

KAMILA EMMANUELLA XAVIER DE AZEVEDO

**RESISTÊNCIA A NEONICOTINOIDES NO PERCEVEJO-MARROM-DASOJA, *Euschistus heros* (F.) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE): SELEÇÃO E BASES FISIOLÓGICAS**

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  
2018

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

T

A994r  
2018  
Azevedo, Kamila Emmanuella Xavier de, 1991-  
Resistência a neonicotinoides no  
percevejo-marrom-da-soja, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera:  
Pentatomidae) : seleção e bases fisiológicas / Kamila  
Emmanuella Xavier de Azevedo. – Viçosa, MG, 2018.  
vii, 34 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Percevejo-marrom. 2. Neonicotinoides (Inseticida).  
3. Resistência aos inseticidas. 4. Soja -Resistência a doenças e  
pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.  
II. Título.

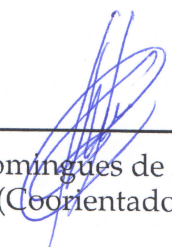
CDD 22. ed. 632.754


KAMILA EMMANUELLA XAVIER DE AZEVEDO

**RESISTÊNCIA A NEONICOTINOIDES NO  
PERCEVEJO-MARROM-DA-SOJA, *Euschistus heros* (F.) (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE): SELEÇÃO E BASES FISIOLÓGICAS**

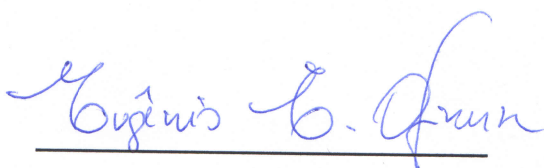
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de agosto de 2018.

  
\_\_\_\_\_  
Graziela Domingues de Almeida Lima  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Haddi Khalid  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Antonio João de Lima Neto

  
\_\_\_\_\_  
Eugênio Eduardo de Oliveira  
(Orientador)

## Agradecimentos

A Deus por está sempre do meu lado dando-me força, perseverança e iluminando-me na caminhada, a Virgem Maria e Santa Rita por toda a sua proteção e por ter me segurado tantas vezes em seus braços.

A minha família que é o meu alicerce e por todos os seus ensinamentos valiosos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Entomologia pelo suporte para a minha formação acadêmica.

Ao professor Dr. Eugênio E. Oliveira pela orientação e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus coorientadores, Dr. Khalid e Dr.<sup>a</sup> Graziela que foram fundamentais para a execução das pesquisas do meu projeto de dissertação e por todo incentivo.

A Nathaly Castellanos, pelo pioneirismo na linha de pesquisa a resistência a inseticida estudada durante o meu mestrado, por todo apoio e amizade.

A todos os estagiários do Laboratório de Neurobiologia e Fisiologia de Invertebrados e especialmente a Giovana, Aline, Emerson, Sarah e Noélio.

Aos professores Dr. Raul Guedes pelo espaço cedido em seu laboratório para a execução dos experimentos e Dr. Eliseu Pereira pelo espaço cedido na sala de criação.

A todos os meus colegas de laboratório que contribuíram para meu crescimento, pelas conversas, conselhos e por toda inestimável ajuda, deixo aqui meu reconhecimento e gratidão.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço a todos que me acompanharam e estimularam nessa caminhada, não somente no período de mestrado, mas em toda minha formação acadêmica.

## Resumo

AZEVEDO, Kamila Emmanuella Xavier, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2018. **Resistência a neonicotinoides no percevejo-marrom-da-soja, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae): Seleção e bases fisiológicas.** Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira. Coorientadores: Graziela Domingues de Almeida Lima e Haddi Khalid.

O inseticida neonicotinoide imidaclopride, tem sido usado amplamente no controle de diversas espécies de insetos – praga, sendo este um dos mais utilizados no controle do *E. heros*. Riscos de falhas no controle do *E. heros* para neonicotinoides tem sido relatados em grandes regiões produtoras de soja no Brasil. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a evolução da seleção da resistência ao inseticida neonicotinoide imidaclopride sob condições laboratoriais em duas linhagens de *E. heros*, Imi-Lab Sel e Imi-Res. Para isto, continuaram a ser realizadas seleções em laboratório, para os insetos de ambas as linhagens através da exposição por 48 h via contato do resíduo seco do imidaclopride, que variou entre a faixa de concentração de 21 a 168  $\mu\text{g i.a./cm}^2$  (equivalente a 5 vezes e 40 vezes a dose de campo, respectivamente). A partir da 21ª geração da Imi – Lab Sel e da 14ª geração da Imi – Res, em razão da dificuldade na dissolução e aplicação do inseticida em concentrações maiores que 168  $\mu\text{g i.a./cm}^2$ , foram feitas seleções com o uso associado ao sinergista Butóxido de Piperonila (PBO), com o intuito de potencializar o efeito tóxico sobre os insetos das duas linhagens. Após 14 gerações para a linhagem Imi- Lab Sel e 12 gerações para a linhagem Imi-Res, estas apresentaram um alto nível de resistência ao imidaclopride chegando a mortalidade de 46% e 40% respectivamente para a concentração de 168  $\mu\text{g i.a./cm}^2$ . A análise de sobrevivência foi realizada por meio de contato e ingestão ao resíduo seco do imidaclopride em dois experimentos, um sem troca de frascos e outro com troca de frascos a cada 72 h. Ambos os frascos tiveram a sua superfície interna previamente impregnada com o controle (i.e. água destilada) e o resíduo seco do imidaclopride. Ambos os experimentos mostraram que as linhagens resistentes apresentaram maior sobrevivência quando expostas por contato e ingestão as concentrações de 4,2 e 12,6  $\mu\text{g i.a./cm}^2$  (equivalente a dose de campo e 3 vezes a dose de campo) do imidaclopride quando comparadas a linhagem suscetível. Análise da taxa respiratória e da massa corpórea mostrou que as linhagens dos *E. heros* selecionadas ao imidaclopride, resultaram em elevada taxa respiratória para fêmeas e machos da Imi – Lab Sel, assim como, as fêmeas da Imi –

Res. Já a taxa respiratória para os machos da Imi-Res foi semelhante, em relação aos insetos da Imi-Lab Sel. A massa corpórea também foi maior para fêmeas e para os machos da Imi – Lab Sel e da Imi – Res quando comparadas com a suscetível. Esses resultados indicam que *E. heros* são capazes de desenvolver resistência sob pressão de seleção ao imidaclopride em condições de laboratório, e que esta promove maior taxa metabólica associada a maior massa corpórea, sugerindo que o desenvolvimento dos seus possíveis mecanismos de resistência possam estar relacionados com maior requerimento energético.

## Abstract

AZEVEDO, Kamila Emmanuella Xavier, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2018. **Resistance to neonicotinoids of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae): Selection and physiological bases.** Advisor: Eugênio Eduardo de Oliveira. Co-Advisors: Graziela Domingues de Almeida Lima and Haddi Khalid.

The neonicotinoid insecticide imidacloprid has been widely used for the control of numerous insect pest, being one of the most used insecticide used to control *E. heros*. Risk of control failures of *E. heros* have been reported in large productive regions of soybean in Brazil. Thus, this work aims to evaluate the evolution of the resistance selection to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in laboratory conditions in two strains of *E. heros*, Imi-Lab Sel and Imi - Res. For this purpose, the laboratory selections continued to be carried out for both strains by the exposure for 48 h to dry imidacloprid residue with concentrations ranging from 21  $\mu\text{g a.i./cm}^2$  (equivalent of 5-fold the field label rate) to 168  $\mu\text{g a.i./cm}^2$  (equivalent of 40-fold the field label rate). From the 21st generation for Imi - Lab Sel and the 14th generation of Imi -Res, due to the difficulty in dilution and application of the insecticide in concentrations above 168  $\mu\text{g a.i./cm}^2$ , we used the synergist piperonyl butoxide (PBO) for the subsequent selections in order to potentialized the toxic effect in the insect of both strains. After 14 generations for the Imi - Lab Sel and 12 generations for Imi - Res, the strains showed a high level imidacloprid resistance, resulting in a mortality of 46% and 40% respectively for the concentration of 168  $\mu\text{g a.i./cm}^2$  (equivalent of 40-fold the field label rate). The survival analysis have been done using exposure by contact to the dry imidacloprid residue and ingestion in two experiments: one without the replacement of glass and another with the replacement of the glass every 72 h. In both experiments the glass had the inner surface previously impregnated with distilled water (control) and with dry imidacloprid residue. For both experiments, the resistant strains showed a higher survival rates during the exposure by contact and ingestions to the concentration of 4.2 and 12.6  $\mu\text{g a.i./cm}^2$  (equivalent of the field label rate and 3-fold the field label rate) of imidacloprid when compared with the susceptible strain. The respiration rate and body weight analysis reveal that the *E. heros* imidacloprid resistant selected strains resulted in a higher respiration rate for females and males of the Imi - Lab Sel, and the females of Imi - Res compared with the susceptible strain. For the males of Imi - Res,

the respiration rate was similar to the Imi – Susc. The body weight was also higher for females and males of Imi – Lab Sel, and females and males of the Imi-Res when compared to the Imi - Susc. These results indicate that *E. heros* can develop resistance under selection pressure to imidacloprid in laboratory conditions, and such resistance promotes higher metabolic rates associated with a higher body mass, suggesting that the possible mechanisms of resistance may be related with a higher energetic demand.

# Sumário

<b>Resistência a neonicotinoides no percevejo-marrom-da-soja, <i>Euschistus heros</i></b>	
<b>(F.) (Hemiptera: Pentatomidae): Seleção e bases fisiológicas</b>	
	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Introdução</b>
	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Material e métodos</b>
	<b>6</b>
2.1	Obtenção e criação dos insetos . . . . .
	6
2.2	Seleção de linhagens resistentes a imidaclopride . . . . .
	7
2.3	Seleção de linhagens resistentes a imidaclopride mais o sinergista Butóxido de Piperonila (PBO) . . . . .
	8
2.4	Análise de sobrevivência . . . . .
	9
2.4.1	Bioensaio de sobrevivência sem troca de frascos a cada 72 h . . . . .
	9
2.4.2	Bioensaio de sobrevivência com troca de frasco a cada 72 h . . . . .
	10
2.5	Respirometria e massa corpórea . . . . .
	10
2.6	Análise estatística . . . . .
	11
<b>3</b>	<b>Resultados</b>
	<b>12</b>
3.1	Seleção de linhagens resistentes a imidaclopride . . . . .
	12
3.2	Análise de sobrevivência . . . . .
	14
3.2.1	Bioensaio de sobrevivência sem troca de frascos a cada 72 h . . . . .
	14
3.2.2	Bioensaio de sobrevivência com troca de frascos a cada 72 h . . . . .
	17
3.3	Respirometria e massa corpórea . . . . .
	20
<b>4</b>	<b>Discussão</b>
	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>Conclusões</b>
	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Agradecimentos</b>
	<b>28</b>
<b>7</b>	<b>Referências</b>
	<b>29</b>

**Resistência a neonicotinoides no  
percevejo-marrom-da-soja, *Euschistus heros*  
(F.) (Hemiptera: Pentatomidae): Seleção e  
bases fisiológicas**

# 1 Introdução

A evolução da resistência a inseticidas é uma das principais preocupações quando se usa estes químicos no controle de insetos-praga (Bass et al. 2015). O controle do percevejo-marrom há muitos anos baseia-se predominantemente no uso de químicos sintéticos, sendo que até o ano de 2004 o seu controle era feito principalmente com organofosforados e endosulfam (Sosa-Gómez and Silva 2010). No entanto, o uso intensivo e o manejo inadequado desses produtos químicos, pode levar ao desenvolvimento de resistência em populações de insetos-praga, a qual é definida, como sendo uma característica herdável que confere aumento na tolerância a um pesticida, ou grupo de pesticidas que seriam normalmente letais para a maioria dos indivíduos de uma população (Crow 1957; Georghiou 1972; Fragoso et al. 2003).

O percevejo-marrom-da-soja, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), é uma das principais pragas das plantações de soja no Brasil e pode ocasionar danos irreversíveis à cultura. Nativo da região neotropical é amplamente distribuído do Centro-Oeste brasileiro ao Norte do estado do Paraná (Corrêa-Ferreira and Panizzi 1999, Hoffmann-Campo et al. 2000a). O ataque destes percevejos pode induzir o abortamento de flores, vagens e provocar danos em sementes, incluindo a redução no teor de óleo, o aumento no teor de proteína e de ácidos graxos livres, além de permitir a entrada de patógenos, através dos danos causados pelas suas peças bucais (Hegeto et al. 2015; Panizzi et al. 2012). Os grãos de soja atacados apresentam-se menores que o normal, enrugados, escuros e chochos, ocorrendo redução da produtividade e qualidade do produto colhido.

Em 2001 foram reportados os primeiros casos de resistência para o *E. heros*, aos inseticidas da classe dos organofosforados e endosulfam (Sosa-Gomez et al. 2001). Uma década depois, estes inseticidas foram banidos no Brasil pela ANVISA, devido ao seu alto nível de toxicidade para vertebrados e a sua alta persistência no meio ambiente (da Rocha et al. 2014; Colasso and Diaz 2015); com isso os neonicotinóides e os piretróides tornaram-se os inseticidas mais comuns utilizados para controlar os

*E. heros*, tanto o seu uso isolado como a mistura dos dois (Sosa-Gómez and Silva 2010; Hegeto et al. 2015; Haddi et al. 2016; Santos et al. 2016 a; Santos et al. 2016 b; Tuelher et al. 2018).

Os inseticidas neonicotinoides introduzidos no mercado na década de 1990, representam o grupo mais comercializado no mundo para o controle de uma ampla diversidade de insetos-praga, principalmente para os fitossuccíveros, (i.e. afídeos, mosca-branca, cigarrinhas e percevejos), mas também são utilizados contra dípteros, coleópteros e lepidópteros (Elbert et al. 2008). Em virtude do seu amplo espectro de ação, da sua alta seletividade para os insetos e baixa toxicidade aos mamíferos (Simon-Delso et al. 2015; Tomizawa and Casida 2005; Liu et al. 2010).

Os neonicotinoides são inseticidas neurotóxicos que atuam como agonistas nos receptores de acetilcolina (nAChRs). Estes inseticidas mimetizam a ação do neurotransmissor acetilcolina que é, entre outros, responsável pela transmissão dos impulsos nervosos entre as células neuronais (Casida 2018). No entanto, os neonicotinoides não são degradados pela acetilcolinesterase (i.e. enzima responsável pela quebra e inativação da acetilcolina), assim, eles se encaixam no receptor da acetilcolina na membrana dos neurônios pós-sinápticos, disparando o potencial de ação no mesmo de forma interrupta, causando no inseto sintomas de hiperatividade nervosa, seguido de colapso do sistema nervoso e morte (Tomizawa and Casida 2005; Bass et al. 2015; Simon-Delso et al. 2015).

O uso intensivo destes químicos tem levado a um aumento na frequência de insetos resistente tornando-se entraves em programas de controle de pragas (Casida and Durkin 2013; Nauen and Denholm 2005). Utilização sem o manejo adequado dos neonicotinoides (e.g. ausência de rotação de inseticida com modo de ação diferente) levou ao desenvolvimento de resistência ao besouro da batata do Colorado *Leptotarsa decemlineata* (Kaplanoglu et al. 2017), a mosca doméstica *Musca domestica* (Reid et al. 2018), a cigarrinha marrom do arroz *Nilaparvata lugens* (Gorman et al. 2008; Garrood et al. 2015), a mosca branca *Bemisia tabaci* (Naveen et al. 2017; Dângelo et al. 2017), aos pulgões *Myzus persicae* (Voudouris et al. 2017) e *Aphis gossypii* (Chen et al. 2017). Esses trabalhos são indicativos que o *E. heros* também pode apresentar risco de desenvolver resistência ao imidaclopride. Tuelher et al. 2018, verificaram riscos de falhas de controle de *E. heros* na região Central do Brasil, incluindo os neonicotinoides (i.e.

imidaclopride e tiametoxam).

Os mecanismos que os insetos podem expressar a resistência aos inseticidas neonicotinoides são pelas alterações bioquímicas, através do aumento da expressão de enzimas detoxificativas, que na maioria das vezes é o primeiro mecanismo de resistência que os insetos desenvolvem (Georghiou 1972; Nauen and Denholm 2005; ). São três principais classes de enzimas que contribuem para eliminação ou inativação das substâncias tóxicas circulantes nos insetos: citocromo P450, Glutathione S-Transferases (GST) e Esterases (Nauen and Denholm 2005; Casida and Durkin 2013; Simon-Delso et al. 2015). O segundo mecanismo é o fisiológico, que está envolvido na redução da penetração e na insensibilidade do sítio-alvo (i.e. mutações nos receptores de acetilcolina nAChRs) aos inseticidas. O terceiro mecanismo é o comportamental que é a capacidade do inseto reduzir sua exposição ao inseticida (Georghiou 1972; Pereira et al. 2009; Bass et al. 2014).

O uso de sinergistas para a detecção de resistência metabólica é uma importante ferramenta nos testes laboratoriais. A interação entre mecanismos de detoxificação metabólica de espécies de insetos resistentes a inseticidas pode ser constatada através do uso de sinergistas. Além disso, a ação dos sinergistas minimizam a quantidade de inseticida químico necessário para o controle de insetos pois, agem como um substrato alternativo, poupando o inseticida do processo de detoxificação (Feyereisen 2015).

Os mecanismos que conferem resistência a inseticidas geralmente estão associados com alterações fisiológicas, pois mudanças adaptativas no fenótipo destes indivíduos requerem um elevado gasto energético e/ou realocação de energia (Guedes et al. 2006; Kliot and Ghanim 2012; French-Constant and Bass 2017). Estas adaptações podem afetar processos fisiológicos básicos, como, o aumento na taxa metabólica, que pode ser necessário para a manutenção dos mecanismos de resistência (e.g. maior atividade de enzimas detoxificativas) a qual muitas vezes leva a elevação da taxa respiratória (Pereira et al. 2009; Oliveira et al. 2007).

A resistência também exige do organismo maiores reservas energéticas resultando no aumento dos órgãos de armazenamento de energia, o que pode levar consequentemente o mesmo a apresentar maior massa corpórea (Guedes et al. 2006) . Contudo, este fenômeno pode levar desvantagens para os organismos resistentes em relação aos suscetíveis por alterar diversos processos fisiológicos no inseto, como custos nos

parâmetros biológicos das populações, como também, na produção de compostos de defesas (Carriere et al. 1994; Foster et al. 2007; French-Constant and Bass 2017; Wang et al. 2018).

O sucesso do manejo da resistência aos inseticidas envolve diversos fatores e depende do seu uso adequado. Todavia, o desenvolvimento de populações resistentes podem contribuir para falhas no controle químico do percevejo-marrom (Tuelher et al. 2018). Assim, a compreensão das bases da resistência a neonicotinoides em *E. heros* é crucial para a detecção precoce, monitoramento e desenvolvimento de estratégias eficientes contra esse fenômeno.

Para entender os mecanismos da resistência e auxiliar em medidas preventivas, o objetivo do trabalho foi caracterizar a evolução da resistência em *E. heros* a imidaclopride e o uso associado do imiclopride com o PBO através de seleção laboratorial para duas linhagens, (i) uma linhagem selecionada oriunda da linhagem padrão do laboratório (Imi-Lab Sel) e (ii) uma linhagem selecionada derivada de população de campo (Imi-Res).

## 2 Material e métodos

### 2.1 Obtenção e criação dos insetos

Três linhagens de *E. heros* foram utilizadas neste trabalho: uma linhagem suscetível (Imi-Susc) originada do Laboratório Semioquímico da EMBRAPA Recursos Naturais e Biotecnologia (Brasília, DF, Brasil); uma linhagem resistente (Imi-Lab Sel) selecionada anteriormente por 14 gerações a faixa de concentração de 1,26 a 21 µg i.a./cm<sup>2</sup> (equivalente a 30% e 5 vezes a dose de campo, respectivamente) ao imidaclopride oriunda da linhagem suscetível (Imi-Susc); e uma linhagem resistente (Imi-Res) selecionada anteriormente por 8 gerações a faixa de concentração de 4,2 a 21 µg i.a./cm<sup>2</sup> (equivalente a dose de campo e 5 vezes a dose de campo, respectivamente) ao imidaclopride em laboratório provinda de população de campo coletada em Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil em janeiro de 2015 (latitude sul: 16 ° 29'43.18 ", longitude oeste: 49 ° 18'05.27 ") (Tuelher et al. 2018). Esta população foi criada livre de inseticida por três gerações, e então usada para seleção de resistência a imidaclopride.

Na linhagem Imi-Susc para aumentar a variabilidade genética dos insetos utilizados, indivíduos coletados em campo de fazendas de soja na região de Tangará da Serra (Estado do Mato Grosso, Brasil) e dos campos de soja experimentais na Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil) foram esporadicamente introduzidos na criação e mantidos sob condições de laboratório totalmente livre de contato a inseticidas.

As linhagens foram mantidas sob condições controladas (25 ± 2 °C, 60 ± 20% UR, fotoperíodo de 14:10 h). Para prevenir a diapausa, foi mantido iluminação artificial entre as 08:00 e as 20:00 h. As ninfas eram criadas em gaiolas de plástico (19 × 22 × 10 cm) forradas com papel e alimentadas ad libitum com uma dieta composta de vagens verdes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), sementes de soja (*Glycine max*), amendoim cru (*Arachis hypogaea*) e sementes de girassol (*Helianthus annuus*) (Borges et al. 2006; Silva et al. 2008). Os adultos eram alimentados ad libitum com a mesma dieta das ninfas e

mantidos em gaiolas de plástico com fitas de organza colocadas dentro de cada uma como local de oviposição.

## 2.2 Seleção de linhagens resistentes a imidaclopride

Insetos adultos de *E. heros* foram tratados, em cada geração, com doses sucessivamente crescentes de imidaclopride ao longo de 6 gerações para a linhagem Imi-Lab Sel e de 6 gerações para a linhagem Imi- Res. Os bioensaios com inseticidas seguiram os métodos que foram adaptados de estudos toxicológicos em *E. heros* realizados com frascos de vidro (Snodgrass et al. 2005; Willrich et al. 2003). O inseticida neonicotinoide imidaclopride (grânulos dispersíveis em água a 700 g/L de ingrediente ativo (i.a.); Bayer CropScience, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado para revestir as paredes internas dos frascos de vidro transparente de 250 mL (EME Equipment, Paulicéia, SP, Brasil). Utilizou-se água destilada como solvente para a preparação das soluções inseticidas.

Adicionaram-se alíquotas de 2 mL a cada frasco de vidro e em seguida estes foram levados para capela de exaustão e colocados na horizontal em um rotor para a secagem da solução inseticida. Nos tratamentos controle, os insetos foram expostos a frascos de vidro revestidos com água destilada. A parte interna do topo de cada frasco foi revestida com PTFE de Teflon® (DuPont, Wilmington, DE, EUA) e fechadas com um pedaço de organza e um elástico para evitar que os insetos escapassem. A faixa de concentrações de imidaclopride usadas nas seleções foi de 21 a 168  $\mu\text{g i.a./cm}^2$  (equivalente a 7 e 40 vezes a dose campo, respectivamente).

Em cada frasco de vidro revestido com o resíduo seco do imidaclopride foram colocados 10 insetos adultos sexados ( $\leq 72$  h de idade) e 48 h após a exposição foi quantificada a mortalidade. Os insetos que não conseguiram percorrer o comprimento de seu corpo após estímulos mecânicos, foram considerados como mortos.

Os insetos sobreviventes à exposição ao imidaclopride foram transferidos para gaiolas alimentados ad libitum com dietas livres de inseticidas para que se reproduzissem e gerassem novos indivíduos para a próxima seleção. Este método foi aplicado para todas as gerações e as concentrações das seleções foram aumentadas baseadas na taxa de mortalidade dos bioensaios da geração parental. As condições de criação foram as

mesmas descritas anteriormente.

### **2.3 Seleção de linhagens resistentes a imidaclopride mais o sinergista Butóxido de Piperonila (PBO)**

Após diversas exposições de concentrações crescentes de inseticida, o neonicotinoide imidaclopride na formulação comercial, chegou a um limite máximo de solubilidade em água destilada, dificultando a sua aplicação nos frascos de vidros. Assim, para dar continuidade as seleções e aumentar a pressão de seleção sobre as linhagens resistentes de *E. heros*, escolheu o sinergista Butóxido de Piperonila (PBO), molécula responsável por potencializar a ação inseticida e atuar na inibição das monooxigenases citocromo P450, que se apresenta como uma das mais importantes e reportadas famílias de enzimas destoxificativas envolvidas na resistência metabólica de insetos.

Insetos adultos de *E. heros* foram tratados ao longo de 8 gerações para a linhagem Imi-Lab Sel e de 6 gerações para a linhagem Imi-Res com a exposição ao sinergista (PBO) 2 h antes das exposições as doses de imidaclopride.

A exposição dos insetos ao PBO ocorreu de forma semelhante a usada para o tratamento com inseticida. A solução foi preparada da seguinte forma; para cada 1 µL de PBO foi adicionado 1000 µL de acetona e cada frasco de vidro foi revestido com uma alíquota de 1 mL da solução. Após a secagem dos frascos foram colocados 10 insetos ( $\leq 72$  h de idade) e depois de 2 h de exposição ao PBO os insetos foram transferidos para os frascos de vidro tratados com o inseticida.

Os insetos sobreviventes à exposição ao imidaclopride mais a exposição prévia ao PBO foram transferidos para gaiolas com dietas livres de inseticidas para que se reproduzissem e gerassem novos indivíduos para a próxima seleção. Este método foi aplicado a partir da 21<sup>a</sup> geração para a Imi-Lab Sel e a partir da 14<sup>a</sup> geração para a Imi-Res. As concentrações das seleções foram aumentadas baseadas no valor da taxa de mortalidade dos bioensaios da geração parental. A faixa de concentrações de imidaclopride usadas nas seleções foi de 29,5 a 168 µg i.a./cm<sup>2</sup> (equivalente a 7 e 40 vezes a dose de campo, respectivamente). As condições de criação foram as mesmas descritas anteriormente.

## 2.4 Análise de sobrevivência

O bioensaio de sobrevivência dos *E. heros* das três linhagens (i.e. Imi-Susc, Imi-Lab Sel e Imi-Res) foi realizado por meio de exposição por contato e ingestão ao resíduo seco do imidaclopride. Este foi dividido em dois experimentos. O primeiro experimento foi realizado para testar a sobrevivência dos percevejos com a troca de vagem tratada com imidaclopride a cada 72 h mantendo os mesmos frascos contendo resíduo seco do imidaclopride na sua superfície interna. Já no segundo experimento tanto as vagens como os frascos com o resíduo seco do imidaclopride foram trocados a cada 72 h. Insetos adultos recém-emergidos de *E. heros* ( $\leq 24$  h de idade) da linhagem suscetível (Imi-Susc) e das linhagens resistentes (Imi-Lab Sel e Imi-Res) foram expostas a duas diferentes concentrações de imidaclopride (i.e. 4,2 e 12,6  $\mu\text{g i.a./cm}^2$ [equivalente a dose de campo e 3 vezes a dose de campo, respectivamente]).

### 2.4.1 Bioensaio de sobrevivência sem troca de frascos a cada 72 h

Para a linhagem Imi-Susc e para as linhagens Imi-Lab Sel e Imi-Res foram utilizadas duas concentrações de imidaclopride (i.e. 4,2 e 12,6  $\mu\text{g i.a./cm}^2$ [equivalente a dose de campo e 3 vezes a dose de campo, respectivamente]).

A exposição foi feita por contato ao resíduo seco e por ingestão. Cada frasco de vidro (250 mL) tinha a superfície do seu interior revestida com uma alíquota de 2 mL da solução inseticida com exceção do controle que foi tratado apenas com água destilada. Em seguida estes foram colocados no rotor para a secagem. Dentro de cada frasco foi colocado um pedaço de vagem com 5 cm de comprimento, que haviam sido expostas as mesmas concentrações utilizadas nos frascos por meio de submersão na solução inseticida durante o período de 5 s. Em seguida, estas foram colocadas em placas de Petri e transportadas para uma capela de exaustão para a realização de sua secagem. Já o controle foi submerso apenas em água destilada.

Em cada frasco foram colocados 10 insetos não sexados e cada tratamento continha 10 repetições. A avaliação da mortalidade foi realizada em intervalos de 1 hora por um período 12 h e depois conduzidas em intervalos de 12 h até um período de 72 h. Após este período eram realizadas 2 avaliações por dia uma com intervalo de 6 h e a outra com intervalo de 18 h. O experimento de sobrevivência foi finalizado

quando os insetos de cada tratamento atingiram 80% de mortalidade. Insetos que não conseguissem percorrer o comprimento de seu corpo após estímulos mecânicos eram considerados mortos. A cada 72 h eram realizadas a troca das vagens por novas vagens previamente expostas a cada tratamento.

#### **2.4.2 Bioensaio de sobrevivência com troca de frasco a cada 72 h**

Insetos adultos recém-emergidos de *E. heros* ( $\leq 24$  h de idade) da linhagem suscetível (Imi-Susc) e das linhagens resistentes (Imi-Lab Sel e Imi-Res), as vagens e os frascos foram expostos as mesmas condições e com as mesmas concentrações utilizadas no experimento sem troca de frascos a cada 72 h. Em cada frasco haviam 10 insetos não sexados e cada tratamento continha 10 repetições. As avaliações da mortalidade foram realizadas em intervalos de 1 hora por um período de 12 h e depois conduzidas em intervalos de 12 h. As avaliações foram finalizadas quando os insetos de cada tratamento atingiram 80% de mortalidade. Insetos que não conseguissem percorrer o comprimento de seu corpo após estímulos mecânicos eram considerados mortos.

### **2.5 Respirometria e massa corpórea**

A taxa respiratória foi avaliada usando um respirômetro do tipo CO<sub>2</sub> Analyzer (Sable Systems International, Las Vegas, NV, USA), seguindo o método descrito previamente (Oliveira et al. 2007; Guedes et al. 2006; Haddi et al. 2015; Haddi et al. 2016). A taxa respiratória média (produção de CO<sub>2</sub>) foi mensurada para insetos adultos fêmeas e machos recém-emergidos (< 24 h de idade) das três linhagens de *E. heros*. O número de indivíduos usados para cada linhagem foi de 67 para a Imi-Susc (36 fêmeas e 31 machos); de 54 para Imi-Lab Sel (25 fêmeas e 29 machos) e de 53 para a Imi-Res (26 fêmeas e 27 machos).

Os insetos foram individualmente colocados em tubos de PVC transparentes com capacidade volumétrica de 20 mL conectados a um sistema completamente fechado. Os tubos eram mantidos conectados ao sistema por 90 min antes da varredura do CO<sub>2</sub> produzido pelos insetos. Para realizar a varredura de todo o CO<sub>2</sub> produzido no interior de cada tubo, realizou-se a passagem de ar livre de CO<sub>2</sub> ao fluxo de 600 mL/min

durante 2 min. Essa corrente de ar faz com que todas as moléculas de CO<sub>2</sub> produzidas passem por um leitor de infravermelho acoplado ao sistema, que continuamente faz a mensuração do CO<sub>2</sub> produzido pelos insetos e contido no interior de cada tubo. Como controle, utilizou-se uma câmara respirométrica sem insetos.

Foram realizadas quatro leituras, sendo a primeira (equivalente à primeira hora) descartada para evitar o registro de CO<sub>2</sub> que entrava nos tubos durante o manuseio dos insetos e possíveis taxas respiratórias mais altas devido ao efeito do estresse. A média das 3 leituras restantes para fêmeas e machos de *E. heros* de cada linhagem foi considerada na análise, sendo cada inseto considerado uma repetição. Os insetos foram pesados antes e após a determinação da taxa respiratória em uma balança analítica (Sartorius BP 210 D, Göttingen, Alemanha), e a variação da massa corporal foi quantificada.

## 2.6 Análise estatística

Os resultados dos bioensaios de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência para determinar os valores do tempo médio letal (TL<sub>50</sub>) e os intervalos de confiança 95% (IC), utilizando os estimadores de Kaplan-Meier (método Log-rank) com o SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, Califórnia, EUA). Os insetos que permaneceram vivos no final do bioensaio foram censurados para as análises. A similaridade geral entre os tempos de sobrevivência e a média (valores de TL<sub>50</sub>) foi testada usando o teste Log-rank, e as comparações entre pares das curvas foram testadas usando o teste de Holm-Sidak ( $P < 0,05$ ). Os resultados da respirometria e da massa corpórea foram submetidos a uma análise univariada de variância (ANOVA) ou ANOVA one-way de Kruskal-Wallis no ranks, quando as hipóteses de normalidade e homocedasticidade não foram satisfeitas.

## 3 Resultados

### 3.1 Seleção de linhagens resistentes a imidaclopride

Através de sucessivas seleções para o imidaclopride em laboratório para o *E. heros* por 14 gerações para a linhagem Imi- Lab Sel e por 12 gerações para a linhagem Imi-Res, chegaram a uma mortalidade de 46% e 40% respectivamente para a concentração de 168  $\mu\text{g i.a./cm}^2$  (equivalente a 40 vezes a dose de campo) mais o uso associado do sinergista PBO (Figura 3.1 A e B).

As concentrações de imidaclopride aplicadas nas linhagens selecionadas de *E. heros* para a resistência ao inseticida aumentaram a cada geração exposta, de 21 a 168  $\mu\text{g i.a./cm}^2$  (equivalente a 5 e 40 vezes a dose de campo, respectivamente) (Figura 3.1 A e B).

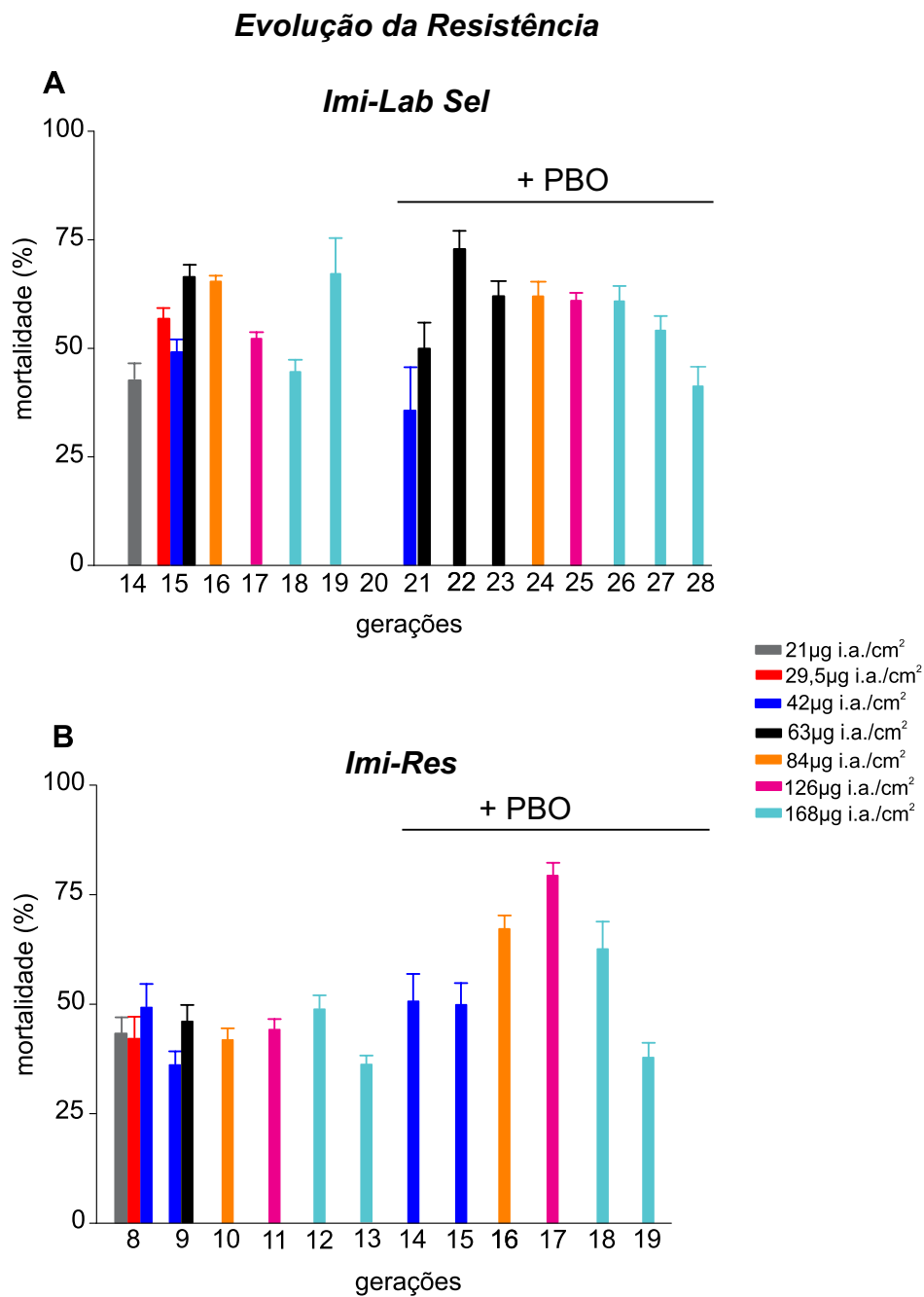


Figura 3.1: Dinâmica da porcentagem de mortalidade de *E. heros* para as Linhagens, Imi – Lab Sel (A) e Imi – Res (B) durante seleção de resistência ao imidaclopride e imidaclopride mais adição do sinergista PBO em condições de laboratório.

Os resultados mostram que a porcentagem de mortalidade para as exposições com apenas o uso do inseticida imidaclopride para a Imi-Lab Sel (i.e. 14<sup>a</sup> a 19<sup>a</sup> geração) variou de 43 a 67% ao longo das gerações. Na 20<sup>a</sup> geração não houve seleção devido à alta porcentagem de mortalidade dos insetos na geração anterior após a exposição, medida adotada para que houvessem insetos suficientes para a próxima seleção (Figura 3.1 A).

A partir da 21ª geração iniciou a seleção com a exposição prévia dos insetos ao sinergista PBO. Não foram observados incrementos na porcentagem de mortalidade dos percevejos da Imi-Lab Sel ao longo das gerações com o uso do sinergista PBO, a mortalidade ficou na faixa de 72 a 43% (Figura 3.1 A).

A porcentagem de mortalidade ao longo das seleções com apenas o uso do imidaclopride não variou muito para a Imi-Res da 8ª a 13ª geração, ficando na faixa de 38 a 55%. A partir da 14ª geração iniciou-se a seleção de indivíduos ao imidaclopride com a exposição prévia ao PBO, a mortalidade ficou na faixa de 78 a 40% (Figura 3.1 B).

Não houve incremento na mortalidade para a concentração do imidaclopride de 29,5 µg i.a./cm<sup>2</sup>, na 14ª e na 15ª geração expostas previamente ao PBO. No entanto, na 16ª e na 17ª geração para a exposição as concentrações do imidaclopride de 84 µg i.a./cm<sup>2</sup> e de 126 µg i.a./cm<sup>2</sup>, respectivamente, houve um incremento de 25 e 22%, respectivamente, na mortalidade com o uso do PBO (Figura 3.1 B). Na 19ª geração, houve redução na mortalidade chegando a menos de 50% (Figura 3.1 B).

## 3.2 Análise de sobrevivência

### 3.2.1 Bioensaio de sobrevivência sem troca de frascos a cada 72 h

A exposição à concentração de 4,2 µg i.a./cm<sup>2</sup> do imidaclopride causou menor sobrevivência nos insetos das linhagens Imi-Susc comparado com as linhagens resistente com um tempo letal médio de  $TL_{50} = 29,38$  h (12,36 – 46,39 h). Para os insetos das linhagens Imi-Lab Sel e para Imi-Res a sobrevivência foi semelhante. O tempo letal médio para a Imi-Lab Sel foi de  $TL_{50} = 163,16$  h (129,28 – 197,04 h) e para a Imi-Res de  $TL_{50} = 149$  h (118,49 - 179,51 h) (Figura 3.2).

A sobrevivência para os insetos da Imi -Susc foi menor quando comparado com a Imi-Lab Sel (Teste H-Sidak = 25,68, gl = 5,  $P < 0,001$ ) e com a Imi -Res (Teste H-Sidak = 29,71, gl = 5,  $P < 0,001$ ). Porém, a sobrevivência entre as linhagens resistentes não diferiu significativamente (Teste H-Sidak = 1,414, gl = 5,  $P = 0,414$ ).

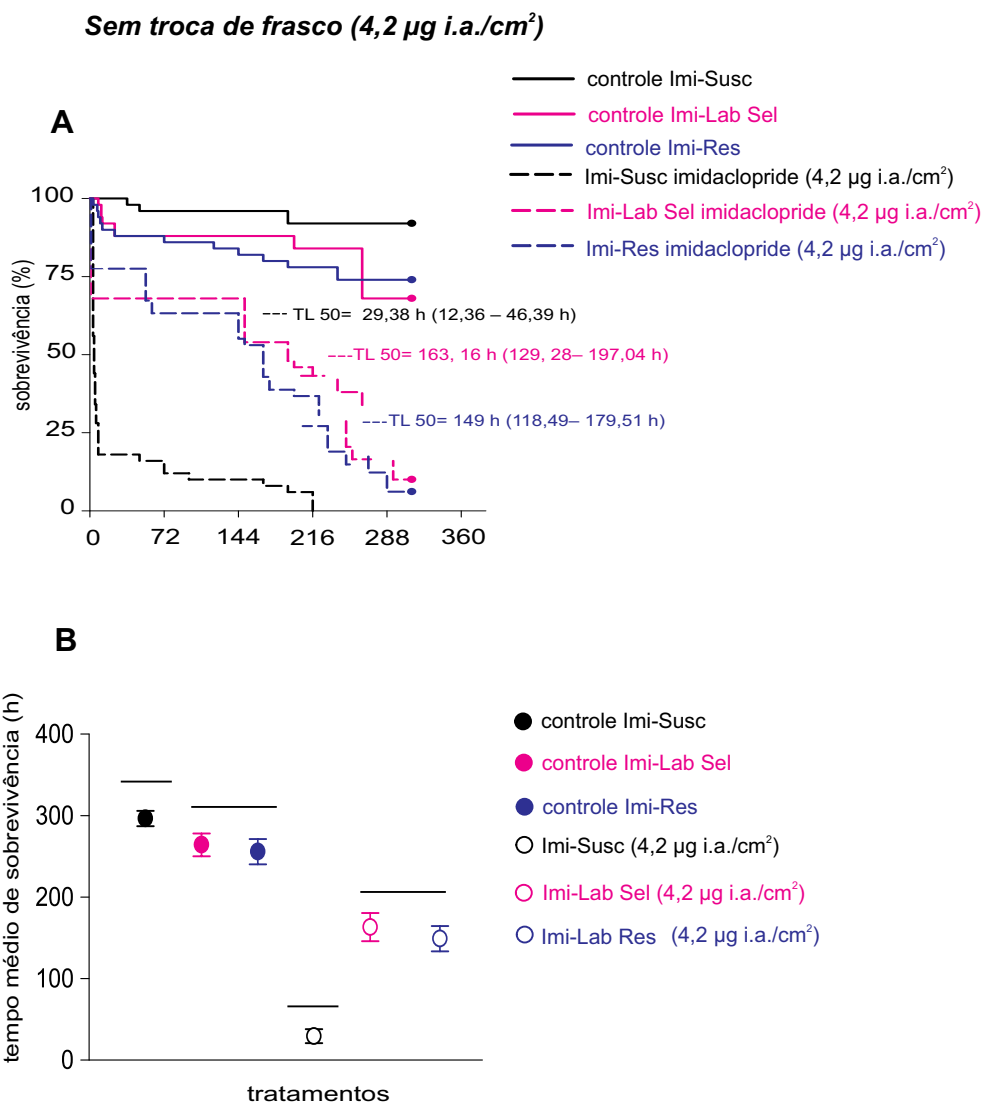


Figura 3.2: Curvas de sobrevivência de adultos de *E. heros* das três linhagens (Imi – Sus; Imi – Lab Sel e Imi-Res) sem troca de frasco a cada 72 h (A) durante exposição por contato e ingestão ao imidaclopride (4,2 µg i.a./cm<sup>2</sup>) e controle com os tempos médios (±EP) de sobrevivência (B). Os símbolos no final da curva indicam dados censurados. Médias acompanhadas por linhas horizontais na mesma altura não diferem significativamente de acordo com o teste H – Sidak ( $P < 0,05$ ).

A exposição à concentração do imidaclopride a 12,6 µg i.a./cm<sup>2</sup> causou menor sobrevivência para a Imi-Susc, com 100% de mortalidade em menos de 72 h. Já as linhagens Imi-Lab Sel e Imi-Res, tiveram maior sobrevivência, no qual sua sobrevivência só reduziu a menos de 20% com mais de 300 h de exposição ao imidaclopride, para ambas as linhagens. A TL<sub>50</sub> para a Imi-Susc foi de TL<sub>50</sub> = 5,48 h (3,93 – 7,03 h), a TL<sub>50</sub> entre as linhagens resistente foi semelhante, para a Imi-Lab Sel foi de TL<sub>50</sub> = 133,66 h (96,95 - 170,37 h) e para a Imi-Res foi de TL<sub>50</sub> = 151,84 h (119,170 - 184,51 h) (Figura 3.3). As curvas de sobrevivência para adultos de *E. heros* das três linhagens

(i.e. Imi-Susc, Imi-Lab Sel e Imi-Res), expostos por contato ao resíduo seco e por ingestão por meio da vagem contaminada com solução inseticida de imidaclopride (12,6  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  equivalente a três vezes a dose de campo), variou significativamente das linhagens resistentes comparadas a suscetível (Teste Log-Rank  $\chi^2 = 298,77$ ,  $\text{gl} = 5$ ,  $P < 0,001$ ).

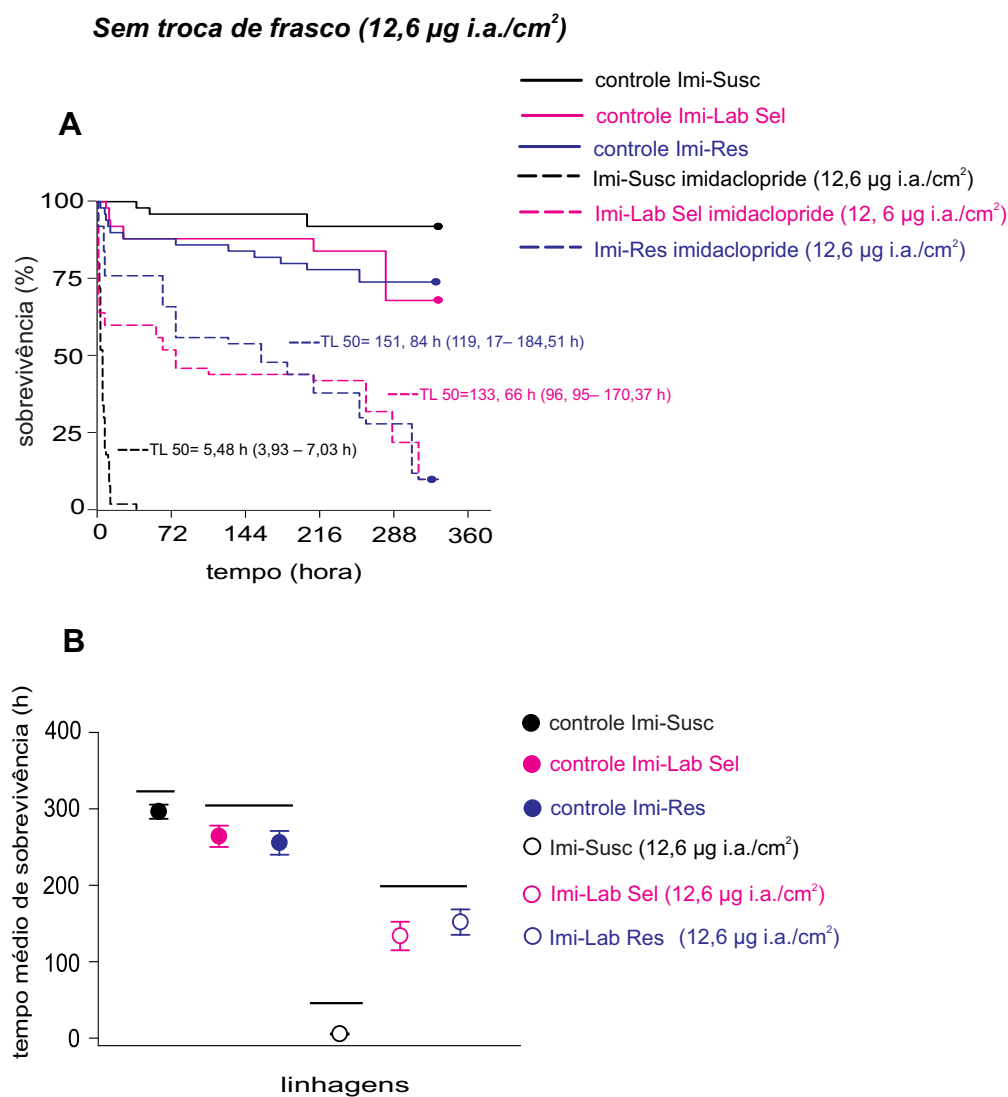


Figura 3.3: Curvas de sobrevivência de adultos de *E. heros* das três linhagens (Imi – Sus; Imi – Lab Sel e Imi-Res) sem troca de frasco a cada 72 h (A) durante exposição por contato e ingestão ao imidaclopride (12,6  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ ) e controle com os tempos médios ( $\pm\text{EP}$ ) de sobrevivência (B). Os símbolos no final da curva indicam dados censurados. Médias acompanhadas por linhas horizontais na mesma altura não diferem significativamente de acordo com o teste H – Sidak ( $P < 0,05$ ).

### 3.2.2 Bioensaio de sobrevivência com troca de frascos a cada 72 h

A exposição à concentração de 4,2 µg i.a./cm<sup>2</sup> do imidaclopride causou menor sobrevivência nos insetos das linhagens Imi-Susc, com 100% da mortalidade com mais de 144 h. Enquanto, Imi-Lab Sel e Imi-Res, tiveram maior sobrevivência, no qual sua sobrevivência só reduziu a menos de 20% com mais de 360 h de exposição ao imidaclopride, para ambas as linhagens (Figura 3.4).

A TL<sub>50</sub> da Imi-Susc foi de 50,38 h (31,37 – 69,48 h), já dos insetos da Imi-Lab Sel foi de TL<sub>50</sub> = 233,28 h (206,94 – 259,62 h) e dos da Imi-Res foi de TL<sub>50</sub> = 196 h (171,1- 222,2 h) (Figura 3.4). A sobrevivência da Imi -Susc foi menor em relação a da Imi-Lab Sel (Teste H-Sidak = 72,758, gl = 5,  $P < 0,001$ ) e da Imi -Res (Teste H-Sidak = 53,486, gl = 5,  $P < 0,001$ ), já entre as linhagens resistentes não diferiram significativamente (Teste H-Sidak = 4,526, gl = 5,  $P = 0,0657$ ).

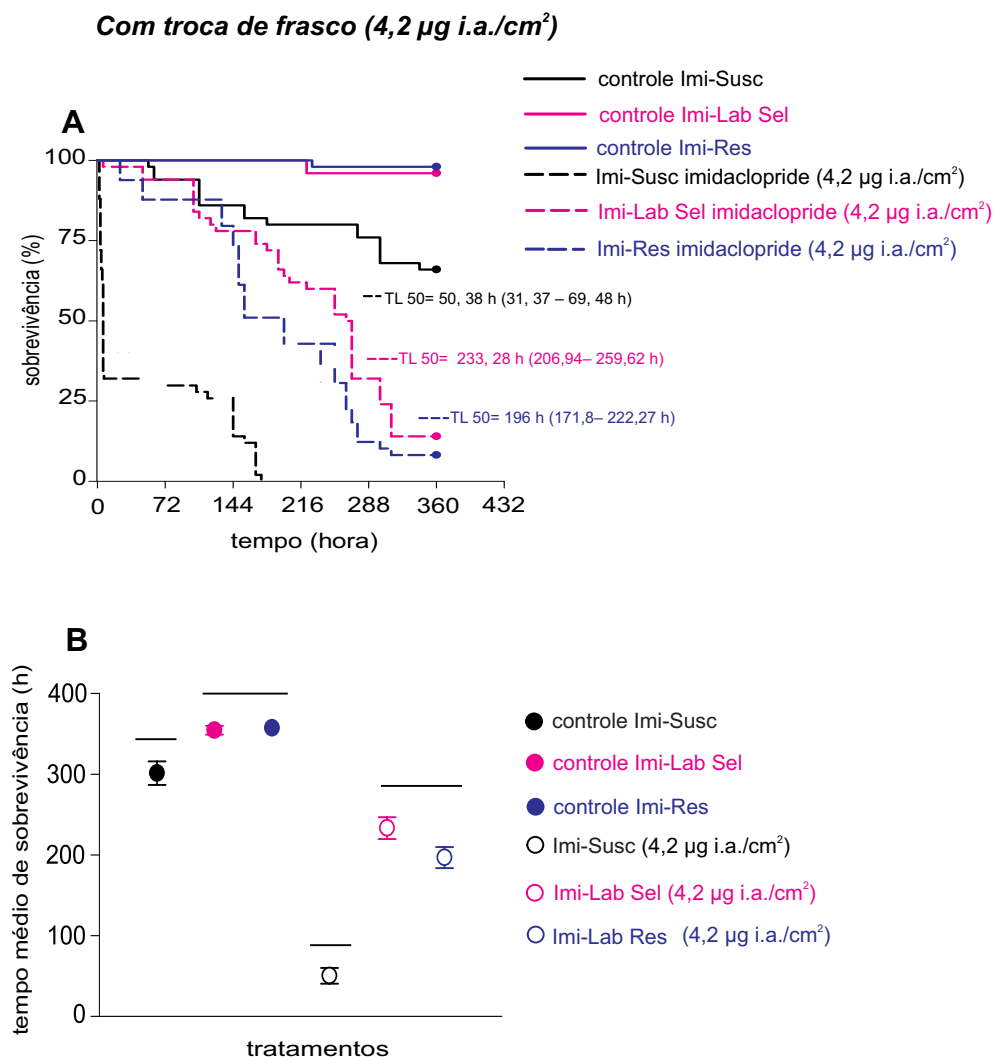


Figura 3.4: Curvas de sobrevivência de adultos de *E. heros* das três linhagens (Imi – Sus; Imi – Lab Sel e Imi-Res) com troca de frasco a cada 72 h (A) durante exposição por contato e ingestão ao imidaclopride (4,2 µg i.a./cm<sup>2</sup>) e controle com os tempos médios (±EP) de sobrevivência (B). Os símbolos no final da curva indicam dados censurados. Médias acompanhadas por linhas horizontais na mesma altura não diferem significativamente de acordo com o teste H – Sidak ( $P < 0,05$ ).

A exposição dos *E. heros* a concentração de 12,6 µg i.a./cm<sup>2</sup> do imidaclopride causou menor sobrevivência nos insetos das linhagens Imi-Susc, com 100% da mortalidade com 48 h. Enquanto, Imi-Lab Sel e Imi-Res, tiveram maior sobrevivência, no qual sua sobrevivência só reduziu a menos de 20% com mais de 320 h de exposição ao imidaclopride (Figura 3.5).

A TL<sub>50</sub> da Imi-Susc foi de 4,43 h (3,06 – 5,71 h). Para a Imi-Lab Sel a TL<sub>50</sub> foi de 214,64 h (182,64 – 246,64 h) e para a Imi – Res foi de TL<sub>50</sub>= 160,47 h (133,5 - 187,44 h) (Figura 3.5).

As curvas de sobrevivência para adultos de *E. heros* das três linhagens (i.e. Imi-Susc, Imi-Lab Sel e Imi-Res), expostos por contato ao resíduo seco e por ingestão por meio da vagem contaminada com solução inseticida de imidaclopride (12,6  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$  equivalente a 3 vezes a dose de campo) variou significativamente das linhagens resistentes comparadas a suscetível (Teste Log-Rank  $\chi^2 = 464,349$ ,  $g1 = 5$ ,  $P < 0,001$ ) (Figura 3.5).

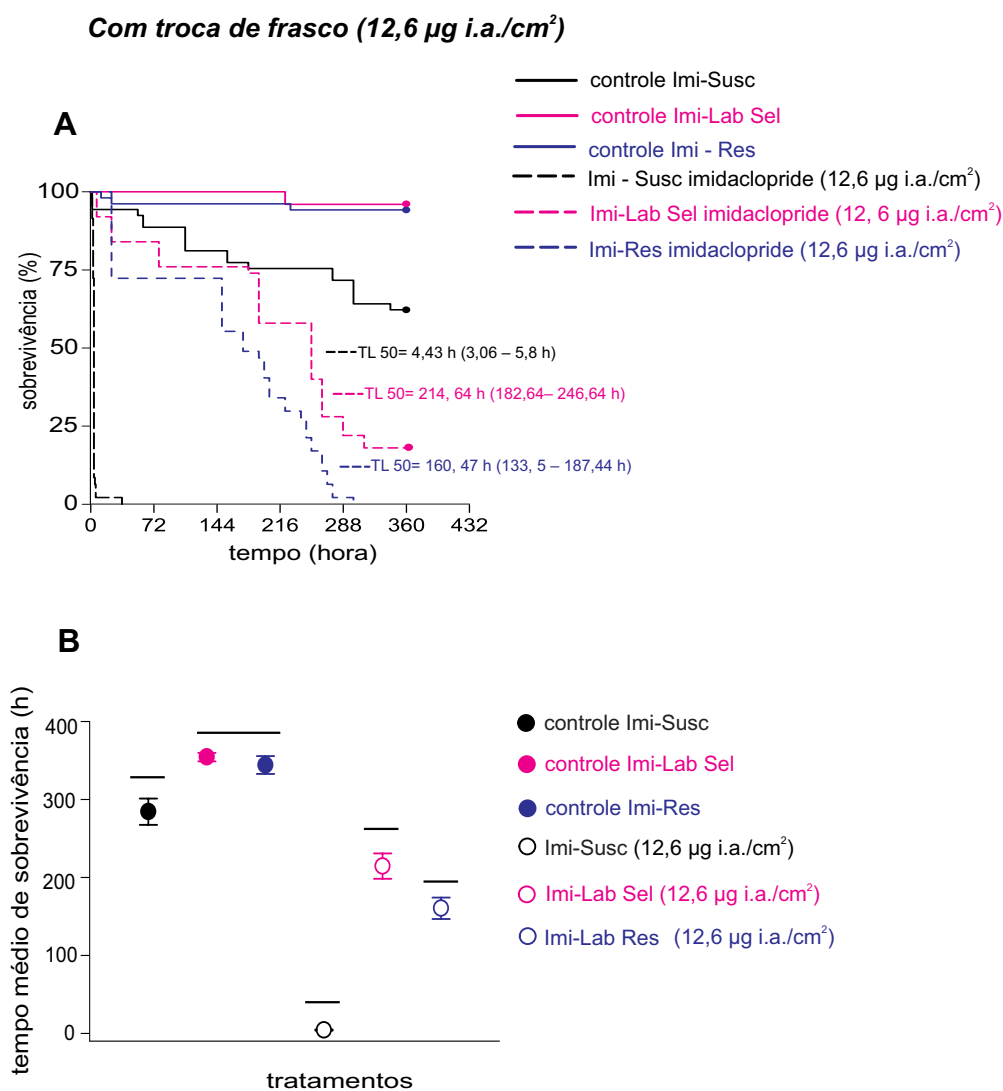


Figura 3.5: Curvas de sobrevivência de adultos de *E. heros* das três linhagens (Imi – Sus; Imi – Lab Sel e Imi-Res) com troca de frasco a cada 72 h (A) durante exposição por contato e ingestão ao imidaclopride (12,6  $\mu\text{g}$  i.a./ $\text{cm}^2$ ) e controle com os tempos médios ( $\pm$ EP) de sobrevivência (B). Os símbolos no final da curva indicam dados censurados. Médias acompanhadas por linhas horizontais na mesma altura não diferem significativamente de acordo com o teste H – Sidak ( $P < 0,05$ ).

### 3.3 Respirometria e massa corpórea

A taxa respiratória entre as três linhagens de *E. heros*, mensurada pela produção de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{L CO}_2 \text{ inseto}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), apresentou diferença significativa ( $F=19,243$ ;  $gl = 2$ ;  $P < 0,001$ ), assim como também para o sexo ( $F= 19,025$ ;  $gl = 1$ ;  $P < 0,001$ ). Não houve diferença significativa na interação linhagem e sexo ( $F= 0,286$ ;  $gl = 2$ ;  $P= 0,752$ ) (Tabela 1). A análise de variância da massa corpórea realizada antes do teste de respirometria indicou que insetos das linhagens resistentes são mais pesados que os da linhagem suscetível de *E. heros* ( $F= 10,252$ ;  $gl = 2$ ;  $P= < 0,001$ ), não foi observado diferença entre os sexos ( $F= 1,606$ ;  $gl = 2$ ;  $P= 0,207$ ) e nem na interação linhagem e sexo ( $F= 1,206$ ;  $gl = 2$ ;  $P= 0,302$ ) (Tabela 1).

Tabela 3.1: Análise de variância da produção de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{L de CO}_2 \text{ inseto}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e massa corpórea (mg) de insetos adultos recém - emergidos (< 24 h) das três linhagens de *E. heros*.

Fonte de variação	Produção de CO <sub>2</sub> ( $\mu\text{L CO}_2 \text{ inseto}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )			Massa corpórea (mg)		
	gl	F	P	gl	F	P
Linhagens	2	19,243	< 0,001*	2	10,252	< 0,001*
Sexo	1	19,025	< 0,001*	1	1,606	0,207
Linhagem x Sexo	2	0,286	0,752	2	1,20	0,302
Erro	171	-	-	176	-	-

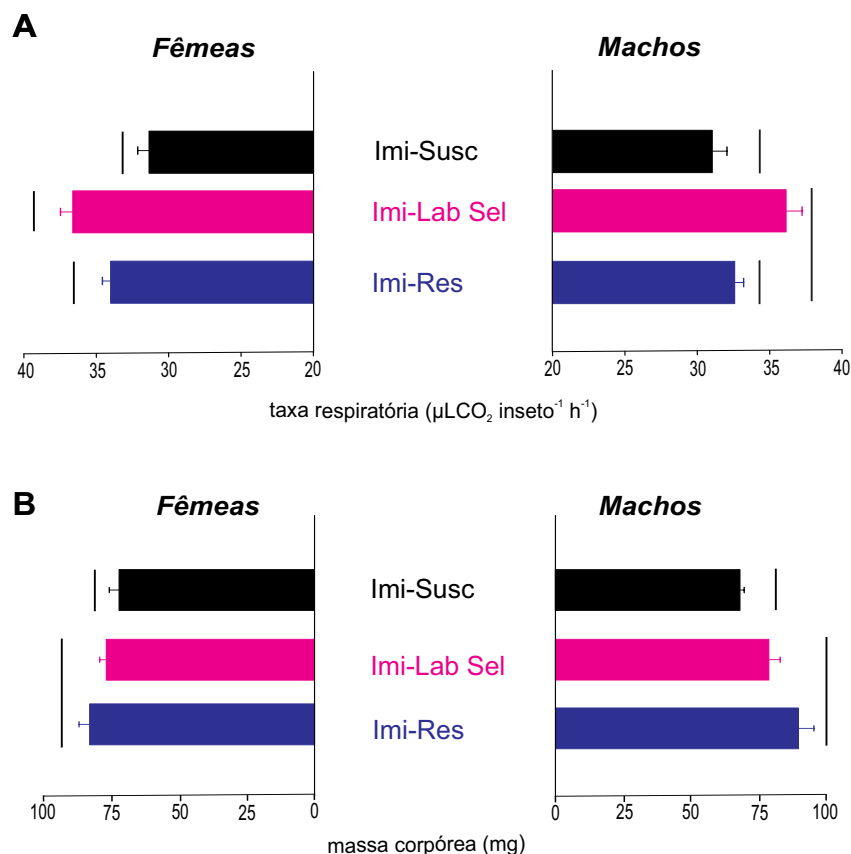


Figura 3.6: Produção de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{L de CO}_2 \text{ inseto}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) ( $\pm\text{EP}$ ) para insetos adultos recém-emergidos ( $< 24 \text{ h}$ ) das três linhagens de *E. heros* fêmeas e machos (**A**). Massa corpórea (mg) de insetos adultos recém-emergidos ( $< 24 \text{ h}$ ) das três linhagens de *E. heros* fêmeas e machos (**B**). Médias seguidas por linhas verticais na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Fêmeas adultas de *E. heros* da Imi-Lab Sel possuem maior taxa respiratória de  $6,66 \mu\text{L de CO}_2 \text{ inseto}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , seguida da Imi-Res de  $2,75 \mu\text{L de CO}_2 \text{ inseto}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a mais, quando comparadas com as fêmeas da Imi-Susc ( $P < 0,05$ ) (Figura 3.6A). Os machos da Imi-Lab Sel possuíram maior taxa respiratória de  $5,28 \mu\text{L de CO}_2 \text{ inseto}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a mais quando comparados com os machos da Imi-Susc, não houve diferença significativa na taxa respiratória entre os machos da Imi-Lab Sel e da Imi-Res ( $P < 0,05$ ) (Figura 3.6A).

Insetos adultos de ambos os sexos de *E. heros* das linhagens Imi-Lab Sel e Imi-Res tiveram massa corpórea semelhante entre-se e maior que a Imi-Susc ( $P < 0,05$ ) (Figura 3.6B). Fêmeas de *E. heros* da Imi-Lab Sel foram  $0,005 \text{ mg}$  e da Imi-Res foram  $0,012 \text{ mg}$  mais pesadas que fêmeas da Imi-Susc. Os machos da Imi-Lab Sel foram  $0,0089 \text{ mg}$  e da Imi-Res foram  $0,0195 \text{ mg}$  mais pesados que os machos da Imi-Susc.

## 4 Discussão

Neste estudo, verificou-se que as linhagens selecionadas de *E. heros*, após 14 gerações para a Imi-Lab Sel e 12 gerações para a Imi-Res, desenvolveram um alto nível de resistência ao inseticida neonicotinoide imidaclopride associado ao PBO sob seleção em laboratório ( $168 \mu\text{g i.a./cm}^2$ , equivalente a 40 vezes a dose de campo). Conferindo maior sobrevivência aos insetos das linhagens Imi-Lab Sel e Imi-Res selecionados ao imidaclopride quando expostos por contato e ingestão ao resíduo seco nas concentrações  $4,2$  e  $12,6 \mu\text{g i.a./cm}^2$  (equivalente a dose de campo e 3 vezes a dose de campo, respectivamente) quando comparados com os insetos da linhagem suscetível. Além disso, os resultados mostram que a seleção da resistência levou a alterações nas bases fisiológicas dos insetos, verificado pela elevação da taxa respiratória associada com a maior massa corpórea das linhagens resistentes quando comparado com a suscetível.

No Brasil populações do percevejo-marrom veem sendo controlada pelo uso de inseticidas neonicotinoides desde 2004 (Sosa-Gómez and Silva 2010; Haddi et al. 2016; Santos et al. 2016 a; Santos et al. 2016 b). Tuelher et al. 2018 observaram riscos na falha de controle no estado do Goiás, uma das principais áreas de produção de soja no Brasil, para beta-ciflutrina e imidaclopride em populações do percevejo-marrom-da-soja. Trabalhos com seleção em laboratório com o pulgão verde *Myzus persicae* (Wang et al. 2018) e com a cigarrinha do arroz *Nilaparvata lugens* (Liu and Han 2006), mostraram o desenvolvimento de níveis altos de resistência a neonicotinoides após contínuas seleções. Em algumas espécies com alta resistência ao imidaclopride, o PBO, composto inibidor das enzimas detoxificativas monooxigenases P450, têm funcionado como uma ferramenta poderosa com efeito sinérgico sobre o inseticida (Bingham et al. 2007), sugerindo assim, que as P450 podem desempenhar papel importante na resistência ao inseticida (Zewen et al. 2003; Tomizawa and Casida 2005; Karunker et al. 2009; Casida 2017).

No presente estudo, verificou-se que o uso do sinergista PBO associado ao inseticida imidaclopride não promoveu grande incremento na porcentagem de mortalidade dos

perceijos para ambas as linhagens selecionadas ao longo das gerações. Isto pode ser explicado, pela possibilidade dos insetos possuírem mais de um mecanismo de resistência (Clements et al. 2017a). Estudo realizado por Kim et al. 2015 com o *Aphis gossypii*, mostraram, por meio de bioensaios com sinergistas que os fatores metabólicos provavelmente não estavam envolvidos na resistência ao imidaclopride, os autores verificaram que a resistência estava relacionada com a mutação nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) ocasionada pela substituição da R81T na subunidade  $\beta$  1.

Outra explicação é que o sinergista PBO, embora seja inibidor da classe geral das enzimas P450, pode está sendo ineficiente em inibir a isoenzima responsável pela resistência nas linhagens, visto que as P450 possuem uma variedade grande de famílias (Pimprikar and Georgiou 1979). Estes resultados indicam que a resistência ao imidaclopride é um fenômeno evolucionário decorrente da contínua pressão de seleção, em que o inseticida pode funcionar como uma peneira seletiva levando ao aumento de fenótipos resistentes que estavam presentes em baixa frequência em populações naturais (Abbas et al. 2014).

O presente estudo mostrou, que seleções por sucessivas gerações em duas linhagens de *E. heros* (i.e. Imi-Lab Sel e Imi-Res) ao imidaclopride sob condições de laboratório, proporcionou maior sobrevivência a estes indivíduos quando expostos ao resíduo seco por contato e ingestão comparados com insetos suscetíveis. Estes resultados corroboram com estudos anteriores sobre a evolução de resistência a inseticidas, que a aplicação contínua destes químicos sobre uma população de insetos-praga leva a seleção de indivíduos capazes de resistir aos efeitos tóxicos do inseticida, provavelmente esta capacidade pode está ligada ao desenvolvimento de mecanismos fisiológicos, bioquímicos e/ou comportamental, (Nauen and Denholm 2005; Bass et al. 2014; Casida 2017).

O experimento com troca dos frascos contaminados com o resíduo seco do imidaclopride a cada 72 h não apresentou diferença no tempo médio letal (TL<sub>50</sub>) quando comparados com o bioensaio sem troca de frascos a cada 72 h para as linhagens resistentes e para a suscetível. Estes, foram realizados para observar se poderia ocorrer alguma diferença na sobrevivência entre os insetos expostos aos tratamentos, já que o imidaclopride é um inseticida fotossensível, e a sua degradação ao longo do tempo poderia

reduzir o seu efeito agudo sobre os insetos influenciando os resultados da sobrevivência nas linhagens testadas. Černigoj et al. (2007), verificaram que o tempo médio de degradação (TD<sub>50</sub>) do imidaclopride pela fotólise em seus experimentos ocorreu em menos de 2 h.

Uma suposição para a não ocorrência de diferença entre os experimentos de sobrevivência é a duração dos efeitos tóxicos do imidaclopride no corpo do inseto. Em estudos realizados com abelhas foi verificado que quando estas eram expostas a dose única do imidaclopride, havia presença do composto e dos seus metabólitos no organismo dos insetos até mesmo 48 h depois, além disso, também observaram que o efeito do imidaclopride se intensificou após as 24 h e com 72 h as abelhas apresentaram menos movimentos (Suchail et al. 2004; Schott et al. 2017). Embora, que não houvesse a troca de frascos impregnados com o resíduo seco de imidaclopride a cada 72 h, havia sempre a troca de vagens contaminadas ao imidaclopride a cada 72 h ao longo dos experimentos de sobrevivência para ambos os bioensaios, o qual poderia está influenciando os resultados do experimento sem troca cada 72 h.

A capacidade dos insetos das linhagens resistente em suportar os efeitos tóxicos pela exposição ao imidaclopride pode levar a alterações nas bases fisiológicas destes indivíduos (Guedes et al. 2006). Os resultados da respirometria mostraram que as fêmeas de *E. heros* das linhagens resistentes e os machos da Imi-Lab Sel possuem maior taxa respiratória quando comparadas com a linhagem suscetível, já os machos da Imi-Res não diferiram quando comparados com os da Imi-Susc. Na quantificação da massa corpórea, ambos os sexos de *E. heros* das linhagens resistente, Imi-Lab Sel e Imi-Res, possuíram maior massa corpórea.

A maioria das estruturas que compõem os seres vivos é produzida a partir de três classes básicas de molécula, os aminoácidos, glicídios e lipídeos. Assim, estes indivíduos precisam produzir maiores quantidades das mesmas, para a manutenção dos mecanismos que os confere a resistência ao imidaclopride. Desta forma, a maior taxa metabólica pode estar relacionada com maiores produções ou modificações das proteínas responsáveis por codificarem as enzimas destoxificativas e/ou as que fazem parte das estruturas do sítio-alvo do imidaclopride (Richard et al. 2017).

A maior produção de CO<sub>2</sub> pelas linhagens resistente, provavelmente, está relacionada com o maior requerimento de reservas energéticas, como observado por Guedes

et al. (2006). Eles verificaram em populações de carunchos do milho *Sitophilus zeamais* resistente a piretroíde maior massa corpórea associada com trofócitos maiores (i.e. células constituintes do corpo gorduroso dos insetos) que em população suscetível.

A semelhança na taxa respiratória entre machos da Imi-Susc e da Imi-Res, pode ter ocorrido pela maior eficiência na mobilização de reservas energéticas para a detoxificação do inseticida, reduzindo assim, possíveis custos adaptativos (Guedes et al. 2006; Rivero et al. 2011). Acredita-se que o custo adaptativo inicial da resistência pode diminuir gradualmente devido a subseqüentes mutações, as quais podem envolver genes modificados ou substituição por outros que possuem menores custos fisiológicos (Crow 1957; Roush and McKenzie 1987).

Outro fator que pode ter influência nesse resultado, é, que os *E. heros* da linhagem Imi-Res são insetos derivados de coleta no campo e estavam expostos há uma variedade de fatores estressores, desta forma, pode ser que o estabelecimento da resistência ocorreu mais rápido através da integração do background genético (Kliot and Ghanim 2012). Isso ocorre devido à variação genética que há em uma população, e é graças a ela que podem ocorrer as seleções de indivíduos mais adaptados aos estressores ambientais (Georghiou 1972).

A evolução de resistência ao imidaclopride veem se destacando como um dos grandes problemas enfrentado no controle de insetos – praga e na perda da eficácia de inseticidas (Bass et al. 2014; French-Constant and Bass 2017). Seleções laboratoriais com linhagens de *E. heros*, mostraram que estes foram capazes de tolerar altas concentrações do imidaclopride ao longo das gerações, desenvolvendo assim, um alto nível de resistência ao químico, implicando em alterações nas bases fisiológicas dos mesmos.

Assim, mais pesquisas são necessárias para entender os mecanismos envolvidos e os custos adaptativos desse fenômeno para as duas linhagens de *E. heros* selecionadas neste trabalho para o inseticida imidaclopride, para auxiliar no controle desta praga nos campos agrícolas (Gordon et al. 2015; Richard et al. 2017; Ejaz et al. 2017; Wang et al. 2018). Sabendo que muitas vezes as medidas de controle só são tomadas quando já tem a constatação de falhas de controle da praga pelo inseticida no campo. Pesquisas laboratoriais relacionadas a este cenário, são uma ferramenta valiosa para avaliar os riscos do desenvolvimento da resistência a inseticidas, assim como, os mecanismos

envolvidos, servindo de base para tomada de decisões preventivas nos programas de manejo de resistência.

## 5 Conclusões

As linhagens de *E. heros*, Imi-Lab Sel e Imi-Res , após sucessivas gerações expostas a concentrações do imidaclopride sob condições laboratoriais desenvolveram altos níveis de resistência ao inseticida. O uso do imidaclopride associado ao sinergista PBO não causou incrementos na mortalidade dos insetos. Os insetos das linhagens resistentes, apresentaram maior sobrevivência quando expostos por contato e ingestão ao resíduo seco do imidaclopride e a seleção ao imidaclopride conferiu alterações fisiológicas para a Imi-Lab Sel e Imi-Res, como, na taxa respiratória e na massa corpórea.

## **6 Agradecimentos**

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

## 7 Referências

- Abbas, N., H. Khan, and S. A. Shad (2014). Cross-resistance, stability, and fitness cost of resistance to imidacloprid in *Musca domestica* L., (diptera: Muscidae). *Parasitology Research* 114(1), 247–255.
- Bass, C., I. Denholm, M. S. Williamson, and R. Nauen (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121, 78–87.
- Bass, C., A. M. Puinean, C. T. Zimmer, I. Denholm, L. M. Field, S. P. Foster, O. Gutbrod, R. Nauen, R. Slater, and M. S. Williamson (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 51, 41–51.
- Bingham, G., R. V. Gunning, G. Delogu, V. Borzatta, L. M. Field, and G. D. Moores (2007). Temporal synergism can enhance carbamate and neonicotinoid insecticidal activity against resistant crop pests. *Pest Management Science* 64(1), 81–85.
- Borges, M., R. Laumann, C. Da Silva, M. Moraes, H. Dos Santos, and D. Ribeiro (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*. 182.
- Carriere, Y., J.-P. Deland, D. Roff, and C. Vincent (1994). Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. *Proceedings Royal Society B* 258(1351), 35–40.
- Casida, J. E. (2017). Pesticide interactions: Mechanisms, benefits, and risks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(23), 4553–4561.
- Casida, J. E. (2018). Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: progress and prospects. *Annual Review of Entomology* 63, 125–144.
- Casida, J. E. and K. A. Durkin (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology* 58, 99–117.
- Černigoj, U., U. L. Štangar, and P. Trebše (2007). Degradation of neonicotinoid insecticides by different advanced oxidation processes and studying the effect of ozone on TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Applied Catalysis B: Environmental* 75(3-4), 229–238.
- Chen, X., F. Li, A. Chen, K. Ma, P. Liang, Y. Liu, D. Song, and X. Gao (2017). Both point mutations and low expression levels of the nicotinic acetylcholine receptor 1 subunit

- are associated with imidacloprid resistance in an *Aphis gossypii* (glover) population from a Bt cotton field in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 141, 1–8.
- Clements, J., S. Schoville, N. Peterson, A. S. Huseeth, Q. Lan, and R. L. Groves (2017a). RNA interference of three up-regulated transcripts associated with insecticide resistance in an imidacloprid resistant population of *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 135, 35–40.
- Colasso, C. G. and M. B. Diaz (2015). Estudo dos aspectos toxicológicos à saúde humana em relação ao praguicida organofosforado metamidofós e sua situação regulatória no Brasil e no mundo. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade* 4(3), 173–204.
- Corrêa-Ferreira, B. S. and A. R. Panizzi (1999). *Percevejos da soja e seu manejo*. Embrapa-CNPSo Londrina.
- Crow, J. F. (1957). Genetics of insect resistance to chemicals. *Annual Review of Entomology* 2(1), 227–246.
- da Rocha, F., F. Bermudez, M. C. Ferreira, K. C. de Oliveira, and J. B. Pinheiro (2014). Effective selection criteria for assessing the resistance of stink bugs complex in soybean. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14(3), 174–179.
- Dângelo, R., M. Michereff-Filho, M. Campos, P. da Silva, and R. Guedes (2017). Insecticide resistance and control failure likelihood of the whitefly *Bemisia tabaci* (MEAM1 b biotype): a Neotropical scenario. *Annals of Applied Biology* 172(1), 88–99.
- Ejaz, M., M. B. S. Afzal, G. Shabbir, J. E. Serrão, S. A. Shad, and W. Muhammad (2017). Laboratory selection of chlorpyrifos resistance in an invasive pest, *Phenacoccus solenopsis* (Homoptera: Pseudococcidae): Cross-resistance, stability and fitness cost. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 137, 8–14.
- Elbert, A., M. Haas, B. Springer, W. Thielert, and R. Nauen (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science* 64(11), 1099–1105.
- Feyereisen, R. (2015). Insect p450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. *Pest Management Science* 71(6), 793–800.
- French-Constant, R. H. and C. Bass (2017). Does resistance really carry a fitness cost? *Current opinion in insect science* 21, 39–46.
- Foster, S. P., M. Tomiczek, R. Thompson, I. Denholm, G. Poppy, A. R. Kraaijeveld, and W. Powell (2007). Behavioural side-effects of insecticide resistance in aphids increase their vulnerability to parasitoid attack. *Animal Behaviour* 74(3), 621–632.
- Fragoso, D. B., R. N. Guedes, and J. A. Ladeira (2003). Selection in the evolution of resistance to organophosphates in *Leucoptera coffeella* (guérin-mèneville)(lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotropical Entomology* 32(2), 329–334.

- Garrood, W. T., C. T. Zimmer, K. J. Gorman, R. Nauen, C. Bass, and T. G. Davies (2015). Field-evolved resistance to imidacloprid and ethiprole in populations of brown planthopper *Nilaparvata lugens* collected from across South and East Asia. *Pest Management Science* 72(1), 140–149.
- Georghiou, G. P. (1972). The evolution of resistance to pesticides. *Annual Review of Ecology and Systematics* 3(1), 133–168.
- Gordon, J. R., M. F. Potter, and K. F. Haynes (2015, jun). Insecticide resistance in the bed bug comes with a cost. *Scientific Reports* 5(1).
- Gorman, K., Z. Liu, I. Denholm, K.-U. Brüggen, and R. Nauen (2008). Neonicotinoid resistance in rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science* 64(11), 1122–1125.
- Guedes, R. N. C., E. Oliveira, N. Guedes, B. Ribeiro, and J. Serrão (2006). Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31(1), 30–38.
- Haddi, K., M. V. Mendes, M. S. Barcellos, J. Lino-Neto, H. L. Freitas, R. N. C. Guedes, and E. E. Oliveira (2016). Sexual success after stress? imidacloprid-induced hormesis in males of the neotropical stink bug *Euschistus heros*. *Plos One* 11(6), e0156616.
- Haddi, K., L. P. Mendonça, M. F. Dos Santos, R. N. C. Guedes, and E. E. Oliveira (2015). Metabolic and behavioral mechanisms of indoxacarb resistance in *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of economic entomology* 108(1), 362–369.
- Hegeto, L., L. Ronqui, A. Lapenta, and F. Albuquerque (2015). Identification and functional characterization of esterases in *Euschistus heros* (Hemiptera, Pentatomidae) and their relationship with thiamethoxam and lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Research* 14(3), 11079–11088.
- Hoffmann-Campo, C. B., F. Moscardi, B. S. Corrêa-Ferreira, L. J. Oliveira, D. R. Sosa-Gómez, A. R. Panizzi, I. C. Corso, D. L. Gazzoni, and E. d. Oliveira (2000a). *Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado*. Embrapa soja Londrina.
- Kaplanoglu, E., P. Chapman, I. M. Scott, and C. Donly (2017). Overexpression of a cytochrome P450 and a UDP-glycosyltransferase is associated with imidacloprid resistance in the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Scientific Reports* 7(1).
- Karunker, I., E. Morou, D. Nikou, R. Nauen, R. Sertchook, B. J. Stevenson, M. J. Paine, S. Morin, and J. Vontas (2009, oct). Structural model and functional characterization of the *Bemisia tabaci* CYP6cm1vq, a cytochrome p450 associated with high levels of imidacloprid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(10), 697–706.
- Kim, J. I., M. Kwon, G.-H. Kim, S. Y. Kim, and S. H. Lee (2015, jun). Two mutations in nAChR beta subunit is associated with imidacloprid resistance in the *Aphis gossypii*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 18(2), 291–296.

- Kliot, A. and M. Ghanim (2012). Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science* 68(11), 1431–1437.
- Liu, G.-Y., X.-L. Ju, and J. Cheng (2010). Selectivity of imidacloprid for fruit fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modeling. *Journal of molecular modeling* 16(5), 993–1002.
- Liu, Z. and Z. Han (2006). Fitness costs of laboratory-selected imidacloprid resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* stål. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* 62(3), 279–282.
- Nauen, R. and I. Denholm (2005). Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 58(4), 200–215.
- Naveen, N. C., R. Chaubey, D. Kumar, K. B. Rebijith, R. Rajagopal, B. Subrahmanyam, and S. Subramanian (2017, jan). Insecticide resistance status in the whitefly, *Bemisia tabaci* genetic groups Asia-i, Asia-II-1 and Asia-II-7 on the indian subcontinent. *Scientific Reports* 7(1), 40634.
- Oliveira, E. E., R. N. C. Guedes, M. R. Totola, and P. De Marco Jr (2007). Competition between insecticide-susceptible and-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Chemosphere* 69(1), 17–24.
- Panizzi, A. R., A. d. F. Bueno, and F. d. Silva (2012). Insetos que atacam vagens e grãos. *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília: Embrapa*, 335–420.
- Pereira, C., E. Pereira, E. Cordeiro, T. Della Lucia, M. Tótola, and R. Guedes (2009). Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: magnitude and behavior. *Crop Protection* 28(2), 168–173.
- Pimprakar, G. D. and G. P. Georghiou (1979, aug). Mechanisms of resistance to diflubenzuron in the house fly, *Musca domestica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 12(1), 10–22.
- Reid, W. R., H. Sun, J. J. Becnel, A. G. Clark, and J. G. Scott (2018). Overexpression of a glutathione S-transferase (Mdgst) and a galactosyltransferase-like gene (Mdgt1) is responsible for imidacloprid resistance in house flies. *Pest Management Science*.
- Richard, H. et al. (2017). Does resistance really carry a fitness cost? *Current Opinion in Insect Science*.
- Rivero, A., A. Magaud, A. Nicot, and J. Vézilier (2011, may). Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Journal of Medical Entomology* 48(3), 694–700.
- Roush, R. T. and J. A. McKenzie (1987). Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual review of entomology* 32(1), 361–380.

- Santos, M., R. Santos, H. Tomé, W. Barbosa, G. Martins, R. Guedes, and E. Oliveira (2016). Imidacloprid-mediated effects on survival and fertility of the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Journal of Pest Science* 89(1), 231–240.
- Santos, M. F., M. R. Campos, J. N. Bravim, E. E. Oliveira, and R. N. C. Guedes (2016). Non-targeted insecticidal stress on the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Crop Protection* 82, 10–16.
- Schott, M., G. Bischoff, G. Eichner, A. Vilcinskas, R. BÄEchler, M. D. Meixner, and A. Brandt (2017). Temporal dynamics of whole body residues of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in live or dead honeybees. *Scientific Reports* 7(1).
- Silva, C. C., R. A. Laumann, M. C. Blassioli, M. Pareja, and M. Borges (2008). *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of telenomus podisi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(5), 575–580.
- Simon-Delso, N., V. Amaral-Rogers, L. P. Belzunces, J.-M. Bonmatin, M. Chagnon, C. Downs, L. Furlan, D. W. Gibbons, C. Giorio, V. Girolami, G. D. P. K. D, H. K. C, L. M, L. E, M. McField, M. P, A. D. M. E, A. M. C, A. N. D, L. Pisa, S. J, D. S. J, T. A, V. D. H, V. P. J, P. V. d. S. J, R. W. P, and W. M (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1), 5–34.
- Snodgrass, G., J. Adamczyk Jr, and J. Gore (2005). Toxicity of insecticides in a glass-vial bioassay to adult brown, green, and southern green stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Economic Entomology* 98(1), 177–181.
- Sosa-Gomez, D. R., I. C. Corso, and L. Morales (2001). Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and metamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). *Neotropical Entomology* 30(2), 317–320.
- Sosa-Gómez, D. R. and J. J. d. Silva (2010). Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45(7), 767–769.
- Suchail, S., L. Debrauwer, and L. P. Belzunces (2004). Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science* 60(3), 291–296.
- Tomizawa, M. and J. E. Casida (2005). Neonicotinoid Inseticide Toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45(1), 247–268.
- Tuelher, E. S., É. H. da Silva, H. S. Rodrigues, E. Hirose, R. N. C. Guedes, and E. E. Oliveira (2018). Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Journal of Pest Science* 91(2), 849–859.

- Villas-BÃŽas, G.L. Gazzoni, D. O. M. C. N. R. A. F.-N. J. H. A. (1990. 43p.). Efeito de diferentes populaÃ§Ãµes de percevejos sobre o rendimento e seus componentes, caracteristicas agronomicas e qualidade de semente de soja. *Embrapa – CNPSo. Boletim de Pesquisa*, 1.
- Voudouris, C. C., M. S. Williamson, P. J. Skouras, A. N. Kati, A. J. Sahinoglou, and J. T. Margaritopoulos (2017). Evolution of imidacloprid resistance in *Myzus persicae* in Greece and susceptibility data for spirotetramat. *Pest Management Science* 73(9), 1804–1812.
- Wang, Z.-H., Y.-J. Gong, J.-C. Chen, X.-C. Su, L.-J. Cao, A. A. Hoffmann, and S.-J. Wei (2018). Laboratory selection for resistance to sulfoxaflor and fitness costs in the green peach aphid *Myzus persicae*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 21(1), 408–412.
- Willrich, M., B. R. Leonard, and D. Cook (2003). Laboratory and field evaluations of insecticide toxicity to stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of cotton science* 7, 156–163.
- Zewen, L., H. Zhaojun, W. Yinchang, Z. Lingchun, Z. Hongwei, and L. Chengjun (2003). Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: cross-resistance patterns and possible mechanisms. *Pest Management Science* 59(12), 1355–1359.