



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULO SÉRGIO GIMENEZ CREMONEZ

**ALTERAÇÕES MORFO-FISIOLÓGICAS EM *Euschistus heros*
FABR. (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) TRATADOS COM
CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DE PIRIPROXIFEM**

Londrina
2020

PAULO SÉRGIO GIMENEZ CREMONEZ

**ALTERAÇÕES MORFO-FISIOLÓGICAS EM *Euschistus heros*
FABR. (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) TRATADOS COM
CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DE PIRIPROXIFEM**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro
Neves

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela de Oliveira
Pinheiro

Londrina
2020

PAULO SÉRGIO GIMENEZ CREMONEZ

**ALTERAÇÕES MORFO-FISIOLÓGICAS EM *Euschistus heros* FABR.
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) TRATADOS COM
CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DE PIRIPROXIFEM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina,
como requisito à obtenção do título de Doutor em
Agronomia

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro
Neves
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela de Oliveira
Pinheiro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Ayres Oliveira Menezes Júnior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Sheila Michele Levy
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Samuel Roggia
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos
Universidade Estadual de São Paulo - UNESP

Londrina, 16 de dezembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À minha mãe, pai (*in memoriam*), irmãos e família.

À Roberta Cremones e família Santos.

Aos orientadores, prof. Pedro Neves e profa. Daniela Pinheiro.

Aos docentes dos Departamentos de Agronomia e Histologia da UEL, em especial: profs. Amarildo Pasini, Ayres Menezes Jr. e Maurício Ventura, profas. Ângela Falleiros, Eliane Victoriano e Sheila Levy.

Ao Programa de Pós-graduação de Agronomia-UEL.

Aos técnicos e equipe da UEL: Davi Tramontina (ento), José Rocha (fito), Renata Baldo, Andréia Pupim e Miriam Vicentini (histo), Márcio Praxedes e João Machado (solos), Alessandra (TAM).

Ao dr. Samuel Roggia, dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo e Jovenil Silva, da Embrapa Soja.

À profa. Daniela Carvalho dos Santos, da UNESP Botucatu.

À equipe de Cape Town (Doutorado Sanduíche): dra. Heather Marco, prof. Gerd Gäde, Andrea Plos, Liesl Phigeland e Calvin Hartnick, da UCT; à Jo Fitzmaurice e Mark Anthony Hunting, de Oranjezicht City Garden; à Andrew Hacking, da Philagro; e à família Mulder.

Aos amigos da UEL: Janaína e Alexandre, Matheus, Alex (Lab. de Ento), Lucas Moraes e Alex Figueiredo (Lab. de Solos), Lucas Fantin (Lab. de Fito), e os legados da graduação Lorrant, Lucas Oliveira, Rafael Hayashida, Emerson e Matheus.

Aos amigos da vida: Mallone, Evandro, Lucas, Marcelo e Fernando.

À CAPES/Fundação Araucária, pela bolsa concedida.

À todos que contribuíram durante essa jornada.

Os tons mais silenciosos da aparente quietude da natureza são perceptíveis nas mais baixas camadas da atmosfera: o som abafado e zumbido dos insetos. É uma das muitas vozes da natureza que são discerníveis à solene e receptiva mente humana.

Alexander von Humboldt, *A Invenção da Natureza*

CREMONEZ, Paulo Sérgio Gimenez. **Alterações morfo-fisiológicas em *Euschistus heros* Fabr. (Hemiptera: Pentatomidae) tratados com concentração subletal de piriproxifem.** 2020. 115 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A principal tática de controle do percevejo marrom Neotropical *Euschistus heros*, praga-chave da soja no Brasil, envolve o uso de inseticidas neurotóxicos, como neonicotinóides e piretróides, que muitas vezes se tornam ineficientes. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a ação de piriproxifem (inseticida desregulador de crescimento) sobre aspectos morfométricos, biológicos e de componentes circulantes na hemolinfa de *E. heros* fêmeas e machos. Para isto, uma concentração subletal pré-determinada de piriproxifem (Tiger[®], CL₃₀ = 0,688 mg L⁻¹) foi utilizada, aplicada topicamente sobre grupos de dez ninfas de quarto instar, sendo utilizados adultos remanescentes para os seguintes bioensaios: i. uma análise de consumo alimentar e morfométrica de corpo foi realizada para observar possíveis padrões de polimorfismo em função do sexo e da exposição ao inseticida; ii. quantificação de fertilidade, fecundidade e análise morfométrica e morfológica de órgãos reprodutivos em 0, 5, 10 e 15 dias de idade adulta; iii. perfil de componentes circulantes, lipídios e carboidratos em 0, 5, 10 e 15 dias de idade, e níveis de micro-elementos Ni, Cu e Zn na hemolinfa de percevejos com 5 dias de idade. Foi possível constatar que piriproxifem possui tendência em afetar o consumo alimentar de *E. heros*, bem como causa alterações morfológicas e morfométricas externas sobre o corpo e internas no sistema reprodutor em ambos os sexos, principalmente sobre a estrutura ovariana: desarranjo das células nutridoras, aumento no tamanho dos oócitos basais no início do desenvolvimento sexual, acompanhados de uma diminuição na espessura do epitélio folicular em fêmeas. Em machos, foram observadas diminuição do tamanho e na forma da cápsula testicular e diminuição na área de núcleos de células acessórias testiculares. Com relação aos níveis de metabólitos energéticos, a concentração de lipídios e carboidratos na hemolinfa de *E. heros* variou entre os sexos, idades e tratamentos. Com relação aos componentes circulantes da hemolinfa, lipídio foi o principal metabólito energético, apresentando níveis maiores em fêmeas. A concentração de carboidratos foi mais sensível à exposição com piriproxifem. Os níveis de micro-elementos são variáveis entre machos e fêmeas; Ni e Zn diminuí consideravelmente após o tratamento com piriproxifem, e a concentração de Cu é similar entre fêmeas e machos não tratados, aumentando em machos tratados. Sendo assim, é possível concluir que a concentração subletal de piriproxifem sobre *E. heros* afeta o desenvolvimento de *E. heros* em diferentes aspectos, em decorrência da ação direta e/ou indireta, causando distúrbios sobre a fisiologia do percevejo. O uso de piriproxifem sobre *E. heros* como alternativa a inseticidas neurotóxicos pode ser uma estratégia eficiente em termos de supressão de níveis populacionais.

Palavras-chave: Percevejos fitófagos. Hormônio juvenil. Fisiologia reprodutiva de insetos. Análises quantitativas. Proteção de culturas.

CREMONEZ, Paulo Sérgio Gimenez. **Morpho-physiological alterations in *Euschistus heros* Fabr. (Hemiptera: Pentatomidae) treated with sub-lethal concentration of pyriproxyfen.** 2020. 115 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The main control tactics of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*, the main soybean pest in Brazil, involve the use of neurotoxic insecticides, such as neonicotinoids and pyrethroids, which are often inefficient. Thus, the objectives of this work were to evaluate the action of pyriproxyfen (insecticide growth disruptor) on morphometric, biological and circulating components in the hemolymph of female and male *E. heros*. For this, a pre-determined sublethal concentration of pyriproxyfen (Tiger®, $LC_{30} = 0.688 \text{ mg L}^{-1}$) was used, applied topically over groups of ten fourth instar nymphs, with remaining adults being used for the following bioassays: i. an analysis of food consumption and body morphometry was carried out to observe possible patterns of polymorphism depending on sex and exposure to the insecticide; ii. quantification of fertility, fertility and morphometric and morphological analysis of reproductive organs at 0, 5, 10 and 15 days of adulthood; iii. profile of circulating components, lipids and carbohydrates at 0, 5, 10 and 15 days of age, and levels of microelements Ni, Cu and Zn in the hemolymph of bedbugs at 5 days of age. It was possible to verify that pyriproxyfen has a tendency to affect food consumption in *E. heros*, as well as causing morphological and morphometric changes on the body and on the reproductive system in both sexes, mainly on the ovarian structure, breakdown of the nutrient cells, increase in basal oocyte size at the beginning of sexual development, accompanied by a decrease in the thickness of the follicular epithelium in females, as well as a decrease in the size and shape of the testicular capsule and a decrease in the area of testicular accessory cell nuclei in males. Regarding levels of energy metabolites, the concentration of lipids and carbohydrates in the hemolymph of *E. heros* is variable between sexes, ages and treatments. Regarding circulating components of hemolymph, lipid is the main energy metabolite, with higher levels in females. The concentration of carbohydrates is more sensitive to exposure with pyriproxyfen. The levels of microelements are variable between males and females; Ni and Zn decrease considerably after treatment with pyriproxyfen, and the concentration of Cu is similar between untreated females and males, increasing in treated males. Thus, it is possible to conclude that the sublethal concentration of pyriproxyfen on *E. heros* indicates a possible effect on the development of *E. heros* in different aspects, due to the direct and / or indirect action, causing disturbances on the physiology of the bug. The use of pyriproxyfen in *E. heros* as an alternative to neurotoxic insecticides can be an efficient strategy in terms of suppressing population levels.

Keywords: Phytophagous stink bugs. Juvenile hormone. Insect reproductive physiology. Quantitative analyses. Crop protection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1	Desenvolvimento de um ovariólomeroísticotelotrófico de Hemiptera.....	23
Figura 2.2	Esquema generalizado representando um folículo testicular de insetos....	24
Figura 2.3	Modelo esquemático generalizado sobre a regulação fisiológica da reprodução em insetos.....	27
Figura 3.1	Marcos morfométricos (MMs) definidos para análise morfométrica geométrica de <i>Euschistus heros</i>	43
Figura 3.2	Consumo alimentar de <i>Euschistus heros</i> tratados com piriproxifem	46
Figura 3.3	Análise de regressão entre variáveis métricas de <i>Euschistus heros</i> tratados com concentração subletal de piriproxifem	47
Figura 3.4	Relações alométricas entre diferentes variáveis de <i>Euschistus heros</i> tratados com concentração subletal de piriproxifem	49
Figura 3.5	Análise de componentes principais (PCA) e gráfico de correlação de variáveis morfométricas de corpo de <i>Euschistus heros</i> tratados com piriproxifem	50
Figura 3.6	Análise de componentes principais (PCA) de marcos morfométricos de <i>Euschistus heros</i> machos e fêmeas tratados com piriproxifem.....	53
Figura 3.7	Análise de variáveis canônicas (CVA) de marcos morfométricos de <i>Euschistus heros</i> machos e fêmeas tratados com piriproxifem	54
Figura 4.1	Ovariólos de fêmeas recém-emergidas (0 DAE) de <i>Euschistus heros</i> tratadas com concentração subletal de piriproxifem.....	67
Figura 4.2	Região de crescimento em ovariólos de fêmeas recém-emergidas (0 DAE) de <i>Euschistus heros</i> tratadas com concentração subletal de piriproxifem	68
Figura 4.3	Oócitos basais em diferentes estágios de desenvolvimento (DAE = dias após emergência) de fêmeas <i>Euschistus heros</i> tratadas com concentração subletal de piriproxifem.....	69
Figura 4.4	Espessura de epitélio folicular em ovariólos de <i>Euschistus heros</i> tratados com concentração subletal de piriproxifem	70
Figura 4.5	Correlação entre medida de área superficial do oócito basal e espessura do epitélio folicular em fêmeas <i>Euschistus heros</i> tratadas com piriproxifem	71

Figura 4.6	Análise morfométrica geométrica e área testicular de <i>Euschistus heros</i> tratados com concentração subletal de piriproxifem	74
Figura 4.7	Espermatogênese em testículo de <i>Euschistus heros</i>	74
Figura 4.8	Área nuclear de células acessórias testiculares de <i>Euschistus heros</i> tratados com concentração subletal de piriproxifem	75
Figura 5.1	Concentração de lipídios na hemolinfa de adultos <i>Euschistus heros</i> tratados e não tratados com piriproxifem.....	88
Figura 5.2	Concentração de carboidratos na hemolinfa de adultos <i>Euschistus heros</i> tratados e não tratados com piriproxifem.....	88
Figura 5.3	Varição de concentração de micro-elementos em hemolinfa de machos e fêmeas de <i>Euschistus heros</i> tratados com concentração subletal de piriproxifem em estágio juvenil final (N4).....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Medidas morfométricas de adultos de <i>Euschistus heros</i> tratados e não tratados com concentração subletal de piriproxifem	51
Tabela 4.1	Parâmetros reprodutivos de casais de <i>Euschistus heros</i> tratados e não tratados com concentração subletal de piriproxifem	65
Tabela 4.2	Análise morfométrica de oócitos basais de <i>Euschistus heros</i> tratados com concentração subletal de piriproxifem	70
Tabela 5.1	Níveis de concentração (mg L^{-1}) de micro-elementos na hemolinfa de <i>Euschistus heros</i> machos e fêmeas tratados com piriproxifem em concentração subletal	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHJ	Análogo do hormônio juvenil
AKH	Hormônio adipocinético
CA	<i>Corpora allata</i>
CAT	Célula acessória testicular
CC	<i>Corpora cardiaca</i>
CL ₃₀	Concentração subletal
Cu	Cobre
CVA	Análise de variáveis canônicas
Fe	Ferro
Ga	Gálio
GPA	Análise generalizada de Procrustes
HJ	Hormônio juvenil
HTH	Hormônio hipertrehalosemico
IBQ	Inibidor da biossíntese de quitina
IDC	Inseticida desregulador de crescimento
K	Número de marcos morfométricos
Lm	Marco morfométrico
MIP	Manejo integrado de pragas
Mo	Molibdênio
Ni	Níquel
OEH	Hormônio ecdisteroidogênico ovariano
PCA	Análise de componentes principais
PI	<i>Parsintercerebralis</i>
Ppx	Piriproxifem
REc-USP	Complexo receptor de ecdisônio-ultraespiráculo
TXRF	Fluorescência de raios-X por reflexão total
UR	Umidade relativa
W	Tungstênio
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	PERCEVEJOS FITÓFAGOS	16
2.1.1	Aspectos Gerais	16
2.1.2	Importância E Danos	18
2.1.3	Percevejo Marrom-Neotropical	19
2.2	ASPECTOS REPRODUTIVOS.....	20
2.2.1	Sistema Reprodutor Feminino	20
2.2.2	Sistema Reprodutor Masculino.....	23
2.2.3	Fisiologia Da Reprodução	25
2.3	INSETICIDAS.....	28
2.3.1	Regulação Fisiológica De Piriproxifem	29
2.4	ANÁLISES FISIOLÓGICAS DE INSETOS	32
2.4.1	Morfometria	32
2.4.2	Elementos Inorgânicos	34
3	ARTIGO A: MORFOMETRIA BASEADA EM MARCOS MORFOMÉTRICOS GEOMÉTRICOS DE <i>Euschistus heros</i> TRATADOS COM PIRIPROXIFEM SUBLETAL	37
3.1	INTRODUÇÃO	40
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.1	Obtenção Dos Insetos	41
3.2.2	Aplicação Dos Inseticidas.....	41
3.2.3	Consumo Alimentar E Massa Corporal.....	42
3.2.4	Coleta De Imagens.....	42
3.2.5	Marcos Morfométricos	43
3.2.6	Medidas Para Morfometria Tradicional	43
3.2.7	Coordenadas Para Morfometria Geométrica	43
3.2.8	Análise Estatística	43
3.3	RESULTADOS.....	44
3.3.1	Consumo Alimentar	44

3.3.2	Morfometria Tradicional	45
3.3.2.1	Relações alométricas lineares	45
3.3.2.2	Análises multivariadas e univariadas.....	47
3.3.3	Morfometria Geométrica	52
3.4	DISCUSSÃO	54
3.4.1	Consumo Alimentar	54
3.4.2	Morfometria Tradicional	56
3.4.3	Morfometria Geométrica	56
3.5	CONCLUSÕES	58
4	ARTIGO B: PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DE Euschistus heros TRATADOS COM PIRIPROXIFEM EM DOSAGEM SUBLETAL	59
4.1	INTRODUÇÃO	61
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.2.1	Obtenção Dos Insetos E Aplicação	62
4.2.2	Fertilidade De Casais E Fecundidade De Progênie	62
4.2.3	Morfologia De Sistemas Reprodutores	63
4.2.4	Análise Estatística	64
4.3	RESULTADOS	64
4.3.1	Análise De Parâmetros Biológicos.....	64
4.3.2	Análise Dos Órgãos Reprodutivos.....	65
4.3.2.1	Sistema reprodutor feminino.....	65
4.3.2.2	Sistema reprodutor masculino	62
4.4	DISCUSSÃO	75
4.4.1	Fecundidade E Fertilidade.....	75
4.4.2	Sistema Reprodutor Feminino	76
4.4.3	Sistema Reprodutor Masculino.....	79
4.5	CONCLUSÕES	81

5	ARTIGO C: VARIAÇÕES DE METABÓLITOS ENERGÉTICOS E MICRO-ELEMENTOS NA HEMOLINFA DE <i>Euschistus heros</i> TRATADOS COM PIRIPROXIFEM EM CONCETRAÇÃO SUBLETAL	82
5.1	INTRODUÇÃO	84
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	85
5.2.1	Obtenção De Insetos E Aplicação	85
5.2.2	Preparo E Análise De Metabólitos Energéticos	85
5.2.3	Preparo E Análise De Amostras Em TXRF	86
5.2.4	Análise Estatística	87
5.3	RESULTADOS	87
5.3.1	Metabólitos Energéticos	87
5.3.2	Micro-elementos	89
5.4	DISCUSSÃO	90
5.4.1	Metabolitos Energéticos	90
5.4.2	Micro-elementos	92
5.5	CONCLUSÕES	94
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
	REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

Os percevejos fitófagos são pragas emergentes na agricultura a nível mundial, e de grande importância. No Brasil, estes insetos vêm se destacando há algumas décadas em decorrência de fatores coevolutivos que os levaram a permanecer em níveis infestantes durante os períodos de safra das principais culturas instaladas, mesmo com intenso uso de controle químico (SOSA-GOMÉZ; SILVA, 2010). Entre os principais fatores que levam a falha de controle destas pragas, o desconhecimento acerca dos aspectos bioquímicos e fisiológicos é um assunto que necessita de maior atenção (RIGA et al., 2020).

O percevejo marrom-Neotropical *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae) é uma praga de grande importância na cultura da soja, e de crescente importância em outros cultivos de expressiva representatividade no cenário agrícola brasileiro (SORIA et al., 2017; CORRÊA; CORDEIRO; OMOTO, 2019; GOMES; HAYASHIDA; BUENO, 2020). Isto se deve principalmente à alta taxa reprodutiva do inseto, e devido a seleção de populações resistentes à inseticidas de uso comum, de modo de ação neurotóxico – amplo espectro, havendo casos documentados em várias populações no Brasil (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010; BUENO et al., 2015; HADDI et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

A problemática do uso de inseticidas neurotóxicos é amplamente explorada na literatura, resumindo-se principalmente toxicidade aos organismos não alvo e humanos (GOULSON, 2020). Dentro das alternativas de controle empregadas, os avanços na área de controle biológico estão sendo amplamente observados no Brasil. Na esfera do manejo integrado de pragas, é importante avaliar a elegibilidade de inseticidas de diferentes modos de ação para o controle de percevejos, de forma a minimizar o impacto no ambiente e em organismos não-alvo, bem como manejar a resistência destas populações.

A determinação do status de uma praga depende em grande parte de seu potencial reprodutivo, para estabelecimento de populações infestantes, i. e., que de fato causam danos econômicos na cadeia produtiva (NAKANO; SILVEIRA-NETO; ZUCCHI, 1981). Sabe-se que nos insetos o processo reprodutivo como um todo é regulado por uma série de fatores fisiológicos, como controle hormonal e homeostase fisiológica (RAABE, 1986; SEIDELMANN et al., 2016).

O piriproxifem é um inseticida análogo de hormônio juvenil (AHJ), apresentando o modo de ação primário sobre o desenvolvimento de insetos, especialmente na fase jovem. Entretanto, sabe-se que o hormônio juvenil (HJ) possui uma ampla atividade na regulação de

diferentes processos, variável de acordo com diferentes espécies e até mesmo entre fêmeas e machos. As implicações de piriproxifem sobre os diferentes mecanismos de ação do HJ, contudo, ainda não são completamente entendidas; sabe-se, contanto, que este inseticida não se limita a desregular apenas o desenvolvimento de insetos no estágio juvenil, sendo observados efeitos negativos em todas as fases de desenvolvimento de diversas espécies de insetos-praga, inclusive *E. heros*.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a ação de piriproxifem sobre aspectos biológicos, morfo-fisiológicos e variações de micro-elementos na hemolinfa de *E. heros*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PERCEVEJOS FITÓFAGOS

2.1.1 Aspectos Gerais

A fitofagia (herbivoria), diferente do que se acredita, não surgiu durante o período Carbonífero, cerca de 350 milhões de anos (PIZZAMIGLIO-GUTIERREZ, 2009), mas anteriormente, durante o início do período Devoniano, em relativo pouco tempo (torno de 20 milhões de anos) após o surgimento das primeiras plantas terrestres, e é atribuída inicialmente aos artrópodes, especialmente Miriapoda e Hexapoda (LEBANDEIRA, 2007; LEBANDEIRA et al., 2014).

Esta condição foi desenvolvida graças à característica autotrófica e de elevado potencial nutritivo de partes vegetais, sendo que são fontes de toda forma de aminoácidos conhecida, além de complexas moléculas vitais, características essenciais para a coevolução entre esses indivíduos (POELMAN; DICKE, 2014; SCHATZ; SAUVION; KJELLBERG, 2017).

Cada tipo de inseto desenvolveu uma preferência alimentar a determinadas espécies vegetais, das quais obtém grande parte de suas necessidades nutricionais pelo menos numa fase de seu desenvolvimento (GULLAN; CRANSTON, 2014). Os casos de herbivoria são tão evidentes e comuns entre os insetos que são muito raras as condições em que uma planta ou algumas de suas partes estejam livres da ação desses organismos em um ambiente natural (BONAVENTURE, 2014).

Os percevejos verdadeiros (Hemiptera: Heteroptera) formam uma subordem com cerca de 40.000 espécies descritas, sendo que uma parte destes insetos tem importância na agricultura de todo mundo, como os percevejos fitófagos que causam danos econômicos em determinados níveis populacionais (DOLLING, 1991), mas também pelos predadores naturais de pragas, que por sua vez desenvolveram característico comportamento de fitofagia apenas como medida suplementar de necessidades nutricionais (COLL; RUBERSON, 1998; TORRES; BOYD, 2009).

O aparelho bucal de percevejos, assim como em toda ordem Hemiptera, é do tipo sugador labial, desenvolvido para sucção de seiva, sangue ou hemolinfa de outros insetos (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2015), através de um estilete aprimorado, de formação complexa entre mandíbulas e maxilas, na qual possuem canálculos individuais para inserção

de saliva e aporte de seiva (TODD; HERZOG, 1980; CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013; COHEN, 2015). O ponto de inserção final do estilete é no parênquima do tecido vegetal, sendo que a saliva injetada pode ser rica em metabólitos fitotóxicos e análogos de fitormônios, como o ácido indolacético, além de enzimas digestivas que auxiliam a elaboração do material nutritivo aproveitado (HORI, 2000 apud PANIZZI; SILVA, 2009). Segundo Panizzi e Lucini (2017), com base em diversos estudos, os percevejos pentatomídeos (Hemiptera: Pentatomidae) são os de maior importância, principalmente por se alimentarem de sementes de diversas plantas cultivadas.

A distribuição destes grupos é bastante dispersa nas regiões tropicais, com presença também em zonas temperadas, de acordo com a espécie vegetal cultivada e seu zoneamento. Isto é de grande importância para determinação da presença destes seres como pragas, principalmente pelo aspecto biológico da diapausa (DOLLING, 1991; SAULICH; MUSOLIN, 2012), período no qual o inseto diminui consideravelmente seus processos metabólicos frente às adversidades climáticas do ambiente (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013).

No Brasil, as condições de desenvolvimento da paisagem agrícola desde o Neolítico foram favorecidas pela riqueza da região entre os biomas das florestas Amazônica e Atlântica, o que nos últimos séculos influenciou a rápida ocupação para pastagens e cultivo de grandes *commodities*, como soja, milho, algodão, entre diversas outras (FEARNSIDE, 2001; CARVALHO; MARCO JR; FERREIRA, 2009). Desta forma, populações de percevejos foram beneficiadas para o alastramento no território do Cone Sul neotropical (SOARES et al., 2018).

Dentre as culturas de maior destaque, a soja tornou-se o cultivo mais expressivo no Brasil, representando 57% da área agrícola total, com uma produção estimada em torno de 115 milhões de toneladas, na safra 2020/21 (CONAB, 2021). Apesar da alta representatividade econômica, o resultado do domínio desta *commodity* foi a fragmentação de áreas naturais, fatores importantes para o estabelecimento inicial de pragas como os percevejos da família Pentatomidae (Hemiptera).

Para Panizzi e Lucini (2017), a presença de percevejos em várias localidades é cada vez mais evidente, não somente em plantas cultivadas, mas também em plantas hospedeiras alternativas, o que permite a ocorrência e dispersão destas espécies, em um período precedente a diapausa, durante o inverno em regiões de climas bem definidos.

2.1.2 Importância E Danos

Na família Pentatomidae, as subfamílias Pentatominae e Edessinae possuem representantes exclusivamente herbívoros, e que, de maneira geral, se caracterizam como pragas, principalmente os do primeiro grupo(PANIZZI; LUCINI, 2017).

Ao se alimentar, estes insetos causam múltiplas perfurações na célula e ali provocando um ponto de necrose do tecido vegetal, pela característica fitoquímica da composição da saliva (HORI, 2000), além de manter uma porta de entrada para a infecção por patógenos (MILES, 1972; PANIZZI; SILVA, 2009). A nível populacional, em um agroecossistema equilibrado, em que medidas de controle ainda não foram aplicadas, isso pode se tornar economicamente significativo,tendo em vista o nível de especificidade do inseto com a planta cultivada(NAKANO; SILVEIRA-NETO; ZUCCHI, 1981).

O potencial de proliferação destes insetos é um dos principais motivos pelos quais são pragas importantes. Nos Estados Unidos, a praga urbana e rural *Halyomorpha halys* Stål (Hemiptera: Pentatomidae), que ataca diversas culturas, como milho, soja, feijão, frutíferas e hortícolas (MCPHERSON; MCPHERSON, 2000), se alastrou de 17 para 41 estados entre 2010 e 2014 (HOLTZ; KAMMINGA, 2010; BITTEL, 2014). No Brasil, o crescimento dos cultivos de soja e milho foram decisivos para o “estouro” de percevejos-praga, como o marrom-neotropical *Euchistus heros* Fabr., o verde *Nezaraviridula* L., o verde-pequeno *Piezodorus guildinii* Westwood, e o barriga-verde *Dichelops melacanthus* Dallas, entre outros (SOSA-GOMÉZ; SILVA, 2010).

A grande proliferação, aliada ao potencial de redução de viabilidade e aumento das condições favoráveis e ao surgimento de doenças das sementes ou plântulas atacadas fazem desses insetos-praga de importante impacto econômico, principalmente no Brasil. As regiões produtoras apresentam um clima favorável ao desenvolvimento dos insetos, que também se aproveitam muitas vezes do sistema de plantio adotado (CHOCOROSQUI; PANIZZI, 2004) e da presença de espécies invasoras e hospedeiras alternativas (MEDEIROS; MEGIER, 2009; SILVA, 2009).

Em diversas regiões agrícolas do Brasil, os percevejos também apresentam casos de populações de expressiva resistência a inseticidas geralmente mais tóxicos e impactantes no agroecossistema, como os produtos neurotóxicos, sendo isso um fator que agrava os danos

desses insetos em diversas lavouras, pois aumenta a dificuldade de controle e o número de aplicações durante as safras (SOSA-GOMÉZ; SILVA, 2010).

2.1.3 Percevejo Marrom-Neotropical

O percevejo *E. heros* surgiu como uma praga secundária na cultura da soja, porém, foi relatado no final da década de 1970 como uma praga em crescente importância no Brasil por diversos autores (CORRÊA et al., 1977). A extrema adaptabilidade com o hospedeiro e o clima da região Neotropical favoreceram o seu estabelecimento como atual principal praga da soja no Brasil.

Esta adaptabilidade é devida em parte pela sua eficiente capacidade reprodutiva. O inseto leva em torno de 30 a 40 dias para atingir o estágio adulto, dependendo do tipo de alimento, e a fêmea adulta pode ovipositar até 130 ovos durante o seu desenvolvimento. Portanto, seu ciclo é relativamente rápido e possui elevado potencial reprodutivo, considerando a viabilidade das ninfas e as condições presentes nas culturas a campo (COSTA; BORGES; VILELA, 1998).

Após a sua atividade na cultura da soja, em que *E. heros* pode produzir até três gerações estratificadas em níveis populacionais comuns, o inseto ainda pode gerar uma quarta geração em plantas hospedeiras alternativas, como os relatados por Corrêa-Ferreira e Panizzi (1999), viz. *Euphorbiaheterophylla*L. (Euphorbiaceae), *Acanthospermumhispidum*DC. (Asteraceae), *Helianthusannuus* L. (Asteraceae) e *Cajanuscajan*(Fabaceae), além de representantes menos comuns de outras oito famílias botânicas (PANIZZI; LUCINI, 2017).

O nível de controle adotado para *E. heros* para soja é de um (para produção de sementes) a dois percevejos maiores que 0,5 cm (produção de grãos) por metro avaliado (BUENO et al., 2013). Estes níveis são determinados de maneira a se obter a melhor adequação, considerando entre outras coisas o avanço da tecnologia, e. g., desenvolvimento de novas cultivares. Entretanto, os valores estabelecidos continuam se mantendo constantes para *E. heros* na soja (BUENO et al., 2015), e são eventualmente analisados para outros cultivos de grande importância (SORIA et al., 2017; GOMES; HAYASHIDA; BUENO, 2020). Populações infestantes acima destes níveis causam prejuízos econômicos, devido aos danos associados as estruturas de frutificação, acarretando perda de qualidade de grãos e subproduto, e de produtividade (HORI et al., 2002; PANIZZI; LUCINI, 2017)

Outra cultura de grande destaque em que *E. heros* surge em crescente importância é o algodão. Isto ocorreu em parte devido às integrações bem-sucedidas no controle do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), o que diminuiu o uso de pesticidas de amplo espectro e permitiu o alastramento do percevejo nas áreas (SORIA et al., 2017).

Em algodão, ninfas e adultos de percevejos podem atacar desde o início do florescimento até a fase final de enchimento de maçãs (SIEBERT et al., 200) sendo que plantas atacadas nos estágios finais do florescimento podem apresentar abscisão de capulhos menores que 25 cm de diâmetro e consequente redução de produção final (SORIA et al., 2017).

Para o controle de *E. heros*, o uso de estratégias baseadas no Manejo Integrado de Pragas (MIP) pode ser uma solução adequada para reduzir as populações infestantes. Este sistema foi sugerido por Hoskins, Borden & Michelbacher (1939) e enfatizado no final da década de 1950, em um trabalho relacionando as medidas de controle químico e biológico em conjunto contra o afídeo *Terioaphis maculata* Buckton (Hemiptera: Aphidae) (STERN et al., 1959). Antes disso, relatos sobre o uso conjunto de controle químico e biológico eram escassos (HOROWITZ; ELLSWORTH; ISHAAYA, 2009). Seguindo o conceito fundamental da integração de métodos de controle em harmoniosa utilização para redução dos danos de pragas a determinada cultura em um agroecossistema (KOGAN, 1998), as diferentes medidas que podem ser adotadas na tomada de decisão sempre precedem o uso de controle químico. Entretanto, quando essas medidas já não são eficientes, o uso de inseticidas deve ser considerado no MIP (METCALF, 1994), desde que apresentem características específicas de seu mecanismo de ação, como seletividade a organismos benéficos (VIEIRA et al., 2012; FONSECA et al., 2015) e não insetos (SÁNCHEZ-BAYO; TENNEKES, 2013).

2.2 ASPECTOS REPRODUTIVOS

2.2.1 Sistema Reprodutor Feminino

No que se refere a pragas agrícolas e proteção de culturas, estudos com sistemas reprodutores dos insetos são essenciais, pois são capazes de determinar o status individual e populacional. Estudos com o objetivo em reprodução de insetos são essenciais para o desenvolvimento de estratégias de controle (VAN LENTEREN, 1999).

Para um panorama mais generalizado, é possível apresentar características que definem um modelo padrão de sistema reprodutor, para maior compreensão do assunto (GULLAN; CRANSTON, 2014).

O sistema reprodutor feminino consta, basicamente, de um par de ovários, dois ovidutos laterais que se juntam em um oviduto comum (ou mediano), sendo que este último continua até a câmara genital (ou *bursacopulatrix*) e, por fim, a vagina. Além disso, existe uma série de estruturas que possuem diversas funções, como a espermateca, que recebe e armazena os espermatozoides até o momento propício da fecundação, e as glândulas acessórias, cujas principais funções são associadas à proteção e fixação dos ovos ao substrato de recepção (SNODGRASS, 1998; GULLAN; CRANSTON, 2014).

Os ovários situam-se acima ou lateralmente ao intestino médio, e cada um consiste em um variado número de ovaríolos, interligados terminalmente por seus filamentos. Proximalmente, os ovaríolos estreitam-se em pedicelos, que juntos formam o cálice e conectam-se aos ovidutos laterais (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013).

Existem dois tipos básicos de ovaríolos: panoístico e meroístico. Nos primeiros os ovos se desenvolvem diretamente a partir de oócitos que se desenvolvem no germário. Nos ovaríolos meroísticos, as células do germário se diferenciam em células nutridoras (trofócitos) e oócitos, sendo que a função dos trofócitos é fornecer conteúdo nutritivo necessário ao desenvolvimento do oócito. Para este tipo de ovaríolo pode existir duas condições diferentes: ou as células nutridoras permanecem na região do germário e fornecem o conteúdo para os oócitos em desenvolvimento no vitelário através de longas projeções citoplasmáticas, no chamado ovaríolomeroísticotelotrófico, ou um grupo de trofócitos permanece intimamente associado e guarnecendo cada oócito em desenvolvimento junto ao vitelário, no ovaríolomeroístico tipo politrófico (GULLAN; CRANSTON, 2014).

Em Hemiptera, os ovaríolos são meroísticotelotróficos (HUEBNER; DIEHL-JONES, 1993; FORTES; SALVADOR; CÔNSOLI, 2011). Este tipo é altamente desenvolvido nos insetos, e permite que substratos nutritivos que são essenciais para o desenvolvimento do oócito sejam transportados através de um tecido conjuntivo trófico, que se inicia com a diferenciação no trofário (região apical do germário) e permanece ao longo do desenvolvimento dos gametas (Figura 2.1). Ao longo disto, existe uma série de processos de diferenciação celular e nuclear, citocinese incompleta com polarização citoplasmática (distribuição de fusoma) e transporte microtubular envolvido (HUEBNER, 1981; KING; CASSIDY; ROUSSET, 1982).

O ovaríolotelotrófico possui uma alta especificação, e é mais basal do que os ovaríolos meroísticopolitróficos. Geralmente, a formação de células nutridoras é muito maior do que a produção de oócitos (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013), normalmente iniciando-se em uma razão de 15:1 devido a quatro divisões iniciais de células somáticas do germário (NATION SR., 2016). Isto leva ao desenvolvimento de tecidos extra-embrionários em quantidade intermediária, i. e., o tecido não aproveitado para o desenvolvimento larval (LYNCH; ROTH, 2011). Por esta razão, estes insetos requerem uma quantidade significativa de energia para a formação e desenvolvimento dos ovaríolos e seus componentes para compensar a alta taxa proliferativa observada em algumas famílias, como Pentatomidae (WITTMAYER; COUDRON; ADAMS, 2001).

As células nutridoras são essenciais para o oócito, pois são elas que garantem nutrientes necessários no início de sua formação. No vitelário, os oócitos iniciam o processo de aproveitamento de nutrientes diretamente da hemolinfa (pré-vitelogênese) através de permeabilidade de membrana do epitélio folicular (RAIKHEL; DHADIALLA, 1992).

O desenvolvimento dos ovos leva, então, ao processo de junção de gametas, onde ocorre efetivamente a fertilização dos ovos desenvolvidos pelo esperma do macho, através do processo de reprodução sexuada. Este tipo é o mais comum entre os insetos, e pode ocorrer de maneiras diversas, devido principalmente a enorme diversidade dessa classe, envolvendo etapas complexas como aglomeração, seleção sexual e corte, comportamento de cópula e armazenamento de esperma (GULLAN; CRANSTON, 2014).

Em Heteroptera, os ovaríolos são divididos em quatro regiões principais: o filamento terminal filamentosos, que forma uma retícula sustentando o órgão reprodutor pelo tórax; o germário, local onde ocorre a diferenciação e permanência das células nutridoras; o vitelário, porção mais desenvolvida em que os oócitos em maturação se dirigem; e o pedicelo, região de liberação dos oócitos maduros para a fecundação.

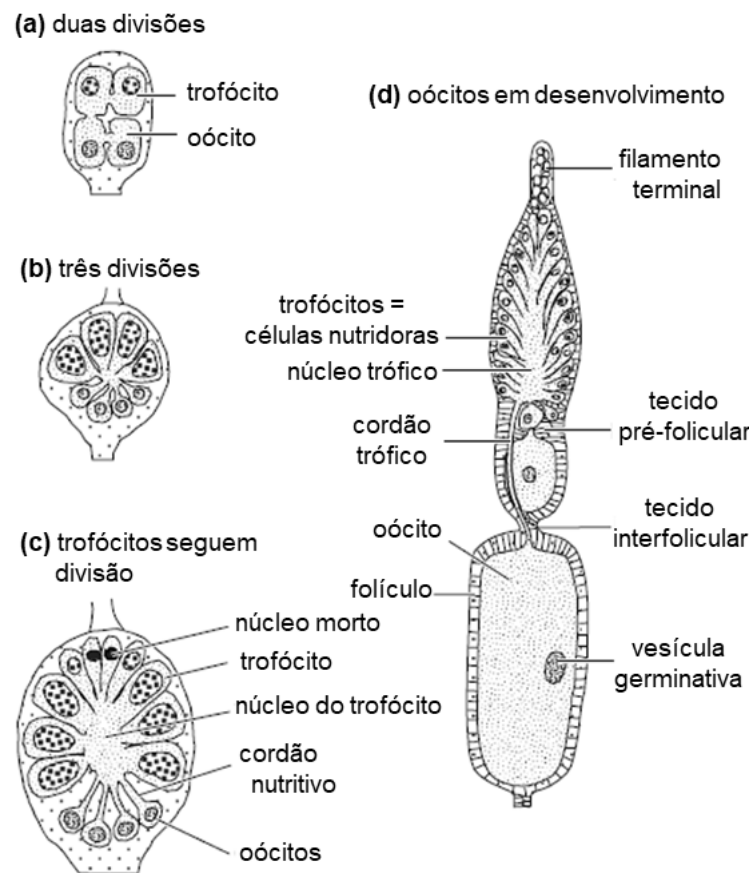


Figura 2.1 – Desenvolvimento de um ovaríolo merosticotelotrófico de Hemiptera. a-c: células em processo de diferenciação no germário; d: esquema de um ovaríolo com oócitos em diferentes estágios de maturação. Adaptado de Chapman, Simpsons e Douglas (2013).

2.2.2 Sistema Reprodutor Masculino

O sistema reprodutor masculino consiste de um par de testículos, podendo ou não ser fundidos, sendo esses casos mais comuns em Lepidoptera (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013), e cada um consiste em uma série de túbulos ou folículos testiculares, responsáveis pela formação do espermátóforo. Os folículos podem variar em número, podendo ser únicos (e.g.: na subordem de coleópteros Adephaga) até mais de 100 (e.g.: Orthoptera), possuem uma fina membrana individual de composição epitelial, com duas camadas de células no tecido conjuntivo interno, e na maioria das vezes são unidos por um tecido, denominado por alguns autores como peritoneal (ASSIS et al., 2019), e neste trabalho adotado a terminologia *detunica externa*.

Os folículos testiculares são as divisões do testículo, homólogos aos folículos ovarianos, i. e., são os sítios da gametogênese nos machos. Uma particularidade é que as

células da linhagem germinativa, diferentemente dos vertebrados e outros invertebrados, são compartimentadas em cistos e divididas em três zonas diferentes (Figura 2.2). Cada zona compreende uma etapa de desenvolvimento do gameta, partindo da porção apical denominada germário, onde as células apicais se diferenciam em espermatogônia e células císticas. Esta espermatogônia passa então a dobrar a quantidade de material e surgem os espermatócitos, ainda na zona de crescimento, para realizar o processo de meiose na próxima etapa. Na zona de maturação e redução, após a divisão meiótica dos espermatócitos começa a ocorrer o processo de transformação (espermiogênese), já na etapa final, onde surge primeiro as espermatídes e, após isto, finalmente formam-se os cistos de espermatozoides (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013).

Cada folículo testicular pode apresentar um canalículo individual na região distal, os vasos eferentes, que em conjunto possuem a função de guarnecer os vasos deferentes (*vasdeferens*, ou *vasa deferentia* no plural) com o espermatozóide recém produzido. Estes, por sua vez são responsáveis por interligar os dois testículos, e mais distalmente apresenta uma dilatação conhecida como vesícula seminal, e encerram em um duto ejaculatório e, por fim, ao pênis (SNODGRASS, 1998; NATION SR., 2016).

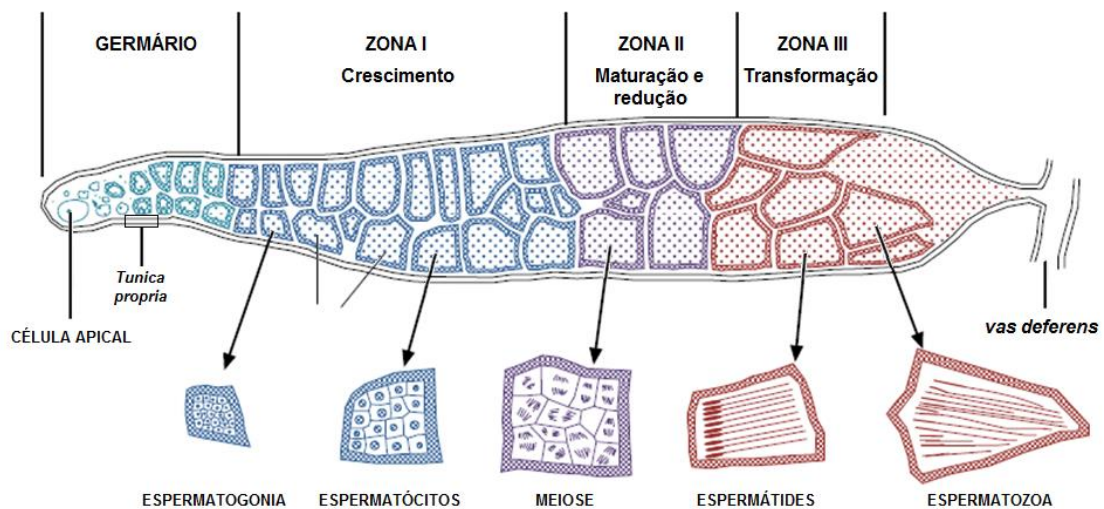


Figura 2.2 – Esquema generalizado representando um folículo testicular de insetos. Adaptado de Chapman, Simpson e Douglas(2013).

Entre as funções das gônadas sexuais masculinas no atributo funcional do sistema reprodutor, as principais são armazenamento de espermatozoides e síntese de material nutritivo e substâncias funcionais, como proteínas e hormônios, que deverão ser transportados para as fêmeas no momento da cópula (SNODGRASS, 1998; PONDEVILLE et al., 2008).

2.2.3 Fisiologia Da Reprodução

Em insetos, a reprodução bem sucedida é alcançada com o equilíbrio de fatores ecológicos e a efetiva regulação interna dos indivíduos envolvidos. Intrinsecamente, isto é altamente dependente da ação de fatores regulatórios, principalmente por peptídeos e hormônios lipofílicos que atuam direta ou indiretamente nos órgãos sexuais (VAN WIELENDAELE; BADISCO; BROECK, 2013).

O hormônio juvenil (HJ) é um composto naturalmente biossintetizado pela glândula retrocerebral pareada *corpora allata* (CA), e possui uma estrutura química peculiar e específica para os insetos (NORIEGA, 2014). O HJ possui ação primária altamente regulatória e generalizada, atuando sobre o desenvolvimento morfo-genético, protoracicotrópico e gonadotrópico (LI; JIA; LI, 2019). A regulação reprodutiva de fêmeas e machos depende da interação de HJ com ecdisteróides, que por sua vez são hormônios que modulam a ecdise e possuem estrutura química bastante similar ao colesterol. De fato, as vias de síntese dos principais ecdisteróides utilizam o colesterol adquirido pela dieta (AMEKU et al., 2017).

Inicialmente, dentro do aspecto de desenvolvimento, o equilíbrio entre HJ e ecdisteróides é o que determina a condição da passagem larval, isto é, uma maior quantidade de HJ circulante relativamente a concentração de ecdisteróide determina uma passagem de estágio normal ou muda (larva-larva), e uma maior concentração de ecdisteróide determina uma passagem metamórfica (larva-pupa/adulto) (SMITH; RYBCZYNSKI, 2011). Níveis harmônicos de concentração destes hormônios influenciam a qualidade sexual do indivíduo adulto.

Dentro do aspecto reprodutivo, HJ e ecdisteróides possuem um papel bastante importante para a síntese de vitelogenina (BELLÉS; MAESTRO, 2005), porém isto é variável de acordo com o grupo taxonômico: alguns insetos dependem somente de HJ para a ativação de genes da vitelogenina, e.g. Dictyoptera, Orthoptera, Hemiptera e alguns Coleoptera; outros utilizam tanto HJ quanto ecdisteróides para esta ativação, especialmente Lepidoptera e alguns Coleoptera; por fim, grande parte de Diptera (principalmente Nematocera) são dependentes de ecdisteróide para síntese de vitelogenina, entretanto, mesmo nestes grupos o HJ é fator estimulante de síntese vitelogênica, principalmente devido a sua atividade sobre o corpo gorduroso (TUFAIL et al., 2014).

A CA possui intensa inervação proveniente do cérebro, que, portanto, possui papel central sobre a regulação da síntese de HJ (NORIEGA, 2014). A denervação da glândula pode levar a uma produção descontrolada de HJ em pupas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (AREIZA et al., 2015). Similarmente, em *Diplopterapunctata* Eschscholtz (Blattodea: Blaberidae) machos implantados com oócitos basais, a vitelogênese foi continuada apenas em insetos desnervados, o que foi associado com uma intensa produção de HJ pela CA (HASS; CASSIAS; WOODHEAD, 2003). Além da produção pela CA, o HJ também é presente na glândula acessória do sistema reprodutor masculino, e é normalmente transferido para as fêmeas no momento da cópula. Entretanto, não se sabe ainda se o hormônio é produzido ou apenas sequestrado e armazenado nas glândulas acessórias (RIVERA-PÉREZ et al., 2020).

Outros peptídeos que atuam sobre a regulação do corpo gorduroso são os compostos hormônio adipocinético (AKH, do inglês *adipokinectichormone*) e hormônio hipertrehalosêmico (HTH, do inglês *hipertrehalosemichormone*), que mobilizam metabólitos do corpo gorduroso em função de uma demanda energética (MARCO; GÄDE, 2020). Estes peptídeos são regulados por enzimas dependentes de zinco (ACE-like, do inglês *angiotensinconvertingenzyme-like*), que nos insetos possuem a função de fragmentar peptídeos de cadeia curta, e são presentes principalmente nos órgãos sexuais (ISAAC et al., 2017). Apesar da complexa atividade de AKH/HTH sobre o corpo gorduroso, a sua inibição normalmente não afeta o atributo reprodutivo dos insetos, possivelmente por existir um mecanismo compensatório para a mobilização dos metabólitos energéticos (GÄDE; MARCO, 2013). O HJ, portanto, possui uma ação direta sobre este mecanismo.

Outros hormônios podem atuar sobre o sistema reprodutor dos insetos. As neuroparsinas são hormônios produzidos no complexo cerebral *parsintercerebralis-corpora cardiaca*, e sua principal função é regular o desenvolvimento dos testículos (BADISCO et al., 2007). Este neuropeptídeo de cadeia longa age como antagonista do hormônio juvenil (GIRARDIE et al., 1987). Em fêmeas, neuropeptídeos estruturalmente similares à neuroparsinas são conhecidos como hormônio ecdisteroidogênico ovariano (OEH, do inglês *ovarianecdysteroidogenichormone*), e atuam como fatores estimulantes de ecdisteróide e regulam a oogênese (LENAERTS et al., 2019). A atividade endócrina das neuroparsinas na gonado-regulação em insetos machos e fêmeas foi e continua sendo objeto de estudo para análise de inseticidas peptídicos sintéticos (DE LOOF et al., 2001; NÄSSEL; ZANDAWALA, 2019). Em virtualmente todos os insetos, o HJ possui um papel central de importância sobre este sistema, e as análises sobre sua atuação e ativação de seus receptores

são e deverão ser conduzidas para estudos que objetivam a atividade reprodutiva, especialmente de insetos pragas.

Em suma, é possível idealizar um modelo generalizado em relação à atividade dos principais componentes hormonais e peptídicos sobre o desenvolvimento reprodutivo em insetos (Figura 2.3).

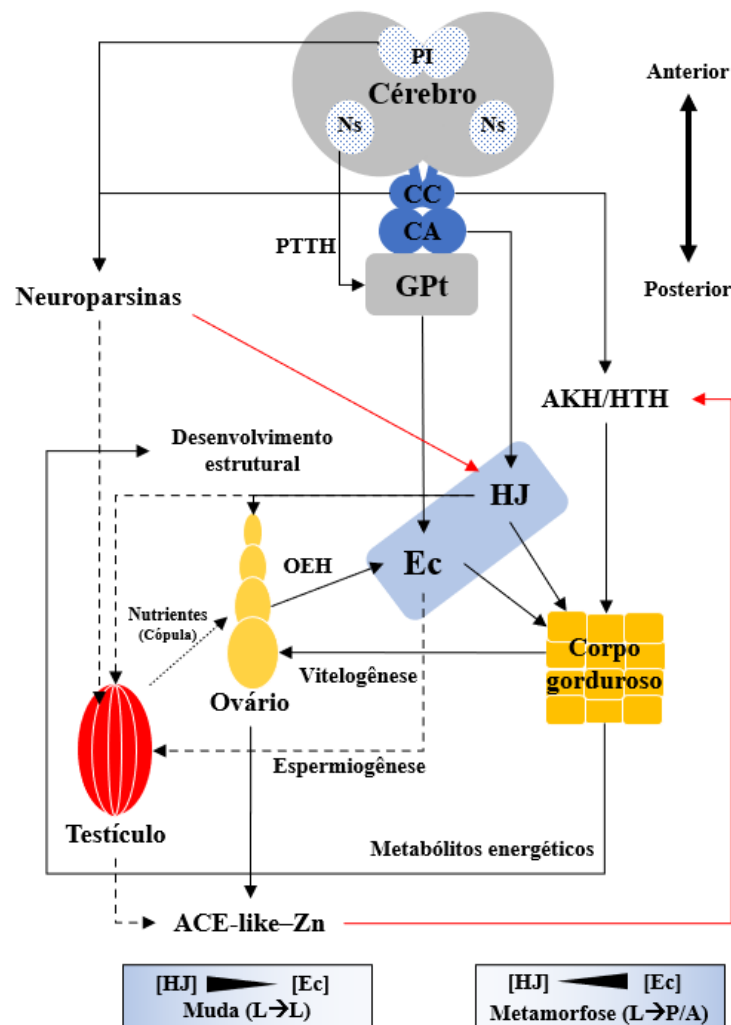


Figura 2.3 – Modelo esquemático generalizado sobre a regulação fisiológica da reprodução em insetos. Setas pretas representam regulação; setas vermelhas representam inibição; setas tracejadas representam rotas específicas para machos. PI: pars intercerebralis; Ns: células neurosecretoras; CC: *corpóra cardíaca*; CA: *corpóra allata*; GPt: gânglio protorácico; PTTH: hormônio protorácico trópico; AKH/HTH: hormônio adipocinético/hormônio hipertrealosêmico; HJ: hormônio juvenil; Ec: ecdisteróide; OEH: hormônio ecdisteroidogênico ovariano; ACE-like-Zn: enzima similar à conversora de angiotensina associada à zinco; L: fase larval; P/A: pupa/adulto. Adaptado de Bellés & Maestro (2005), Badisco et al. (2007), Smith & Rybczynski (2011), Isaac et al. (2017), Li et al. (2019) e Lenaerts et al. (2019).

2.3 INSETICIDAS

Existem diversos problemas atribuídos ao emprego de inseticidas como técnica majoritária no controle de insetos-pragas. Muitas das consequências do uso no passado já foram amplamente investigadas (DEVINE; FURLONG, 2007; NICOPOULOU-STAMATI et al., 2016; UPADHAYAY et al., 2020), e nos dias de hoje ainda se trata de um assunto de grande importância na esfera agrônômica e social.

Os organismos que ocupam e participam do ecossistema em que estes compostos químicos são liberados, acidentalmente ou propositalmente, possuem uma limitada capacidade de adaptação aos impactos agudos destes compostos, principalmente levando em conta a natureza complexa do produto (COLLINS et al., 2020). Sobretudo, o acentuado uso de pesticidas – bem como fármacos e compostos químicos utilizados em indústrias modernas – resultou no acúmulo de um número de compostos complexos amplamente espalhados na biosfera (BERNHARDT; ROSI; GESSNER, 2017).

A maior parte dos inseticidas responsáveis por esta contaminação são compostos neurotóxicos, que apresentam um grande espectro de ação, tendo em vista que diversos animais compartilham o *design* neural básico em que se concentra o modo de ação destes produtos. Neonicotinóides são os inseticidas mais utilizados no mundo (SÁNCHEZ-BAYO; TENNEKES, 2020), sendo aplicados na forma de tratamento de sementes ou pulverização de culturas e frutícolas diversas (JESCHKE et al., 2011), com amplo espectro de atuação em organismos terrestres (PISA et al., 2015) e alta lixiviação e contaminação de corpos d'água (MORISSEY et al., 2015).

Os aspectos químicos de diversos inseticidas são motivo de preocupação com relação a dieta, sendo que estes compostos são altamente biomagnificados na cadeia alimentar e evidenciados em amostras teciduais em diversos organismos (NOUGADÈRE et al., 2011; ŞAHIN; USKUN; NAYIR, 2017; TANG et al., 2018).

Por fim, o emprego de inseticidas afeta uma série de insetos benéficos e não-maléficos. O uso intensivo destes compostos é citado com um dos responsáveis pelo declínio da diversidade da entomofauna mundial, especialmente insetos de grande importância como polinizadores, revolvedores de matéria orgânica e espécies aquáticas (SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019). Outros artrópodes benéficos também são prejudicados com a aplicação intensiva de inseticidas, especialmente neurotóxicos (MOKRY; HOAGLAND, 1990; FOUNTAIN et al., 2007; MABUBU et al., 2017).

A integração de uma série de fatores, colocados em prática no momento da intervenção para controle de uma praga em determinado local, no que se refere apenas ao manejo químico, pode ser uma alternativa para a minimização desta série de problemas oriundos do uso intensivo de compostos químicos. Um dos assuntos modernos é o que define as práticas biorracionais de controle químico (GUERRERO; ROSELL, 2005; PALLI, 2009; KHATER, 2011).

Os fatores em questão fazem parte de um modelo sistemático com o objetivo de minimizar o impacto negativo de um inseticida sobre o ecossistema, em um primeiro nível pensando em seletividade a mamíferos (ROSELL et al., 2008), mas que em um grau mais aprofundado também se aplica a proteção de outros seres vivos e seu habitat, como organismos aquáticos, invertebrados e microrganismos do solo e água, e finalmente aos insetos não-alvo e entomofauna benéfica (HOROWITZ; ELLSWORTH; ISHAAYA, 2009).

Alguns autores, ao passo que defendem a atividade de um inseticida biorracional e sua importância para a defesa vegetal e MIP, limitam a definição destes compostos a produtos de origem bacteriana (COUCH; ROSS, 1980) ou semioquímicos e extratos botânicos (biopesticidas) (ROSELL et al., 2008). Entretanto, o termo foi introduzido no final da década de 1970 (JOHNSON, 1979; MENN; HENRICK, 1981) para se referir ao emprego de compostos químicos, sintéticos ou extratos vegetais, primariamente feromônios, esterilizantes e inseticidas desreguladores de crescimento (IDCs).

Dentro do contexto moderno de proteção de culturas, o conceito foi reformulado e abrange não somente as várias classes inseticidas com modos-de-ação diferentes de inseticidas de alta toxicidade ao ambiente, como os inseticidas de amplo espectro neurotóxicos (LIU; STANSLY, 1995; ISHAAYA; KONTSEDALOV; HOROWITZ, 2005; RIMOLDI; SCHNEIDER; RONCO, 2008; PALLI, 2009; SARWAR, 2015; SABRI et al., 2017), mas também a forma de se empregar estes compostos, e. g. avaliação de histórico de pragas em determinada área, redução consciente das dosagens e avaliação de níveis de danos econômicos de ação (HOROWITZ et al., 2005).

2.3.1 Regulação Fisiológica De Piriproxifem

Os inseticidas que atuam no sistema hormonal de insetos, definidos por Williams (1967) como inseticidas de terceira geração, e também conhecidos como inseticidas desreguladores de crescimento (IDCs) (DHADIALLA; RETNAKARAM, SMAGGHE,

2005), tiveram base nos estudos de determinação de HJ de alguns insetos, como os trabalhos pioneiros citados por Ramaseshadri, Farkaš&Palli (2012), em que puderam ser determinados três tipos: o HJ-I (RÖLLER et al., 1967); HJ-II (MEYER et al., 1968); e HJ-III (JUDY et al., 1973). Os estudos relatam moléculas de configuração sesquiterpenoide não-cíclico, cuja atividade sobre os insetos seria a regulação da maturidade em insetos juvenis. Além do HJ, os ecdisteróides também foram modelos para o desenvolvimento de outros IDCs (PENER; DHADIALLA, 2012).

Piriproxifem é um IDC da classe dos análogos do hormônio juvenil (AHJ), isto é, atua primariamente na competição com HJ pelo sítio de ligação em receptores específicos, desencadeando uma cascata de reações secundárias e terciárias que afetam a regulação do desenvolvimento geral e específico, especialmente sobre os órgãos reprodutivos, formação e regulação do corpo gorduroso, mecanismos de indução e quebra da diapausa, atividades comportamentais e resposta a estresse, e determinação do *status quo* nos insetos de modo geral e de castas em insetos eussociais (HARTFELDER, 2000; BERGER; DUBROVSKY, 2005; GOODMAN; CUSSON, 2011; DENLINGER; YOCUM; RINEHART, 2012; JINDRA et al., 2015).

Em insetos, o sistema nervoso central possui o cérebro como comando geral e um número variável de gânglios que percorrem a região ventral do organismo, em um sistema de gerenciamento local (TRUMAN, 1990). Uma das funções do cérebro é de regulação do sistema hormonal, através de redes neurais específicas que interligam gânglios e glândulas retrocerebrais de produção e/ou armazenamento de hormônios. O HJ é produzido por uma destas glândulas, a *corpora allata* (CA), e distribuído pela hemolinfa, regulados por uma intensa nervação provenientes do cérebro e do gânglio subesofágico (GOODMAN, CUSSON, 2011).

A ultraestrutura presente na CA indica uma região rica em retículo endoplasmático liso, organela presente principalmente na fase juvenil dos insetos e praticamente ausentes no estágio pupal, sendo, portanto, associada à síntese de HJ (SEDLAK et al., 1983). Os estudos citados por Goodman e Cusson (2011) ainda indicam que a glândula não armazena o hormônio, sendo que sua liberação ocorre imediatamente após sua síntese.

Como o hormônio naturalmente produzido regula uma série de funções e aspectos da morfologia funcional, o desenvolvimento de produtos análogos seria de grande importância no âmbito de síntese de um inseticida. Desta maneira, os inseticidas análogos do hormônio juvenil (AHJ) foram produzidos sobre esse fundamento. Estudos sobre o desenvolvimento de

tal composto foram realizados poucos anos após a descoberta das moléculas do HJ, entre as décadas de 1960 e 1970, sendo ainda considerados como IDC (RAMASESHADRI; FARKAŠ; PALLI, 2012).

A biossíntese do HJ é governada majoritariamente através da via do mevalonato, especificamente na produção do ácido farnesóico, que através de enzimas de metil-transferase e epoxidase dão origem ao HJ-III (GOODMAN; CUSSON, 2011). Os modos de ação como um todo e as características positivas que caracterizam o HJ como componente essencial para o desenvolvimento larval como um todo ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, sabe-se que estruturalmente as moléculas dos AHJ são similares às do HJ, podendo, contudo, ter características distintas, como compostos cíclicos (e.g.: piriproxifem e fenoxicarbe) ou acíclicos (e.g.: metopreno), com a conformação padrão do sesquiterpeno (SLÁMA, 1979).

Os estudos sobre a ação de AHJs sobre o desenvolvimento de pragas são diversos. Os resultados geralmente são em função da deformação dos insetos-alvo em virtude da incapacidade de metamorfose, desregulada pela saturação dos receptores de HJ devido à concentração dos produtos (ASHBURNER, 1970; AXTELL; DUKES; EDWARDS, 1979; BANKS; WILLIAMS; LOFGREN, 1988; EL-SHAZLY; REFAIE, 2002; EVENDEN; ARMITAGE; LAU, 2007; AGÜERO; NEVES; CREMONEZ, 2014). Os produtos também possuem ação sobre a regulação normal dos órgãos reprodutores e na embriogênese (EVANS et al., 1995; ZERA; BOTTSFORD, 2001; GHASEMI; SENDI; GHADAMYARI, 2010; CREMONEZ et al., 2017).

Com AHJ, efeitos em morte celular programada foram observados na broca-do-bambu *Omphisafuscidentalis* Hampson (Lepidoptera: Crambidae), além de aumento dos níveis de ecdisteróides na hemolinfa das larvas em diáspausa, o que pode ter desencadeado processos fisiológicos complexos (MANABOON et al., 2012). Sabe-se, no entanto que o AHJ parece atuar de alguma forma sobre o ultraespiráculo no complexo REc-USP, sítio de ligação de ecdisônio (GOODMAN; CUSSON, 2012), sendo ainda possível que o produto atue, além da ação específica, de modo indireto sobre os níveis de regulação hormonal de tais ecdisteróides.

A ação destes compostos tem intensa relação com a atividade do HJ e, contudo, com a regulação hormonal que este exerce sobre os processos de desenvolvimento dos insetos. Em estudo com piriproxifem, o produto atuou negativamente sobre todas as etapas de desenvolvimento de *Schistocerca gregaria* Forsskål (Orthoptera: Acrididae), desde a oviposição, no desenvolvimento embrionário e pós-embrionário, até as etapas de metamorfose

do acridídeo (VENNARD et al., 1998). Os estudos anteriormente realizados com *D. melacanthus* também demonstraram a ação ovicida e sobre o desenvolvimento do embrião quando a geração parental havia sido tratada previamente com piriproxifem (CREMONEZ et al., 2017).

2.4 ANÁLISES FISIOLÓGICAS DE INSETOS

Quantificações analíticas são importantes medidas para determinação de mudanças fisiológicas e muito utilizadas nas ciências ômicas (NOUZOVA et al., 2018; ZOGLI et al., 2020). Na prática, o desenvolvimento de bioensaios de alterações fisiológicas em função da ação de um agente externo necessita de uma análise sobre a necessidade de distinguir os sexos como tratamentos distintos, uma vez que diferenças fisiológicas entre machos e fêmeas são comumente observadas (GÄDE, 2002; DE LOOF, 2014; CREMONEZ et al., 2019; ANDREAZZA et al., 2020).

2.4.1 Morfometria

Insetos são animais altamente especializados e exemplos de que a evolução adaptativa é bem sucedida no que se refere ao seu tamanho. Este processo é conhecido como miniaturização, e é muito evidente na linha filogenética dos artrópodes (MINELLI; FUSCO, 2019). De forma geral, a complexidade dos sistemas biológicos dos insetos é altamente eficiente em um organismo completo e de tamanho altamente reduzido. Ao mesmo passo que este processo resulta em uma ampla especiação, uma gama de variações é encontrada em organismos da mesma espécie, sendo exemplos mais comuns os polimorfismos populacionais e o dimorfismo sexual clássico (BLANCKENHORN; MEIER; TEDER, 2007). De fato, sabe-se que existem populações heterogêneas de *E. heros* ambientadas no território Neotropical, com características genéticas que diferenciam linhagens em diferentes regiões do Brasil (SOARES et al., 2018). Entretanto, análises morfométricas são complementares às morfológicas como ferramentas eficientes e acessíveis para distinguir diferentes grupos de uma espécie.

A morfometria é o estudo estatístico da variação em relação ao tamanho e formato de um objeto, e pode ser aplicada a praticamente todas as áreas da ciência. Na área das ciências biológicas, estudos sobre a biometria já eram conduzidos desde meados do século XIX

(ELEWA, 2010). Entretanto, os estudos sobre a variação de carcaça de gafanhotos em diferentes fases (i. e. gregários ou solitários) realizados por Blackith (1957) representam uma das primeiras abordagens efetivas de traduzir um complexo modelo biológico em termos quantitativos.

No estudo da morfometria, é possível distinguir dois tipos básicos: a morfometria tradicional, baseadas nos princípios geométricos básicos de medidas entre diferentes pontos, normalmente utilizando a variação básica de um plano bidimensional, e. g. o comprimento longitudinal de um inseto, a área do organismo ou um órgão, ou a distância entre a inserção de um apêndice a outro (ELEWA, 2010); e a morfometria geométrica, apresentada por Rohlf & Marcus (1993) como uma revolução no estudo morfométrico, que se baseia na diferença de forma entre determinado grupo e outro, seja no plano bi ou tridimensional, desconsiderando medidas alométricas, ou seja, a variação de tamanho é desconsiderada nesta análise (TATSUTA; TAKAHASHI; SAKAMARI, 2018).

As medidas morfométricas tradicionais são simples, sendo necessário o emprego de ferramentas de medição como réguas, escalas ou compassos. A partir da tomada de dados, a variação é facilmente observada utilizando o emprego de comparação métrica, relação percentual, razões e análises estatísticas específicas para a comparação entre os grupos de estudo (ELEWA, 2010). Este tipo de análise é amplamente empregada no estudo de insetos, principalmente para levar em consideração variações de tamanho entre os grupos (DUJARDIN, 2008).

Em estudos de morfometria geométrica, os dados são registrados na forma de coordenadas tomadas em pontos de referência morfológicos, denominados marcos morfométricos (MMs) (ADAMS; ROHLF; SLICE, 2004). Pode-se verificar a sua adequação em cobrir as estruturas de interesse por meio de uma exibição gráfica dos marcos. Deste modo, a partir da análise de marcos homólogos entre os diferentes indivíduos da amostra, é possível analisar quais são os pontos onde as diferenças são mais expressivas e, por fim, facilita a interpretação dos resultados na análise biológica; não é apenas possível analisar se existem diferenças nas formas de diferentes tratamentos, mas também que certas estruturas específicas se moveram em relação a outras em função deste tratamento (ROHLF; MARCUS, 1993). Adicionalmente, é possível estender a aplicação da morfometria geométrica através da digitalização do contorno geral ou superfície de uma estrutura ou determinadas partes de uma estrutura. Isto é possível através da realização de uma sequência de pontos digitalizados ao longo do contorno que, por fim, é traduzido em várias coordenadas quantitativas (DUJARDIN

et al., 2014). As estimativas dos parâmetros da função ajustada podem então ser usadas como variáveis em análises estatísticas uni e/ou multivariadas.

O uso de morfometria geométrica se mostra complementar ou mesmo fundamental na discriminação de espécies, estágios de desenvolvimento e tratamentos. Apesar de envolver modelos matemáticos complexos, a disponibilidade de programas auxilia na importação, digitalização e demais etapas do processo da análise morfométrica (DUJARDIN, 2008).

Seja tradicional ou geométrica, os estudos de morfometria são e devem continuar sendo empregados como uma forma complementar e até mesmo mais eficiente que a análise subjetiva visual, como proposto por Mutanen&Pretorius (2007), uma vez que a utilização de mecanismos computacionais diminuem o erro amostral na análise de variação e facilitam a interpretação dos resultados finais.

Diversos aspectos da variação morfométrica são relacionados com a formação do organismo biológico em estudo, ou seja, o completo funcionamento de sua fisiologia (ELEWA, 2010). Em insetos, é necessário, sobretudo, compreender os aspectos morfo-fisiológicos que podem estar atrelados com as variáveis morfométricas, visto que o desenvolvimento destes seres tem completa influência sobre a forma final.

2.4.2 Elementos Inorgânicos

Fisiologicamente, os insetos de forma geral podem necessitar de uma extensa variedade de minerais em quantidades relativamente pequenas em sua nutrição, por exemplo, íons metálicos que atuam como cofatores enzimáticos ou ainda como componentes auxiliares de moléculas orgânicas estruturais (NATION SR., 2016).

Com exceção dos elementos orgânicos de composição (C, N, H e O), os elementos inorgânicos podem ser classificados em três tipos diferentes, de acordo com a sua concentração na matriz de análise: macro-elementos, que são os elementos químicos de maior concentração, muitas vezes estruturais (e.g.: S, P, Cl, Ca, K); micro-elementos, geralmente parte de grupos prostéticos de ligação essenciais para o funcionamento de enzimas (e.g.: Ni, Zn, Cu, Fe, Mo); e elementos traço, que basicamente são elementos residuais e que, normalmente não possuem função biológica (KABATA-PENDIAS, 2011).

Alguns elementos metálicos são essenciais como grupo prostético componente de algumas proteínas conjugadas dependentes de suas propriedades, como transferência de

elétrons (comum aos íons Fe, Zn, Cu, Ni, Mo e W) denominadas metaloproteínas (DOW, 2017). Portanto, estes elementos possuem relação direta, muitas vezes, com alterações no metabolismo celular, na atividade mitocondrial e na atividade enzimática em geral (MARKLOVÁ, 2002; PROTASOVA et al., 2007).

O ferro (Fe) é o elemento mais comum entre as metaloproteínas, componente da globinas e da proteínas Fe-S, possuindo diversas funções regulatórias (JOHNSON; SMITH, 2005), além de ser íon essencial da composição de enzimas importantes e bem diversas como as catalases, hidrogenases e aconitases (DLOUHY; OUTTEN, 2013).

O zinco (Zn) é essencial como componente da enzima álcool desidrogenase (MCKINLEY-MCKEE; WINBERG; PETTERSSON, 1991; DANIELSSON et al., 1994) e é o íon estabilizador dos dedos de zinco, que são componentes de nucleases e outros dímeros essenciais nos organismos eucariotos (KLOWDEN, 2013; MARET, 2013).

Cobre (Cu) é componente das plastocianinas, importante para a cadeia de transferência de elétrons em plantas (SOLOMON; GEWIRTH; COHEN, 1986), e aproveitado por insetos na melanogênese, processo de escurecimento e endurecimento do exoesqueleto (NORGATE et al., 2006). Cu também é componente de outras metaloenzimas, como a nitrito redutase e a citocromo C-oxidase da mitocôndria de uma vasta quantidade de organismos (VEST; HASHEMI; COBINE, 2013).

Sabe-se também que alguns elementos metálicos (e.g.: Zn, Mn, Ca e Fe) encontram-se presentes nas mandíbulas de insetos herbívoros, como componentes que auxiliam a resistência destes aparatos frente ao consumo de alimento (MORGAN et al., 2003; CRIBB et al., 2008).

Os elementos inorgânicos, em determinadas dosagens, ainda podem afetar o desenvolvimento bioquímico e genético comum dos insetos. Estudos com nanopartículas de Ag em doses não-letais sobre *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) demonstraram que o material causa efeito de perda de pigmentação do exoesqueleto devido ao sequestro de Cu, além de infertilidade e comprometimento do voo (ARMSTRONG et al., 2013). Os mesmos insetos, tratados com NiSO₄ e NiCl₂ *in vitro* apresentaram diferenciações do DNA normal de hemócitos, demonstrando fatores mutagênicos e co-mutagênicos de Ni sobre a mosca (CARMONA; CREUS; MARCOS, 2011). Níquel também é relatado como mecanismo de defesa de plantas hiperacumuladoras, que extraem o elemento do solo, contra insetos herbívoros (BOYD; MARTENS, 1994; BOYD, 2009).

Outros elementos, como Al, Co, Cr e Se também podem ser aproveitados por plantas e apresentam toxicidade aos insetos, que passam a evitar essas hospedeiras (MEINDL; BAIN; ASHMAN, 2013; SCHOWALTER, 2016). Em fibras musculares de larvas de *Xylotrupesdichotomus*L. (Coleoptera: Dynastidae), os canais de rianodina que recebem íons de Ca^{2+} demonstraram permeabilidade aos elementos Mn, Cd, Zn e Be testados (FUKUDA; KAWA, 1977), demonstrando que estes compostos podem afetar na contração muscular em insetos.

Análises de elementos químicos em amostras biológicas afetadas pelo efeito de inseticidas são muito empregadas em animais e plantas adjacentes aos agro-ecossistemas onde os produtos são aplicados (SHARMA et al., 2020). Contudo, apesar da facilidade de análise pelo emprego de técnicas modernas, como a análise de fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF), que apresenta grande precisão em amostras de material relativamente pequenas, sendo capaz de determinar elementos traços (KLOCKENKÄMPER; VON BOHLEN, 2015), estudos de alterações de elementos químicos no organismo dos próprios insetos em função da ação inseticida ainda são escassos (MIGDAŁ et al., 2018; CREMONEZ et al., 2019).

A ocorrência de poucos trabalhos específicos de alterações de elementos químicos em insetos possivelmente ocorre pelo fato de que os próprios produtos, isto é, compostos químicos modernos, geralmente não possuem elementos químicos contaminantes (e. g. metais pesados) em suas formulações. Entretanto, sabe-se que intrinsecamente a regulação de elementos inorgânicos no organismo dos insetos é altamente regulada pela homeostase química do organismo, bem como pelas interações deste com o ambiente (TANG; ZHOU, 2013; JEYASINGH et al., 2017). Diferentes tipos de tratamentos, e. g. exposição a um agente xenobiótico (DOW, 2017; CREMONEZ et al., 2019) ou mesmo o parasitismo (PINHEIRO et al., 2010) podem afetar o balanço destes elementos.

De modo geral, é importante salientar a importância das investigações com base em análises quantitativas como ponto de partida de estudos que envolvem as interações fisiológicas de inseticidas no organismo de insetos.

3 ARTIGO A: MORFOMETRIA BASEADA EM MARCOS MORFOMÉTRICOSGEOMÉTRICOS DE*Euschistus heros*TRATADOS COM PIRIPROXIFEM SUBLETAL

Landmark-based geometric morphometrics of *Euschistus heros* treated with sub-lethal pyriproxyfen

Paulo S. G. CREMONEZ¹, Janaína F. MATSUMOTO¹ Daniela O. PINHEIRO², Pedro M. O. J. NEVES¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina-PR, Brasil; ²Departamento de Histologia, UEL, Londrina-PR, Brazil.

RESUMO

A aplicação de técnicas morfométricas para análise de variação de forma e tamanho de insetos de importância econômica é bastante utilizada para caracterizar polimorfismo, e estudos sobre a associação destas técnicas com análises biológicas de pragas agrícolas têm sido pouco descritos. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram analisar consumo alimentar e medidas morfométricas tradicional e geométrica, baseadas em marcos morfométricos de corpo, em *Euschistus heros* fêmeas e machos tratados com piriproxifem subletal. Grupos de ninfas de quarto instar (N4) receberam aplicação tópica de piriproxifem $CL_{30} = 0,688 \text{ mL i. a. L}^{-1}$, sendo mantidas em condições controladas ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $65 \pm 5\%$ UR, 14 h fotofase) até a emergência dos adultos. Para comparação, grupos de N4 foram tratadas com água destilada pura como tratamento controle. Adultos que sobreviveram ao tratamento foram sexados e individualizados em placa de Petri (6 cm diam.) no momento da emergência. Inicialmente, medidas de consumo alimentar e massa corporal foram tomadas às 0, 24 e 48h após a emergência. Aos sete dias após emergência, foram tomadas fotografias de cada inseto em posição dorsal em microscópio estereoscópico, para digitalização dos marcos morfométricos. A partir de medição direta e conversão vetorial de coordenadas, foi realizado as análises de morfometria tradicional e geométrica, respectivamente. Para o primeiro caso, medidas de comprimento longitudinal, largura na altura do eixo pré-umeral e no eixo médio e área total do corpo foram os parâmetros selecionados. Níveis de consumo alimentar são similares independente do tratamento, exceto por uma significativa redução em fêmeas tratadas com 24h após emergência, normalizado às 48h. Entretanto, pela análise de tendência, é possível que insetos não tratados possuam uma tendência a consumir mais alimento. Fêmeas de *E. heros* são maiores e possuem maior massa, além de apresentar um morfotipo diferente de machos. Piriproxifem diminui a extensão do eixo pré-umeral em fêmeas adultas, porém não afeta significativamente o comprimento longitudinal, a largura, a área e massa corporal. As relações entre o desenvolvimento no estágio ninfal final com a configuração do corpo de *E. heros* adultos são indícios de alterações fisiológicas causados por piriproxifem, e o expressivo dimorfismo sexual é fator importante a ser avaliado em futuros estudos.

Palavras-chave: morfometria geométrica baseada em marcos morfométricos (MGBM); percevejo marrom-neotropical; inseticida desregulador de crescimento; alometria.

ABSTRACT

Studies on morphometric techniques to analyze shape and size variation in insects exposed to insecticides are still very scarce. The objectives of this work were to analyze food consumption, traditional and geometric morphometric measurements, based on defined body landmarks, in female and male *Euschistus heros* treated with sublethal pyriproxyfen. Groups of fourth instar nymphs (N4) received topical application of piriproxifem $CL_{30} = 0.688 \text{ mL a. i. L}^{-1}$, being maintained in controlled conditions ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $65 \pm 5\%$ RH, 14 h photophase) until adult emergence. For comparison, groups of N4 were treated with pure distilled water as a control treatment. Remaining adults were sexed and individualized in a Petri dish (6 cm diam.) at adult emergence. Initially, measurement of food consumption and body mass were taken at 0, 24 and 48 h after emergence. At seven days after emergence, photographs of each insect in dorsal position were taken under a stereomicroscope, to digitize the morphometric landmarks. From direct measurement and vectorial conversion of coordinates, analyzes of traditional and geometric morphometry were performed, respectively. For the first case, measurements of longitudinal length, width at the pre-humeral axis and in the middle axis and total body area were the parameters selected. For geometric morphometry, the groups were compared with each other, with differences still being observed between the nymph-adult

intermediary morphotype in relation to adults and N4. Levels of food consumption are similar regardless of treatment, except for a significant reduction in females treated 24 hours after emergence, normalized at 48 hours. However, through trend analysis, it is possible that untreated insects have a tendency to consume more food. *E. heros* females are larger and have greater mass, in addition to having a different morphotype than males. Piriproxifem decreases the extension of the pre-humeral axis in adult females, but does not significantly affect longitudinal length, width, area and body mass. The relationships between development in the final nymphal stage with the body configuration of adult *E. heros* are indications of physiological disorders caused by piriproxifem, and the expressive sexual dimorphism is an important factor to be evaluated in future studies.

Keywords: landmark-based geometric morphometrics (LBGM); Neotropical brown stink bug; insect growth disruptor; allometry

3.1 INTRODUÇÃO

Nos organismos, a variação fenotípica é um produto da interação do conjunto gênico com os fatores abióticos, e ao longo do tempo é responsável pelo processo de especiação e polimorfismo (FUTUYMA, 2005). Dentro de uma mesma espécie, esta variação pode apresentar vários graus, sendo que organismos desuniformes são extremamente comuns na natureza (KLINGENBERG, 2009). As variações podem estar relacionadas com diferentes parâmetros associados a um organismo ou parte deste, e. g. tamanho, massa, forma e configuração, e através da análise morfométrica, é possível estimar quantitativamente os níveis de variação que agregam ou segregam determinados grupos.

A combinação das definições geométricas das formas com técnicas modernas de análises estatísticas uni e multivariadas foi o ponto de partida do campo da morfometria geométrica (KLINGENBERG; MONTEIRO, 2005). As aplicações práticas deste campo na área da entomologia são extensivamente documentadas (ELEWA, 2010; LORENZ et al., 2017; PALCI; LEE, 2019).

De modo geral, a morfometria geométrica utiliza de pontos geométricos na imagem do objeto biológico que definem a forma básica principal, denominados marcos morfométricos (MMs), e são definidos como pontos homólogos no objeto de estudo que podem ser aplicados à todas as amostras, por exemplo, a ponte do nariz na face humana (BOOKSTEIN, 1997). Entretanto, apesar de possuir grande potencial de aplicação na investigação de alterações morfogenéticas em insetos após a ação de um pesticida, o emprego de técnicas morfométricas mistas nestes estudos ainda são muito limitadas.

Os inseticidas desreguladores de crescimento (IDC) são pesticidas que atuam sobre o desenvolvimento e crescimento da praga. Devido ao modo de ação por ingestão, estes inseticidas apresentam menor toxicidade ao ambiente em relação a inseticidas neurotóxicos de contato comumente utilizados, como organofosforados, carbamatos, piretróides, fenilpirazóis, entre outros (DHADIALLA; RETNAKARAM, SMAGGHE, 2005). Dentre os IDCs, o piriproxifem, que mimetiza o HJ nos insetos, apresenta características de seletividade, devido ao modo de ação intimamente relacionado com a fisiologia de artrópodes (PALLI, 2009). Em decorrência de sua natureza química, piriproxifem ultimamente afeta o desenvolvimento do inseto-alvo, sendo que uma concentração subletal pode não causar a morte direta, entretanto, causar diferentes tipos de deformidades morfológicas e esterilidade (ALIZADEH et al., 2012). Entre as principais modificações morfogenéticas ocorre o surgimento de indivíduos intermediários às fases de desenvolvimento (SIAL; BRUNNER, 2010). Estes insetos possuem

características larvais após a emergência do adulto, devido a modificações no balanço hormonal central (LI; JIA; LI, 2019). Contudo, excluindo-se este grupo subjetivamente distinto, em insetos expostos pode ocorrer o surgimento de adultos aparentemente saudáveis, e medidas morfométricas mistas podem ser aplicadas para entender a real discrepância entre estes insetos e organismos não tratados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar medidas morfométricas tradicionais e geométricas baseadas em MMs em *E. heros* fêmeas e machos tratados com piriproxifem subletal no quarto estágio ninfal, bem como avaliar os possíveis padrões de discrepância entre os diferentes morfotipos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção Dos Insetos

Adultos de *E. heros* foram obtidos de criação mantida no Laboratório de Entomologia da Embrapa Soja e levados para o Laboratório de Insetos do Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina - UEL.

Os percevejos foram criados em caixas de plástico com tampa telada ($v = 12$ L), vagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Fabaceae), sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (Fabaceae) e de soja (*Glycine max* Merrill) (Fabaceae), como alimento padrão, e rolos de algodão umedecido com água destilada para hidratação, conforme metodologia proposta por Depieri, Siqueira e Panizzi (2010).

Para o estudo foram utilizadas ninfas de quarto instar (N4) de *E. heros*, fase caracterizada pelo surgimento dos ângulos umerais do pronoto (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999), obtidas a partir da geração F1 da criação estoque, com a finalidade de avaliar efeitos de piriproxifem no desempenho, estrutura e funcionalidade de órgãos reprodutores dos insetos adultos.

Para a criação, assim como em todas as etapas dos bioensaios, os insetos foram mantidos em condições controladas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ UR e 14 h de fotoperíodo.

3.2.2 Aplicação Dos Inseticidas

Para o bioensaio, o produto utilizado foi piriproxifem (Tiger® 100 EC) em concentração subletal (CL_{30}) = $0,688 \times 10^{-2}$ mL i. a. L^{-1} misturado em água destilada

(CREMONEZ et al., 2019), e água destilada pura como testemunha. Uma alíquota de 1 mL da emulsão inseticida foi pulverizada sobre grupos de dez indivíduos N4 dentro de uma caixa de poliestireno (PS) cristal (11,0 x 11,0 cm), utilizando uma torre de Potter (BurkardScientific) calibrada com pressão de trabalho de 68,9 kPa, de forma a permitir a deposição uniforme do inseticida sobre os insetos. Alimento padrão da criação foi fornecido *ad lib* e os insetos permaneceram em repouso até a emergência de adultos.

3.2.3 Consumo Alimentar E Massa Corporal

O consumo alimentar foi analisado através de análise gravimétrica. Vagens de feijão orgânico foram cortadas em seções de 1.5 cm para padronização. Para a unidade experimental, um percevejo adulto recém-emergido, distinto entre fêmea ou macho, foi adicionado a uma placa de Petri (6 cm diam) com uma seção de vagem pré-pesada. Os insetos foram pesados antes (0h), às 24 e às 48 h após a exposição. Para controle de perda natural de massa do alimento, um grupo controle de seções foi analisado sem insetos. Nenhum outro alimento ou fonte de água foi adicionado à unidade experimental.

As análises de massa corporal foram tomadas com machos e fêmeas tratados e não tratados com sete dias de idade, previamente alimentados com vagem de feijão e sementes de amendoim e soja *ad lib*. As pesagens dos alimentos e dos insetos foram tomadas em balança analítica (prec. 0.0001 g) BEL® M214Ai (BEL Engineering, Piracicaba, Brasil).

3.2.4 Coleta De Imagens

Previamente à coleta de imagens, machos e fêmeas adultos com sete dias de idade foram anestesiados a frio (-4°C) por 1 min para imobilização. Para as imagens, fotografias de cada inseto em posição dorsal e alinhamento no plano longitudinal com auxílio de uma pinça anatômica, juntamente com uma régua milimetrada de precisão (Jeol®), foram tomadas em microscópio estereoscópico (25x de aumento) com câmera Moticam® 3.0 MP (Motic, KowloonBay, China) acoplada na lente ocular, resolução de 1296 x 972 pixels, e posterior processamento e armazenamento de imagens pelo software MoticImage Plus 3.0.

3.2.5 Marcos Morfométricos

Os marcos morfométricos (MMs) são marcações morfológicas baseadas no objeto de estudo com a função de definir pontos de interesse, tanto para as medidas de morfometria tradicional, quanto para a determinação de coordenadas para a morfometria geométrica. Neste trabalho, os MMs ($K = 20$) foram definidos com base nos principais vértices geométricos do corpo e do escutelo dos insetos, sendo estes pontos padrões onde possíveis deformações podem se manifestar (Figura 3.1).

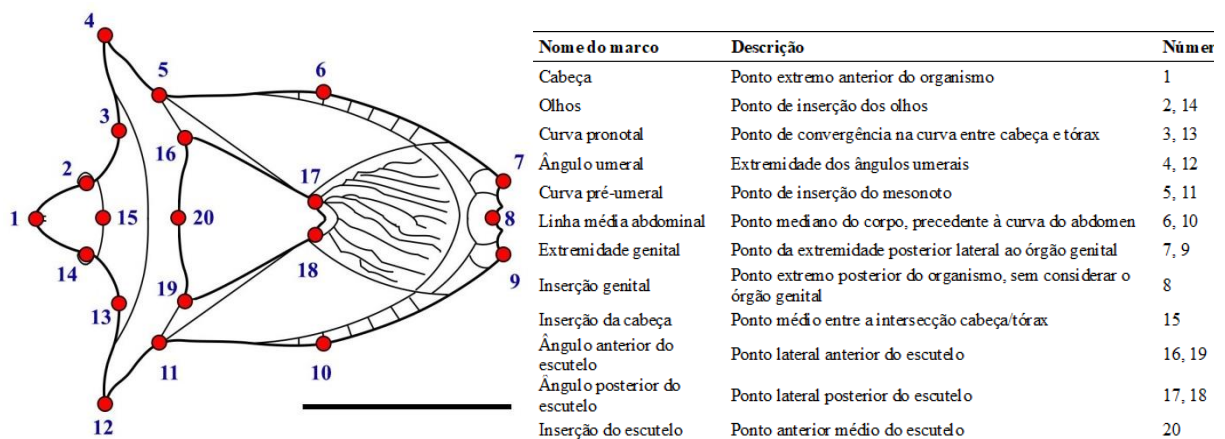


Figura 3.1 – Marcos morfométricos (MMs) definidos para análise morfométrica geométrica de *Euschistus heros*. Barra = 5 mm

3.2.6 Medidas Para Morfometria Tradicional

As imagens com os MMs delimitados foram importadas para o software ImageJ v. 1.52a (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004), para tomada das seguintes variáveis métricas: comprimento longitudinal (CL = MM1 – MM8; mm), eixo transversal médio (EM = MM6 – MM10; mm), eixo transversal pré-umeral (EP = MM5 – MM11; mm) e área (A = perímetro externo MM1 – MM14; mm²).

3.2.7 Coordenadas Para Morfometria Geométrica

A digitalização dos MMs foi realizada com o software tpsDig2 v. 2.31 (ROHLF, 2017) e importados para o software MorphoJ v. 1.07a (KLINGENBERG, 2011) para realização das análises morfométricas geométricas.

3.2.8 Análise Estatística

Os conjuntos de variáveis morfométricas escalares (tradicional) e os valores de massa corporal (MC) foram analisados conjuntamente. A normalidade foi verificada por

Shapiro-Wilk e/ou por análise residual, para validar as premissas da análise de variância (ANAVA) e detectar possíveis *outliers* (FERNANDEZ, 1992). Comprovada normalidade, os dados foram primeiramente submetidos a ANAVA univariada, para verificar diferenças entre os tratamentos para cada variável estudada, seguido de teste *ad hoc* de Tukey ($p \leq 0.05$). Para testar o comportamento das variáveis, análises de regressão linear foram realizadas para verificar correlação entre as variáveis métricas, e para testar a covariância e contribuição das variáveis para caracterização dos tratamentos, o agrupamento dos dados foi submetido a análise multivariada (MANAVA) e posterior análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analyses*). Foi utilizado o programa R (R CORE TEAM, 2020).

Para as variáveis morfométricas vetoriais (geométrica), foram realizadas as análises preliminares generalizada de Procrustes (GPA), para sobreposição dos MMs e remoção de erros arbitrários (viz. posicionamento, escala e rotação), e o processamento das matrizes de covariância. Em seguida, os tratamentos foram individualizados para PCA e análise de variáveis canônicas (CVA), uma análise linear discriminante que leva em consideração variações intra e intergrupos e representa os grupos em *clusters* distintos (multidimensional) em um morfoespaço cartesiano simplificado (LORENZ, 2017). Foi utilizado o programa MorphoJ v. 1.07a (KLINGENBERG, 2011).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Consumo Alimentar

Os dados de consumo alimentar foram diferentes às 24 e 48h de avaliação. Em insetos machos, descontando-se o valor médio de perda de massa natural (=vagem controle), houve um consumo médio entre 13,5 e 15,9 mg por percevejo nas primeiras 24h, sendo similar em insetos tratados e não tratados. Entretanto, os valores de consumo médio aumentaram mais de duas vezes em percevejos controle (32,5 mg) nas 24h seguintes, enquanto em percevejos tratados com piriproxifem o consumo permaneceu similar ao do primeiro dia (15,5 mg) (Figura 3.2).

O consumo de percevejos fêmeas não tratadas foi significativamente maior às 24h de avaliação ($p = 0,048$), entretanto similar ao consumo de fêmeas tratadas às 48h ($p = 0,424$). O consumo de machos tratados e não tratados foi similar em 24h ($p = 0,899$) e 48h ($p = 0,322$). Adicionalmente, a análise de regressão mostra uma tendência maior de consumo do grupo de percevejo controle em relação aos insetos tratados, evidenciadas pelo coeficiente angular (Figura 3.2).

3.3.2 Morfometria Tradicional

3.3.2.1 Relações alométricas lineares

Através das análises de regressão linear entre as variáveis métricas de comprimento longitudinal (CL), eixo médio (EM) e eixo pré-umeral (EP), através da interpolação de um plano de regressão, é possível observar uma relação alométrica positiva entre as variáveis analisadas, i. e., os índices de uma variável métrica aumentam proporcionalmente em função da outra (ver setas do plano de regressão, Figura 3.3). É possível observar ainda que fêmeas são significativamente maiores em relação aos machos, e insetos não tratados, de um modo geral, são maiores que os tratados com piriproxifem.

Assumindo-se a dependência das variáveis CL, EM e EP com a área (A) e massa corporal (MC), as múltiplas análises de regressão linear demonstram níveis significativos de correlação entre quase todos os grupos e em todos os tratamentos, sendo o coeficiente de regressão mais fraco entre as variáveis EM e MC ($R^2 = 0,730$) e o maior entre as variáveis EM e EP ($R^2 = 0,930$) (Figura 3.4). Quando se analisa os tratamentos em perspectiva, as relações alométricas são positivamente correlacionadas, tanto em função do sexo quanto da exposição ao inseticida.

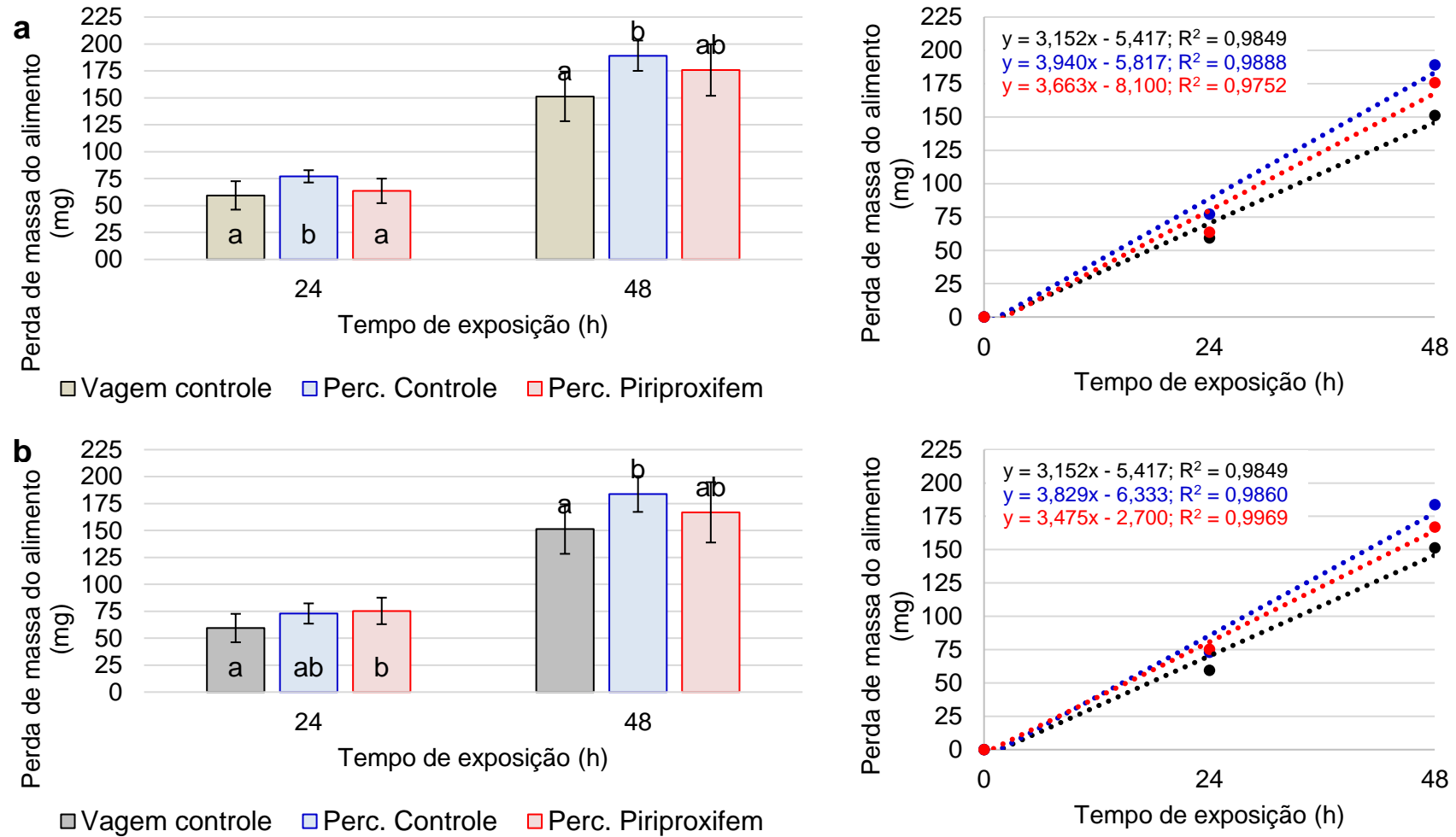


Figura 3.2 – Consumo alimentar de *Euschistus heros* tratados com piriproxifen. a) perda de massa de alimento e análise de regressão linear entre fêmeas; b) comparação entre machos. Colunas seguidas com mesma letra em cada dia avaliado não diferem significativamente, teste Tukey ($p \leq 0,05$).

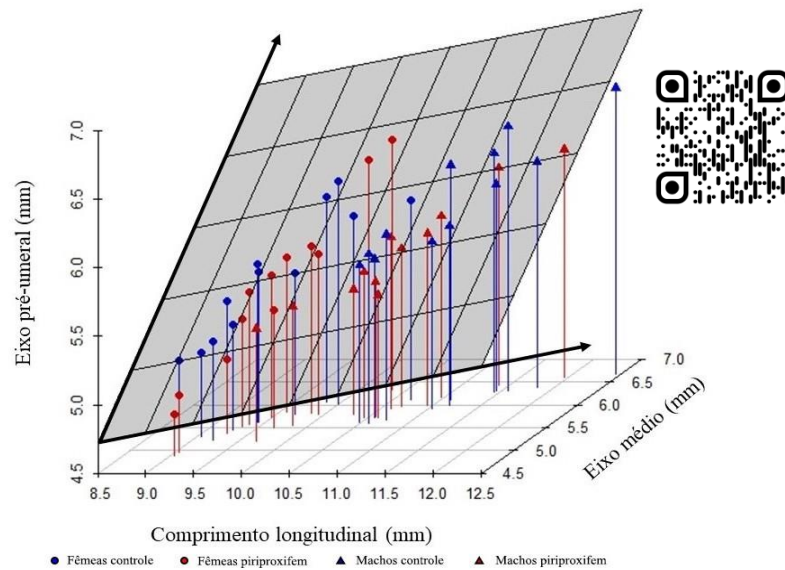


Figura 3.3 – Análise de regressão entre variáveis métricas de *Euschistus heros* tratados com concentração subletal de piriproxifem. O código a direita pode ser scaneado para exibição *on-line* do gráfico tridimensional animado. R v. 3.6.2, pacote car

3.3.2.2 Análises multivariadas e univariadas

Os resultados da análise multivariada apresentaram diferença significativa entre os grupos nas variáveis analisadas (Wilks $\lambda = 0,0368$, $F = <0,001$), sendo, por fim, possível observar que todas as variáveis apresentaram diferença em pelo menos um tratamento. As análises univariadas das medidas morfométricas de comprimento longitudinal demonstram diferença significativa entre fêmeas e machos de *E. heros*, bem como entre fêmeas tratadas com piriproxifem nas variáveis eixo pré-umeral e área (Tabela 3.1).

Através da análise de componentes principais (PCA), a distinção entre os grupos se integra no gráfico multidimensional simplificado (morfoespaço), onde todos os 20 marcadores morfométricos representam as variações, sendo possível observar, portanto, determinado agrupamento dos tratamentos e dos sexos (Figura 3.5); foi possível observar que a maior fonte de variação (CP1) apresenta uma amplitude que abrange todos os indivíduos do tratamento controle, com um deslocamento dos grupos em relação ao sexo: fêmeas ligeiramente deslocadas para a esquerda e machos para a direita, mas nenhum mais centralizado que o outro, isto é, não existe um fator hiperalométrico que favorece algum sexo, porém o dimorfismo, apesar de discreto, é presente.

Na análise do segundo maior componente (CP2), que responde por apenas 7% da variação, é possível observar um deslocamento do grupo de amostras no morfoespaço cartesiano em relação ao tratamento com piriproxifem, com respostas diferentes em relação aos diferentes sexos: em fêmeas controle, a distribuição é mais centralizada, enquanto fêmeas

tratadas possuem um deslocamento positivo. Em machos controle também é possível observar um padrão mais central, porém, machos tratados são amplamente distribuídos, com indivíduos cobrindo grande parte do morfoespaço (Figura 3.5).

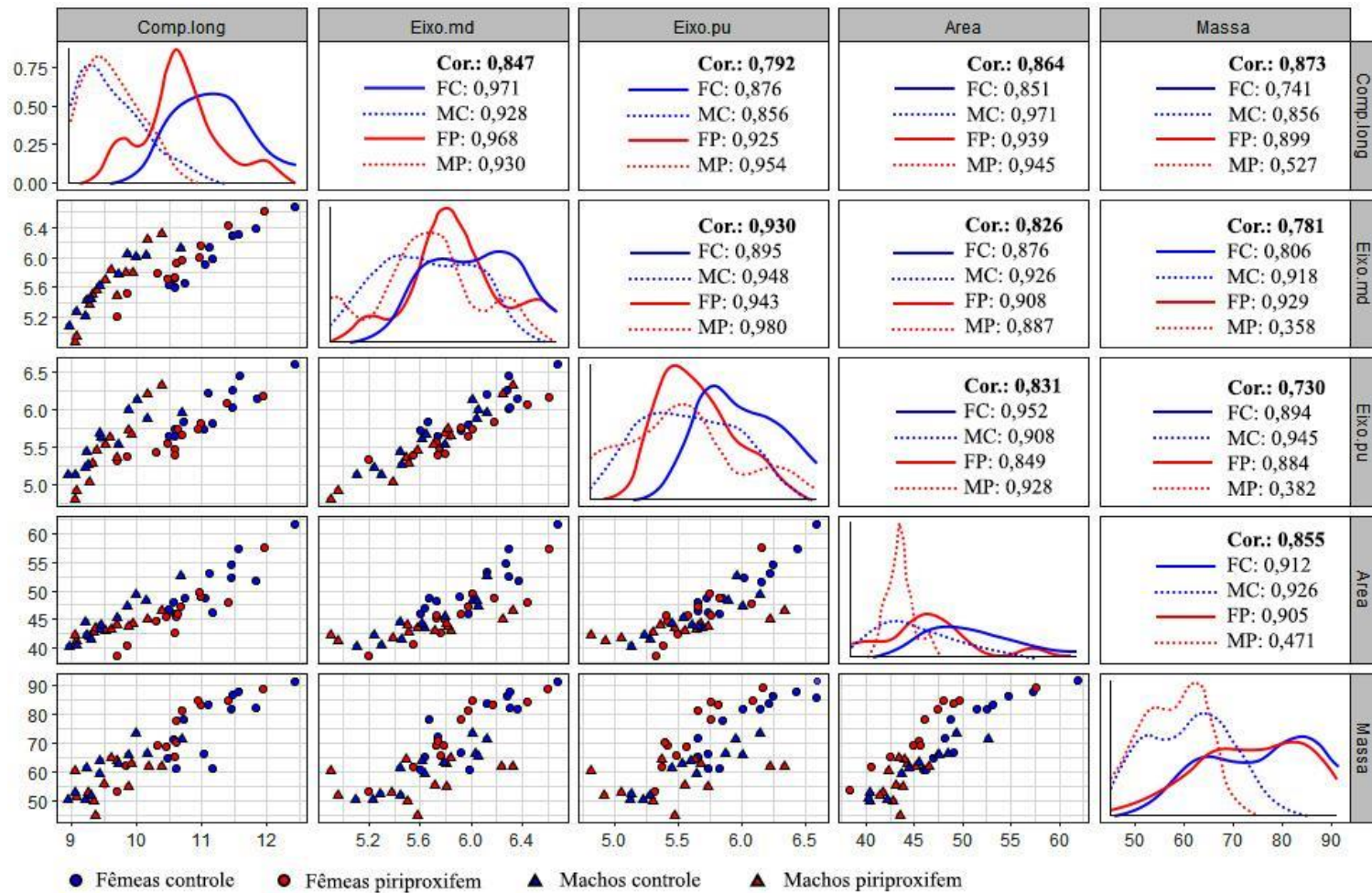


Figura 3.4 – Relações alométricas entre diferentes variáveis de *Euschistus heros* tratados com concentração subletal de piriproxifem. R v. 3.6.2, pacote ggplot2,

ggpairs

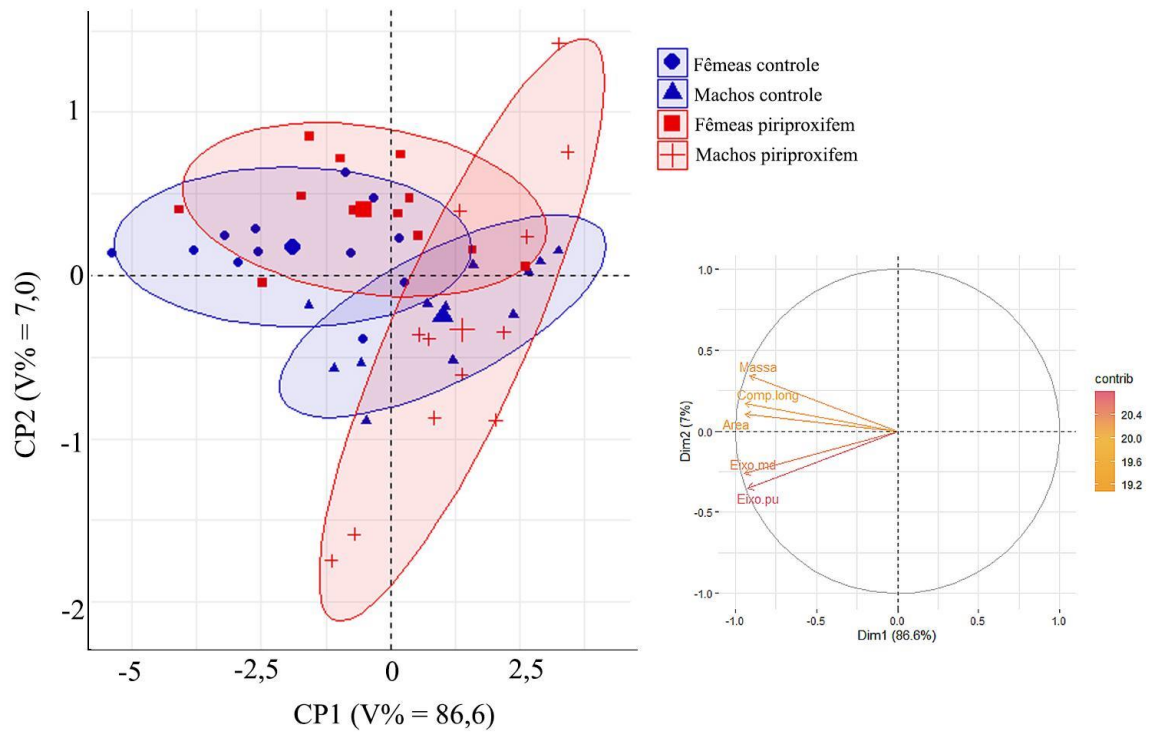


Figura 3.5 – Análise de componentes principais (PCA) e gráfico de correlação de variáveis morfométricas de corpo de *Euschistus heros* tratados com piriproxifem. R v. 3.6.2, pacote factoextra 1.0.6

Tabela 3.1 Medidas morfométricas de adultos de *Euschistus heros* tratados e não tratados com concentração subletal de piriproxifem

Fonte de variação	g.l.	Variáveis										
		Comprimento longitudinal (mm)	Eixo médio (mm)	Eixo pré-umeral (mm)	Área geral (mm ²)	Massa corporal (mg)						
Controle	Fêmeas	3, 44	11,20 ± 0,59	a	6,08 ± 0,43	a	6,00 ± 0,32	a	51,34 ± 4,90	a	76,29 ± 10,75	a
	Machos	3, 44	9,58 ± 0,51	b	5,63 ± 0,38	b	5,62 ± 0,37	b	44,63 ± 5,51	b	61,05 ± 7,99	b
Piriproxifem	Fêmeas	3, 44	10,67 ± 0,62	a	5,98 ± 0,47	ab	5,61 ± 0,39	b	46,23 ± 4,87	b	74,16 ± 10,78	a
	Machos	3, 44	9,59 ± 0,42	b	5,64 ± 0,17	b	5,35 ± 0,23	b	43,91 ± 2,49	b	57,41 ± 6,38	b
ANAVA	CV%		5,18		6,45		5,76		9,52		13,21	
	p-valor		0,0000		0,0213		0,0003		0,0011		0,0000	
MANAVA	F		27.1		3.45		4.59		8.69		12.6	
	p-valor		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	

Nota: Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$. g.l. = graus de liberdade; ANAVA – análise de variância; MANAVA = análise de multivariância; CV% = coeficiente de variação; F = valor do teste f de hipóteses. n = 48.

3.3.3 Morfometria Geométrica

As amostras de formas de *E. heros* foram eficientemente definidas e agrupadas através da PCA e CVA, respectivamente. Para tanto, a análise generalizada de Procrustes (GPA) foi realizada *a priori* com as coordenadas cartesianas obtidas; deste modo, os efeitos alométricos (i. e. efeitos da variação de tamanho, previamente observados isoladamente na morfometria tradicional) aqui são anulados, através da aplicação de uma regressão multivariada entre forma e tamanho, sendo que os resíduos da análise subtraem os efeitos alométricos e resta a variação de forma (KLINGENBERG, 2009). Após a GPA, as matrizes de covariância podem ser realizadas para prosseguir com a PCA e CVA.

Os dois componentes principais mais variáveis foram plotados em um morfoespaço e respondem conjuntamente a uma variação de 50,1%. Através do posicionamento dos pontos centroides de cada marco, que discrimina a máxima variação dos dois primeiros componentes principais, é possível observar diferenças entre os morfotipos hipotéticos (i. e., a representação média dada pela junção de todos os pontos centróides *versus* a representação média dos pontos na máxima variação) pela distorção de grade tipo D'arcy Thompson e nos pontos ligados, sendo principalmente atribuídas à placa anal (MM8) e no ângulo umeral (MM4 e MM12). Existe um discreto deslocamento do escutelo no conjunto geral, porém, não há diferença significativa na distinção de um evento de modularidade (Figura 3.6a). A distribuição dos pontos no morfoespaço da PCA apresenta o agrupamento dos tratamentos e sexos, delimitados em elipses (90% dos dados) para visualização (Figura 3.6b).

De maneira complementar, a análise de variáveis canônicas (CVA) apresenta um modelo discriminante dos grupos de tratamentos através de um morfoespaço de análise multivariada, de forma a representar o maior agrupamento dos tratamentos em função da variação entre os grupos (Figura 3.7).

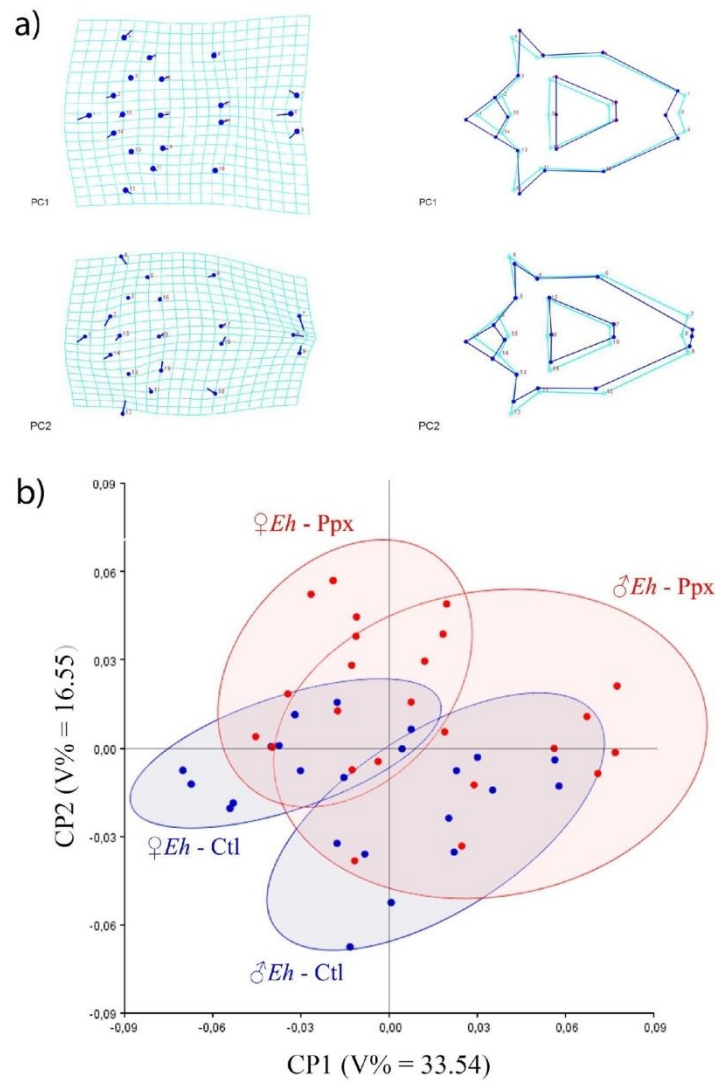


Figura 3.6 – Análise de componentes principais (PCA) de marcos morfométricos de *Euschistus heros* machos e fêmeas tratados com piriproxifem. a) mudanças de forma com base no primeiro (PC1) e segundo componentes principais (PC2); b) gráfico da PCA representando os dados no morfoespaço. Elipses representam a distribuição dos valores (intervalo de confiança = 90%). n = 48. MorphoJ v. 1.07a

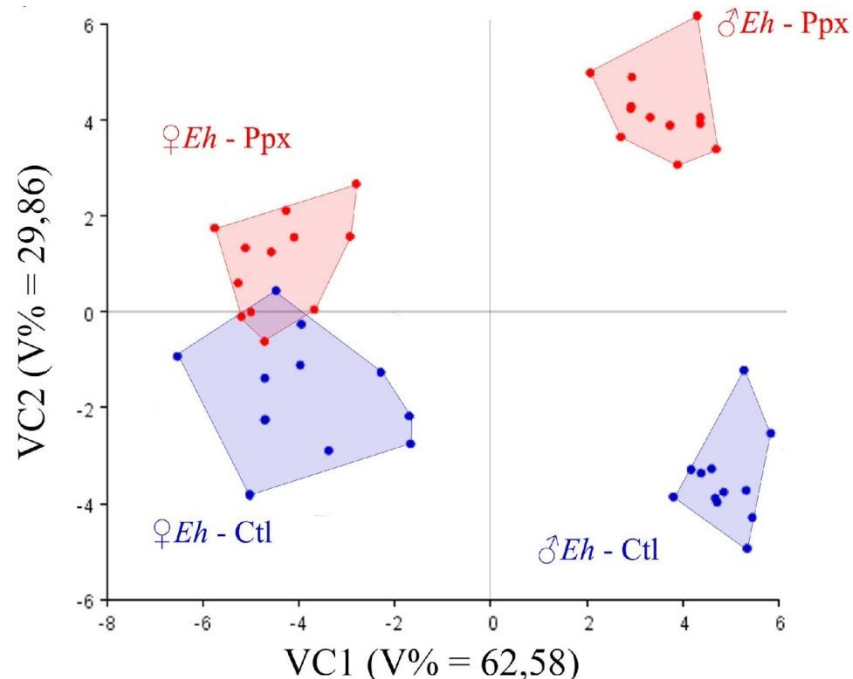


Figura 3.7 – Análise de variáveis canônicas (CVA) de marcos morfométricos de *Euschistus heros* machos e fêmeas tratados com piriproxifem. n = 48. MorphoJ v. 1.07a

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Consumo Alimentar

O aumento de consumo de alimento é esperado com o avanço da idade de vida adulta, o que foi observado em *E. heros* alimentados com vagem de feijão. Isto ocorre pois o consumo alimentar é uma condição básica para o desenvolvimento, crescimento, reprodução e dispersão, e as ninfas são condicionadas a alimentar-se constantemente com o avanço da idade, característica que é mantida após a passagem para o estágio adulto (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012).

Conforme o aumento de consumo, o aumento de massa corporal nos adultos também foi observado com *E. heros*, especialmente nas fêmeas. De fato, a eficiência digestiva é uma função que se correlaciona positivamente com a conversão de massa corporal e ao estágio de desenvolvimento dos insetos (FARRAR JR; BARBOUR; KENNEDY, 1989). Além do mais, sabe-se que as variações quantitativas de massa de alimento são métodos que podem ser atribuídos ao nível de atividades fisiológicas e alterações bioquímicas (COUDRON; YOCUM; BRANDT, 2006).

Alterações ou diferenças de fisiologia afetam a frequência de alimentação, sendo que a quantidade de aminoácidos livres e a osmolaridade da hemolinfa são os principais fatores

que aumentam o intervalo de alimentação, porém não afetam os níveis finais de consumo (ABISGOLD; SIMPSON, 1987). Estas alterações podem ocorrer devido a diferentes interações do ambiente, como a exposição à agentes xenobióticos (SENTHIL-NATHAN, 2013; TONG; NIEH; TOSI, 2019), especialmente inseticidas neurotóxicos (CHAPMAN, 1974; LEE, 2000; COOK, 2019). Outra estratégia adaptativa é a realocação de recursos e mecanismos de compensação em estágios juvenis maiores e na fase adulta de insetos, como estratégia de reabilitação a uma má nutrição (BOGGS, 2009). Normalmente, estas consequências são reguladas durante o estágio de pupa ou levadas adiante como deficiências durante a vida adulta. Neste último caso, estas deficiências são intrinsecamente perceptíveis pelo organismo, e.g. metabólitos circulantes da hemolinfa e suas interações com o sistema nervoso central (RAUBENHEIMER; SIMPSON, 1993).

Por fim, a realocação de recursos serve como mecanismo de remediação através de regulações fisiológicas de diversas maneiras, como: diapausa, reabsorção de tecidos e regulação de nutrientes recém ingeridos (NESTEL et al., 2016). Estudos acerca de mecanismos compensatórios de ingestão em insetos adultos ainda são pouco estudados em hemimetábolos, sendo em sua maioria realizados com ortópteros (HAHN; KUNERT, 2006; RAUBENHEIMER; JONES, 2006).

As implicações dos mecanismos compensatórios podem ser negativas sob o ponto de vista econômico, isto é, quando se trata de um inseto-praga, uma vez que existe um sistema de compensação na aquisição de recursos por parte do inseto. Em *E. heros*, sabe-se que a aplicação preventiva de inseticidas pode aumentar o dano causado na cultura da soja (CAVALLARI et al., 2013), e de uma forma mais específica, neonicotinóides podem causar um efeito hormético sobre o desempenho sexual do percevejo (HADDI et al., 2016). Em *E. heros* tratados com piriproxifem, machos tratados não tiveram o consumo afetado, porém foram os mais sensíveis em relação a progressão de consumo nas 48h de avaliação. Sendo assim, é possível que um maior tempo de avaliação seja necessário para concluir os efeitos do inseticida sobre este parâmetro. Adicionalmente, uma avaliação bioquímica da hemolinfa pode ser complementar para analisar os efeitos de piriproxifem sobre a fisiologia do percevejo.

3.4.2 Morfometria Tradicional

As variáveis métricas foram eficientes para a diferenciação entre os sexos e as provocadas pela ação de piriproxifem. As fêmeas de *E. heros* são maiores e mais pesadas que os machos, como observado em outras espécies de pentatomídeos (NIELSEN; SHEARER; HAMILTON; 2008). Isto ocorre em diversas espécies de insetos, e se dá por conta de processos evolucionários diversos que modulam o dimorfismo sexual por tamanho (SSD, do inglês *sexual sizedimorphism*). Basicamente, a característica evolutiva mais importante na classe dos insetos é a de oviposição e defesa da prole, e não a própria aptidão (WATANABE, 2001).

A correlação entre a proporção de massa corporal com o SSD foi objeto de investigações em diferentes grupos taxonômicos, sendo que diferentes abordagens já foram observadas. No que se refere a relação entre SSD e o crescimento dos organismos, geralmente se observa a regra de Rensch, i. e., a taxa de SSD aumenta em espécies em que o macho é o maior, e diminui em espécies onde a fêmea é maior (RENSCH, 1950). Entretanto, alguns autores postulam que certas espécies apresentam um padrão inverso da regra (FAIRBARN, 1997), algumas vezes explicado por diferenças no tempo de maturação sexual (BLANCKENHORN et al., 2007). Em relação ao estudo com *E. heros*, a regra de Rensch é válida, uma vez que o dimorfismo em favor de maior tamanho de fêmeas é significativo na análise morfométrica, porém discreto quando comparado com outras espécies de insetos onde machos são maiores (TEDER, TAMMARU, 2005). Estudos futuros com grupos de Pentatomidae podem ser desenvolvidos para elucidar estes indícios.

Adicionalmente, os resultados de correlação demonstram que as variáveis morfométricas estão apontadas na mesma direção e com mesmo tamanho de setas, o que indica uma correlação positiva e contribuição geral equilibrada, respectivamente, na variação dos organismos amostrais (ABDI; WILLIAMS, 2010), i. e., todas as variáveis contribuem similarmente e proporcionalmente para demonstrar as variações entre os grupos de organismos amostrais. Isto indica que, sobre condições normais, *E. heros* se desenvolve isometricamente em função de tamanho e massa corporal.

3.4.3 Morfometria Geométrica

A maior variação observada na PCA relacionada ao ponto extremo da placa anal (MM8) sugere que a razão do dimorfismo sexual na forma é proveniente de modificações nesta região. Em machos, a placa anal é recuada, em formato de “v”, possivelmente para a

disposição do aparato sexual. Este aspecto morfológico pode estar ligado às características evolutivas do órgão sexual, de modo a auxiliar na cópula. Em insetos machos, a morfologia genital é altamente influenciada pela seleção sexual. Entretanto, existem empecilhos para comprovar empiricamente as relações co-evolutivas ou pleiotrópicas entre seleção sexual e evolução genital (SIMMONS, 2014), e apesar da maioria dos estudos serem relacionados a insetos (EBERHARD et al., 1998), o desenvolvimento evolutivo do dimorfismo sexual em Pentatomidae ainda é pouco estudado, podendo estar ultimamente relacionado à característica reprodutiva e preservação da prole (NIELSEN; SHEARER; HAMILTON, 2008).

O agrupamento de amostras de *E. heros* observado na CVA é resultado das variações morfogênicas entre os sexos e pelas causadas por piriproxifem. Diferentes grupos taxonômicos de insetos podem ser categorizados através da análise de variáveis canônicas (LORENZ, 2017), bem como a distinção dos padrões de desenvolvimento. Peterson et al. (2019) conseguiram, com sucesso, fazer uma análise de agrupamento dos seis diferentes instares de *Blatellaasahinai*Mizukubo (Blattodea: Ectobiidae) através do comprimento e largura do pronoto, utilizando a técnica de aproximação bayesiana de modelagem gaussiana mista. Para este agrupamento, o modelo com transformação logarítmica simples é essencial para diferenciação dos grupos.

Em relação às diferenças causadas por piriproxifem em *E. heros*, a variação deve ocorrer devido interações diretas e indiretas: no primeiro caso, os receptores de HJ são ativados por piriproxifem (JINDRA et al., 2015), e ocorre uma desregulação fisiológica persistente nos últimos estágios ninfais, causando o surgimento de insetos adultos mal formados. Uma das principais consequências da hiperatividade dos receptores de HJ é o desbalanço hormonal com ecdisteróides. Normalmente, o equilíbrio criado pelo gradiente entre HJ/ecdisteróide determina o tipo de ecdise; uma maior concentração de HJ em relação à ecdisteróide determina uma passagem de estágio normal, ou muda (ninfa-ninfa), enquanto uma relativa menor concentração de HJ determina uma passagem metamórfica (ninfa-adulto) (SMITH; RYBCZYNSKI, 2011). As variações em percevejos adultos tratados podem ter relação com a ação de piriproxifem sobre as características morfogênicas durante o desenvolvimento ninfal final, e estudos ontogênicos devem ser realizados para definir as interações da ação do produto com o desenvolvimento ninfal de *E. heros*.

As interações indiretas referem-se a efeitos colaterais de piriproxifem sobre fatores ligados aos padrões de desenvolvimento, que por sua vez possuem relação com o consumo alimentar e conversão de massa. Uma dieta pobre é capaz de moldar o dimorfismo sexual, podendo inclusive inverter a posição de domínio de um sexo em relação ao outro

(BONDURIANSKY, 2007). De fato, para algumas espécies biológicas, o dimorfismo sexual se origina em fatores ligados a medidas intraespecíficas de competição por comida (dimorfismo sexual ecológico) (FAIRBARN, 1997). Empiricamente, esta teoria é complicada de se provar tendo em conta muitos cofatores evolutivos que se relacionam com o desenvolvimento, o que aumenta a possibilidade de fatores de confusão que comprometem a investigação, e. g. relacionados ao ambiente, genética, idade e sazonalidade (STAMPS, 1993; KRAUSHAAR; BLANCKENHORN, 2002). Em *E. heros*, as condições controladas de aclimação e população homogênea foram utilizadas, o que aumenta a credibilidade das diferenças observadas.

Piriproxifem em concentração subletal aplicada em estágios ninfais mais tardios é capaz de modificar características morfogenéticas em *E. heros*.

3.5 CONCLUSÕES

Machos tratados não tiveram o consumo afetado, porém foram os mais sensíveis em relação a progressão de consumo nas 48h de avaliação. Sendo assim, é possível que um maior tempo de avaliação seja necessário para concluir os efeitos mais evidentes do inseticida sobre este parâmetro.

O dimorfismo sexual é um fator importante a ser considerado nos estudos com *E. heros*, pois a variação entre os sexos é mais expressiva que a variação devido a ação de piriproxifem. Através da análise morfométrica, é possível concluir que piriproxifem altera a forma do corpo de *E. heros*, e o dimorfismo sexual ocorre principalmente por mudanças na região posterior do corpo.

4 ARTIGO B: PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DE *Euschistusheros* TRATADOS COM PIRIPROXIFEM EM DOSAGEM SUBLETAL

Morphologic and morphometric parameters of reproductive organs of *Euschistusheros* treated with sub-lethal pyriproxyfen dosage

Paulo S. G. CREMONEZ¹, Janaína F. MATSUMOTO¹, Daniela O. PINHEIRO², Pedro M. O. J. NEVES¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina-PR, Brasil, ²Departamento de Histologia, UEL, Londrina-PR, Brazil.

Correspondencia: Daniela O. Pinheiro, Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil.
Email: daniela_pinheiro@uel.br

RESUMO

O percevejo *Euschistus heros* é uma praga importante no cenário agrícola brasileiro e de crescente importância na região Neotropical. Seu potencial reprodutivo e resistência a inseticidas é fator determinante para sua caracterização como praga-chave em grandes culturas como soja e algodão. Com isto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de piriproxifem sobre a reprodução e desenvolvimento morfológico do aparelho reprodutor de *E. heros*. O produto utilizado foi piriproxifem (Tiger® 100 EC) na concentração subletal ($CL_{30} = 0,688 \text{ mL.i.a. L}^{-1}$), pré-determinada para ninfas de quarto instar (N4), que foi aplicado sobre grupos de ninfas deste estágio. Os bioensaios realizados foram: (i) avaliação dos parâmetros biológicos fecundidade (número de ovos/fêmea) e fertilidade (número de ninfas eclodidas) de casais adultos; (ii) avaliação morfométrica e morfológica de ovários e testículos dos percevejos adultos com diferentes idades. Em termos relativos a fêmeas e machos não tratados, as taxas de fertilidade e fecundidade, respectivamente, apresentam redução de 2 e 12% quando apenas o macho é tratado, 47 e 53% quando apenas as fêmeas são tratadas, e 32 e 46% quando fêmeas e machos são tratados. Em relação à análise morfométrica, oócitos basais são maiores e mais pré-vitelogênicos em fêmeas recém-emergidas tratadas, e a área nuclear de células acessórias testiculares não se modifica com o tempo em insetos controle, entretanto, são menores em 10 e 15 dias de idade em insetos tratados. A forma do testículo foi modificada, partindo de um padrão elipsóide para obpiriforme, caracterizado por uma hipertrofia da região basal ao longo do tempo. Adicionalmente, a área aparente do órgão aumenta até os 10 dias de idade, diminuindo novamente aos 15 dias. Piriproxifem afeta o desenvolvimento das ninfas de 4º instar de *E. heros*, evidenciando efeitos negativos sobre a biologia reprodutiva de fêmeas e machos que atingem a fase adulta.

Palavras-chave: percevejo marrom-Neotropical; reprodução de insetos; inseticida desregulador de crescimento.

ABSTRACT

The stink bug *Euschistus heros* is an important pest in the Brazilian agricultural scenario and of increasing importance in the Neotropical region. Its reproductive potential and resistance to insecticides is a determining factor for its characterization as a key pest in large crops such as soybeans and cotton. Then, the aims of this work were to evaluate the effects of piriproxifem on the reproduction and morphological development of the reproductive system of *E. heros*. The product used was pyriproxifem (Tiger® 100 EC) in sublethal concentration ($LC_{30} = 0.688 \text{ ml a.i. L}^{-1}$), pre-determined for fourth instar nymphs (N4), which was applied to groups of nymphs of this stage. The bioassays performed were: (i) evaluation of biological parameters fertility (number of eggs/female) and fecundity (number of hatched nymphs) of adult couples; (ii) morphometric and morphological evaluation of ovaries and testicles of adult bedbugs with different ages. In terms of untreated females and males, fertility and fecundity rates, respectively, show a reduction of 2 and 12% when only the male is treated, 47 and 53% when only the females are treated, and 32 and 46% when females and males are treated. Regarding the morphometric analysis, basal oocytes are larger and more pre-vitellogenic in newly emerged treated females, and the nuclear area of testicular accessory cells does not change over time in control insects, however, they are smaller in 10 and 15 days age in treated insects. The shape of the testicle was modified, starting from an ellipsoid to obpiriform pattern, characterized by a hypertrophy of the basal region over time. In addition, the apparent area of the organ increases until 10 days of age, decreasing again at 15 days. Piriproxifem affects the development of the nymphs of the 4th instar of *E. heros*, showing negative effects on the reproductive biology of females and males that reach adulthood.

Keywords: Neotropical brown stink bug; insect reproduction; insect growth disruptor.

4.1 INTRODUÇÃO

O percevejo marrom-neotropical *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae) tornou-se uma praga agrícola de grande importância no setor produtivo da região do Cone Sul do Brasil (SOARES et al., 2018), com relatos de ocorrência em regiões vizinhas da Argentina (SALUSO et al., 2011). O seu expressivo potencial reprodutivo e disseminativo além da seleção de populações resistentes a inseticidas são as principais causas que definiram sua importância na área. Com relação aos danos estes insetos reduzem significativamente a produtividade e qualidade das sementes em formação (PANIZZI; SILVA, 2009).

No aprimoramento de um sistema produtivo menos agressivo ao meio ambiente, é preciso considerar o manejo de resistência das populações de pragas, com a utilização adequada como a rotação de produtos com diferentes modos de ação (SPARKS et al., 2020). Dentro desta vertente, o uso de inseticidas desreguladores de crescimento, por alguns ainda classificados como biorracionais, surge como uma alternativa para o controle de populações infestantes de pragas e uma alternativa a inseticidas de amplo espectro e altamente tóxicos ao ambiente (HOROWITZ; ELLSWORTH; ISHAAYA, 2009).

Estudos sobre o desenvolvimento do aparelho reprodutor dos insetos são essenciais para determinar seu status, tanto individual, quanto populacional (ESQUIVEL, 2009). Fêmeas de percevejos Pentatomidae são extremamente prolíficas, possuindo ovários constituídos por ovariolos meroísticostelotróficos, i. e., apresentam um *cluster* de células nutridoras remanescentes na porção apical e que possuem a função de transferir proteínas e nutrientes aos oócitos em formação no vitelário, através de prolongamentos citoplasmáticos (HUEBNER; DIEHL-JONES, 1993; FORTES; SALVADOR; CÔNSOLI, 2011).

O desenvolvimento e maturação dos ovários e testículos são essenciais para garantir que o conjunto de células da linhagem germinativa se desenvolvam para a fecundação e formação do zigoto. Este processo é dependente do desenvolvimento e controle hormonal regular, principalmente nos estágios juvenis finais, o que envolve a interação direta e indireta de hormônio juvenil (HJ). O HJ atua sobre a maturação sexual, metabolismo lipídico e biossíntese de vitelogenina (VENNARD et al., 1998; GUO et al., 2014; SMYKAL et al., 2014; LENAERTS et al., 2016; GIJBELS et al., 2019). Da mesma maneira, sabe-se que análogos de HJ, como piriproxifem, fenoxicarb e metopreno, possuem mecanismos regulatórios de parâmetros reprodutivos similares (EDWARDS; BRAUN; WYATT, 1993;

JINDRA et al., 2015), sendo potenciais compostos para controle de pragas. As implicações do uso de análogos de HJ sobre a biologia reprodutiva de percevejos-praga, no entanto, ainda são pouco investigadas.

Pensando nisto, os objetivos deste trabalho foram avaliar características biológicas e de desempenho reprodutivo de fêmeas e machos tratados com piriproxifem em estágio juvenil, através do desempenho reprodutivo (fecundidade e fertilidade) e os efeitos do inseticida sobre o desenvolvimento dos órgãos reprodutores.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção Dos Insetos E Aplicação

Os insetos foram obtidos e tratados conforme metodologia descrita no Artigo A, itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente.

4.2.2 Fertilidade De Casais E Fecundidade De Progenie

Adultos recém-emergidos foram sexados e os casais formados, de acordo com o delineamento cruzado para formação dos tratamentos, como segue: fêmea controle x macho controle (casal controle, FC x MC); fêmea controle x macho tratado (FC x MP); fêmea tratada x macho controle (FP x MC); e fêmea tratada x macho tratado (FP x MP). Foram formados oito casais por tratamento.

Cada casal foi individualizado em caixa de poliestireno cristal (PC)cristal (11 x 11 x 3 cm) forrada com papel filtro e contendo alimento padrão, conforme determinado no Artigo A, item 3.2.1. As caixas foram mantidas sob condições controladas por um período de 14 dias com a finalidade de permitir a cópula e oviposição.

Após o período, o número de ovos foi quantificado para a anotação da fertilidade, e em seguida colocadas em caixa de PC cristal (11 x 11 x 3 cm) forradas com papel filtro umedecido com água destilada e uma vagem de feijão, permanecendo até a eclosão das ninfas para a quantificação da fecundidade.

4.2.3 Morfologia De Sistemas Reprodutores

Para análise dos sistemas reprodutores, foram utilizados fêmeas e machos adultos virgens de diferentes idades como: recém-emergidos (0), 5, 10 e 15 dias após emergência (DAE). Os ovários e testículos foram coletados em solução salina (1,80 g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16 de CaCl; 0,004g de NaHCO₃ e água destilada-q.s.p 100 mL, pH 7,4) e imediatamente fixados em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) por 4h.

Para análise morfométrica da cápsula testicular, os órgãos, ainda em solução fixadora, foram fotografados em microscópio estereoscópico (25x) SZ61 (Olympus®, Tóquio, Japão) acoplado com câmera Moticom® 3.0 MP (Motic, KowloonBay, China) resolução de 1296 x 972 pixels.

Após a fixação, o material foi submetido ao processo de inclusão em resina glicol-metacrilato. Os órgãos foram lavados em solução tampão fosfato de sódio (0,1M e pH 7,2), em três vezes (cinco minutos cada), desidratados em série crescente de álcool etílico (70, 90 e 100% por 20 minutos cada), pré-infiltrados em solução de resina pura (hidroxetilmetacrilato + ativador) + álcool 100% (1:1) por 4h em temperatura ambiente, infiltrados em resina pura Historesin® (LeicaBiosynthesis, Wetzlar, Alemanha) em temperatura ambiente por 24h, incluído em moldes apropriados de polietileno contendo solução de resina básica (hidroxetilmetacrilato) + ativador (dibenzoilperóxido) + endurecedor (dimetilsulfóxido) e mantido em temperatura ambiente até a total polimerização da resina.

Os blocos com o material foram cortados em micrótomo rotativo automático (4 µm) e as lâminas provenientes coradas com hematoxilina-eosina, analisadas em fotomicroscópio de luz Zeiss® AxioPhot (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha).

Para a análise quantitativa as variáveis analisadas foram: para os ovários, foi selecionado apenas o oócito mais basal entre os folículos ovarianos de cada órgão, sendo tomadas medidas de comprimento e largura (µm), e calculada a área superficial (A, mm²), através da fórmula:

$$A = \frac{2\pi b \left(b + a \frac{\arcsen e}{e} \right)}{1000000}$$

Onde: *a* é o semi-eixo do comprimento do ovariolo; *b* é o semi-eixo de sua largura; e *e* é a excentricidade da elipse, dada pela fórmula:

$$e = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}}$$

Também foi feito o cálculo do volume do oócito basal (V , mm^3), através da fórmula do esferóide prolato (LUMBRERAS et al., 1991), conforme a seguinte equação:

$$V = \frac{\frac{4}{3}\pi b^2 a}{1000000000}$$

Para os testículos, o padrão de desenvolvimento e possíveis alterações em função da ação de piriproxifem foram avaliadas através de alterações externas e internas; para observar mudanças ortogonais na forma do testículo, uma análise generalizada de Procrustes (GPA) foi realizada com base nas imagens das cápsulas testiculares, através da demarcação de 100 marcos morfométricos no perímetro de cada órgão, digitalizados através do software tpsDig2 v. 2.31 (ROHLF, 2017), e a imagem média estimada dos órgãos foi gerada com auxílio do software tpsSuper v. 2.05 (ROHLF, 2018). Adicionalmente, para avaliação de alterações internas, a área aparente de núcleos de células acessórias testiculares (CATs) foi medida com auxílio do software ImageJ, conforme descrito por Cremonez et al. (2019).

4.2.4 Análise Estatística

No bioensaio de fertilidade e fecundidade de casais, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento, sendo um casal por repetição ($n = 48$).

Os dados quantitativos foram submetidos à análise de normalidade de Shapiro-Wilk e/ou análise de resíduos (FERNANDEZ, 1992) para validação da análise de variância (ANAVA) como teste estatístico mais adequado para comparação. Na ocorrência de nulidades, os valores da variável foram transformados em $\sqrt{x+1}$. O processamento de dados foi realizado com o auxílio do software R v. 3.6.2 (R CORE TEAM, 2020).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análise De Parâmetros Biológicos

Os valores de fertilidade e fecundidade são representados pelo número médio de ovos por fêmea e média de ninfas eclodidas, respectivamente. A partir da análise de variância,

não foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos avaliados em fertilidade [$F_{(3, 28)} = 1,782$, p-valor = 0,1839] e fecundidade [$F_{(3, 28)} = 2,279$, p-valor = 0,1012] (Tabela 4.1).

Os dados totais mostram uma diminuição discreta de fertilidade e fecundidade quando apenas o macho foi tratado. Contudo, é possível observar maior redução destes parâmetros nos tratamentos com fêmeas tratadas. Adicionalmente, a taxa de eclosão é mais afetada quando ambos insetos foram tratados, sendo que menos em 70% de ovos não eclodiram ninfas.

Tabela 4.1 Parâmetros reprodutivos de casais de *Euschistus heros* tratados e não tratados com concentração subletal de piriproxifem

Tratamento	Fertilidade (Ovos por fêmea)	Fecundidade (Ninfas eclodidas)	Total de ovos	Total de ninfas	Eclosão (%)	Proporção relativa ao controle (%)	
	($X \pm EP$) ^{ns}	($X \pm EP$) ^{ns}	(n)	(n)		Fertilidade	Fecundidade
FC x MC	24,8 ± 2,9	23,3 ± 2,6	198	186	94,6	-	-
FC x MP	24,1 ± 4,7	20,4 ± 4,3	193	163	83,5	97,5	87,6
FP x MC	13,1 ± 3,8	10,9 ± 3,5	105	87	85,6	53,0	46,8
FP x MP	16,9 ± 5,4	12,9 ± 4,9	135	103	66,2	68,2	55,4

Nota: X = média; EP = erro padrão da média; FC x MC = casal controle = fêmea controle e macho controle; FC x MP = fêmea controle e macho tratado; FP x MC = fêmea tratada e macho controle; FP x MP = fêmea tratada e macho tratado; ns = diferença não significativa (análise de variância). n = 8 casais por tratamento.

4.3.2 Análise Dos Órgãos Reprodutivos

4.3.2.1 Sistema reprodutor feminino

Em *E. heros*, foi possível observar ovariolos distintos e suas estruturas em fêmeas adultas através da abertura ventral do abdômen (Figura 4.1A e B). Apesar de não fecundadas, o processo de oogênese foi completo independente do tratamento, i. e., foi possível observar posturas de fêmeas mais velhas (10 e 15 DAE), independente do tratamento.

Em fêmeas recém-emergidas (0 DAE) do tratamento controle, os oócitos observados dependem completamente dos substratos oriundos das células nutridoras, isto é, não são guarnecidos pelo aporte de material nutritivo via folículo (Figura 4.1C). Entretanto, ovariolos de fêmeas 0 DAE tratadas com piriproxifem já apresentam oócitos pré-vitelogênicos, evidenciado pela presença de vitelogenina na região periférica do ooplasma (Figura 4.1D).

As células nutridoras são claramente visíveis em fêmeas 0 DAE, do tratamento controle, sendo indistinguíveis a partir deste momento nos tempos avaliados. Em relação aos tratamentos, é possível observar uma diferença estrutural entre fêmeas tratadas com piriproxifem, observando-se um arranjo celular mais espaçado na região do germário em relação a fêmeas do tratamento controle (Figura 4.2).

A partir dos 5 DAE, as diferenças morfológicas estruturais são menos evidentes em relação ao tratamento com inseticida. Fêmeas com 5 DAE apresentam oócitos a partir do estágio pré-vitelogênico, caracterizado pela presença de grânulos não corados no oócito (Figura 4.3A), e oócitos vitelogênicos, em que é possível observar intensa maturação do vitelo (Figura 4.3B). Aos 10 e 15 DAE, é possível observar a oogênese em todos os folículos dos ovários em diferentes estágios de desenvolvimento. Nos oócitos do vitelário, as células do epitélio folicular se tornam altamente funcionais, com intensa atividade de síntese proteica (Figura 4.3C) e gradualmente passam a se tornar células binucleadas (Figura 4.3D). Neste período, os oócitos basais são bem desenvolvidos e coriogênicos (Fig. 4.3E), e fêmeas com essa idade já ovipositam naturalmente e sem necessidade de fecundação, entretanto, gerando ovos inférteis.

Características quantitativas da oogênese foram comparadas com base no desenvolvimento morfométrico do oócito mais basal. A partir das variáveis morfométricas analisadas (comprimento, largura, área superficial e volume), existe diferença significativa entre fêmeas tratadas e não tratadas recém-emergidas (Tabela 4.2). Independente do tratamento, um padrão de desenvolvimento foi observado; oócitos de fêmeas recém-emergidas apresentam menores proporções em relação aos demais tempos de desenvolvimento, e uma expressiva diferença também foi observada nas fêmeas entre 5 e 15 DAE, sendo que oócitos aos 10 DAE apresentam valores intermediários.

Em relação à espessura do epitélio folicular na região do oócito basal, fêmeas recém-emergidas não tratadas apresentam uma média de espessura de 41,1 μm , reduzindo em torno de 20% a cada cinco dias, se estabilizando aos 15 DAE. Entretanto, fêmeas recém-emergidas tratadas com piriproxifem apresentam redução de espessura comparadas ao tratamento controle. Esta redução na espessura se mantém constante até o final da avaliação, sendo então similar a fêmeas não tratadas (Figura 4.4). Com o crescimento e desenvolvimento, naturalmente a espessura do folículo é inversamente proporcional à medida de área do oócito (Figura 4.5).

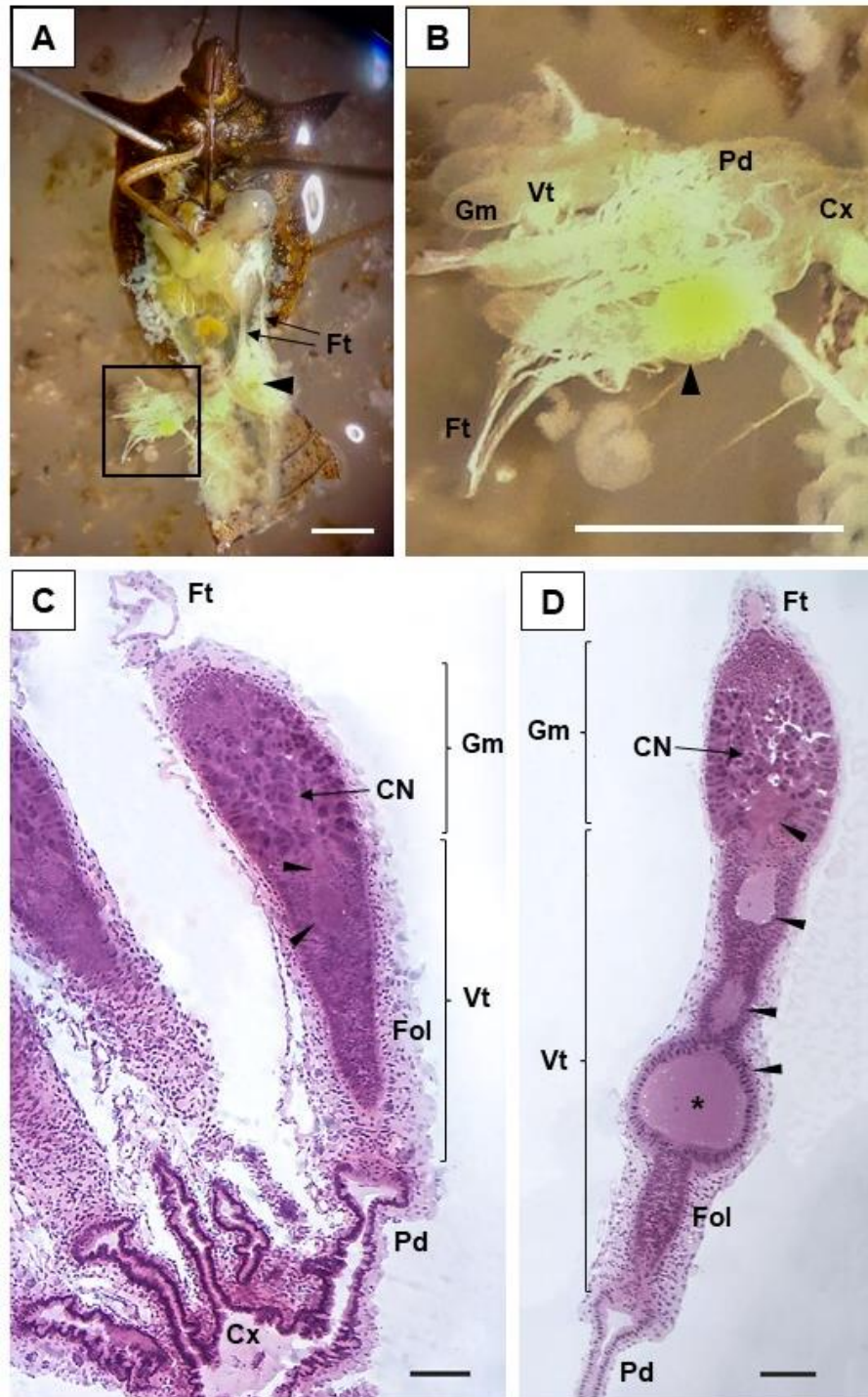


Figura 4.1 – Ovariolos de fêmeas recém-emergidas (0 DAE) de *Euschistus heros* tratadas com concentração subletal de piriproxifem. A) Fêmea tratada com piriproxifem com ovários expostos; B) Detalhe ampliado do ovário evidenciando as principais estruturas; C) fotomicrografia de ovariolos de fêmea do tratamento controle; D) fotomicrografia de ovariolos de fêmea tratada com piriproxifem. Ft: filamentos terminais; Gm: germário; CN: células nutritoras; Vt: vitelário; Fol: folículo ovariano; Pd: pedicelo; Cx: cálice; ►: oócito.; *: oócito pré-vitelogênico. c-d: Coloração por hematoxilina e eosina. Barras: a-b = 1 mm; c-d = 100 μ m.

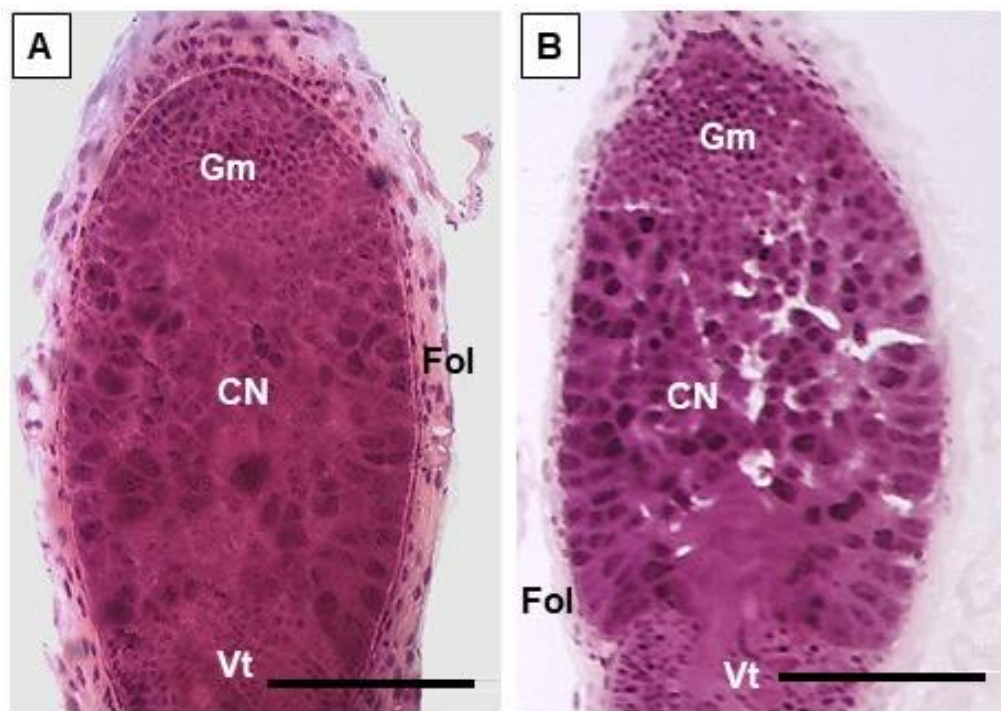


Figura 4.2 –Fotomicrografias da região de crescimento em ovariolos de fêmeas recém-emergidas (0 DAE) de *Euschistus heros* tratadas com concentração subletal de piriproxifen. A) corte longitudinal da região do germário em ovariolo de fêmea do tratamento controle; B) corte longitudinal do germário em ovariolo de fêmeas tratadas com piriproxifen. Gm: germário; CN: células nutridoras;Fol: foliculo ovariano; Vt: vitelário. Coloração por hematoxilina e eosina. Barras = 100 µm.

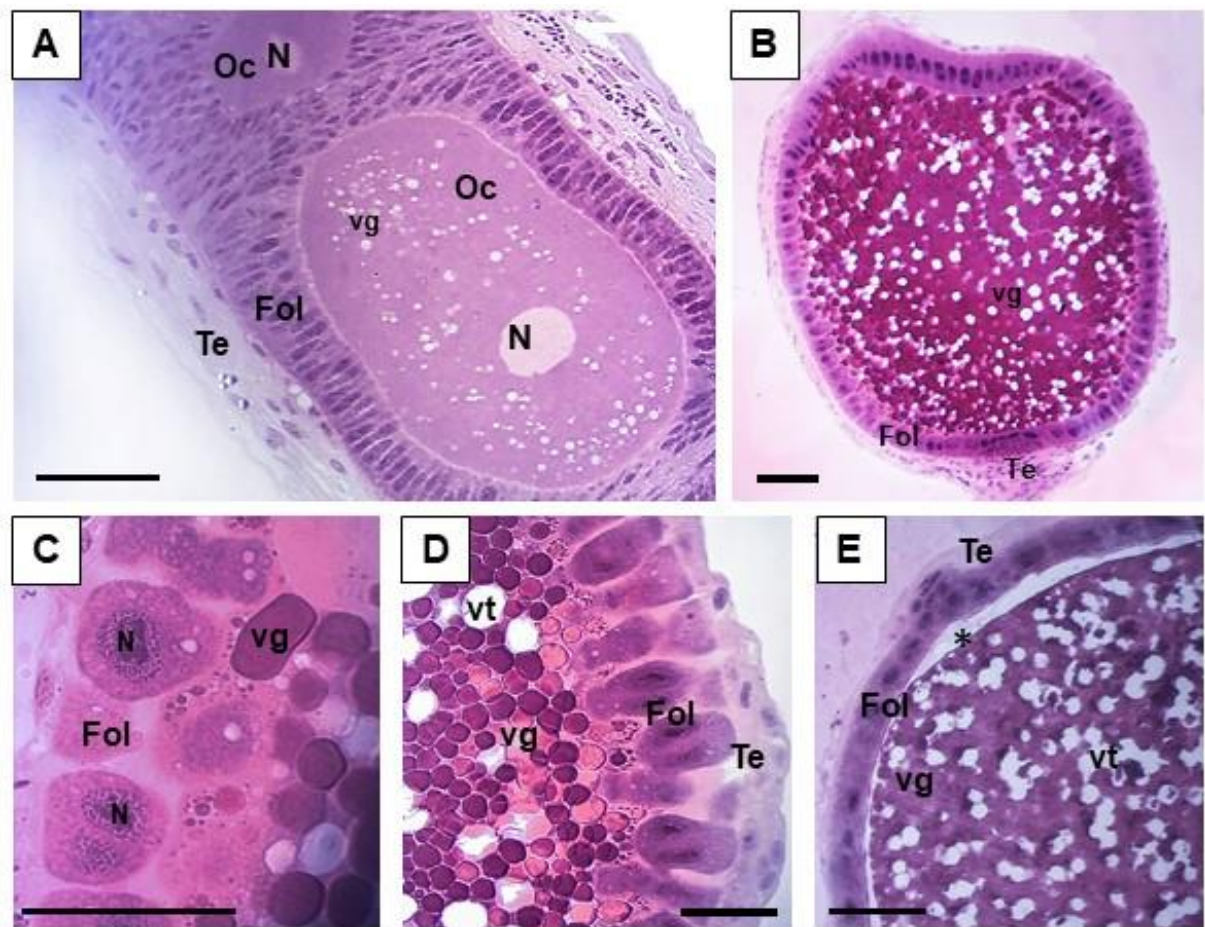


Figura 4.3 –Fotomicrografias de oócitos basais em diferentes estágios de desenvolvimento de fêmeas *Euschistus heros* tratadas com concentração subletal de piriproxifen. A) oócito pré-vitelogênico em fêmea controle (5 DAE); B) oócito vitelogênico em fêmea controle (10 DAE); C) detalhe de células do folículo em fêmeas tratadas (5 DAE). Notar núcleo (N) com grumos de cromatina indicando processo de síntese protéica; D) detalhe da região do folículo com células binucleadas de fêmeas controle (10 DAE); E) oócito em estágio de coriogênese completa em fêmeas controle (15 DAE). Oc: oócito; N: núcleo; Te: túnica externa; Fol: epitélio folicular; vg: vitelogenina; vt: vitelo maduro; *: espaço perioocítico. Coloração por hematoxilina e eosina. Barras: a-b = 100 μ m; c-e = 50 μ m.

Tabela 4.2 – Análise morfométrica de parâmetros métricos (média \pm DP) de oócitos basais de *Euschistus heros* tratados com concentração subletal de piriproxifem

Idade adulta (dias)	Parâmetro métrico	Controle (água destilada)	Piriproxifem CL ³⁰ (0,688 mL i. a. L ⁻¹)	<i>p</i> -valor ¹
0	Comprimento ($\mu\text{m} \pm \text{DP}$)	78.31 \pm 21.83	177.87 \pm 134.24	0,0006*
	Largura ($\mu\text{m} \pm \text{DP}$)	61.85 \pm 18.93	129.04 \pm 93.46	0,0004*
	Área superficial ($\mu\text{m}^2 \pm \text{DP}$)	0.0153 \pm 0.0080	0.0985 \pm 0.1965	0,0004*
	Volume ($\mu\text{m}^3 \pm \text{DP}$)	0.0002 \pm 0.0001	0.0054 \pm 0.0165	0,0009*
5	Comprimento	498.14 \pm 194.69	343.52 \pm 143.11	0,0560 ^{ns}
	Largura	382.18 \pm 144.69	276.82 \pm 152.67	0,1284 ^{ns}
	Área superficial	0.6253 \pm 0.4043	0.3426 \pm 0.3249	0,0971 ^{ns}
	Volume	0.0522 \pm 0.0464	0.0242 \pm 0.0320	0,1203 ^{ns}
10	Comprimento	559.24 \pm 242.96	517.92 \pm 193.98	0,6219 ^{ns}
	Largura	464.84 \pm 187.95	344.05 \pm 95.24	0,0600 ^{ns}
	Área superficial	0.8937 \pm 0.6940	0.5344 \pm 0.2671	0,1145 ^{ns}
	Volume	0.0943 \pm 0.1001	0.0382 \pm 0.0282	0,0785 ^{ns}
15	Comprimento	594.95 \pm 95.30	664.82 \pm 153.18	0,1820 ^{ns}
	Largura	473.50 \pm 94.05	552.69 \pm 184.22	0,1998 ^{ns}
	Área superficial	0.8467 \pm 0.3064	1.1767 \pm 0.6664	0,1243 ^{ns}
	Volume	0.0751 \pm 0.0448	0.1320 \pm 0.1089	0,0963 ^{ns}

Nota:¹teste t de Student: * = diferença significativa; ns = diferença não significativa. DP = desvio padrão. n = 56

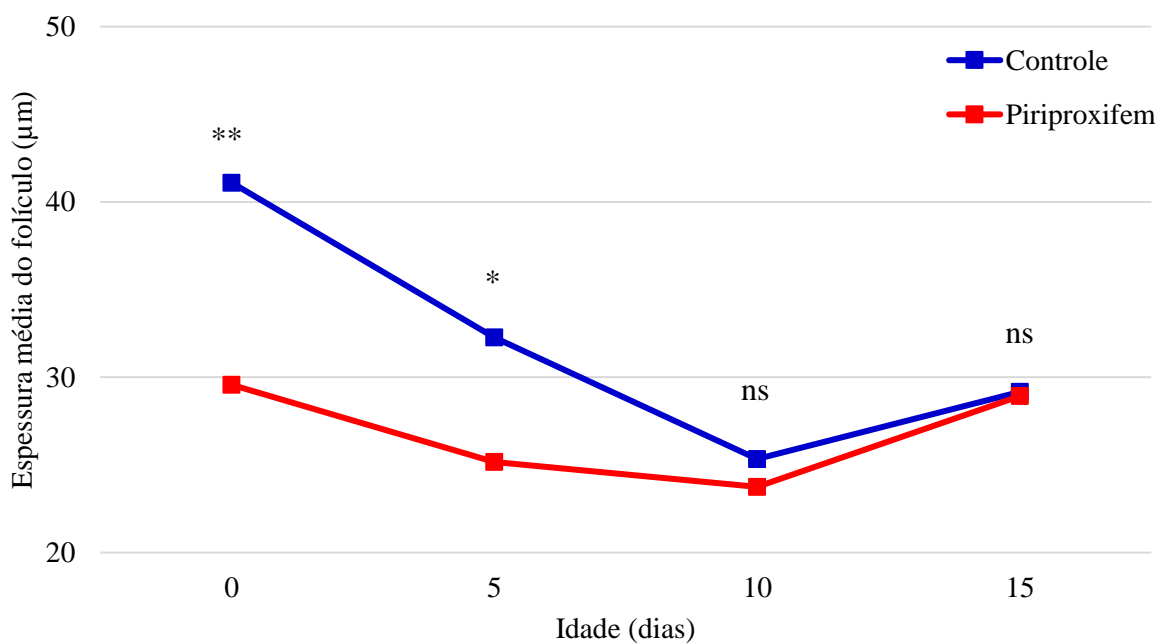


Figura 4.4 – Espessura de epitélio folicular em ovariolos de *Euschistus heros* tratados com concentração subletal de piriproxifem. Diferenças entre tratamentos pelo teste não-

paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney: ns = não-significativo; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.
n = 288.

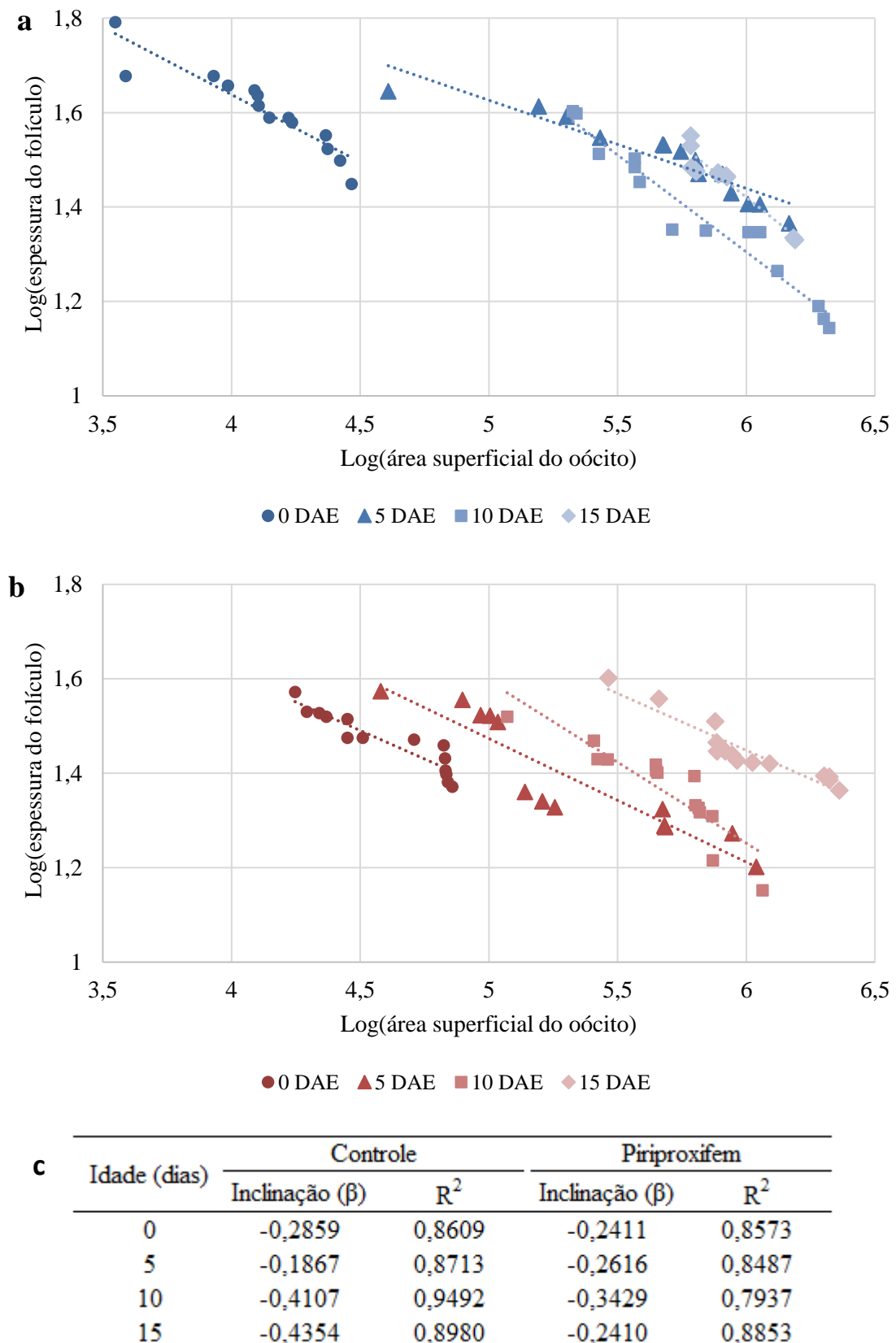


Figura 4.5 – Correlação entre medida de área superficial do oócito basal e espessura do epitélio folicular em fêmeas *Euschistus heros* tratadas com piriproxifem. a) correlação em

fêmeas controle; b) correlação em fêmeas tratadas; c) tabela com valores de inclinação e relação entre os tratamentos. n = 56 medidas de área de oócito; 288 medidas de folículo epitelial.

4.3.2.2 Sistema reprodutor masculino

Os testículos de *E. heros* são pareados, sendo formados por seis folículos cada, numerados F1-F6. Todos os folículos seguem a mesma configuração espermatogênica descrita na literatura (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013), sendo formados, da região apical para a basal, de um germário, pela zona de crescimento com os cistos de espermatogônias e espermatócitos, seguida pela zona de maturação ou redução, onde várias divisões meióticas darão origem aos cistos de espermátides, e finalmente a zona de transformação, onde ocorre o processo de espermição, i. e., transformação de espermátide em espermatozoide.

O padrão de desenvolvimento observado através de análise generalizada de Procrustes (GPA) foi o de um testículo inicialmente oval (esferóide prolato) em machos recém-emergidos (0 DAE), e ao longo do período de desenvolvimento avaliado foi possível observar mudanças no formato inicial caracterizadas por uma hipertrofia desproporcional da região apical, especificamente na zona de crescimento, i. e., cistos de espermatogônias e espermatócitos, passando para uma forma final obpiriforme (Figura 4.6).

Em relação à função, os folículos dão origem a dois tipos morfológicamente distintos de células de linhagem germinativa, sendo possível observar cistos menores nos folículos F1, F2, F3 e F5, e um tipo de cisto com células maiores e de conformação mais alongada nos folículos F4 e F6 (Figura 4.7A).

Ao longo do folículo, é possível observar todas as fases do processo espermatogênico, conforme descrito por Chapman, Simpson e Douglas (2013): inicia-se com o germário, local onde ocorre a diferenciação das células somáticas e germinativas, estas sendo denominadas espermatogônias, que passam pela zona de crescimento e se transformam em espermatócitos (Figura 4.7B e C). Na zona de divisão e maturação, as espermatogônias passam pelo processo de meiose e começa a se diferenciar nas espermátides, sendo todo o processo sequencial compartimentado em cistos com núcleos de células somáticas acessórias testiculares (CATs) aderidas à estrutura dos septos de tecido conjuntivo (também conhecidos como túnica interna) (Figuras 4.7A,B e C). Estas células são homólogas às células de Sertoli em organismos vertebrados (GURAYA, 1995) Na sequência, inicia-se a fase de

transformação da espermatíde (Figuras 4.7C, D e E), que dá início ao processo de espermiogênese, resultando na obtenção de cistos de espermatozóides (Figura 4.7E).

Os padrões morfológicos da estrutura dos septos são variáveis, sendo possível observar, de uma forma geral, uma maior espessura e células estruturais diferenciadas em insetos adultos mais velhos (Figura 4.7G). Em insetos com 10 DAE, também foi possível observar um estreitamento desse tecido na região de spermatogônias após exposição com piriproxifem (Figura 4.7H).

Devido a sua conformação tridimensional irregular, não é possível definir claramente a extensão das CATs no plano de corte histológico. Entretanto, é possível observar claramente os núcleos destas células, aderidos a parede do tecido conjuntivo interno, sendo presentes nas zonas de crescimento e remanescentes na zona de maturação. Estas células não se alteram em número, e em média a área nuclear aparente flutua entre 50000 e 55000 μm^2 . É possível observar uma redução significativa da extensão nuclear após a ação de piriproxifem em testículos de 10 ($t = 2,481$; $p\text{-valor} = 0,019$) e 15 DAE ($t = 2,458$, $p\text{-valor} = 0,020$) (Figura 4.8).

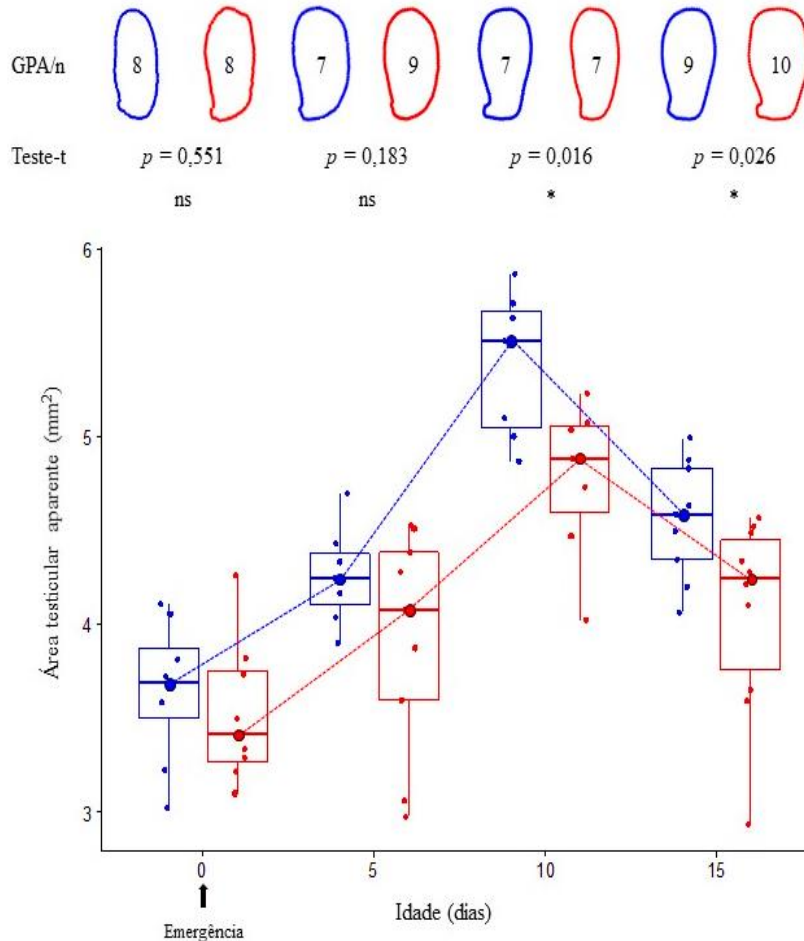


Figura 4.6 – Análise morfométrica geométrica e área testicular de *Euschistus heros* tratados com concentração subletal de piriproxifem. GPA = análise generalizada de Procrustes; n = número amostral; ns = não significativo; * = significativo a $p \leq 0,05$.

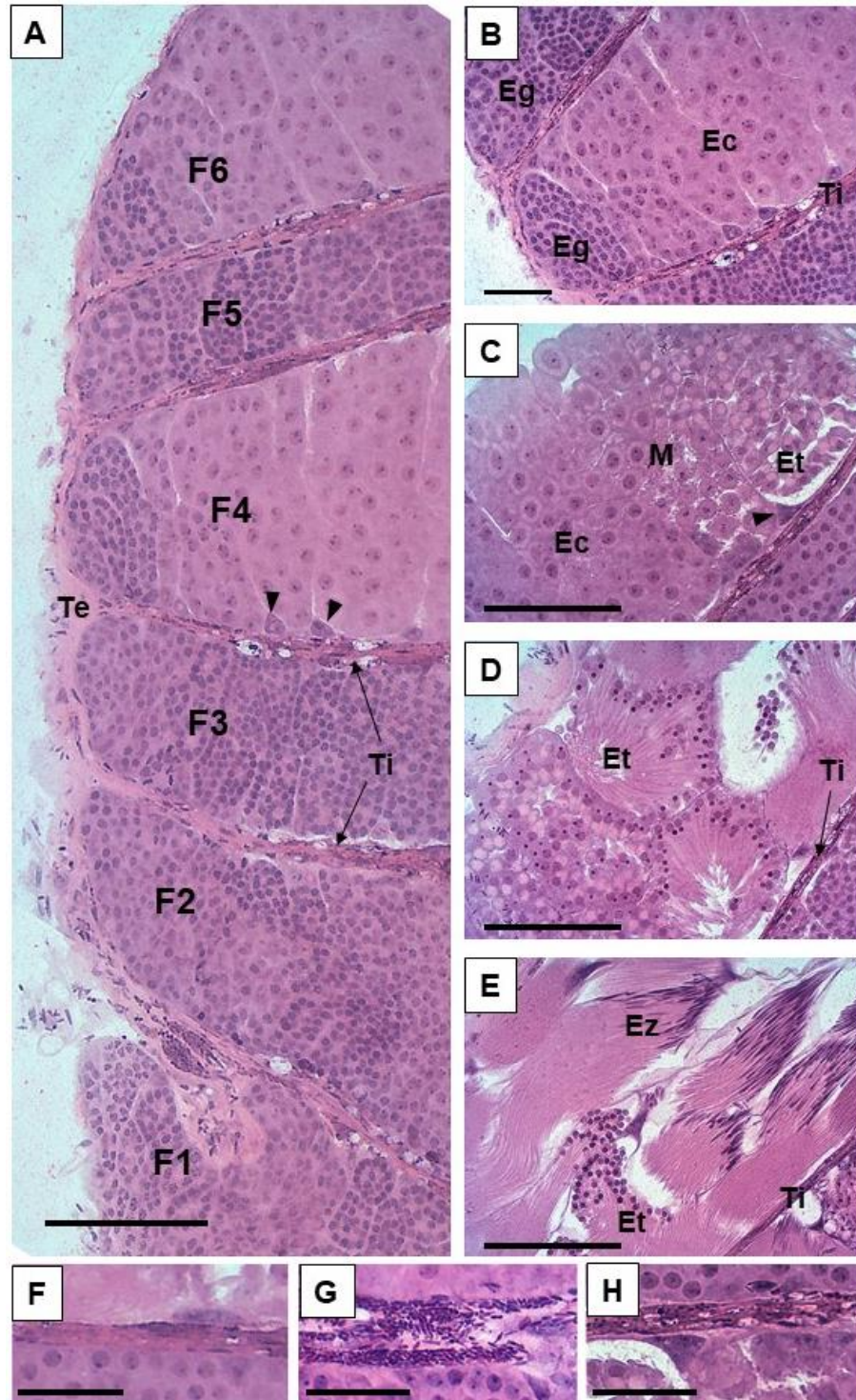


Figura 4.7 –Fotomicrografias de espermatogênese em testículo de *Euschistus heros*. A) porção apical do testículo, com a demarcação dos seis folículos (F1-F6); B) detalhe da zona de crescimento; C) detalhe da zona de maturação e redução, notar região de divisão meiótica (M); D) detalhe para a zona de transformação; E) detalhe para a espermiogênese; F) detalhe dos septos de tecido conjuntivo(Ti) em insetos controle recém-emergido; G) Ti em inseto

controle com 10 dias de idade adulta; H) Ti em inseto tratado com piriproxifem com 10 dias de idade adulta. Eg = espermatogônias; Ec = espermatócitos; Et = espermátides; Ez = espermatozóides; Te = túnica externa; Ti = septo de tecido conjuntivo; ► = núcleo de célula acessória testicular. Coloração por hematoxilina e eosina. Barras = 50 μm .

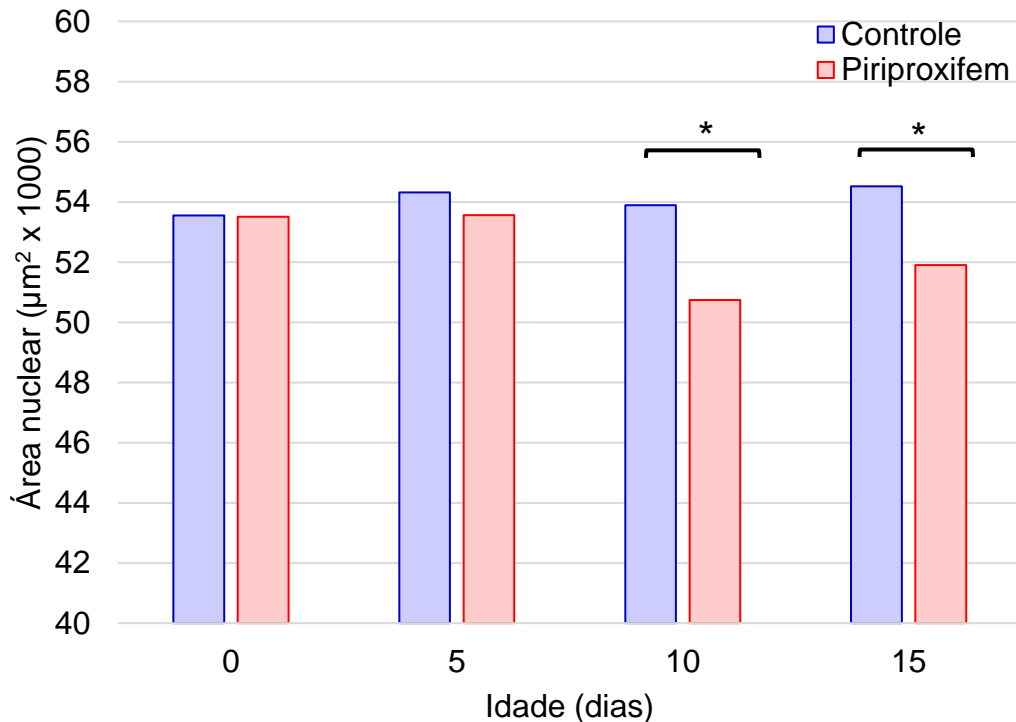


Figura 4.8 – Área nuclear de células acessórias testiculares de *Euschistus heros* tratados com concentração subletal de piriproxifem. * = diferença significativa a $p \leq 0,05$, teste-t não-pareado. $n = 240$.

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Fecundidade E Fertilidade

O elevado coeficiente de variação observado em todos os parâmetros de análise de fertilidade e fecundidade de *E. heros* ocorreu especialmente pela diferença natural no número de posturas observada dentro de cada tratamento, o que conseqüentemente corresponde a uma variação no número de ninfas eclodidas. Entretanto, considerando a proporção relativa, ocorreu alterações nos parâmetros reprodutivos em casais em que ao menos um indivíduo foi tratado com piriproxifem. A maior diminuição de fertilidade e fecundidade ocorreu quando a fêmea foi exposta ao tratamento piriproxifem.

Os efeitos de piriproxifem sobre os parâmetros reprodutivos de *E. heros* pode ter ocorrido devido a um desequilíbrio na homeostase de HJ e outros hormônios relacionados. De

um modo geral, fêmeas de insetos apresentam padrões regulatórios dependentes de componentes hormonais. Muitas, por exemplo, são sensíveis ao precursor de HJ, farnesol, que possui estrutura química bastante similar a piriproxifem, i. e., sesquiterpenóide, com modo de ação similar ao próprio HJ (DE LOOF, 2014; DE LOOF; SCHOOFS, 2019). Além disso, sabe-se que piriproxifem possui um efeito negativo sobre parâmetros reprodutivos (fecundidade, fertilidade e viabilidade de ninfas eclodidas) em fêmeas do percevejo *Nezaraviridula* (AGÜERO; NEVES; CREMONEZ, 2014), bem como diminuição de fecundidade e fertilidade em *E. heros* em soja a campo com doses recomendadas para controle de *Bemisiatabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) (MATSUMOTO, 2020). As interações são basicamente similares, sendo que o sítio de ação de HJ, assim como seus precursores e análogos, são os receptores intracelulares tipo bHLH-PAS (do inglês, *basic Helix-Loop-Helix/Per-ARNT-SIM*), como Met e Gce (CHARLES et al., 2011; JINDRA et al., 2015).

A atividade de piriproxifem, aplicado em ninfas grandes de *E. heros*, sobre a redução de parâmetros reprodutivos dos adultos pode representar implicações econômicas, uma vez que existem relatos da infestação destes percevejos em períodos vegetativos da cultura da soja (BARCELOS et al., 2019), momento onde o controle de lagartas-praga também se faz necessário. De fato, os percevejos permanecem em plantas hospedeiras adjacentes no período de diapausa (CORREA-FERREIRA; PANIZZI, 1999), fisiologicamente preparados para a dispersão no momento em que a cultura começa a se desenvolver. Deste modo, o manejo com piriproxifem é promissor para suprimir populações infestantes de percevejos no período de infestação, e a antecipação da aplicação deve ser analisada com o propósito de avaliar a eficiência na integração do controle de percevejos e lagartas.

4.4.2 Sistema Reprodutor Feminino

Piriproxifem indica uma alteração no padrão de distribuição morfológica na região das células nutridoras em fêmeas de *E. heros*. Resultado similar foi observado com outras espécies de insetos, como em *Monomorium pharaonis* L. (Hymenoptera: Formicidae) (TAY; LEE, 2014), *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) (CREMONEZ et al., 2017), e em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (AHMED et al., 2020). Isto ocorre pois o HJ é requerido em diferentes proporções em relação às células somáticas e germinativas do germário, e, portanto, um gradiente padrão é necessário para a correta organização e estrutura

do ovário (LUO et al., 2020). Por fim, as consequências do desequilíbrio hormonal podem ter efeitos negativos sobre a reprodução (KAUR; CHANDI, 2016).

Em termos reprodutivos, a fisiologia do processo de oogênese é um dos fatores que explicam os efeitos negativos de piriproxifem sobre *E. heros*. A oogênese representa o processo completo que vai desde o desenvolvimento do oócito até a postura. Em Pentatomidae, fêmeas podem ovipositar mesmo sem cópula (CINGOLANI et al., 2019), sendo um processo que requer uma grande quantidade de energia. A falta de alimento, no entanto, pode levar ao processo de reabsorção dos oócitos em desenvolvimento (KOTAKI et al., 2016). As condições ideais de criação e alimento *ad libitum* são fatores que podem ter contribuído para a oviposição das fêmeas virgens de *E. heros*.

Os padrões de desenvolvimento dos oócitos de *E. heros* são similares aos relatados em outros Heteroptera (DITTMANN; MAIER, 1986; ASSIS et al., 2019). Em *E. heros*, os oócitos são vitelogênicos a partir de 5 DAE, onde foi possível observar células foliculares binucleadas e com nucléolo bem evidente nos oócitos basais. Resultado similar foi observado em ovários de *Podisusnigrispinus* Say (Hemiptera: Pentatomidae) (ASSIS et al., 2019). Entretanto, em fêmeas expostas a piriproxifem em N4, os oócitos vitelogênicos foram observados em várias fêmeas recém-emergidas (0 DAE), possivelmente pela atividade análoga à do HJ sobre a incorporação da vitelogenina, especialmente em uma dose regulada como a CL₃₀ (EDWARDS; BRAUN; WYATT, 1993),

A incorporação de vitelogenina pelo oócito é dependente da atividade do folículo, que possui uma determinada permeabilidade e faz o aporte desta proteína pela hemolinfa. Similar em *E. heros*, o processo é evidente aos 5 DAE em oócitos de baratas *Nauphoetacineera* Burmeister (Blattodea: Blaberidae) (BUHLMANN, 1976). Entretanto, as próprias células foliculares de *E. heros* apresentam padrões de síntese protéica, também observado em *P. nigrispinus* (ASSIS et al., 2019). Isto também explica a redução da espessura deste tecido ao redor do oócito conforme ocorre o desenvolvimento do oócito, assim como também é a razão por qual insetos tratados com piriproxifem no começo da vida adulta apresentam folículos mais finos, uma vez que a vitelogênese é antecipada pela atividade do inseticida.

Assumindo papel central sobre a intermediação hormonal da reprodução, o hormônio juvenil (HJ) é responsável por uma série de processos. Diversos modelos são utilizados para

entender a importância de HJ sobre a reprodução dos insetos (SANTOS; HUMANN; HARTFELDER, 2019). De uma forma geral, existem receptores centrais que são ativados pelo hormônio e desencadeiam uma série de reações em cascata, e, através da ativação de genes e interações com outros hormônios e neuropeptídeos, finalmente agem sobre a síntese, acúmulo e maturação de lipídios e vitelina, importantes para a oogênese.

Através da interação com os mesmos receptores (JINDRA et al., 2015), piriproxifem possui uma atividade primária sobre a reprodução (EDWARDS; BRAUN; WYATT, 1993). Contudo, de um modo geral, enzimas responsáveis por finalizar a ação de HJ, como HJ esterase e HJ epóxi-hidrolase, apesar de estimuladas por agonistas de HJ (EL-SHEIKH; KAMITA; HAMMOCK, 2016), não afetam sua atividade (ZHANG; KASAI; SHONO, 1998).

Os efeitos de piriproxifem sobre a vitelogenina são amplamente documentados. Ao passo que o produto age como análogo de HJ, existe uma expressão positiva entre a aplicação de piriproxifem e síntese de vitelogenina (EDWARDS; BRAUN; WYATT, 1993). Entretanto, altas doses de piriproxifem inibem a vitelogênese em diferentes etapas, desde a própria síntese (PINTO; BITONDI; SIMÕES, 2000), no desbalanço hormonal, especialmente em insetos com vitelogênese dependente de ecdisteróide (BARCHUK; BITONDI; SIMÕES, 2002), até o processo de incorporação de vitelogenina ao ooplasma, principalmente devido a alterações estruturais no sistema reprodutor (XU et al., 2015).

A atividade de HJ sobre a reprodução também depende em grande parte da espécie estudada, principalmente em relação ao seu ciclo de vida. Em Pentatomidae, a regulação hormonal por HJ intermedia processos importantes, como a produção de componentes de feromônios na correta proporção (MORAES et al., 2008), diapausa (PENCA; HODGES, 2017) e realocação de recursos e absorção de oócitos em desenvolvimento (KOTAKI et al., 2016).

O HJ também desempenha papel importante na funcionalidade da estrutura folicular ovariana. Os efeitos da aplicação de HJ pode influenciar essa estrutura a produzir mais proteína, e também é relatado que os níveis naturais deste hormônio aumentam consideravelmente durante a vitelogênese (DITTMANN; MAIER, 1986). Em *Nilaparvatalugens*(Stål) (Hemiptera: Delphacidae), HJ é essencial para a expressão de vitelogenina, maturação dos oócitos e fecundidade (LU et al., 2016). Entretanto, a

funcionalidade de HJ pode ser afetada pela exposição com piriproxifem, sendo que os níveis de ação do hormônio são normalmente regulados pelo metabolismo, contudo, o inseticida permanece em atividade. As implicações da ação de piriproxifem sobre fêmeas de *E. heros* indica que o inseticida afeta parâmetros reprodutivos associados a funcionalidade do sistema reprodutor.

4.4.3 Sistema Reprodutor Masculino

A análise morfométrica dos testículos de *E. heros* demonstra um padrão de desenvolvimento peculiar. Mourão e Panizzi (2002) descreveram esquematicamente um padrão morfológico similar ao analisar o desenvolvimento de testículo de *E. heros*. Os autores apresentam dois graus de desenvolvimento: imaturos, com pequenas gônadas em um padrão oblongo, com maior razão comprimento:largura; e maduros, grandes com um padrão elipsóide prolatado e folículos bem demarcados.

O desenvolvimento padrão da espermatogênese em insetos ocorre da região apical para a basal, em direção ao vaso deferente, sendo que as células da linhagem germinativa são caracteristicamente arranjadas em cistos (ROOSE-RUNGE, 1977). Em *E. heros*, os tipos distintos de folículos testiculares foram analisados em uma série de trabalhos (SOUZA; ITOYAMA, 2010; AGUIAR et al., 2017; CREMONEZ et al., 2019), bem como seu característico polimorfismo espermático (COSSOLIN, 2015). Morfologicamente, é possível distinguir três tipos de espermatozoides, sendo o *tipo 1* mais comum nos folículos da metade mais proximal (F1-F3); o espermatozóide *tipo 2*, morfometricamente similar ao *tipo 1*, que é produzido no característico estreito F5; e o espermatozóide *tipo 3*, produzido nos folículos F4 e F6, naturalmente mais volumosos e com comprimento até 4x maior que os demais. No presente estudo, foi possível observar uma hipertrofia da região da zona de desenvolvimento, principalmente devido a maior área de espermatogônias dos folículos F4 e F6, e que, ao longo do tempo, confere o padrão obpiriforme ao testículo.

A ação de piriproxifem sobre a morfometria do órgão sexual masculino de *E. heros* é estrutural, e conseqüentemente pode afetar a sua funcionalidade. Sabe-se que o piriproxifem atua sobre o desenvolvimento e a estrutura interna da cápsula testicular em Pentatomidae: a ação de piriproxifem CL₃₀ causou desestruturação e presença de material indicativo de morte celular em cistos de espermatozoides em *Dichelops melacanthus*, porém nenhuma alteração pode ser observada nos núcleos de células acessórias testiculares (CATs) (CREMONEZ et al.,

2017). Fragmentos de testículo de *Oryctesrhinoceros* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) incubados *invitro* dependem da atividade de ecdisteroides e a presença do tecido interno dos folículos para completar os processos de divisão celular das células da linhagem espermatogênica (JACOB, 1992). No mesmo estudo, o autor teorizou que uma atividade parácrina putativa do tecido influenciava o desenvolvimento das células. Entretanto, esta ação tem relação com a presença das CATs no tecido conjuntivo testicular.

Alterações morfométricas em núcleos de CATs foram observadas após aplicação de IDCs da classe dos inibidores da biossíntese de quitina (IBQs), buprofezina e lufenurom, em testículos de *E. heros* machos com 5 DAE (CREMONEZ et al., 2019). Os IBQs atuam sobre o transporte vesicular intracelular que impede a atividade da enzima quitina sintetase (MATSUMURA, 2010), um mecanismo diferente da ação de piriproxifem, que por sua vez desencadeia uma cascata de reações ao se ligar e modular receptores de HJ em um modo de ação primário (JINDRA et al., 2015). Entretanto, a ação de piriproxifem produz uma reação generalizada em relação ao desenvolvimento estrutural, especialmente levando em conta a atividade de HJ sobre a maturação de desenvolvimento do próprio sistema reprodutor.

Apesar da enorme quantidade de trabalhos sobre a ação de HJ sobre a reprodução de fêmeas, o entendimento sobre este hormônio em machos ainda é muito pouco documentado. Grande parte dos estudos estão associados com a atividade hormonal nas glândulas acessórias, contudo, a sua principal função é associada ao estímulo da reprodução de fêmeas durante a cópula (PARTHASARATHY et al., 2009). Entretanto, sabe-se que HJ intermedia relações morfológicas indiretas entre diferentes tratos e sistemas fisiológicos com o desenvolvimento sexual masculino em determinadas espécies de insetos (FRY, 2006; FLATT; KAWECKI, 2007; CONTRERAS-GARDUÑO et al., 2011). Adicionalmente, sabe-se que a ingestão de metopreno, um análogo de HJ, promove um desenvolvimento mais rápido de testículos em *Bactroceratryoni* Froggatt (Diptera: Tephritidae) (ADNAN; PÉREZ-STAPLES; TAYLOR, 2020). Neste sentido, as alterações observadas na estrutura e desenvolvimento da cápsula testicular e nos núcleos de CATs de *E. heros* após a exposição com piriproxifem podem estar relacionadas principalmente com os efeitos colaterais sobre o desenvolvimento.

Em Pentatomidae, o processo reprodutivo e garantia de prole é uma característica mais importante que a própria aptidão, viz. processos que levam ao surgimento de populações resistentes à xenobióticos. Apesar disto, algumas populações de *E. heros* possui uma

importante característica de resistência, especialmente a inseticidas neurotóxicos e.g. neonicotinóides. Isto ocorre principalmente devido ao surgimento de haplótipos resistentes, oriundos de duas linhagens principais na região do Brasil (SOARES et al., 2018). Contudo, é devido ao potencial reprodutivo que o inseto assume o status de praga-chave da cultura da soja. Devido a esta característica, a ação de piriproxifem sobre a estrutura do sistema reprodutor masculino de *E. heros* indica que o inseticida possui potencial para controle de populações infestantes do percevejo.

4.5 CONCLUSÕES

Em termos reprodutivos, foi possível concluir que fêmeas adultas de *E. heros* são mais sensíveis a piriproxifem em concentrações subletal aplicado em quarto instar comparado com machos. O inseticida causa alterações morfológicas e morfométricas no sistema reprodutor em ambos os sexos, principalmente sobre a estrutura ovariana, desarranjo das células nutridoras, aumento no tamanho dos oócitos basais no início do desenvolvimento sexual, acompanhados de uma diminuição na espessura do epitélio folicular em fêmeas, bem como diminuição do tamanho e na forma da cápsula testicular e diminuição na área de núcleos de células acessórias testiculares em machos.

5 ARTIGO C: VARIAÇÕES DE METABÓLITOS ENERGÉTICOS E MICRO-ELEMENTOS NA HEMOLINFA DE *EUSCHISTUS HEROS* TRATADOS COM PIRIPROXIFEM EM CONCETRAÇÃO SUBLETAL

Variation of fuel metabolites and micro-elements in the hemolymph of *Euschistusero* treated with pyriproxyfen sub-lethal dosage

Paulo S. G. CREMONEZ¹, Janaína F. MATSUMOTO¹, Avacir C. ANDRELLO², Daniela O. PINHEIRO³, Pedro M. O. J. NEVES¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina-PR, Brasil, ²Departamento de Física, UEL, Londrina-PR, Brazil. ³Departamento de Histologia, UEL, Londrina-PR, Brazil.

Correspondencia: Daniela O. Pinheiro, Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil.
Email: daniela_pinheiro@uel.br

RESUMO

Euschistus heros é uma praga de grande importância em muitas lavouras no Brasil, e diferentes estratégias de controle, principalmente envolvendo produtos químicos, são atualmente avaliadas; contudo, os efeitos secundários destes produtos químicos sobre o equilíbrio dos níveis de elementos inorgânicos na hemolinfa ainda são pouco estudados. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram determinar níveis de lipídios e carboidratos, bem como de três microelementos, Ni, Cu e Zn, na hemolinfa de *E. heros* adultos, após aplicação de piriproxifem sobre ninfas de 4º instar. Para isto, a hemolinfa foi coletada com capilar de vidro e níveis de lipídios e carboidratos foram analisados pela reação positiva de vanilina e antrona, respectivamente. Para análise de micro-elementos, a hemolinfa foi coletada com uma agulha ultrafina e agrupada em um tubo de 2 mL e adicionado em discos de acrílico com Ga como padrão. Os discos de amostra foram então analisados em sistema de fluorescência de raios-X por reflexão total para leitura das concentrações elementares. Lipídios são os metabólitos energéticos majoritários em *E. heros*, entretanto, a variação de carboidratos na hemolinfa é mais sensível a ação de piriproxifem, independente do sexo. Em insetos não tratados, foi possível observar diferenças nos níveis de Ni e Zn entre machos e fêmeas, mas não em concentrações de Cu. Após a exposição do inseticida, os níveis destes microelementos foram variáveis. Esta variação observada em lipídios, carboidratos e micro-elementos inorgânicos pode estar associada a maiores modificações observadas na fisiologia causadas pela atividade inseticida de piriproxifem nos estágios juvenis finais do percevejo.

Palavras-chave: Percevejo marrom-Neotropical, Substratos energéticos, Metaloenzimas, TXRF – análise de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total

ABSTRACT

Euschistus heros is a pest of great importance in many crops in Brazil, and different control strategies, mainly involving chemical products, are currently being evaluated; however, the side effects of these chemicals on the balance of levels of inorganic elements in hemolymph are still poorly studied. Thus, the objectives of this work were to determine levels of lipids and carbohydrates, as well as three microelements, Ni, Cu and Zn, in the hemolymph of *E. heros* adults, after application of pyriproxyfen on 4th instar nymphs. For this, the hemolymph was collected with glass capillaries and levels of lipids and carbohydrates were analyzed by the positive reaction of vanillin and antrone, respectively. For analysis of microelements, the hemolymph was collected with an ultrafine needle and grouped in a 2 mL tube and added to acrylic discs with Ga as standard. The sample discs were then analyzed in a Total Reflection X-Ray Fluorescence spectrometer analysis to read the elements concentrations. Lipids are the major energy metabolites in *E. heros*, however, the variation in carbohydrates in hemolymph is more sensitive to the action of pyriproxyfen, regardless of sex. In untreated insects, it was possible to observe differences in Ni and Zn levels between males and females, but not in Cu concentrations. After exposure of the insecticide, the levels of these microelements were variable. This variation observed in lipids, carbohydrates and inorganic micro-elements may be associated with greater changes observed in physiology caused by the insecticidal activity of pyriproxyfen in the final juvenile stages of the stink bug.

Keywords: Neotropical-brown stink bug, Energetic substrates, Metalloenzymes, TXRF-Total Reflection X-Ray Fluorescence analysis.

5.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das características bioquímicas de um organismo está relacionado com a concentração de elementos inorgânicos na escala ecológica, em que evoluíram e ajustaram sua adaptabilidade a esses fatores. Esse processo também permitiu que determinados indivíduos tivessem uma capacidade de regulação dos componentes que lhes são essenciais e/ou fazem parte de um meio adaptativo diferencial. Contudo, este mesmo fator lhes confere capacidade de ajuste da composição química, como nos casos de contaminação, muito comum em plantas e microrganismos (KABATA-PENDIAS, 2011). Contudo, devido ao alto grau de diversidade das espécies de insetos existentes, não seria incomum considerar que condições similares ocorrem a indivíduos deste grupo.

Os insetos, de uma forma geral, possuem uma alta capacidade de adaptação ao ambiente em que estão inseridos. Durante o desenvolvimento da Era Antropogênica, os fatores de adaptação foram amplificados devido à grande modificação na paisagem ambiental (HAWTHORNE, 1997). Fatores ligados à nutrição dos insetos são essenciais para determinação de componentes circulantes que lhes são assimilados (WATANABE et al., 2007; SWANSON et al., 2016; MARCO; GÄDE, 2017).

Existem trabalhos para a determinação do balanço de elementos inorgânicos em sistemas biológicos de insetos-praga em função de um fator que ocasiona o desequilíbrio (KOZLOV; HAUKIOJA; KOVNATSKY, 2000; PINHEIRO et al., 2010; MANTUANO et al., 2012). Entretanto, ainda são escassos os trabalhos que tratam da ação de inseticidas biorracionais, como os IDCs, sobre essa flutuação.

Em *Euschistus heros*, sabe-se que piriproxifem, um análogo do hormônio juvenil, afeta níveis de macro-elementos, que possuem funções distintas e essenciais em diversas rotas fisiológicas do inseto (CREMONEZ et al., 2019). No trabalho em questão, foi possível observar um aumento generalizado dos macro-elementos Ca, S, Cl, K e P, sendo este incremento ainda maior em machos do que em fêmeas. Contudo, no estudo, os micro-elementos não foram considerados. Desbalanços iônicos, causados por variações em macro- e micro-elementos, podem estar associados com alterações na nutrição dos insetos, como as modificações evidenciadas no labirinto basal de células colunares e projeções citoplasmáticas de células caliciformes no intestino médio de *Diatraea saccharalis* (PINHEIRO et al., 2010). Isto, de uma forma geral, se relaciona com o desenvolvimento do inseto e pode afetar ainda

diretamente uma gama de funções fisiológicas distintas, como já descritas com o desbalanço de macro-elementos em *E. heros*.

Investigações por análises bioquímicas, principalmente dosagem de lipídeos e carboidratos na hemolinfa de percevejo, servem para elucidar inúmeras lacunas existentes na literatura quanto à atuação e regulação hormonal no sistema reprodutor de insetos.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a variação nos níveis de lipídios e carboidratos, assim como de três micro-elementos Ni, Cu e Zn na hemolinfa de *E. heros* tratados com piriproxifem em concentrações subletal.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção De Insetos E Aplicação

Os insetos foram obtidos e tratados conforme metodologia descrita no Artigo A, itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente.

5.2.2 Preparo E Análise De Metabólitos Energéticos

Os insetos adultos vivos com 0, 5, 10 e 15 dias após emergência foram isolados por 2h em frascos escuros com papel toalha umedecido. Após isto, uma pequena punção foi feita na região do pronoto e a hemolinfa foi delicadamente extraída com micropipeta de capilaridade (0,5 μ L), imediatamente adicionada em tubos de ensaio contendo 100 μ l de ácido sulfúrico PA e agitado vigorosamente para homogeneização. Em seguida, foram conduzidas análises para determinar teores de lipídios e carboidratos, conforme metodologia proposta por van Handel (1985a, b).

Para medição dos teores de lipídios, foi realizado o método de espectrometria de reação positiva da sulfo-fosfo-vanilina (SPV). Os tubos foram incubados em termobloco de banho seco (100°C) por 10 min, e em seguida adicionado 1 mL de solução SPV (198 mg de vanilina, 66,8 mL de H₃PO₄, 33,2 mL de água destilada). As amostras foram mantidas em escuro por 30 min antes da leitura em espectrofotômetro a 546 nm de absorbância. Para comparação, uma curva de calibração padrão foi realizada usando a mesma metodologia com quantidades conhecidas de colesterol.

Para medição de teores de carboidratos, foi conduzido o método de espectrometria de reação positiva de antrona. Em cada tubo, foi adicionada 2 mL da solução de antrona (120 mg de antrona, 60 mL de H₂SO₄, 30 mL de água destilada), e posteriormente as amostras foram incubadas em termobloco (100°C) por 8 min. Em seguida, as amostras foram mantidas em escuro por 30 min antes da leitura em espectrofotômetro a 585 nm de absorbância. Para comparação, uma curva de calibração padrão foi realizada usando a mesma metodologia com quantidades conhecidas de glicose.

5.2.3 Preparo E Análise De Amostras Em TXRF

Para as análises de micro-elementos, a hemolinfa dos percevejos adultos com 5 dias após emergência foi extraída conforme metodologia utilizada por Cremonez et al. (2019). Cada inseto foi cuidadosamente alfinetado dorsalmente em placa de Petri com parafina sólida, permitindo que pequenas incisões fossem feitas no abdômen, de forma a evitar perfurar qualquer órgão ou tecido gorduroso. Através dos furos, a hemolinfa foi delicadamente drenada por pressão com agulha ultrafina (6 mm). As amostras coletadas foram agrupadas em um tubo de 2,0 mL sobre um bloco de gelo.

A hemolinfa foi centrifugada em temperatura ambiente a 6000 rpm (HT[®] CM-610) por três minutos, e o plasma sobrenadante foi extraído. O material foi imediatamente levado ao Laboratório de Física Nuclear Aplicada (LFNA) da UEL para análise de fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF).

Para a amostragem, uma alíquota de 10 µL do plasma extraído foi adicionada no centro do disco acrílico de leitura (2 cm diam.) e posteriormente 10 µL de gálio (Ga) solubilizado em água deionizada foi adicionado sobre cada amostra como padrão interno de leitura (PI). As amostras foram levadas a estufa em 60°C até a completa secagem e prevalência do filme de leitura sobre a superfície do disco. As amostras foram analisadas em um espectrofotômetro de TXRF (S2 PICOFOX[®], BrukerCorp.) com auxílio do software Spectra PICOFOX v. 7.2.5. Os discos foram analisados antes da amostragem em um tempo de leitura de 100 s, para subtração de qualquer elemento presente na superfície. A leitura das amostras finais foi feita em triplicata, com um tempo de leitura real de 300 s.

5.2.4 Análise Estatística

Os dados de ambos bioensaios foram previamente submetidos a teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os valores de lipídios e carboidratos foram comparados entre machos e fêmeas, tratados e não tratados com piriproxifem, em cada tempo de análise, sendo realizado o teste t de Student para amostras não pareadas ($p \leq 0,05$). No total, para lipídios foram avaliados 10 insetos por sexo por tratamento ($n = 80$), e para carboidratos foram avaliados 8 insetos por sexo por tratamento ($n = 64$). Para as amostras submetidas a quantificação de micro-elementos, os dados finais de leitura foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Todo o processamento de dados foi realizado com auxílio do software R[®] (R CORE TEAM, 2020).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Metabólitos Energéticos

De modo geral, os níveis de lipídios na hemolinfa de *E. heros* aumentam de acordo com o desenvolvimento do inseto adulto, sendo maiores inicialmente em fêmeas e estabilizando ao final do período de avaliação, e com uma tendência de aumento continuada nos machos (Figura 5.1).

Os níveis de carboidratos aumentam expressivamente no início do desenvolvimento adulto, e possuem uma tendência de estabilização a partir dos 10 DAE. Diferentemente dos lipídios, os níveis de carboidratos no final do período de avaliação em machos apresentam uma queda (Figura 5.2).

Lipídios foram observados em maior concentração que carboidratos, em uma proporção média de 2:1. As fêmeas apresentam maior concentração de metabólitos circulantes, sendo observados valores máximos de lipídios de $25,37 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em fêmeas não tratadas aos 10 DAE, e de $27,44 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em machos não tratados aos 15 DAE (Figura 5.1), e picos de concentração de carboidratos aos 15 DAE, em torno de $12,57 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em fêmeas não tratadas aos 10 DAE, e $11,68 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em machos não tratados aos 10 DAE (Figura 5.2).

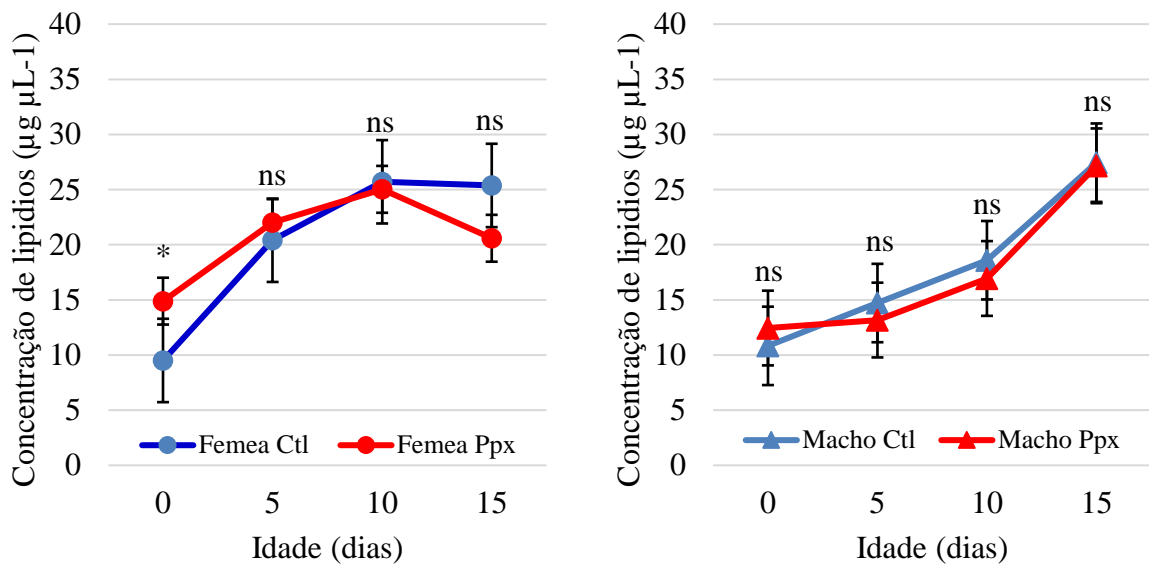


Figura 5.1 – Concentração de lipídios na hemolinfa de adultos *Euschistus heros* tratados e não tratados com piriproxifem. Teste t de Student: ns = diferença não significativa; * = diferença significativa ($p < 0,05$). $n = 80$.

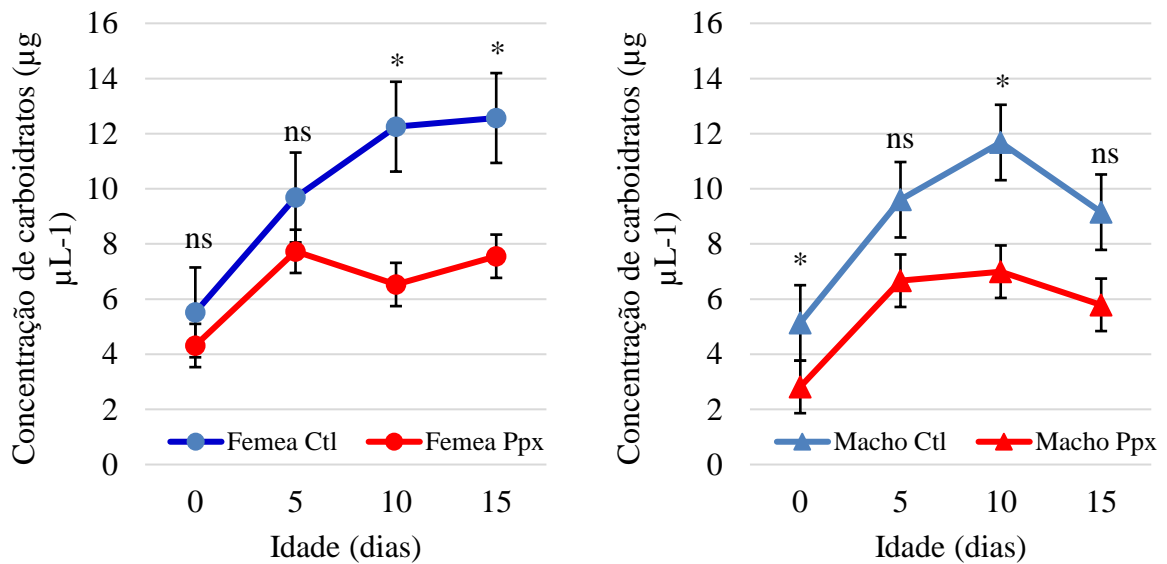


Figura 5.2 – Concentração de carboidratos na hemolinfa de adultos *Euschistus heros* tratados e não tratados com piriproxifem. Teste t de Student: ns = diferença não significativa; * = diferença significativa ($p < 0,05$). $n = 64$.

5.3.2 Micro-elementos

Os micro-elementos observados na hemolinfa de fêmeas e machos de *E. heros* adultos mostram uma desregulação geral em função da ação de piriproxifem em concentração subletal nos estágios terminais do período juvenil (Tabela 5.1), sendo possível observar as variações entre os tratamentos e entre os sexos (Figura 5.3).

De modo geral, Ni e Zn são os micro-elementos que foram diferentes em razão do sexo, sendo maiores concentrações em machos. Contudo, os comportamentos de ambos foram diferentes em função da ação de piriproxifem. Níquel foi reduzido em ambos os sexos, demonstrando um padrão de redução similar para machos e fêmeas. O micro-elemento que se apresenta com maior quantidade, independente do tratamento, é o Zinco. Este elemento é mais de 20% maior em fêmeas do que em machos não tratados, entretanto, os níveis são reduzidos após a aplicação do produto, sendo maior nas fêmeas, de modo que machos tratados possuem maior quantidade de Zn na hemolinfa em relação às fêmeas tratadas. Cobre apresenta-se como um micro-elemento de concentração similar em machos e fêmeas não tratados, contudo, existe uma disparidade após a exposição dos insetos ao tratamento com piriproxifem, sendo que a concentração aumenta na hemolinfa de machos tratados (>68%) e diminui em fêmeas (-16%) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Níveis de concentração (mg L^{-1}) de micro-elementos na hemolinfa de *Euschistus heros* machos e fêmeas tratados com piriproxifem em concentração subletal

Micro-elemento	Controle água destilada pura		Piriproxifem LC ₃₀ 0,688 mL.i.a. L ⁻¹		<i>p</i> -valor
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	
Ni	0.59±0.48 c	1.07±0.04 a	0.31±0.02 d	0.64±0.02 b	3.522×10^{-9}
Cu	0.75±0.01 b	0.77±0.02 b	0.63±0.01 c	1.30±0.03 a	1.421×10^{-9}
Zn	4.32±0.03 a	3.56±0.05 b	2.94±0.08 d	3.40±0.02 c	7.325×10^{-9}

Nota: Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$. i. a. = ingrediente ativo. Padrão interno = Ga + água deionizada = $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ga = 10 p.p.m.

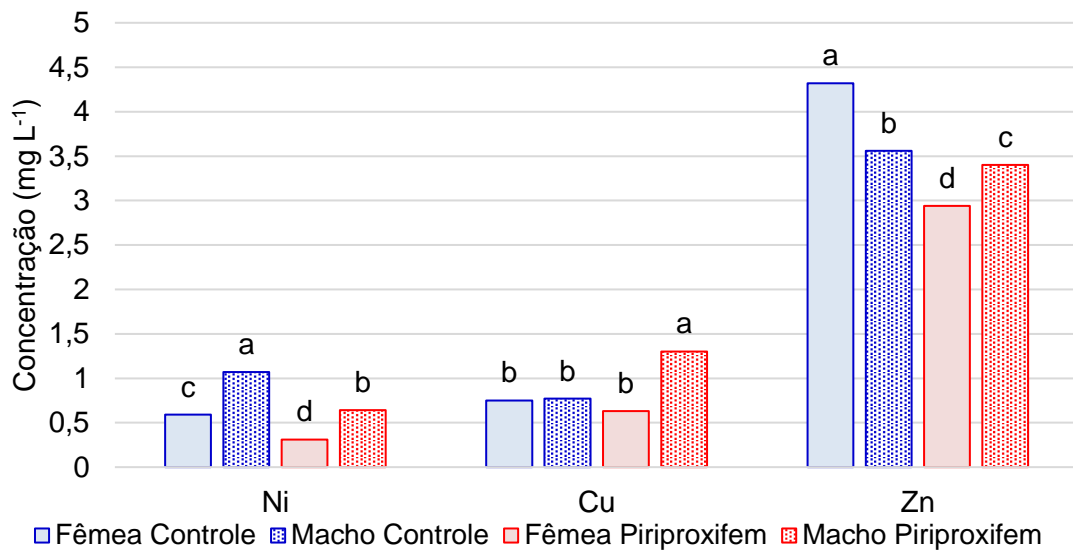


Figura 5.3 Variação de concentração de micro-elementos em hemolinfa de machos e fêmeas de *Euschistus heros* tratados com concentração subletal de piriproxifem em estágio juvenil final (N4).

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Metabolitos Energéticos

As análises de amostras de hemolinfa de *E. heros* apresentam uma proporção maior de lipídios do que carboidratos. Esta correlação indica que os lipídios são os principais substratos utilizados pelo inseto, conforme observado por Gäde et al. (2004), em estudo realizado com diferentes padrões de dispersão em *Notonecta glauca* L. (Hemiptera: Notonectidae). As diferenças entre os níveis metabólicos são relacionadas principalmente a padrões de dispersão e respostas fisiológicas dependentes de material energético; insetos que produzem longos intervalos de voo, e.g. migratórios, naturalmente possuem um metabolismo dependente de lipídio (MARCO; GÄDE, 2017), enquanto aqueles de voos esporádicos ou curtos possuem uma preferência a carboidrato (ALVES et al., 2007), ou mesmo aminoácidos como a prolina, o que é o caso de alguns Coleoptera (GÄDE; AUERSWALD, 2002). Em insetos com padrão misto de dispersão, i.e., que apresentam voos longos e curtos, lipídios e carboidratos são utilizados na mesma proporção, como as mariposas-praga da subfamília Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae) (JAFFE et al., 1988; JONES et al., 2019). Em *E. heros*, os lipídios são importantes para garantir a qualidade do inseto após o período de diapausa, sendo mobilizado principalmente para aspectos relacionados à reprodução.

Apesar dos níveis de carboidratos serem em média metade de lipídios, estes são os metabólitos energéticos que mais variaram em *E. heros* após a exposição à piriproxifem. A concentração de carboidrato circulante também é reflexo da quebra de glicogênio presente no corpo gorduroso, o que pode ocorrer quando a demanda por lipídio é muito alta (VAN DER HORST; VAN DOORN; BEENAKKERS, 1978; ARRESE; SOULAGES, 2010). Contudo, em alguns Heteroptera os níveis de glicogênio são baixos em relação a reserva lipídica, sendo ainda variável de acordo com a dieta e dispersão. Sabe-se que grande parte dos percevejos fitófagos (Hemiptera: Pentatomidae) possuem padrões diversos de dispersão: *Dichelops melacanthus* Dallas, é um inseto de voo rápido e frequente, principalmente nos períodos mais amenos do dia (SOSA-GOMÉZ et al., 2014); *Nezaraviridula* L. e *Piezodorus guildinii* Westwood, podem se dispersar até 70 m, em condições de alta temperatura, enquanto *E. heros* é a espécie com menor capacidade de voo (SOSA-GOMÉZ et al., 2004). É possível que, a partir deste comportamento, *E. heros* seja o percevejo fitófago mais dependente de lipídios, sendo, portanto, o motivo que os níveis deste metabólito foram maiores e mais estáveis na hemolinfa.

Além do voo e demais estratégias de dispersão, outros mecanismos requerem uma alta demanda de energia dependendo da espécie de inseto, como reprodução e diapausa (GÄDE; AUERSWALD, 2000; GÄDE, 2009; MARCO; ŠIMEK; GÄDE, 2011). A diapausa é o período de dormência reprodutiva onde o *E. heros* hiberna sob folhas secas no campo durante os meses do inverno, assim, esta espécie apresenta esta estratégia adaptativa, na qual é especializado em armazenamento de lipídios em diversos tecidos do corpo gorduroso, sendo prontamente disponíveis no momento da nova safra (PANIZZI; HIROSE, 1995).

Fisiologicamente, a liberação endógena de lipídeos e carboidratos do corpo gorduroso é regulada pelo hormônio adipocinético (AKH), um neuropeptídeo que apresenta estrutura variável entre octa a decapeptídeo, com as terminações bloqueadas em um piroglutamato (-N) e uma carboxamida (-C), contendo determinados aminoácidos em partes específicas, como Fen ou Tir na posição 4, Trp na posição 8, e resíduo de Gli na posição 9, descrita para *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) com a seguinte natureza química (sequência de aminoácidos): pGlu-Leu-Tir-Fen-Tir-Ser-Ser-Trp-Gli-NH₂ (EDWARDS; WEAVER; MARRIS, 2001).

Estudos com AKH são considerados de grande importância na subordem Heteroptera, pois estes insetos possuem grande mobilidade e, portanto, necessitam de muita energia (KODRÍK et al., 2010; GÄDE; MARCO, 2013). Além de estudos que associam a

mobilidade geral como em voos e dispersão, o AKH também tem atuação direta e indireta com a reprodução, pois esse processo depende do tecido adiposo para o desenvolvimento e formação de componentes essenciais, como a vitelogenina (ZIBAE; SENDI, 2011). A vitelogenina por sua vez é responsável pela nutrição do oócito, e sua concentração na hemolinfa está diretamente ligada a fatores relacionados a idade de desenvolvimento, que determina o volume da CC-CA e a concentração de HJ circulante (BUHLMANN, 1976), e em resposta às alterações nos níveis de carboidratos e lipídeos na hemolinfa (GÄDE; MARCO, 2009). Devido ao alto potencial proliferativo após a diapausa seja um dos motivos pela maior disponibilidade de lipídios observada na hemolinfa de *E. heros*.

Com relação a interação de piriproxifem nos níveis de metabólitos energéticos de *E. heros*, os principais resultados indicam a ação do produto em fêmeas com 10 e 15 dias de idade, período de maior atividade sexual. Sabe-se, também, que o produto causa um aumento em aminoácidos livres na hemolinfa de *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae), associados com a degradação de proteínas, especialmente ligadas a diapausa (YI; ADAMS, 2000). Neste mesmo estudo, os níveis de lipídios também foram aumentados, principalmente em fêmeas, o que foi correlacionado com a crescente concentração de vitelogenina. Piriproxifem também afeta negativamente medidas quantitativas e qualitativas de hemócitos circulantes na hemolinfa de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (SEZER; OZALP, 2015). De modo geral, as alterações nos níveis metabólicos e proteicos da hemolinfa de insetos tratados com análogos de HJ são consequências de seu processo sobre o desenvolvimento e sobre o desbalanço com ecdisteróide, que ultimamente regula funções fisiológicas em larvas e adultos (ARIBI et al., 2006). Desta maneira, a ação de piriproxifem sobre os componentes energéticos de *E. heros* indica que modificações na homeostase hormonal, finalmente, afetaram a disponibilidade de carboidratos.

5.4.2 Micro-elementos

Níveis de micro-elementos são variáveis na hemolinfa de *E. heros* após a exposição a piriproxifem. Em termos de níveis de macro-elementos, sabe-se que a flutuação ocorre em função de um estresse fisiológico, causado por fatores como o parasitismo (PINHEIRO et al., 2010). Em estudo com piriproxifem subletal em *E. heros* sobre níveis de macro-elementos, foi possível observar uma variação uniforme, sendo que a exposição ao produto causou um aumento geral em P, K, S, Cl e Ca na hemolinfa (CREMONEZ et al., 2019). No mesmo

estudo, os autores observaram que as variações foram diferentes entre fêmeas e machos, concluindo que a ação do inseticida tinha relação com o sexo, isto é, pode ter afetado o sistema reprodutor ou componentes fisiológicos dimórficos.

Neste estudo, a ação de piriproxifem sobre os micro-elementos foi variável entre machos e fêmeas apenas na análise de Cu, aumentando em machos tratados, o que indica um desbalanço específico na homeostase deste elemento. Muitas famílias proteicas são dependentes de Cu, como as chaperonas, responsáveis pelo controle em diferentes sistemas do organismo, e.g. digestivo, reprodutivo e nervoso, com funções intercambiáveis (HUA et al., 2010). Outro exemplo de metaloproteína dependente de Cu são as pro-fenoloxidasas (PFOs), tirosinases que, nos insetos, auxiliam no sistema imune humoral, esclerotização e melanização de ferimentos, e em sua estrutura apresentam sítios de ligação de Cu. Sabe-se que a aplicação de inseticidas desreguladores de crescimento afeta o desenvolvimento geral de percevejos, sendo um dos sintomas de sua ação a deposição irregular de quitina na cutícula e diferentes padrões de melanização, como acentuações nas articulações de pernas e diminuição da cor em outras regiões (MERZENDORFER, 2013; AGÜERO; NEVES; CREMONEZ, 2014). A correlação entre o aumento de Cu na hemolinfa de *E. heros*, observada após a exposição à piriproxifem, com a resposta do sistema imunológico, pode ser assunto para estudos futuros.

A maior concentração de Ni observada em machos adultos de *E. heros*, indiferentemente do tratamento, pode estar associada com a circulação do elemento na hemolinfa. Ni é altamente tóxico para o sistema reprodutor de mamíferos (FORGACS et al., 2012), assim como em insetos. Em *Spodoptera litura*, Ni provocou uma redução na capacidade espermática, no peso e volume de testículos e um aumento nos níveis de peroxidação lipídica analisados em tecidos testiculares (SUN et al., 2016). Estudos sobre a acumulação deste micro-elemento em órgãos específicos do percevejo, como em testículos e ovários, poderão ser conduzidos no futuro para identificar e correlacionar a atividade de piriproxifem sobre os níveis de acumulação e sequestro.

Além do modo de ação clássico de piriproxifem ligado ao agonismo com o hormônio juvenil, as deficiências de Zn causadas em *E. heros* fêmeas e machos tratados podem indicar uma desregulação hormonal indireta. Algumas proteínas conhecidas como metaloendopeptidases (MEP) dependem de Zn para realizar a clivagem de hormônios específicos de insetos, como é o caso do AKH, que depende da MEP neprilisina para clivar a ligação peptídica $\text{Asn}^3\text{-Phe}^4$ (TURNER; ISAAC; COATES, 2001). Adicionalmente, Zn (II) é

componente estrutural de receptores acoplados às proteínas G (GPCRs), sítio que este e outros hormônios peptídicos se ligam para a ativação específica (NAIR; JACKSON; GÄDE, 2001; MUGUMBATE; JACKSON; VAN DER SPOEL, 2011). É possível concluir que Zn é fator limitante no desenvolvimento ninfal final de *E. heros*, e estudos mais aprofundados sobre a atividade de AKH sobre percevejos tratados com este inseticida deverão ser conduzidos no futuro para correlacionar com as análises observadas.

Os dados com micro-elementos observados em *E. heros* indicam que piriproxifem, de uma forma direta e/ou indireta, possui atividade sobre rotas fisiológicas distintas, podendo finalmente indicar que, além do modo de ação clássico, existe um efeito colateral do inseticida na fisiologia do inseto.

5.5 CONCLUSÕES

A concentração de lipídios e carboidratos na hemolinfa de *E. heros* é variável entre os sexos, idades e tratamentos. Lipídio é o principal e mais resiliente metabólito energético, com maiores concentrações relativas em fêmeas recém-emergidas tratadas com piriproxifem, e similar ao longo do desenvolvimento. A concentração de carboidratos é mais afetada pela exposição com piriproxifem, sendo a máxima diferença entre insetos tratados e não tratados aos 10 dias de idade adulta.

Os níveis de micro-elementos são variáveis entre machos e fêmeas; Ni diminui consideravelmente após o tratamento com piriproxifem, assim como Zn, neste caso especialmente em fêmeas. A concentração de Cu é similar entre fêmeas e machos não tratados, e aumenta em machos após exposição ao inseticida, indicando que piriproxifem pode afetar vias fisiológicas relacionadas ao sistema imunológico, endócrino e reprodutivo.

As alterações observadas nos componentes da hemolinfa de *E. heros* são respostas da funcionalidade de diferentes sistemas fisiológicos, associadas aos fatores como sexo, idade e homeostase fisiológica, que ultimamente é afetada por efeitos diretos e indiretos da ação de piriproxifem.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma única aplicação de piriproxifem em concentração subletal em ninfas de quarto instar de *Euschistus heros* produz efeitos morfogenéticos e fisiológicos sobre adultos remanescentes. As implicações da ação do inseticida ocorrem em diferentes proporções de acordo com o sexo e idade do inseto.

As alterações provocadas por piriproxifem devem ocorrer em decorrência da ação direta e/ou indireta. De forma direta, piriproxifem liga-se a receptores específicos de hormônio juvenil (HJ) (e.g.: Met, Gce) e desencadeia a cascata de reações subsequentes, de maneira não controlada pelo organismo, levando a distúrbios sobre a fisiologia do percevejo. Indiretamente, a atividade de piriproxifem interfere sobre o desenvolvimento ninfal final, consequentemente afetando a qualidade biológica do inseto adulto.

Assumindo-se os dois fatores como corretos, a ação de piriproxifem afeta a homeostase de HJ e causa um desequilíbrio hormonal em estágios críticos de desenvolvimento do percevejo, comprometendo funções biológicas importantes, como reprodução e dispersão, que determinam o *status* de praga a *E. heros*. Desta maneira, piriproxifem pode ser uma importante ferramenta para a supressão de populações infestantes de percevejos-praga, e sua incorporação no manejo de controle deve ser avaliada.

REFERÊNCIAS

- ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 4, p. 433-459, 2010.
- ABISGOLD, J. D.; SIMPSON, S. J. The physiology of compensation by locusts for changes in dietary protein. **Journal of Experimental Biology**, v. 129, n. 1, p. 329-346, 1987.
- ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. **Italian Journal of Zoology**, v. 71, n. 1, p. 5-16, 2004.
- ADNAN, S. M.; PÉREZ-STAPLES, D.; TAYLOR, P. W. Dietary methoprene treatment promotes rapid development of reproductive organs in male Queensland fruit fly. **Journal of Insect Physiology**, v. 126, p. 104094, 2020.
- AGÜERO, M. A. F.; NEVES, P. M. O. J.; CREMONEZ, P. S. G. Efeito do piriproxifem e diflubenzurom na reprodução de *Nezaraviridula* (L.) [Hemiptera: Pentatomidae]. **Investigación Agraria**, v.16, n.2, p. 99-106, 2014.
- AGUIAR, R. C. M.; HUSCH, P. E.; GALLO, R. B.; LEVY, S. M.; VILAS-BÔAS, L. A.; SILVA, C. R. M.; SOSA-GOMÉZ, D. R.; ROSA, R. Effects of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin on spermatogenesis of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Entomological Science**, v. 20, n. 1, p. 279-287, 2017.
- AHMED, T. H.; SAUNDERS, T. R.; MULLINS, D.; RAHMAN, M. Z.; ZHU, J. Molecular action of pyriproxyfen: Role of the Methoprene-tolerant protein in the pyriproxyfen-induced sterilization of adult female mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008669, 2020.
- ALIZADEH, M.; KARIMZADEH, J.; RASSOULIAN, G. R.; FARAZMAND, H.; HOSEINI-NAVEH, V.; POURIAN, H. R. Sublethal effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue, on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): life table study. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 45, n. 14, p. 1741-1763, 2012.
- ALVES, G. G.; MARINHO-CARVALHO, M. M.; ATELLA, G. C.; SILVA-NETO, M. A. C.; SOLA-PENNA, M. Allosteric regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity of fat body and flight muscle from the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 1, p. 53-62, 2007.
- AMEKU, T.; YOSHINARI, Y.; FUKUDA, R.; NIWA, R. Ovarian ecdysteroid biosynthesis and female germline stem cells. **Fly**, v. 11, n. 3, p. 185-193, 2017.
- ANDREAZZA, F.; HADDI, K.; NÖRNBERG, S. D.; GUEDES, R. N. C.; NAVA, D. E.; OLIVEIRA, E. E. Sex-dependent locomotion and physiological responses shape the insecticidal susceptibility of parasitoid wasps. **Environmental Pollution**, p. 114605, 2020.
- AREIZA, M.; NOUZOVA, M.; RIVERA-PEREZ, C.; NORIEGA, F. G. 20-hydroxyecdysone stimulation of juvenile hormone biosynthesis by the mosquito *Corpora allata*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 64, p. 100-105, 2015.
- ARIBI, N.; SMAGGHE, G.; LAKBAR, S.; SOLTANI-MAZOUINI, N.; SOLTANI, N. Effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on development of the mealworm, *Tenebrio molitor*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 1, p. 55-62, 2006.

- ARMSTRONG, N.; RAMAMOORTHY, M.; LYON, D.; JONES, K.; DUTTAROY, A. Mechanism of silver nanoparticles action on insect pigmentation reveals intervention of copper homeostasis. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53186, 2013.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.
- ASHBURNER, M. Effects of juvenile hormone on adult differentiation of *Drosophila melanogaster*. **Nature**, v. 227, p. 187-189, 1970.
- ASSIS, M. Q., DOHANIK, V. T., OLIVEIRA, L. L., ZANUNCIO, J. C., SERRÃO, J. E. Evidence for a transcellular route for vitellogenin transport in the telotrophic ovary of *Podisusnigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.
- AXTELL, R. C.; DUKES, J. C.; EDWARDS, T. D. Field tests of diflubenzuron, methoprene, flitmlol and chlorpyrifos for the control of *Aedes taeniorhynchus* larvae in diked dredged spoil areas. **Mosquito News**, v. 39, n. 3, p. 520, 1979.
- BADISCO, L.; CLAEYS, I.; VAN LOY, T.; VAN HIEL, M.; FRANSSENS, V.; SIMONET, G.; VANDEN BROECK, J. Neuroparsins, a family of conserved arthropod neuropeptides. **General and Comparative Endocrinology**, v. 153, n. 1-3, p. 64-71, 2007.
- BANKS, W. A.; WILLIAMS, D. F.; LOFGREN, C. S. Effectiveness of fenoxycarb for control of real imported fire ants (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 81, p. 83-87, 1988.
- BARCELOS, M. N.; SOUZA, T. S.; TOSCANO, L. C.; MARUYAMA, W. I. Aspectos fisiológicos e fitotécnicos do ataque de *Euschistus heros* em soja. **Ciência&Tecnologia**, v. 11, n. 1, p. 15-21, 2019.
- BARCHUK, A. R.; BITONDI, M. M. G.; SIMÕES, Z. L. P. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. **Journal of Insect Science**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2002.
- BELLÉS, X.; MAESTRO, J. L. Endocrine peptides and insect reproduction. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 47, n. 1, p. 23-37, 2005.
- BERGER, E. M.; DUBROVSKY, E. B. Juvenile hormone molecular actions and interactions during development of *Drosophila melanogaster*. In: LITWACK, G. (Ed.). **Insect hormones, Vitamines and Hormones**, v. 73, London: Academic Press, p. 175-215.
- BERNHARDT, E. S.; ROSI, E. J.; GESSNER, M. O. Synthetic chemicals as agents of global change. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 15, n. 2, p. 84-90, 2017.
- BITTEL, J. Stinkbugs have spread to 41 states; can we stop them? National Geographic, 2014. Disponível em: <http://news.nationalgeographic.com/news/2014/10/141017-stinkbugs-insects-science-animals-nation-control/>. Acesso em 14/06/2017.
- BLACKITH, R. E. Polymorphism in some Australian locusts and grasshoppers. **Biometrics**, v. 13, n. 2, p. 183-196, 1957.
- BLANCKENHORN, W. U.; DIXON, A. F. G.; FAIRBARN, D. J.; FOELLMER, M. W.; GIBERT, P.; VAN DER LINDE, K.; MEIER, R.; NYLIN, S.; PITNICK, S.; SCHOFF, C.; SIGNORELLI, M.; TEDER, R.; WIKLUND, C. Proximate causes of Rensch's rule: does sexual size dimorphism in arthropods result from sex differences in development time? **The American Naturalist**, v. 169, n. 2, p. 245-257, 2007.
- BLANCKENHORN, W. U.; MEIER, R.; TEDER, T. Rensch's rule in insects: patterns among and within species. In: FAIRBAIRN, D. J.; BLANCKENHORN, W. U.; SZÉKELY, T.

- (Eds.). **Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism**. Oxford: University Press, 2007. p. 60-70.
- BOGGS, C. L. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. **Functional Ecology**, v. 23, n. 1, p. 27-37, 2009.
- BONAVENTURE, G. Plants recognize herbivorous insects by complex signaling networks. In: VOELCKEL, C.; JANDER, G. **Annual plant reviews volume 47: Insect-plant interactions**. Oxford: Wiley Blackwell. 2014. p. 1-37.
- BONDURIANSKY, R. The evolution of condition-dependent sexual dimorphism. **The American Naturalist**, v. 169, n. 1, p. 9-19, 2007.
- BOOKSTEIN, F. L. **Morphometric tools for landmark data: geometry and biology**. Cambridge: University Press, 1997. 436p.
- BOYD, R. S. High-nickel insects and nickel hyperaccumulator plants: a review. **Insect Science**, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2009.
- BOYD, R. S.; MARTENS, S. N. Nickel hyperaccumulated by *Thlaspi montanum* Var. *montanum* is acutely toxic to an insect herbivore. **Oikos**, v. 70, n. 1, p. 21-25, 1994.
- BUENO, A. F.; BORTOLOTTI, O. C.; POMARI-FERNANDES, A.; FRANÇA-NETO, J. B. Assessment of a more conservative stink bug economic threshold for managing stink bugs in Brazilian soybean production. **Crop Protection**, v. 71, p. 132-137, 2015.
- BUENO, A. F.; PAULA-MORAES, S. V.; GAZZONI, D. L.; POMARI, A. F. Economic thresholds in soybean-integrated pest management: old concepts, current adoption, and adequacy. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 439-447, 2013.
- BUHLMANN, G. Haemolymph vitellogenin, juvenile hormone, and oöcyte growth in the adult cockroach *Nauphoeta cinerea* during first pre-oviposition period. **Journal of Insect Physiology**, v. 22, n. 8, p. 1101-1110, 1976.
- CARMONA, E. R.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxic effects of two nickel-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 718, n. 1, p. 33-37, 2011.
- CARVALHO, F. M. V.; MARCO JR., P.; FERREIRA, L. G. The Cerrado into pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1392-1403, 2009.
- CAVALLARI, L. S.; ROGGIA, S.; CAMPOS, T. A.; SISMEIRO, M.; PEREIRA, J.; LOPES, G.; PASINI, A. Aplicações preventivas de inseticidas intensificam o ataque do percevejo-marrom *Euschistus heros* em soja. In: Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, 8, 2013, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2013. p. 133-136.
- CHAPMAN, R. F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E. (Eds.). **The insects: structure and function**. 5 ed. Cambridge: Academic Press, 2013. 959 p.
- CHAPMAN, R. F. The chemical inhibition of feeding by phytophagous insects: a review. **Bulletin of Entomological Research**, v. 64, n. 3, p. 339-363, 1974.
- CHARLES, J. P.; IWEMA, T.; EPA, W. C.; TAKAKI, K.; RYNES, J.; JINDRA, M. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 52, p. 21128-21133, 2011.

- CHOCOROSQUI, V. R.; PANIZZI, A. R. Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 4, p. 487-492, 2004.
- CINGOLANI, M. F.; ROGGIERO, M. F.; BARAKAT, M. C.; LILJESTHRÖM, G. G. Polyandry and trade-off between fecundity and longevity in female *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 110, n. 1, p. 155-160, 2020.
- COHEN, A. C. **Insect diets: science and technology**. Boca Raton: CRC Press, 2015. 474p.
- COLL, M.; RUBERSON, J. R. **Predatory Heteroptera: their ecology and use in biological control**. Lanham: Entomological Society of America, 1998. 233 p.
- COLLINS, C.; DEPLEGGE, M.; FRASER, R.; JOHNSON, A.; HUTCHISON, G.; MATTHIESSEN, P.; MURPHY, R.; OWENS, S.; SUMPTER, J. Key actions for a sustainable chemicals policy. **Environment International**, v. 137, p. 105463, 2020.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, Safra 2020/21**, v. 8, n. 4, 2021. 85p.
- CONTRERAS-GARDUÑO, J.; AGUILAR, A. C.; AMORÍN, M. A.; RIVERA, A. C. Juvenile hormone favors sexually-selected traits but impairs fat reserves and abdomen mass in males and females. **Evolutionary Ecology**, v. 25, n. 4, p. 845-856, 2011.
- COOK, S. C. Compound and dose-dependent effects of two neonicotinoid pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) metabolic physiology. **Insects**, v. 10, n. 1, p. 18, 2019.
- CORRÊA, A. S.; CORDEIRO, E. M. G.; OMOTO, C. Agricultural insect hybridization and implications for pest management. **Pest Management Science**, v. 75, n. 11, p. 2857-2864, 2019.
- CORRÊA, B. S.; PANIZZI, A. R.; NEWMAN, G. G.; TURNIPSEED, S. G. Distribuição geográfica e abundância estacional dos principais insetos-praga da soja e seus predadores. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 6, n. 1, p. 40-50, 1977.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. **Percevejos da soja e seu manejo**. Londrina, PR: EMBRAPA-CNPSO, 1999. 45p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 24).
- COSSOLIN, J. F. S. **Polimorfismo e ultraestrutura dos espermatozoides de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, 2015, 24 p.
- COSTA, M. L. M.; BORGES, M.; VILELA, E. F. Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 4, 1998.
- COUCH, T. L.; ROSS, D. A. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 22, n. 7, p. 1297-1304, 1980.
- COUDRON, T. A.; YOCUM, G. D.; BRANDT, S. L. Nutrigenomics: a case study in the measurement of insect response to nutritional quality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 121, n. 1, p. 1-14, 2006.
- CREMONEZ, P. S. G.; PINHEIRO, D. O.; FALLEIROS, A. M. F.; NEVES, P. M. O. J. Performance of reproductive system of *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) subjected to buprofezin and pyriproxyfen: morphological analysis of ovarioles and testis. **Semina Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2279-2291, 2017.

- CREMONEZ, P. S. G.; GOUVEA, S. P.; PINHEIRO, D. O.; FALLEIROS, A. M. F.; LEVY, S. M.; MENEGHIN, A. M.; FONSECA, I. C. B.; NEVES, P. M. O. J. Chitinbiosynthesisinhibitors in *Euschistus heros* Fabr. (Hemiptera: Pentatomidae): morphometric alterations in testes and nuclei of testicular accessory cells of adults. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, p. 410-7, 2019.
- CREMONEZ, P. S. G.; MATSUMOTO, J. F.; ANDRELLO, A. C.; ROGGIA, S.; PINHEIRO, D. O.; NEVES, P. M. O. J. Macro-elements in the hemolymph of adult *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae) treated with pyriproxyfen. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 220, p. 47-51, 2019.
- CRIBB, B. W.; STEWART, A.; HUANG, H.; TRUSS, R.; NOLLER, B.; RASCH, R.; ZALUCKI, M. P. Insect mandibles - comparative mechanical properties and links with metal incorporation. **Naturwissenschaften**, v. 95, n. 1, p. 17-23, 2008.
- DANIELSSON, O.; ATRIAN, S.; LUQUE, T.; HJELMQVIST, L.; GONZALEZ-DUARTE, R.; JÖRNVALL, H. Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 91, n. 11, p. 4980-4984, 1994.
- DE LOOF, A.; BAGGERMAN, G.; BREUER, M.; CLAEYS, I.; CERSTIAENS, A.; CLYNEN, E.; JANSSEN, T.; SCHOofs, L.; VANDEN BROECK, J. Gonadotropins in insects: an overview. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 3, p. 129-138, 2001.
- DE LOOF, A.; SCHOofs, L. Mode of action of farnesol, the “Noble Unknown” in particular in Ca^{2+} homeostasis, and its juvenile hormone-esters in evolutionary retrospect. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 141, 2019.
- DE LOOF, A. The essence of female–male physiological dimorphism: differential Ca^{2+} -homeostasis enabled by the interplay between farnesol-like endogenous sesquiterpenoids and sex-steroids? The Calcigender paradigm. **General and Comparative Endocrinology**, v. 211, p. 131-146, 2014.
- DENLINGER, D. L.; YOCUM, G. D.; RINEHART, J. P. Hormonal control of diapause. In: GILBERT, L. I. (Ed.). **Insect endocrinology**, London: Academic Press, 2011. p. 430-463.
- DEPIERI, R. A.; SIQUEIRA, F.; PANIZZI, A. R. Aging and food source effects on mandibular stylets teeth wear of phytophagous stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 952-956, 2010.
- DEVINE, G. J.; FURLONG, M. J. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. **Agriculture and Human Values**, v. 24, n. 3, p. 281-306, 2007.
- DHADIALLA, T. S.; RETNAKARAM, A.; SMAGGHE, G. Insect growth- and development-disrupting insecticides. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (Eds.). **Comprehensive molecular insect science**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 55–115.
- DITTMANN, F.; MAIER, E. Developmental patterns of DNA-accumulation and nuclear division in the follicle epithelium of the red cotton bug, *Dysdercus intermedius* (Heteroptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 33, n. 3, p. 191-200, 1987.
- DLOUHY, A. C.; OUTTEN, C. E. The iron metallome in eukaryotic organisms. In BANCI, L. (Ed.). **Metallomics and the cell**. Metal ions in life sciences, v. 12. Dordrecht: Springer, 2013. p. 241-278.

- DOLLING, W. R. **The Hemiptera**. Oxford: University Press, 1991. 274 p.
- DOW, J. A. T. The essential roles of metal ions in insect homeostasis and physiology. **Current Opinion in Insect Science**, v. 23, p. 43-50, 2017.
- DUJARDIN, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 875-890, 2008.
- DUJARDIN, J. P.; KABA, D.; SOLANO, P; DUPRAZ, M.; MCCOY, K. D.; JARAMILLO-O, N. Outline-based morphometrics, an overlooked method in arthropod studies? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 704-714, 2014.
- EBERHARD, W. G.; HUBER, B. A.; BRICEÑO, R. D.; SALAS, I.; RODRIGUEZ, V. One size fits all? Relationships between the size and degree of variation in genitalia and other body parts in twenty species of insects and spiders. **Evolution**, v. 52, n. 2, p. 415-431, 1998.
- EDWARDS, G. C.; BRAUN, R. P.; WYATT, G. R. Induction of vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* by the juvenile hormone analog, pyriproxyfen. **Journal of Insect Physiology**, v. 39, n. 7, p. 609-614, 1993.
- EDWARDS, J. P.; WEAVER, R. J.; MARRIS, G. C. Endocrine changes in lepidopteran larvae: potential challenges to parasitoid development and survival. In: EDWARDS, J. P.; WEAVER, R.J. (Eds.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd., 2001. p. 1-32.
- ELEWA, A. M. T. **Morphometrics for nonmorphometricians**. Berlin: Springer, 2010. 367p.
- EL-SHAZLY, M. M.; REFAIE, B. M. Larvicidal effect of the juvenile hormone mimic pyriproxyfen on *Culex pipiens*. **Journal of American Mosquito Control Association**, v. 18, p. 321-328, 2002.
- EL-SHEIKH, E. A.; KAMITA, S. G.; HAMMOCK, B. D. Effects of juvenile hormone (JH) analog insecticides on larval development and JH esterase activity in two spodopterans. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 128, p. 30-36, 2016.
- ESQUIVEL, J. F. Stages of gonadal development of the southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae): improved visualization. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, n. 2, p. 303-309, 2009.
- EVANS, R.G.; SUNLEY, A.; BRADFORD, C.; PATMORE, R. I. Effects of fenoxycarb on development and reproduction of the oriental cockroach, *Blattaoientalis*. **Medical Veterinary Entomology**, v. 9, p. 235-240, 1995.
- EVENDEN, M. L.; ARMITAGE, G.; LAU, R. Effects of nutrition and methoprene treatment upon reproductive diapause in *Caloptilia fraxinella* (Lepidoptera: Gracillariidae). **Physiological Entomology**, v. 32, p. 275-282, 2007.
- FAIRBAIRN, D. J. Allometry for sexual size dimorphism: pattern and process in the coevolution of body size in males and females. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 28, n. 1, p. 659-687, 1997.
- FARRAR JR, R. R.; BARBOUR, J. D.; KENNEDY, G. G. Quantifying food consumption and growth in insects. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, MD, v. 82, n. 5, p. 593-598, 1989.
- FEARNSIDE, P. M. Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. **Environmental Conservation**, v. 28, n. 1, p. 23-28, 2001.

- FERNANDEZ, G. C. J. Residual analysis and data transformations: important tools in statistical analysis. **HortScience**, v. 27, n. 4, p. 297-300, 1992.
- FLATT, T.; KAWECKI, T. J. Juvenile hormone as a regulator of the trade-off between reproduction and life span in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v. 61, n. 8, p. 1980-1991, 2007.
- FONSECA, A. P. P.; MARQUES, E. J.; TORRES, J. B.; SILVA, L. M.; SIQUEIRA, H. A. A. Lethal and sublethal effects of lufenuron on sugarcane borer *Diatraea flavipennella* and its parasitoid *Cotesia flavipes*. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 9, p. 1869-1879, 2015.
- FORGACS, Z.; MASSÁNYI, P.; LUKAC, N.; SOMOSY, Z. Reproductive toxicology of nickel—review. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 47, n. 9, p. 1249-1260, 2012.
- FORTES, P.; SALVADOR, G.; CÔNSOLI, F. L. Ovary development and maturation in *Nezaraviridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 1, p. 89-96, 2011.
- FOUNTAIN, M. T.; BROWN, V. K.; GANGE, A. C.; SYMONDSON, W. O.; MURRAY, P. J. The effects of the insecticide chlorpyrifos on spider and Collembola communities. **Pedobiologia**, v. 51, n. 2, p. 147-158, 2007.
- FRY, C. L. Juvenile hormone mediates a trade-off between primary and secondary sexual traits in stalk-eyed flies. **Evolution & Development**, v. 8, n. 2, p. 191-201, 2006.
- FUKUDA, J.; KAWA, K. Permeation of manganese, cadmium, zinc, and beryllium through calcium channels of an insect muscle membrane. **Science**, v. 196, n. 4287, p. 309-311, 1977.
- FUTUYMA, D. J. **Evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 604p.
- GÄDE, G.; AUERSWALD, L. Beetles' choice—proline for energy output: control by AKHs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 132, n. 1, p. 117-129, 2002.
- GÄDE, G.; AUERSWALD, L. Flight substrates and their regulation by a member of the AKH/RPCH family of neuropeptides in Cerambycidae. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 1575-1584, 2000.
- GÄDE, G.; AUERSWALD, L.; PREDEL, R.; MARCO, H. G. Substrate usage and its regulation during flight and swimming in the backswimmer, *Notonecta glauca*. **Physiological Entomology**, v. 29, p. 84-93, 2004.
- GÄDE, G.; MARCO, H. G. AKH/RPCH peptides. In: KASTIN, A. J. (Ed.). **Handbook of biologically active peptides: Invertebrate peptides**, 2 Ed., San Diego: Elsevier Academic Press, 2013. p. 185-190.
- GÄDE, G.; MARCO, H. G. Flight-related metabolism and its regulatory peptides in the spittle bug *Locris arithmetica* (Cicadomorpha: Cercopidae) and the stink bugs *Nezaraviridula* (Heteroptera: Pentatomidae) and *Encosternum delegorguei* (Heteroptera: Tessaratomidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 1134-1144, 2009.
- GÄDE, G.; MARCO, H. G. Structure, function and mode of action of select arthropod neuropeptides. In: RAHMAN, A. (Ed.). **Studies in natural products chemistry**, v. 33, Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 69-139.
- GÄDE, G.; HOFFMANN, K. H.; SPRING, J. H. Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p. 963-1032, 1997.

GÄDE, G. Peptides of the adipokinetic hormone/red pigment concentrating hormone family—a new take on biodiversity. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1163, 2009. p. 125–136.

GÄDE, G. Sexual dimorphism in the pyrgomorphid grasshopper *Phymateus morbillos*: from wing morphometry and flight behaviour to flight physiology and endocrinology. **Physiological Entomology**, v. 27, n. 1, p. 51-57, 2002.

GÄDE, G.; ŠIMEK, D.; MARCO, H. G. The African froghopper *Ptyelus flavescens* (suborder: Cicadomorpha) contains two novel and one known peptides of the adipokinetic hormone (AKH) family: structure, function and comparison with aphid AKH (suborder: Sternorrhyncha). **Amino Acids**, v. 49, n. 10, p. 1679-1690, 2017.

GHASEMI, A.; SENDI, J.; GHADAMYARI, M. Physiological and biochemical effect of pyriproxyfen on Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 4, p. 416-422, 2010.

GIRARDIE, J.; BOUREME, D.; COUILLAUD, F.; TAMARELLE, M.; GIRARDIE, A. Anti-juvenile effect of neuroparsin A, a neuroprotein isolated from locust corpora cardiaca. **Insect Biochemistry**, v. 17, n. 7, p. 977-983, 1987.

GIJBELS, M.; LENAERTS, C.; BROECK, J. V.; MARCHAL, E. Juvenile hormone receptor Met is essential for ovarian maturation in the Desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Scientific Reports**, v. 9, p. 10797, 2019.

GOMES, E. C.; HAYASHIDA, R.; BUENO, A. F. *Dichelops melacanthus* and *Euschistus heros* injury on maize: Basis for re-evaluating stink bug thresholds for IPM decisions. **Crop Protection**, v. 130, p. 105050, 2020.

GOODMAN, W. G.; CUSSON, M. The juvenile hormones. In: GILBERT, L. I. (Ed.). **Insect endocrinology**, London: Academic Press, 2011. p. 310-365.

GOULSON, D. Pesticides, corporate irresponsibility, and the fate of our planet. **One Earth**, Maryland Heights, MO, v. 2, n. 4, p. 302-305, 2020.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The insects: an outline in entomology**. 5 ed. Oxford: Willey Blackwell, 2014. 632 p.

GUERRERO, A.; ROSELL, G. Biorational approaches for insect control by enzymatic inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 461-469, 2005.

GUO, W.; WU, Z.; SONG, J.; JIANG, F.; WANG, Z.; DENG, S.; WALKER, V.; ZHOU, S. Juvenile hormone-receptor complex acts on *Mcm4* and *Mcm7* to promote polyploidy and vitellogenesis in the migratory locust. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 10, e1004702, 2014.

GURAYA, S. S. The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis. **International Review of Cytology**, v. 160, p. 163-220, 1995.

HADDI, K.; MENDES, M. V.; BARCELLOS, M. S.; LINO-NETO, J.; FREITAS, H. L.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Sexual success after stress? Imidacloprid-induced hormesis in males of the neotropical stink bug *Euschistus heros*. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0156616, 2016.

HAHN, S.; KUNERT, G. Short-term consequences of nutritional depression on foraging behaviour of dark bush-crickets *Pholidoptera griseoaptera* (Orthoptera: Ensifera). **European Journal of Entomology**, v. 103, n. 1, p. 249-253, 2006.

HARTFELDER, R. Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, SP, v. 33, p. 157-177, 2000.

- HASS, J. K.; CASSIAS, K. A.; WOODHEAD, A. P.; STAY, B. The effect of ovary implants on juvenile hormone production by *corpora allata* of male *Diploptera punctata*. **Journal of Insect Science**, v. 3, n. 1, p. 30, 2003.
- HAWTHORNE, D. J. Ecological history and evolution in a novel environment: habitat heterogeneity and insect adaptation to a new host plant. **Evolution**, v. 51, n. 1, p. 153-162, 1997.
- HOLTZ, T.; KAMMINGA, K. Qualitative analysis of the pest risk potential of the brown marmorated stink bug (BMSB), *Halyomorpha halys* (Stål), in the United States. USDA APHIS PQ, 2010. Disponível em: http://www.michigan.gov/documents/mda/BMSB_Pest_Risk_Potential_USDA_APHIS_Nov_2011_344862_7.pdf. Acesso em 14/06/2017.
- HORI, K. Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera. In: SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R. (Eds.). **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 11-35
- HOROWITZ, A. R.; ELLSWORTH, P. C.; ISHAAYA, I. Biorational pest control – an overview. In: ISHAAYA, I.; HOROWITZ, A. R. **Biorational control of arthropod pests: application and resistance management**. Dordrecht: Springer, 2009, p. 1-20.
- HOROWITZ, A. R.; KONTSEDALOV, S.; KHASDAN, V.; ISHAAYA, I. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 58, n. 4, p. 216-225, 2005.
- HOSKINS, W. M.; BORDEN, A. D.; MICHELbacher, A. E. Recommendations for a more discriminating use of insecticides. **Proceedings of the 6th Pacific Science Congress**. 5 Ed. Berkeley: University of California Press, 1939. p. 119-123.
- HUA, H.; GEORGIEV, O.; SCHAFFNER, W.; STEIGER, D. Human copper transporter Ctr1 is functional in *Drosophila*, revealing a high degree of conservation between mammals and insects. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 107, 2010.
- HUEBNER, E.; DIEHL-JONES, W. Nurse cell–oocyte interaction in the telotrophic ovary. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 22, p. 369–387, 1993.
- ISHAAYA, I.; KONTSEDALOV, S.; HOROWITZ, A. R. Biorational insecticides: Mechanism and cross-resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 58, n. 4, p. 192-199, 2005.
- JACOB, M. *In vitro* spermatogenesis in *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera, Scarabaeidae)- the role of ecdysone and juvenile hormone. **Zoological Science**, v. 9, n. 2, p. 457-461, 1992.
- JAFFE, H.; RAINA, A. K.; RILEY, C. T.; FRASER, B. A.; BIRD, T. G.; TSENG, C. M.; ZHANG, Y. S.; HAYES, D. K. Isolation and primary structure of a neuropeptide hormone from *Heliothis zea* with hypertrehalosemic and adipokinetic activities. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 155, n. 1, p. 344-350, 1988.
- JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; ELBERT, A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2897-2908, 2011.
- JEYASINGH, P. D.; GOOS, J. M.; THOMPSON, S. K.; GODWIN, C. M.; COTNER, J. B. Ecological stoichiometry beyond redfield: an ionic perspective on elemental homeostasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 722, 2017.

- JINDRA, M.; UHLIROVA, M., CHARLES, J. P., SMYKAL, V., HILL, R. J. Genetic evidence for function of the bHLH-PAS protein Gce/Met as a juvenile hormone receptor. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 7, p. e1005394, 2015.
- JOHNSON, E. L. Pesticide regulation, pest management and mosquito control. **Mosquito News**, Aliso Viejo, CA, v. 39, n. 4, p. 731-736, 1979.
- JOHNSON, M. K.; SMITH, A. D. Iron–sulfur proteins. In: KING, R. B. (Ed.). **Encyclopedia of inorganic chemistry**, 2 Ed., Chichester: John Wiley & Sons, 2005. p. 2298-2328.
- JONES, C. M.; PARRY, H.; TAY, W. T.; REYNOLDS, D. R.; CHAPMAN, J. W. Movement ecology of pest *Helicoverpa*: implications for ongoing spread. **Annual Review of Entomology**, v. 64, p. 277-295, 2019.
- JUDY, K. J.; SCHOOLEY, D. A.; DUNHAM, L. L.; HALL, M. S.; BERGOT, B. J.; SIDDALL, J. B. Isolation, structure, and absolute configuration of a new natural insect juvenile-hormone from *Manduca sexta* - (organ culture corpora-allata high-resolution liquid chromatography tobacco hornworm). **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 70, p. 1509–1513, 1973.
- KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soil and plants**. 4 Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011. 505 p.
- KAUR, K.; CHANDI, A. K. Physiological influences of pyriproxyfen on economically important insect pests. **Ecological Perspectives**, n. 43, p. 686-691, 2016.
- KHATER, H. F. Ecosmart biorational insecticides: Alternative insect control strategies. In: PERVEEN, F. (Ed.). **Insecticides – Advances in integrated pest management**, Rijeka: InTech, 2011. p. 17-60.
- KING, R. C.; CASSIDY, J. D.; ROUSSET, A. The formation of clones of interconnected cells during gametogenesis in insects. In: KING, R. C.; AKAI, H. (Eds.). **Insect ultrastructure**, v. 1, New York: Springer Science+Business Media, 1982. p. 3-31.
- KLINGENBERG, C. P.; MONTEIRO, L. R. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. **Systematic Biology**, v. 54, n. 4, p. 678-688, 2005.
- KLINGENBERG, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 2, p. 353-357, 2011.
- KLINGENBERG, C. P. Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: tools for evaluating *a priori* hypotheses. **Evolution & Development**, Malden, MA, v. 11, n. 4, p. 405-421, 2009.
- KLOCKENKÄMPER, R.; VON BOHLEN, A. Total-reflection X-ray fluorescence analysis and related methods. 2 Ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2015. 520p.
- KLOWDEN, M. J. **Physiological systems in insects**. 3 ed. London: Elsevier Academic Press, 2013. 682 p.
- KODRÍK, D.; MARCO, H. G.; ŠIMEK, P.; SOCHA, R.; ŠTYS, P.; GÄDE, G. The adipokinetic hormones of Heteroptera: a comparative study. **Physiological Entomology**, v. 35, p. 117-127, 2010.
- KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 243-270, 1998.

- KOTAKI, T.; KAIHARA, K.; ANDO, Y.; MISAKI, K.; SHINADA, T. Oosorption in the stink bug *Plautiastali*: role of juvenile hormone in the induction of oosorption. **Physiological Entomology**, v. 41, n. 2, p. 127-131, 2016.
- KOZLOV, M. V.; HAUKIOJA, E.; KOVNATSKY, E. F. Uptake and excretion of nickel and copper by leaf-mining larvae of *Eriocraniase mipurplella* (Lepidoptera: Eriocraniidae) feeding on contaminated birch foliage. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 303–310, 2000.
- KRAUSHAAR, U.; BLANCKENHORN, W. U. Population variation in sexual selection and its effect on size allometry in two dung fly species with contrasting sexual size dimorphism. **Evolution**, v. 56, n. 2, p. 307-321, 2002.
- LEBANDEIRA, C. C. The origin of herbivory on land: initial patterns of plant tissue consumption by arthropods. **Insect Science**, v. 14, p. 259-275, 2007.
- LEBANDEIRA, C. C.; TREMBLAY, S. L.; BARTOWSKI, K. E.; HERNICK, L. V. Middle Devonian liverwort herbivory and antiherbivory defence. **New Phytologist**, v. 202, p. 247-258, 2014.
- LEE, C. Y. Sublethal effects of insecticides on longevity, fecundity and behaviour of insect pests: a review. **Journal of Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 107-112, 2000.
- LENAERTS, C.; MARCHAL, E.; PEETERS, P.; BROECK, J. V. The ecdysone receptor complex is essential for the reproductive success in the female desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.
- LENAERTS, C.; VAN WIELENDAELE, P.; PEETERS, P.; BROECK, J. V.; MARCHAL, E. Ecdysteroid signaling components in metamorphosis and development of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 75, p. 10-23, 2016.
- LORENZ, C.; ALMEIDA, F.; ALMEIDA-LOPES, F.; LOUISE, C.; PEREIRA, S. N.; PETERSEN, V.; VIDAL, P. O.; VIRGINIO, F.; SUESDEK, L. Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 54, p. 205-215, 2017.
- LORENZ, C. **Emprego de técnicas morfométricas, espectrometria MALDI-TOF e sequenciamento genético para classificação e filogenia de Culicidae (Diptera)**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 148p.
- LI, K.; JIA, Q.; LI, S. Juvenile hormone signaling—a mini review. **Insect Science**, v. 26, n. 4, p. 600-606, 2019.
- LIU, T.; STANSLY, P. A. Toxicity and repellency of some biorational insecticides to *Bemisia argentifolii* on tomato plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 74, n. 2, p. 137-143, 1995.
- LU, K.; CHEN, X.; LIU, W. T.; ZHANG, X. Y.; CHEN, M. X.; ZHOU, Q. Nutritional signaling regulates vitellogenin synthesis and egg development through juvenile hormone in *Nilaparvatalugens* (Stål). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 269, 2016.
- LUO, W.; VEERAN, S.; WANG, J.; LI, S.; LI, K.; LIU, S. N. Dual roles of juvenile hormone signaling during early oogenesis in *Drosophila*. **Insect Science**, v. 27, n. 4, p. 665-674, 2020.
- LYNCH, J. A.; ROTH, S. The evolution of dorsal–ventral patterning mechanisms in insects. **Genes & Development**, v. 25, n. 2, p. 107-118, 2011.
- MABUBU, J. I.; NAWAZ, M.; CAI, W.; ZHAO, J.; HE, Y.; HUA, H. Ecotoxicity of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiacloprid to the soil-dwelling arthropod

- Folsomia candida* (Collembola). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 90, n. 4, p. 323-333, 2017.
- MANABOON, M.; YASANGA, T.; SAKURAI, S.; SINGTRIPOP, T. Programmed cell death of larval tissues induced by juvenile hormone in the bamboo borer, *Omphisafuscidentalis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 9, p. 1202-1208, 2012.
- MANTUANO, A.; PICKLER, A.; BARROSO, R. C.; ALMEIDA, A. P.; BRAZ, D.; CARDOSO, S. C.; GONZALEZ, M. S.; FIGUEIREDO, M. B.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Elemental changes in hemolymph and urine of *Rhodniusprolixus* induced by in-vivo exposure to mercury: A study using synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta part B**, v. 71, p. 127-130, 2012.
- MARCO, H. G.; GÄDE, G. Adipokinetic hormone: a hormone for all seasons? In: SALEUDDIN, S.; LANGE, A. B.; ORCHARD, I. (Eds.). **Advances in invertebrate (neuro)physiology: a collection of reviews in the Post-genomic Era**, v. 2, Burlington: Apple Academic Press Inc., 2020. p. 129-175.
- MARCO, H. G.; GÄDE, G. Structure and function of adipokinetic hormones of the large white butterfly *Pieris brassicae*. **Physiological Entomology**, v. 42, n. 2, p. 103-112, 2017.
- MARCO, H. G.; ŠIMEK, P.; GÄDE, G. The first decapeptide adipokinetic hormone (AKH) in Heteroptera: a novel AKH from a South African saucer bug, *Laccocoris purpureus* (Naucoridae, Laccocorinae). **Peptides**, v. 32, p. 454-460, 2011.
- MARET, W. Zinc and zinc proteome. In BANCI, L. (Ed.). **Metallomics and the cell. Metal ions in life sciences**. v. 12. Dordrecht: Springer, 2013. p. 479-502.
- MARKLOVÁ, E. Microelements and inherited metabolic diseases. **Acta Medica**, v. 45, p. 129-133, 2002.
- MATSUMOTO, J. F. **Piriproxifem sobre parâmetros biológicos, histológicos dos testículos e flutuação populacional de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, 2020, 55 p.
- MATSUMURA, F. Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 2, p. 133-139, 2010.
- MCKINLEY-MCKEE, J. S.; WINBERG, J. O.; PETTERSSON, G. Mechanism of action of *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase. **Biochemistry International**, v. 25, n. 5, p. 879-885, 1991.
- MCPHERSON, J. E.; MCPHERSON, R. **Stink bugs of economic importance in America north of Mexico**. Boca Raton: CRC Press, 2000. 272p.
- MEDEIROS, L.; MEGIER, G. A. Ocorrência e desempenho de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) em plantas hospedeiras alternativas no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 459-463, 2009.
- MEINDL, G. A.; BAIN, D. J.; ASHMAN, T. Edaphic factors and plant-insect interactions: direct and indirect effects of serpentine soil on florivores and pollinators. **Oecologia**, v. 173, p. 1355-1366, 2013.
- MENN, J. J.; HENRICK, C. A. Rational and biorational design of pesticides. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, p. 57-71, 1981.

- MERZENDORFER, H. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. **Insect Science**, v. 20, n. 2, p. 121-138, 2013.
- METCALF, R. L. Insecticides in pest management. In: METCALF, R. L.; LUCKMANN, W. H. **Introduction to insect pest management**. 3 Ed. New York: Wiley-Interscience, 1994. p. 245-314.
- MEYER, A. S.; SCHNEIDE, H. A.; HANZMANN, E.; KO, J. H. The two Juvenile hormones from cecropia silk moth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 60, p. 853-858, 1968.
- MIGDAŁ, P.; ROMAN, A.; POPIELA-PLEBAN, E.; KOWALSKA-GÓRALSKA; OPALIŃSKI, S. The impact of selected pesticides on honey bees. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 27, n. 2, 2018.
- MILES, P. W. The saliva of Hemiptera. **Advances in Insect Physiology**, v. 9, p. 183-255, 1972.
- MINELLI, A.; FUSCO, G. No limits: Breaking constraints in insect miniaturization. **Arthropod Structure & Development**, v. 48, p. 4-11, 2019.
- MOKRY, L. E.; HOAGLAND, K. D. Acute toxicities of five synthetic pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 9, n. 8, p. 1045-1051, 1990.
- MORAES, M. C. B.; BORGES, M.; PAREJA, M.; VIEIRA, H. G.; SERENO, F. T. S.; LAUMANN, R. A. Food and humidity affect sex pheromone ratios in the stink bug, *Euschistus heros*. **Physiological Entomology**, v. 33, n. 1, p. 43-50, 2008.
- MORGAN, T. D.; BAKER, P.; KRAMER, K. J.; BASIBUYUK, H. H.; QUICKE, D. L. Metals in mandibles of stored product insects: do zinc and manganese enhance the ability of larvae to infest seeds? **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 1, p. 65-75, 2003.
- MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A. R. Diapausa e diferentes formas sazonal em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae) no norte do Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 2, p. 205-218, 2000.
- MUGUMBATE, G.; JACKSON, G. E.; VAN DER SPOEL, D. Open conformation of adipokinetic hormone receptor from the malaria mosquito facilitates hormone binding. **Peptides**, v. 32, n. 3, p. 553-559, 2011.
- MUTANEN, M.; PRETORIUS, E. Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. **Systematic Entomology**, v. 32, n. 2, p. 371-386, 2007.
- NAIR, M. M.; JACKSON, G. E.; GÄDE, G. Conformational study of insect adipokinetic hormones using NMR constrained molecular dynamics. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 15, n. 3, p. 259-270, 2001.
- NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; ZUCCHI, R. A. **Entomologia econômica**. Piracicaba: Esalq, 1981. 314p.
- NATION SR., J. L.; **Insect physiology and biochemistry**. 3 Ed. Boca Raton: CRC Press, 2016. 669 p.
- NÄSSEL, D. R.; ZANDAWALA, M. Recent advances in neuropeptide signaling in *Drosophila*, from genes to physiology and behavior. **Progress in Neurobiology**, 2019.

- NESTEL, D.; PAPADOPOULOS, N. T.; PASCACIO-VILLAFÁN, C.; RIGHINI, N.; ALTUZAR-MOLINA, A. R.; ALUJA, M. Resource allocation and compensation during development in holometabolous insects. **Journal of Insect Physiology**, v. 95, p. 78-88, 2016.
- NIELSEN, A. L.; SHEARER, P. W.; HAMILTON, G. C. Toxicity of insecticides to *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) using glass-vial bioassays. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, n. 4, p. 1439-1442, 2008.
- NORGATE, M.; LEE, E.; SOUTHON, A.; FARLOW, A.; BATTERHAM, P.; CAMAKARIS, J.; BURKE, R. Essential roles in development and pigmentation for the *Drosophila* copper transporter DmATP7. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 1, p. 475-484, 2006.
- NORIEGA, F. G. Juvenile hormone biosynthesis in insects: what is new, what do we know, and what questions remain? **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, n. 1, p. 1-16, 2014.
- NOUGADÈRE, A.; RENINGER, J. C.; VOLATIER, J. L.; LEBLANC, J. C. Chronic dietary risk characterization for pesticide residues: A ranking and scoring method integrating agricultural uses and food contamination data. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1484-1510, 2011.
- PALCI, A., LEE, M. S. Geometric morphometrics, homology and cladistics: review and recommendations. **Cladistics**, v. 35, n. 2, p. 230-242, 2019.
- PALLI, S. R. Recent advances in the mode of action of juvenile hormones and their analogues. In: ISHAAYA, I.; HOROWITZ, A. R. (Eds.). **Biorational control of arthropod pests: application and resistance management**, Dordrecht: Springer, 2009. p. 111-129.
- PANIZZI, A. R.; HIROSE, E. Seasonal body weight, lipid content, and impact of starvation and water stress on adult survivorship and longevity of *Nezaraviridula* and *Euschistus heros*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 76, n. 3, p. 247-253, 1995.
- PANIZZI, A. R.; LUCINI, T. Host plant-stink bug (Pentatomidae) relationships. In: ČOKL, A.; BORGES, M. (Eds.). **Stink Bugs: biorational control based on communication processes**. Boca Raton: CRC Press, 2017. p. 31-58.
- PANIZZI, A. R.; SILVA, F. A. C. Insetos sugadores de sementes (Heteroptera). In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 465-522.
- PARRA, J. R. P.; PANIZZI, A. R.; HADDAD, M. L. Nutritional indices for measuring insect food intake and utilization. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Insect bioecology and nutrition for Integrated Pest Management**. Boca Raton: CRC Press, 2012. p. 13-49.
- PARTHASARATHY, R.; TAN, A.; SUN, Z.; CHEN, Z.; RANKIN, M.; PALLI, S. R. Juvenile hormone regulation of male accessory gland activity in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Mechanisms of Development**, v. 126, n. 7, p. 563-579, 2009.
- PENCA, C.; HODGES, A. C. Pyriproxyfen treatment terminates *Halyomorpha halys* reproductive diapause, with an indirect mortality effect on its egg parasitoid *Trissolcus japonicus*. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 4, p. 1269-1276, 2017.
- PENER, M. P.; DHADIALLA, T. S. An overview of insect growth disruptors: applied aspects. **Advances in Insect Physiology**, v. 43, p. 1-162, 2012.
- PINHEIRO, D. O.; ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, O. L. A. D.; NASCIMENTO FILHO, V. F.; ALMEIDA, E.; CÔNSOLI, F. L. Inorganic elements in the fat bodies of *Diatraea saccharalis*

(Lepidoptera: Crambidae) larvae parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Comparative Biochemistry and Physiology part B**, v. 156, p. 273-278, 2010.

PINTO, L. Z.; BITONDI, M. M. G.; SIMÕES, Z. L.P. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 2, p. 153-160, 2000.

PISA, L. W.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; DOWNS, C. A.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; MCFIELD, M.; MORISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; SETTELE, J.; SIMON-DELISO, N.; STARK, J. D.; VAN DER SLUIJS, J. P.; VAN DYCK, H.; WIEMERS, M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68-102, 2015.

PIZZAMIGLIO-GUTIERREZ, M. A. Interações inseto-planta. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 211-250.

POELMAN, E. H.; DICKE, M. Plant-mediated interactions among insects within a community ecological perspective. In: VOELCKEL, C.; JANDER, G. (Eds.). **Annual plant reviews volume 47: Insect-plant interactions**. Oxford: Wiley Blackwell. 2014. p. 309-338.

PONDEVILLE, E.; MARIA, A.; JACQUES, J. C.; BOURGOIN, C.; DAUPHIN-VILLEMANT, C. *Anopheles gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 105, p. 19631-19636, 2008.

PROTASOVA, O. V.; MAKSIMOVA, I. A., BOTYIN, M. A., ZAKHAROVA, O. V., DOLETSKAYA, D. V. Morphological disintegration of biological fluids and tissues and the imbalance of macro- and microelements. **Human Physiology**, v. 33, p. 221-225, 2007.

R CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2020.

RAABE, M. Insect reproduction: regulation of successive steps. **Advances in Insect Physiology**, n. 19, p. 29-154, 1986.

RAIKHEL, A.; DHADIALLA, T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annual Review of Entomology**, n. 37, p. 217-251, 1992.

RAMASESHADRI, P.; FARKAŠ, R.; PALLI, S. R. Recent progress in juvenile hormone analogues (JHA) research. **Advances in Insect Physiology**, v. 43, p. 353-436, 2012.

RAUBENHEIMER, D.; JONES, S. A. Nutritional imbalance in an extreme generalist omnivore: tolerance and recovery through complementary food selection. **Animal Behaviour**, v. 71, n. 6, p. 1253-1262, 2006.

RAUBENHEIMER, D.; SIMPSON, S. J. The geometry of compensatory feeding in the locust. **Animal Behaviour**, v. 45, n. 5, p. 953-964, 1993.

RENSCH, B. Die Abhängigkeit der relativen Sexualdifferenz von der Körpergröße. **Bonner Zoologische Beiträge**, v. 1, p. 58-69, 1950.

RIGA, M.; DENECKE, S., LIVADARAS, I., GEIBEL, S., NAUEN, R., & VONTAS, J. Development of efficient RNAi in *Nezaraviridula* for use in insecticide target discovery. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 3, p. e21650, 2020.

- RIMOLDI, F.; SCHNEIDER, M. I.; RONCO, A. E. Susceptibility of *Chrysoperla externa* eggs (Neuroptera: Chrysopidae) to conventional and biorational insecticides. **Environmental Entomology**, v. 37, n. 5, p. 1252-1257, 2008.
- RIVERA-PÉREZ, C.; CLIFTON, M. E.; NORIEGA, F. G.; JINDRA, M. Juvenile hormone regulation and action. In: SALEUDDIN, S.; LANGE, A. B.; ORCHARD, I. (Eds.). **Advances in invertebrate (neuro)physiology: a collection of reviews in the Post-genomic Era**, v. 2, Burlington: Apple Academic Press Inc., 2020. p. 1-76.
- ROHLF, F. J. **Digitize landmarks & outlines from image files, scanner, or vídeo** - tpsDig2 v. 2.31, 2017. Disponível em: <https://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-dataacq.html>. Acesso em: 11/07/2020.
- ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 8, n. 4, p. 129-132, 1993.
- ROHLF, F. J. **Superimposition, image unwarping and averaging** – tpsSuper v. 2.05, 2018. Disponível em: <https://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-super.html>. Acesso em: 11/07/2020.
- RÖLLER, H.; DAHM, K. H.; SWEELY, C. C.; TROST, B. M. The structure of the juvenile hormone. **Angewandte Chemie International**, v. 6, n. 2, p. 179-180, 1967.
- ROOSE-RUNGE, E. C. **The process of spermatogenesis in animals**. Cambridge: Cambridge University Press, 1977. 214 p
- ROSELL, G.; QUERO, C.; COLL, J.; GUERRERO, A. Biorational insecticides in pest management. **Journal of Pesticide Science**, v. 33, n. 2, p. 103-121, 2008.
- ŞAHİN, G.; USKUN, E.; AY, R.; NAYIR, T. Determination of the residue levels of some commonly used organophosphorus pesticides in breast milk. **Ankara Medical Journal**, v. 17, n. 1, 2017.
- SALUSO, A.; XAVIER, L.; SILVA, F. A. C.; PANIZZI, A. R. An invasive pentatomid pest in Argentina: neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 6, p. 704-705, 2011.
- SÁNCHEZ-BAYO, F.; TENNEKES, H. A. Time-Cumulative Toxicity of Neonicotinoids: Experimental Evidence and Implications for Environmental Risk Assessments. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 5, p. 1629, 2020.
- SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological Conservation**, v. 232, p. 8-27, 2019.
- SANTOS, C. G.; HUMANN, F. C.; HARTFELDER, K. Juvenile hormone signaling in insect oogenesis. **Current Opinion in Insect Science**, v. 31, p. 43-48, 2019.
- SANTOS, M. F.; CAMPOS, M. R.; BRAVIM, J. N.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. C. Non-targeted insecticidal stress on the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Crop Protection**, v. 82, p. 10-16, 2016.
- SAULICH, A. K.; MUSOLIN, D. L. Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) from the temperate zone. **Entomological Review**, v. 92, n. 1, p. 1-26, 2012.
- SCHATZ, B.; SAUVION, N.; KJELLBERG, F.; A. NEL. Plant-insect interactions: a paleontological and an evolutionary perspective. In: SAUVION, N.; THIÉRY, D.; CALATAYUD, P. **Insect-plant interactions in a crop protection perspective**. Advances in Botanical Research, v. 81. London: Elsevier Academic Press, 2017. p. 1-24.

- SCHOWALTER, T. D. **Insect ecology**: an ecosystem approach. 4 Ed. London: Elsevier Academic Press, 2016. 762 p.
- SEDLAK, B. J.; MARCHIONE, L.; DEVORKIN, B.; DAVINO, R. Correlations between endocrine gland ultrastructure and hormone titers in the fifth larval instar of *Manduca sexta*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 52, n. 2, p. 291-310, 1983.
- SEIDELMANN, K.; HELBING, C.; GÖBELER, N.; WEINERT, H. Sequential oogenesis is controlled by an oviduct factor in the locusts *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*: Overcoming the doctrine that patency in follicle cells is induced by juvenile hormone. **Journal of Insect Physiology**, v. 90, p. 1-7, 2016.
- SENTHIL-NATHAN, S. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 359, 2013.
- SEZER, B.; OZALP, P. Effects of pyriproxyfen on hemocyte count and morphology of *Galleria mellonella*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, n. 2a, p. 621-625, 2015.
- SHARMA, A.; KUMAR, V.; KOHLI, S. K.; KAUR, R.; KAUR, T.; ARORA, S.; THUKRAL, A. K.; BHARDWAJ, R. Pesticide metabolism in plants, insects, soil microbes and fishes: An overview. In: SRIVASTAVA, P. K.; SINGH, V. P.; SINGH, A.; TRIPATHI, D. K.; SINGH, S.; PRASAD, S. M.; CHAUHAN, D. K. (Eds.). **Pesticides in crop production: Physiological and biochemical action**, Chichester, 2020. p. 35-54.
- SIAL, A. A.; BRUNNER, J; F. Lethal and sublethal effects of an insect growth regulator, pyriproxyfen, on obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 2, p. 340-347, 2010.
- SIEBERT, M. W.; LEONARD, B. R.; GABLE R. H.; LAMOTTE, L. R. Cotton boll age influences feeding preference by brown stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 82-87, 2005.
- SILVA, J. J. Flutuação populacional e dados de biológicos de *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) em plantas hospedeiras. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, 2009, 51 p.
- SIMMONS, L. W. Sexual selection and genital evolution. **Austral Entomology**, v. 53, n. 1, p. 1-17, 2014.
- SLÁMA, K. Insect hormones and antihormones in plants. In: ROSENTHAL, G. A.; JANZEN, J. H. (Eds.) **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. New York: Academic Press, 1979. p. 683-700.
- SMITH, W.; RYBCZYNSKI, R. Prothoracicotropic hormone. In: GILBERT, L. I. (Ed.). **Insect endocrinology**, London: Academic Press, 2011. p. 1-62.
- SMYKAL, V.; BAJGAR, A.; PROVAZNIK, J.; FEXOVA, S.; BURICOVA, M.; TAKAKI, K.; HODKOVA, M.; JINDRA, M.; DOLEZEL, D. Juvenile hormone signaling during reproduction and development of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, p. 69-76, 2014.
- SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology**. Ithaca: Cornell University Press, 1998. 667p.
- SOARES, P. L.; CORDEIRO, E. M.; SANTOS, F. N.; OMOTO, C.; CORREA, A. S. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

- SOLOMON, E. I.; GEWIRTH, A. A.; COHEN, S. L. Spectroscopic studies of active sites. blue copper and electronic structural analogs. **ACS Symposium Series**, v. 307, p. 236–266, 1986.
- SORIA, M. F.; DEGRANDE, P. E.; PANIZZI, A. R.; TOEWS, M. D. Economic injury level of the neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) on cotton plants. **Neotropical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 324-335, 2017.
- 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. F.; HIROSE, E.; ROGGIA, S. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Brasília: Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E), 2014. 102p.
- SOSA-GOMEZ, D. R.; DELPIN, K. E.; ALMEIDA, A. M.; HIROSE, E. Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 2, p. 179-187, 2004.
- SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, J. J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 7, p. 767-769, 2010.
- SOUZA, H. V.; ITOYAMA, M. M. Comparative study of spermatogenesis and nucleolar behavior in testicular lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Psyche**, v. 2010, n. 428673, 2010.
- SPARKS, T. C.; CROSSWAITH, A. J.; NAUEN, R.; BANBA, S.; CORDOVA, D.; EARLEY, F.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; FUJIOKA, S.; HIRAO, A.; KARMON, D.; KENNEDY, R.; NAKAO, T.; POPHAM, H. J. R.; SALGADO, V.; WATSON, G. B.; WEDEL, B. J.; WESSELS, F. J. Insecticides, biologics and nematicides: Updates to IRAC's mode of action classification—a tool for resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 104587, 2020.
- STAMPS, J. A. Sexual size dimorphism in species with asymptotic growth after maturity. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 50, n. 2, p. 123-145, 1993.
- STERN, V. M.; SMITH, R. F.; VAN DEN BOSCH, R.; HAGEN, K. S. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: the integrated control concept. **Hilgardia**, v. 29, n. 2, p. 81-101, 1959.
- SUN, H.; WU, W.; GUO, J.; XIAO, R.; JIANG, R.; ZHENG, L.; ZHANG, G. Effects of nickel exposure on testicular function, oxidative stress, and male reproductive dysfunction in *Spodoptera litura* Fabricius. **Chemosphere**, v. 148, p. 178-187, 2016.
- SWANSON, E. M.; ESPESET, A.; MIKATI, I.; BOLDUC, I.; KULHANEK, R.; WHITE, W. A.; KENZIE, S.; SNELL-ROOD, E. C. Nutrition shapes life-history evolution across species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1834, p. 20152764, 2016.
- TANG, X.; ZHOU, B. Iron homeostasis in insects: insights from *Drosophila* studies. **IUBMB Life**, Philadelphia, PA, v. 65, n. 10, p. 863-872, 2013.
- TANG, Y.; HU, L.; HONG, G.; ZHONG, D.; SONG, J.; ZHAO, G.; LU, Z. Diagnostic value of complete blood count in Paraquat and organophosphorus poisoning patients. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 7, p. 439-447, 2018.

- TATSUTA, H.; TAKAHASHI, K. H.; SAKAMAKI, Y. Geometric morphometrics in entomology: Basics and applications. **Entomological Science**, v. 21, n. 2, p. 164-184, 2018.
- TAY, J. W.; LEE, C. Y. Influences of pyriproxyfen on fecundity and reproduction of the Pharaoh ant (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 3, p. 1216-1223, 2014.
- TEDER, T.; TAMMARU, T. Sexual size dimorphism within species increases with body size in insects. **Oikos**, v. 108, n. 2, p. 321-334, 2005.
- TODD, J. W.; HERZOG, D. C. Sampling phytophagous Pentatomidae on soybean. In: KOGAN, M.; HERZOG, D. C. (Eds.). **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer-Verlag, 1980. p. 438-478.
- TONG, L.; NIEH, J. C.; TOSI, S. Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation. **Chemosphere**, v. 237, p. 124408, 2019.
- TORRES, J. B.; BOYD, D. W. Zoophytophagy in predatory Hemiptera. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1199-1208, 2009.
- TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. 2 Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 766p.
- TRUMAN, J. W. Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. **Journal of Neurobiology**, v. 21, n. 7, p. 1072-1084, 1990.
- TUFAIL, M.; NAGABA, Y.; ELGENDY, A. M.; TAKEDA, M. Regulation of vitellogenin genes in insects. **Entomological Science**, v. 17, n. 3, p. 269-282, 2014.
- TURNER, A. J.; ISAAC, R. E.; COATES, D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. **BioEssays**, v. 23, n. 3, p. 261-269, 2001.
- UPADHAYAY, J.; RANA, M.; JUYAL, V.; BISHT, S. S.; JOSHI, R. Impact of pesticide exposure and associated health effects. In: SRIVASTAVA, P. K.; SINGH, V. P.; SINGH, A.; TRIPATHI, D. K.; SINGH, S.; PRASAD, S. M.; CHAUHAN, D. K. (Eds.). **Pesticides in crop production: Physiological and biochemical action**, Chichester, 2020. p. 69-88.
- VAN DER HORST, D. J.; VAN DOORN, J. M.; BEENAKKERS, A. M. Dynamics in the haemolymph trehalose pool during flight of the locust, *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry**, v. 8, n. 6, p. 413-416, 1978.
- VAN HANDEL, E. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 1, n. 3, p. 299-301, 1985a.
- VAN HANDEL, E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 1, n. 3, p. 302-304, 1985b.
- VAN LENTEREN, J. C. Fundamental knowledge about insect reproduction: essential to develop sustainable pest management. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 36, n. 1-3, p. 1-15, 1999.
- VAN WIELENDAELE, P.; BADISCO, L.; BROECK, J. V. Neuropeptidergic regulation of reproduction in insects. **General and Comparative Endocrinology**, v. 188, p. 23-34, 2013.
- VENNARD, C.; NGUAMA, B.; DILLON, R. J.; OOUCHI, H.; CHARNLEY, A. K. Effects of the juvenile hormone mimic pyriproxyfen on egg development, embryogenesis, larval development, and metamorphosis in the desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 1, p. 41-49, 1998.

- VEST, K. E.; HASHEMI, H. F.; COBINE, P. A. The copper metallome in eukaryotic cells. In BANCI, L. (Ed.). **Metallomics and the cell: metal ions in life sciences**. v. 12. Dordrecht: Springer, 2013. p. 451-478.
- VIEIRA, S. S.; BOFF, M. I. C.; BUENO, A. F.; GOBBI, A. L.; LOBO, R. V.; BUENO, R. C. O. F. Efeitos dos inseticidas utilizados no controle de *Bemisiatabaci*(Gennadius) biótipo B e sua seletividade aos inimigos naturais na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1809-1818, 2012.
- WATANABE, M. A. On some biological parameters of insects aiming their utilization in biological control. **Ecossistema**, v. 26, n. 1, p. 82-85, 2001.
- WATANABE, T.; BROADLEY, M. R.; JANSEN, S.; WHITE, P. J.; TAKADA, J.; SATAKE, K.; TAKAMATSU, T.; TUAH, S. J.; OSAKI, M. Evolutionary control of leaf element composition in plants. **New Phytologist**, v. 174, n. 3, p. 516-523, 2007.
- WILLIAMS, C. M. Third-generation pesticides. **Scientific American**, v. 217, p. 13-17, 1967.
- WITTMAYER, J. L.; COUDRON, T. A.; ADAMS, T. S. Ovarian development, fertility and fecundity in *Podisus maculiventris* Say (Heteroptera: Pentatomidae): an analysis of the impact of nymphal, adult, male and female nutritional source on reproduction. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 39, n. 1, p. 9-20, 2001.
- YI, S. X.; ADAMS, T. S. Effect of pyriproxyfen and photoperiod on free amino acid concentrations and proteins in the hemolymph of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 10, p. 1341-1353, 2000.
- XU, Q.; TANG, B.; ZOU, Q.; ZHENG, H.; LIU, X.; WANG, S. Effects of pyriproxyfen on female reproduction in the common cutworm, *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS one**, v. 10, n. 10, p. e0138171, 2015.
- ZERA, A. J.; BOTTSFORD, J. The endocrine-genetic basis of life-history variation: the relationship between the ecdysteroid titer and morph-specific reproduction in the wing-polymorphic cricket *Gryllus firmus*. **Evolution**, v. 55, n. 3, p. 538-549, 2001.
- ZHANG, L.; KASAI, S.; SHONO, T. *In vitro* metabolism of pyriproxyfen by microsomes from susceptible and resistant housefly larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 37, n. 3, p. 215-224, 1998.
- ZIBAE, A.; ZIBAE, I.; SENDI, J. J. A juvenile hormone analog, pyriproxyfen, affects some biochemical components in the hemolymph and fat bodies of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 3, p. 289-298, 2011.