de doses subletais de imidaclopride e os recentes surtos de *E. heros* observadas nas lavouras brasileiras de soja. Apesar de não todos os questionamentos esclarecidos, é mais um passo nas investigações, na tentativa de elucidar os mecanismos fisiológicos que provocam tais mudanças em relação à sobrevivência e fertilidade de *E. heros*.

## Conclusões gerais

- O neonicotinoide imidaclopride mostrou-se satisfatório no controle de todos os instares de *Euschistus heros* estudados, inclusive na presença de cloreto de sódio.
- O inseticida apresentou maior toxicidade às ninfas de 4º instar quando cloreto de sódio foi adicionado à mistura.
- No comportamento reprodutivo doses subletais de imidaclopride causaram efeito no comportamento de corte e cópula, aumentando o tempo de cópula e diminuindo o tempo de corte em fêmeas tratadas quando acasaladas com machos não-tratados;
- Os efeitos de doses subletais foram observados uma diferença no número de posturas colocadas por fêmeas a cada dia, fêmeas tratadas quando acasaladas com machos não-tratados tendem a colocar menos posturas e não um pico de oviposição.
- Fêmeas acasaladas com machos tratados possuem um pico de oviposição, porém o mesmo é menor quando comparado ao controle e demora mais tempo para acontecer.
- Também foi encontrada diferença no número de ovos colocados por fêmeas por dia, quando tratadas com doses subletais, as fêmeas tem uma oviposição menor e ainda que não tratadas quando acasaladas com machos tratados há uma redução na taxa de oviposição.

## Referências

- Ali A.; Ahmad, F.; Biondi, A.; Wang, Y. Desneux, N.** 2012. Potential for using *Datura alba* leaf extracts against two major stored grain pests, the khapra beetle *Trogoderma granarium* and the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *J Pest Sci* 85:359–366.
- Avila, C.J.; Grigolli, J.F.J.** 2014. Pragas de soja e seu controle. Tecnologia e produção: Soja 2013/2014. Maracaju, MS. p. 109-168
- Beckel, H.S.B.; Lorini, I.; Lazzari, S.M.N.** 2006. Efeito do sinergista bu-tóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. *Revista Brasileira de Entomologia* 50:110-114.
- Bengochea, P.; Budia, F.; Viñuela, E.; Medina, P.** 2014. Are kaolin and copper treatments safe to the olive fruit fly parasitoid *Psytalia concolor*. *J Pest Sci* 87:351–359.
- Biondi, A.; Mommaerts, V.; Smaghe, G.; Vinuela, E.; Zappala, L.; Desneux, N.** 2012. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Manag Sci* 68:1523–1536.
- Biondi, A.; Zappala, L.; Stark, J.D.; Desneux, N.** 2013. Do biopesticides affect the demographic traits of a parasitoid wasp and it's biocontrol services through sublethal effects. *PLOS ONE*: e76548.
- Brown, L.A.; Ihara, M.; Buckingham, S.D.; Matsuda, K.; Sattelle, D.B.** 2006. Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.*, 99. pp. 608–615.
- Braeckman, B.; Simoens, C.; Rzeznik, U.; Raes, H.** 1997. Effect of sublethal doses of cadmium, inorganic mercury and methylmercury on the cell morphology of an insect cell line (*Aedes Albopictus*, C6/36). *Cell Biol Int* 21:823–32.
- Brailovsky, H.; Cervantes, L.; Mayorga, C.** 1992. Hemiptera: Heteroptera de México XLIV. Biología, estadios ninfales y fenología de la tribu Pentatomini (Pentatomidae) en la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz. Mexico, Universidad Nacional Autonoma, Instituto de Biología. 204p. (Publicaciones Especiales 8).
- Calow, P.; Silby, R.M.** 1990. A physiological basis of populations processes: ecotoxicological implications. *Funct. Ecol.* 4: 283-288.

**Cock, A.; Clercq, P.; Tirry, L.; Degheele, D.** 1996. Toxicity of diafenthiuron and imidacloprid to the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Environ. Entomol. 25: 476-480.

**Corso, I.C.; Gazzoni, D.L.** 1998. Sodium chloride: An insecticide enhancer for controlling pentatomids on soybeans. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.33, n.10, p.1563-1571,

**Corso, I.C.** 1990. Uso de sal de cozinha na redução da dose de inseticida Para controle de percevejos da soja. CT/45, CNPSo, ago.190, p.3.

**Costa Lima, A.M.** 1940. Insetos do Brasil: hemípteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. t. 2. 351 p. (Série Didática, 3).

**Croft, B.A.** 1990. Arthropod Biological Control Agents and Pesticides. New York: Wiley. 723 pp.

**Charpentier, G.; Louat, F.; Bonmatin, J.M.; Marchand, P.A.; Vanier, F.; Locker, D.** 2014. Lethal and sublethal effects of imidacloprid, after chronic exposure, on the insect model *Drosophila melanogaster*. Environ. Sci. Technol 48:4096-102.

**Claver, M.A.; Ravichandran, B.; Khan, M.M.; Ambrose, D.P.** 2003 Impact of cypermethrin on the functional response, predatory and mating behaviour of a non-target potential biological control agent *Acanthaspis pedestris* (Stal) (Het., Reduviidae). Journal of Applied Entomology 127:18-22.

**Degrande, P. E.; Vivan, L. M.** 2009. Boletim de Pesquisa de Soja. Pragas da soja. Rondonópolis: Fundação MT. v. 13, 229-265 p.

**Desneux, N.; Pham-Delegue, M.H.; Kaiser, L.** 2004. Ovoposition behavior and patch-time allocation in two aphid parasitoids exposed to deltamethrin residues. Entomol Exp Appl 112: 227–235.

**Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.M.** 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annu. Rev. Entomol. 52, 81–106.

**Dewsbury, D.A.** 1982. Ejaculate cost and male choice. The American Naturalist 119:601-610

**Fairbrother, A.; Purdy, J.; Anderson, T.; Fell, R.** 2014. Risks of neoni-

cotinoid inseticides to honeybee. *Environmental toxicology and chemistry*. 33(4), 719-731.

**Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira N.,S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C.; Berth, F.,E.; Parra, J.R.P.; Zuzhi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Marchin, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C.** 2002. *Entomologia agrícola*. Piracicaba, SP. 920 p.

**Gazzoni, D.L.** 1994. *Manejo de pragas da soja: uma abordagem histórica*. Londrina: Embrapa-CNPSO. 72p. (Embrapa-CNPSO. Documentos, 78).

**Goulson, D.** 2013. Reiew: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977–987.

**Guedes, R.N.C.; Cutler, C.** 2014. Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Manag Sci* 70:690–697.

**Honda, H; Tomizawa, M.; Casida, J.E.** 2006. Insect nicotinic acetylcholine receptors: neonicotinoid binding site specificity is usually but not always conserved with varied substituents and species *J. Agric. Food Chem.*, 54 pp. 3365–3371

**Kogan,M.** 1998.Intregated pest management: historical perspectives and conteporany developments. *Annual Review of Entomology*, Palo alto, v. 43, p. 243-270.

**Magalhaes, L. C.; Hunt, T. E.;Siegfried, B. D.** 2008. Development of methods to evaluate susceptibility of soybean aphid to imidacloprid and thiamethoxam at lethal and sublethal concentrations. *Entomol. Exp. Appl.* 128: 330 D336.

**Matsuda, K.; Buckingham, S.D.; Kleier, D.; Rauh, J.J.; Grauso, M.; Sattelle, D.B.** 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:573–580.

**McDermott, J. M., and B. A. McDonald.** 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 353D369 Nauen, R.; Elbert, A. 2003. European monitoring, of resistance to insecticides in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) with special reference to imidacloprid. *Bull. Entomol. Res.* 93: 47D54.

**Nakatsumu, K.; Kramer, D.L.** 1982. Is sperm cheap? Limited male fertility and female choice in the lemon tetra (Pisces,Characidae). *Science* 216:753-755.

**Niva, C.C.; Panizzi, A.R.** 1996. Efeitos do cloreto de sódio no comportamento

de *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) em vagens de soja. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v.25, p.251- -257.

**Panizzi, A.R. & F. Slansky, Jr.** 1985. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. The Fla. Entomol. 68: 184-213.

**Panizzi, A.R.** 2004. Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). In: CAPINERA, J.L. (Ed.). Encyclopedia of Entomology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

**Panizzi, A.R.; Bueno, A.F.; Silva, F.A.C.** 2014. Insetos que atacam vagens e grãos. In: Hoffman-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (eds) Soja: Manejo integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga. EMBRAPA, Brasília-DF, pp 424 335-420.

**Pauku, S.; Kotiaho, J.S.** 2005. Cost of reproduction in *Callosobruchus maculatus*: effects of mating on male longevity and the effect of male mating status on female longevity. Journal of Insect Physiology 51:1220-1226.

**Picanço, M. , Ribeiro, L.J.;Leite, G.L.D.; Zanuncio, J.C.** 1997. Seletividade de inseticidas a *Podisus nigrispinus* predador de *Ascia monuste orseis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 32, n. 4, p. 369-372, 1997.

**Planes, L.; Catalan, J.; Tena, A.; Porcuna, J.L.; Jacas, J.A.; Izquierdo, J.; Urbaneja, A.** 2013. Lethal and sublethal effects of spirotetramat on the mealybug destroyer, *Cryptolaemus montrouzieri*. J Pest Sci 86:321–327.

**Quarcoo, F.; Bonsi, C.; Tackie, N.; Franklin; Conrad B.; Nii T.** 2014. Pesticides, the environment, and human health. In: Larramendy ML, Soloneski S (eds), Agricultural and Biological Sciences: "Pesticides - Toxic Aspects", InTech Europe, Rijeka, Croatia, pp. 81-103.

**Reynolds, J.D.** 1996. Animal breeding systems. Trends in Ecology & Evolution 11:68-72.

**Ridley, M.** 1990. The control and frequency of mating in insects. Functional Ecology 4:75-84.

**Rodrigues, A.R.S.; Torres, J.B.; Siqueira, H.A.A.; Teixeira, V.W.** 2009. *Podisus nigrispinus* requer cópulas longas para o sucesso reprodutivo. Neotropical Entomology 38:746-753.

**Saber, M.; Abedi, Z.** 2013. Effects of methoxyfenozide and pyridalyl on the larval ectoparasitoid *Habrobracon hebetor*. J Pest Sci 86:685–693.

**Santos, M.F.; Santos, R.L.; Tomé, H.V.V.; Barbosa, W.F.; Martins, G.F.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.** 2015. Imidacloprid-mediated shift in the survival-fertility trade-off of the Neotropical brown stink bug *E.heros*. Journal of pest science. (Em prelo).

**SAS Institute.** 2008. SAS/STAT User's Guide. Cary, NC, USA.

**Sosa-Gómez, D. R.; Delpin, K. E.; Almeida, A.; Hirose, E.** 2004. Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. Neotrop. Entomol. 33: 179–187.

**Sosa-Gómez, D.R.; Corrêa-Ferreira, B.S.; Hoffmann-Campo, C.B.; Corso, I.C.; Oliveira, L.J.; Moscardi, F.; Panizzi, A.R.; Bueno, A. de F.; Hirose, E.** 2006. Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina, RS. 66p.

**Snodgrass, G.L.; Adamczyk, J.J.; Gore, J.** 2005. Toxicity of insecticides in a glass-vial bioassay to adult brown, green, and southern green stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). J Econ Entomol 98:177-181.

**Stark, J.D.; Banks, J.E.** 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. Annu Rev Entomol 48:505–519.

**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. Proc Natl Acad Sci USA 101:732–736.

**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.

**Thany, S.H.; Lenaers, G.; Raymond-Delpech, V.; Sattelle, D.B.; Lapied, B.** 2007. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors Trends Pharmacol. Sci., 28 pp. 14–22.

**Thompson, H.M.** 2003. Behavioral effects of pesticides in bees: their potential for use in risk assessment. Ecotoxicology 12:317–30.

**Tram, U.; Wolfner, M.F.** 1999. Male seminal fluid proteins are essential for sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153:837-844.

**Van, V.W.A.** 1992. Production of sperm reduces nematode lifespan. *Nature* 360:456-458.

**Vilca, M.K.S.; Vieira, J.L.; Guedes, R.N.C.; Gontijo, L.M.** 2014. Azadirachtin-induced hormesis mediating shift in fecundity-longevity trade-off in the mexican bean weevil (Chrysomelidae: Bruchinae). *J Econ Entomol* 107:860-866.

**Wilkinson, C. F.** 1976, *Insecticide Biochemistry and Physiology*. New York, Plenum, p. 431-506.

**Willrich, M.M.; Leonard, B.R.; Cook, D.R.** 2003. Laboratory and field evaluations of insecticide toxicity to stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *J Cotton Sci* 7:156-163.

**Tabela 1.** Toxicidade ao imidaclopride no percevejo-marron-da-soja *Euchistus heros* em adultos, 4° e 5° instar. Os valores das concentrações letais (CL) foram estimadas baseadas nos bioensaios de concentração-mortalidade usando análise de Probit. Concentrações são expressas em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  i.a.

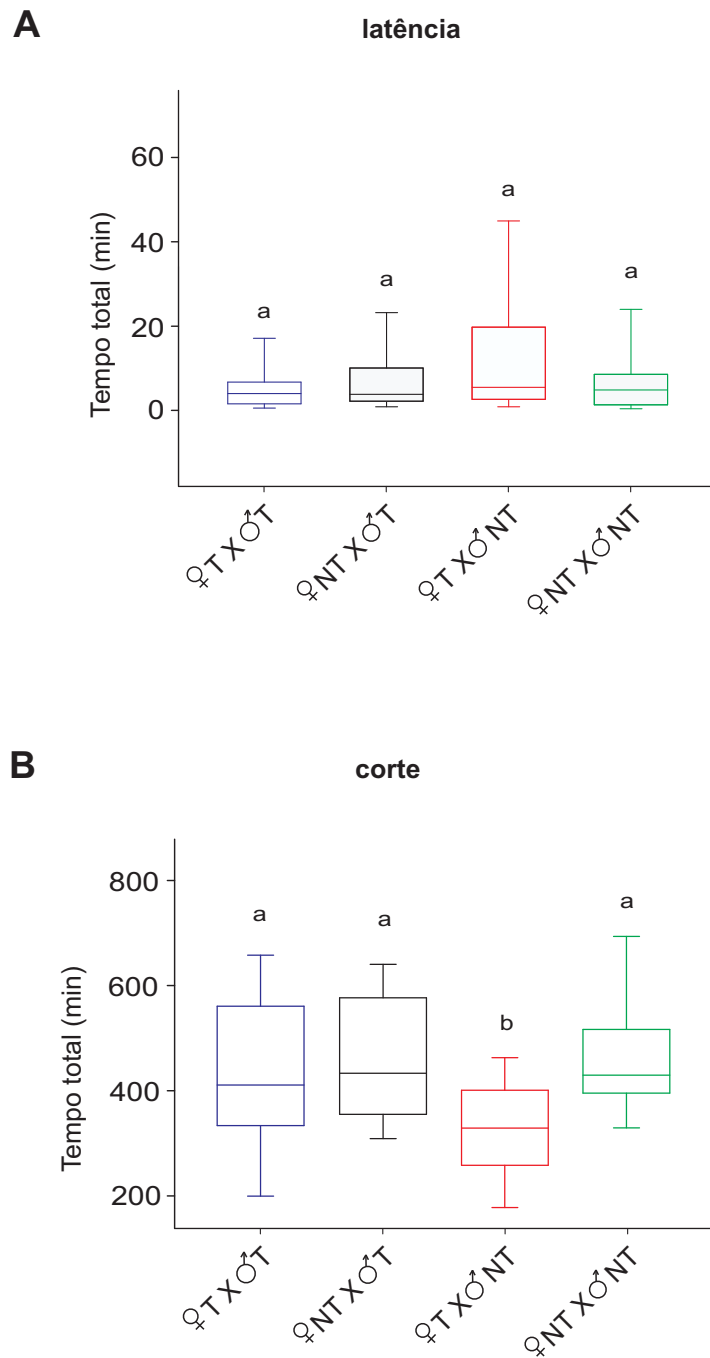
	Número de Indivíduos	Inclinação $\pm$ EPM	CL <sub>50</sub> (95% FL) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ i.a.)	CL <sub>80</sub> (95% FL) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ i.a.)	X <sup>2</sup>	P
Imidacloprid						
Adulto	350	3.13 $\pm$ 0.33	0.83 (0.60-1.25)	2.66 (1.65-5.49)	0,97	0,91
5° instar	700	1.33 $\pm$ 0.09	0.02 (0.01-0.03)	0.84(0.55-1.46)	1,8	0,88
4° instar	600	0.87 $\pm$ 0.10	2.14 (1.39-3.58)	42.46 (19.07-146.38)	3.21	0.96
Imidacloprid + Sal						
Adulto	600	0.22 $\pm$ 0.09	0.62 (0.32-1.08)	3.92 (2.09-10.73)	7.98	0,09
5° instar	600	1.17 $\pm$ 0.09	0.04 (0.03-0.06)	0.40 (0.28-0.63)	4.33	0,36
4° instar	600	0.82 $\pm$ 0.07	0.09 (0.05-0.14)	1.05 (0.71-1.66)	2.20	0,07

**Tabela 2.** Porcentagem de *E. heros* com dificuldade de locomoção e estado normal, expostos a doses letais e subletais do inseticida imidaclopride.  
 \* Dificuldade de locomoção = somatório das porcentagens de indivíduos com os comportamentos: caminhar lentamente e caminhando após estímulo

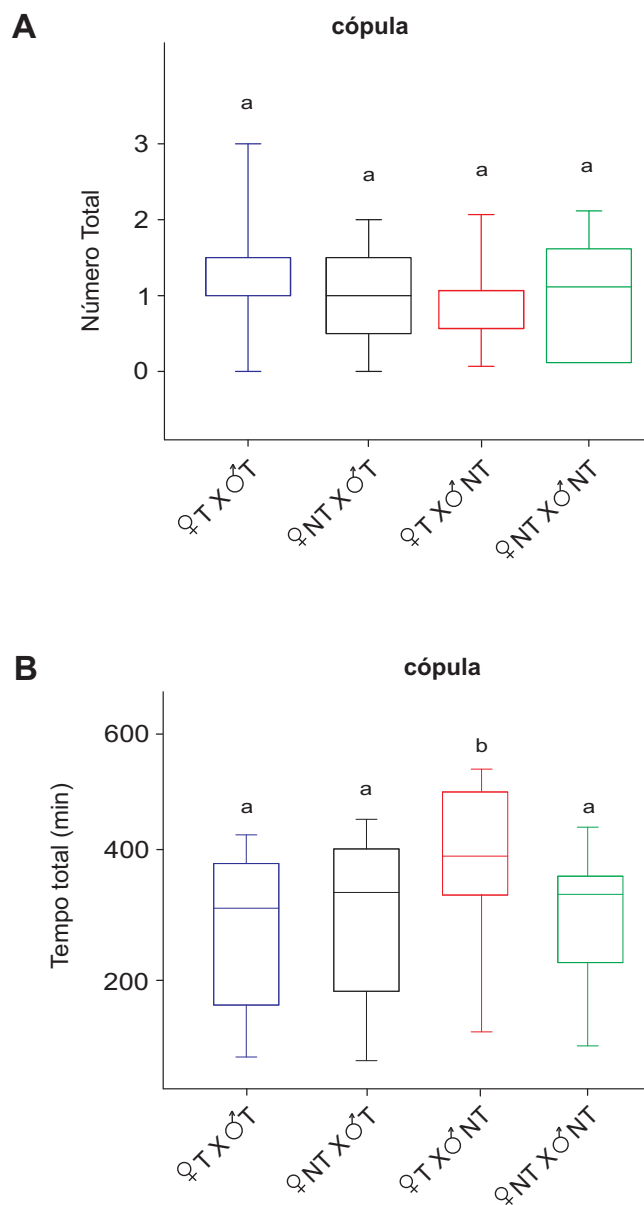
<b>Dificuldade na locomoção *</b>							<b>Normais</b>						
<b>24 Horas</b>							<b>24 Horas</b>						
<b>Concentração</b>	<b>4° Instar</b>		<b>5° Instar</b>		<b>Adultos</b>		<b>Concentração</b>	<b>4° Instar</b>		<b>5° Instar</b>		<b>Adultos</b>	
	<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>	<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>	<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>		<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>	<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>	<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>
<b>Controle H<sub>2</sub>O</b>	0	45	35	40	0	18	<b>Controle H<sub>2</sub>O</b>	73	54	52	43	100	71
<b>Controle H<sub>2</sub>O + Sal</b>	-	38	-	10	-	16	<b>Controle H<sub>2</sub>O + Sal</b>	-	58	-	73	-	68
<b>0,003 X</b>	10	66	49	62	0	43	<b>0,003 X</b>	64	6	9	10	100	51
<b>0,01 X</b>	53	59	72	52	18	61	<b>0,01 X</b>	9	0	0	2	62	23
<b>0,03 X</b>	50	50	50	49	29	62	<b>0,03 X</b>	13	0	0	0	29	24
<b>0,1 X</b>	36	21	25	44	10	67	<b>0,1 X</b>	17	0	0	0	4	3
<b>0,3 X</b>	51	23	26	20	3	56	<b>0,3 X</b>	0	0	0	0	0	7
<b>1,0 X</b>	40	17	6	15	13	52	<b>1,0 X</b>	0	0	0	0	2	0
<b>3,0 X</b>	45	11	3	9	10	39	<b>3,0 X</b>	3	0	0	0	0	0

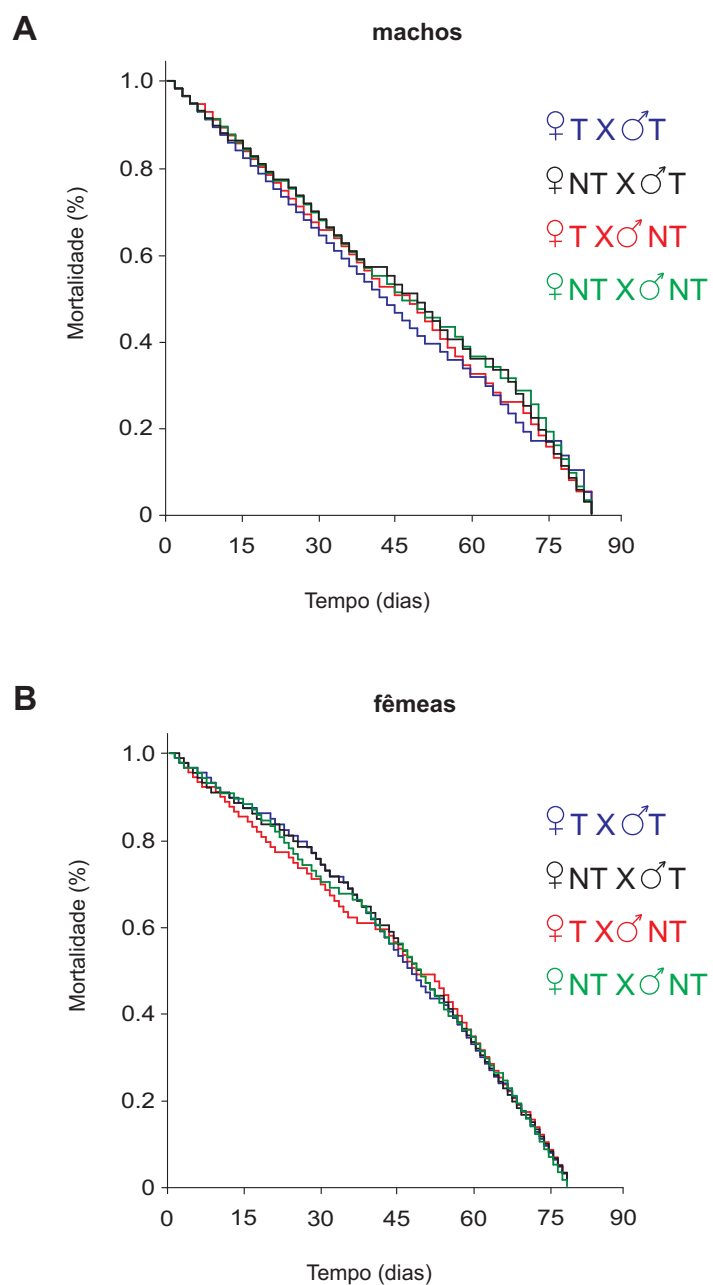
<b>48 Horas</b>							<b>48 Horas</b>						
<b>Concentração</b>	<b>4° Instar</b>		<b>5° Instar</b>		<b>Adultos</b>		<b>Concentração</b>	<b>4° Instar</b>		<b>5° Instar</b>		<b>Adultos</b>	
	<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>	<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>	<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>		<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>	<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>	<b>IMI</b>	<b>IMI + SAL</b>
<b>Controle H<sub>2</sub>O</b>	33	57	56	53	0	26	<b>Controle H<sub>2</sub>O</b>	50	35	38	41	100	68
<b>Controle H<sub>2</sub>O + Sal</b>	-	59	-	35	-	20	<b>Controle H<sub>2</sub>O + Sal</b>	-	35	-	40	-	69
<b>0,003 X</b>	34	63	51	53	8	51	<b>0,003 X</b>	40	0	3	0	92	20
<b>0,01 X</b>	56	33	38	43	30	57	<b>0,01 X</b>	3	0	0	0	44	13
<b>0,03 X</b>	32	33	25	26	36	63	<b>0,03 X</b>	0	8	0	0	17	0
<b>0,1 X</b>	23	26	23	17	18	58	<b>0,1 X</b>	9	0	0	0	2	7
<b>0,3 X</b>	24	19	9	14	13	42	<b>0,3 X</b>	0	0	0	0	10	3
<b>1,0 X</b>	18	7	11	3	11	32	<b>1,0 X</b>	0	0	0	0	0	0
<b>3,0 X</b>	10	4	0	4	0	16	<b>3,0 X</b>	0	0	0	0	0	0



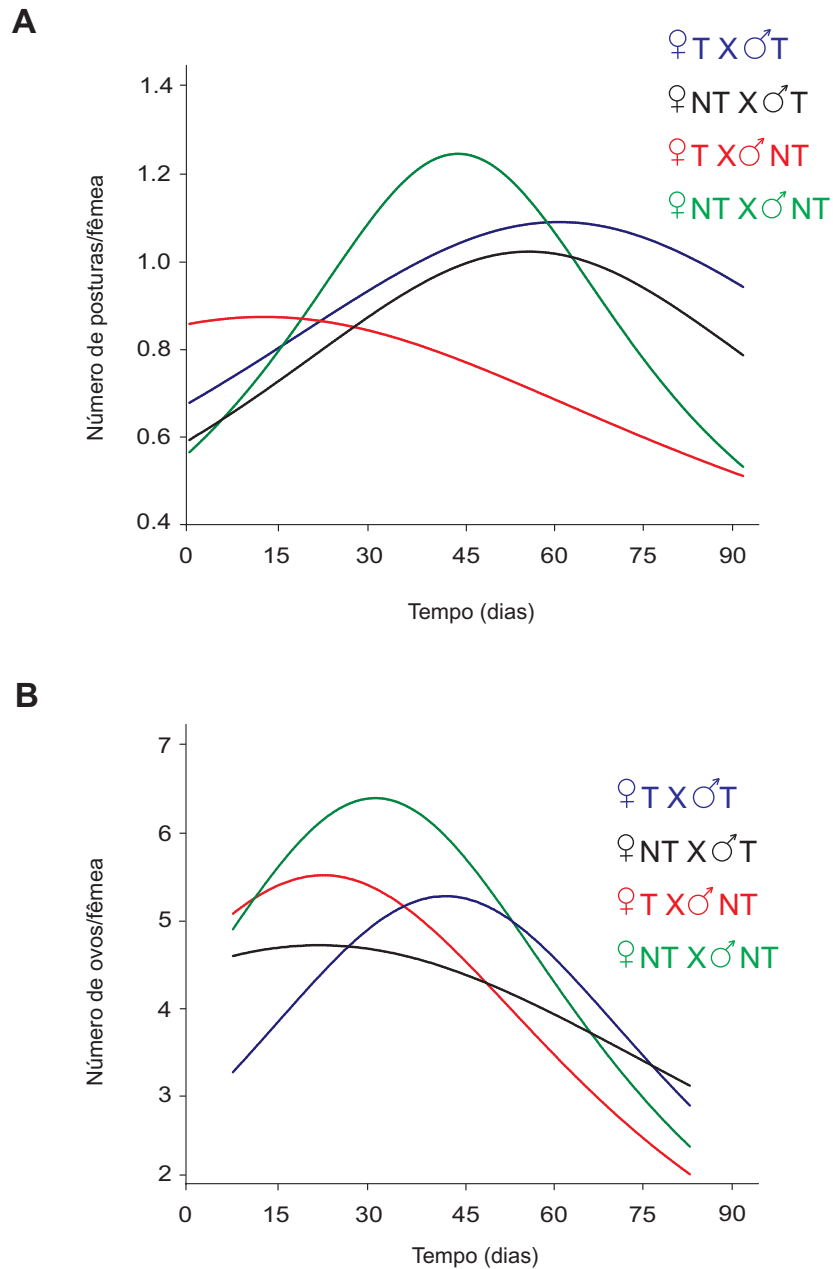
**Figura 1.** Tempo de latência (A) e tempo de corte (B) em adultos recém emergidos de *E. heros* exposto à dose subletal do inseticida neonicotinóide imidaclopride (0,01% dose de campo recomendada) por 48 horas. Tempo de latência (OneWay Anova,  $P = 0,433$ ). Tempo de corte (Tukey's HSD Test,  $P = 0,017$ ).



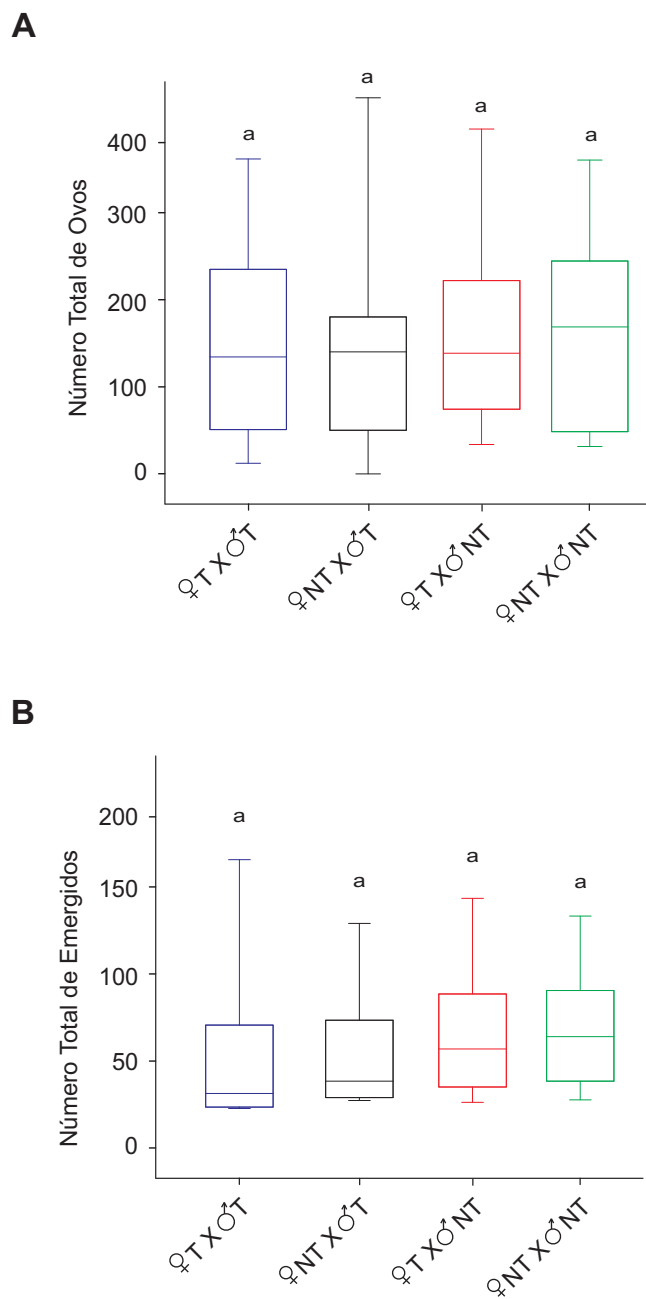
**Figura 2.** Número (A) e tempo de cópula (B) em adultos recém emergidos de *E. heros* exposto à dose subletal do inseticida neonicotinóide imidaclopride (0,01% dose de campo recomendada) por 48 horas. Número de cópulas (OneWay Anova,  $P = 0,656$ ). Tempo de cópula (Tukey's HSD Test,  $P = 0,030$ ).



**Figura 3.** Mortalidade de machos (A) e fêmeas de adultos (B) recém emergidos de *E. heros* exposto à dose subletal do inseticida neonicotinóide imidaclopride (0,01% dose de campo recomendada) por 48 horas ao longo de 90 dias após o acasalamento.



**Figura 4.** Número de posturas (A) e ovos depositados (A) por dia por fêmeas de adultos recém emergidos de *E. heros* exposto à dose subletal do inseticida neonicotinóide imidaclopride (0,01% dose de campo recomendada) por 48 horas ao longo de 90 dias após o acasalamento.



**Figura 5.** Número total de ovos depositados (A) e o número total de indivíduos emergidos (B) por fêmeas de adultos recém emergidos de *E. heros* exposto à dose subletal do inseticida neonicotinóide imidaclopride (0,01% dose de campo recomendada) por 48 horas ao longo de 90 dias após o acasalamento.