Instituto de Biociências

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos subletais e transgeracionais do Sulfoxaflor no inseto não alvo *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae)

.

AIME GIOVANNA PEREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Carvalho Dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Elton Luiz Scudeler

BOTUCATU - SP
2022

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

Instituto de Biociências

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

PG-BGA

AIME GIOVANNA PEREIRA

Efeitos subletais e transgeracionais do Sulfoxaflor no inseto não alvo *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae)

Dissertação (mestrado) apresentada a Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada.

BOTUCATU - SP
2022

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pereira, Aime Giovanna.
Efeitos subletais e transgeracionais do Sulfoxaflor no inseto não alvo *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae) / Aime Giovanna Pereira. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Daniela Carvalho dos Santos
Coorientador: Elton Luiz Scudeler
Capes: 20601000

1. Praguicidas. 2. Toxicidade. 3. Intestinos. 4. Túbulos de Malpighi.

Palavras-chave: Intestino; Sulfoxaflor; Toxicidade; Transgeracional; Túbulos-de-Malpighi.

Dedicatória

Dedico esse trabalho ao Rafael, não há um dia em que eu não lembre de você.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, que foi meu maior apoio e acalento nos últimos anos.

A minha família, meu pai Elson, meu padrasto Romeu, minha madrasta Carolina e a minha irmã Brenda, por entenderem minha agenda apertada a minha ausência e ainda assim me apoiaram. Um agradecimento em especial para minha mãe Neidi, por tudo que fez e faz por mim desde sempre, a minha maior saudade e o meu maior amor, hoje e sempre.

Ao meu namorado Iago, meu melhor amigo, companheiro de vida, histórias e conversas filosóficas.

Professora Dra. Daniela, por esses três anos de parceria, por me receber em seu laboratório e por toda ajuda.

Professor Dr. Elton, por todo apoio, aprendizado nesses três anos, me tornei uma profissional melhor por ter te conhecido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.666620/2022-00.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica e seus funcionários, Claudete, Luciana, Maria Helena, Shelly e Tiago, por toda ajuda e disponibilidade para término dos meus experimentos.

Aos amigos e professores de graduação da UFSCar Sorocaba, que com toda certeza me ajudaram a chegar aqui e a me tornar quem eu sou. Em especial a minha amiga Joara, minha companheira.

Aos amigos de Sorocaba, Isabela e Vitor, os melhores amigos que poderia ter.

Aos amigos que fiz em Botucatu, que ajudaram na minha jornada: Ana Silvia, por dividir as horas dentro do laboratório, por toda ajuda mesmo que meio a pandemia. Matheus e Nathalia, por todo carinho e amor que me receberam. Aos outros amigos que também me ajudaram de alguma maneira.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, e os funcionários da Pós-Graduação, ao CEATOX, ao IB de maneira geral por todo serviço prestado.

"Tive tempo de refletir um pouco sobre como é importante ter os olhos bem abertos para tudo, mas que não existe nada mais importante do que estar na companhia de alguém que a gente ama." – O dia do curinga.

Sumário

1. Introdução 8
2. Objetivo 15
3. Referências Bibliográficas 16
4. Resultados 22
4.1 CAPÍTULO 1 23
4.1.1 Introdução 25
4.1.2 Material e Métodos 28
4.1.3 Resultados 32
4.1.4 Discussão 35
4.1.5 Referencias 40
5. Lista de Tabelas 47
6. Lista de Imagens 49
7. Conclusão 55

Resumo

A espécie *Ceraeochrysa claveri* é um importante predador polífago na sua fase larval, atuando em diferentes agroecossistemas, o que o torna um potente aliado dos produtores agrícolas no combate a insetos pragas. Porém, o uso de novas moléculas inseticidas pode prejudicar as fases de desenvolvimento ou comprometer as funções metabólicas de inimigos naturais, necessários para o controle natural de pragas. Inseticidas a base de sulfoxaflor como princípio ativo estão se tornando populares entre os agricultores por possuir um amplo espectro de eficácia contra pragas, sendo utilizado em agroecossistemas que também acomodam *C. claveri*. Com o propósito de avaliar os efeitos do sulfoxaflor em *C. claveri*, posturas de ovos de *Diatraea saccharalis* foram tratadas com soluções contendo sulfoxaflor (formulação comercial Verter SC®), nas concentrações correspondendo a 10, 30 e 50% da CL50 e posteriormente oferecidas *ad libitum* para larvas de primeiro instar de *C. claveri* durante 10 dias. Após esta exposição por ingestão, o mesêntero (intestino médio) e os túbulos de Malpighi das larvas foram coletados para análise morfológica (histológica e ultraestrutural). Adultos (Geração F0) que foram submetidos aos tratamentos quando larva, foram sexados e separados em casais para avaliarmos parâmetros biológicos, como longevidade dos adultos, fertilidade e fecundidade, período de pré-oviposição e ovoposição, mortalidade e duração das fases do ciclo de vida, os dados foram utilizados para análise estatística. Larvas (Geração F1) oriundas do cruzamento de F0 foram acompanhadas durante todo seu ciclo de vida para avaliação de possíveis efeitos transgeracionais na progênie, parâmetros biológicos como mortalidade e duração das fases do ciclo de vida foram avaliados diariamente. Os resultados obtidos indicaram alterações morfológicas nas células dos órgãos investigados, assim como algumas diferenças estatísticas significativas dos grupos experimentais em relação ao controle, tanto na geração F0 quanto na geração F1. Foram identificadas diferenças estatísticas na fecundidade e fertilidade dos insetos da geração F0 e no ciclo de vida das larvas da geração F0 e da F1. As células do epitélio intestinal e dos túbulos de Malpighi dos grupos experimentais apresentaram grande vacuolização citoplasmática e aumento da atividade autofágica. Nas células do mesêntero, protusões citoplasmáticas apicais e descolamento/espaçamento basal em relação à membrana basal também foram detectadas, além da presença de grande quantidade de grânulos de cálcio nas células dos órgãos dos grupos experimentais, principalmente nas células epiteliais dos túbulos de Malpighi, o que pode estar relacionado ao papel deste íon no aumento da produção dos fluidos para excreção e, consequentemente, para o processo de desintoxicação celular. Apesar dos resultados estatísticos relacionados aos parâmetros biológicos e transgeracionais de *C. claveri* mostrarem diferenças significativas relacionadas aos efeitos do inseticida nos grupos experimentais e os resultados morfológicos apresentarem alterações celulares importantes, o impacto do sulfoxaflor, neste modelo de bioensaio, não foi expressivo negativamente, a ponto de comprometer a sobrevivência da espécie no ambiente onde se faz uso de subdoses deste inseticida, o que parece indicar uma tolerância deste inseto ao inseticida avaliado.

Palavras-Chave: Toxicidade, inseto, predador de pragas, geração F1, morfologia celular

Abstract

The species *Ceraeochrysa claveri* is an important polyphagous predator in its larval stage, acting in different agroecosystems, which makes it a powerful ally of agricultural producers in the fight against insect pests. However, the use of new insecticidal molecules can harm the developmental stages or compromise the metabolic functions of natural enemies, necessary for the natural control of pests. Insecticides based on sulfoxaflor as an active ingredient are becoming popular among farmers for having a broad spectrum of efficacy against pests, being used in agroecosystems that also accommodate *C. claveri*. In order to evaluate the effects of sulfoxaflor on *C. claveri*, *Diatraea saccharalis* egg-layings were treated with solutions containing sulfoxaflor (commercial formulation Verter SC®), at concentrations corresponding to 10, 30 and 50% of LC50 and subsequently offered ad libitum to first instar larvae of *C. claveri* for 10 days. After this ingestion exposure, the mesentery (midgut) and Malpighian tubules of the larvae were collected for morphological (histological and ultrastructural) analysis. Adults (F0 Generation) that were submitted to treatments as larvae, were sexed and separated into couples to evaluate biological parameters, such as adult longevity, fertility and fecundity, pre-oviposition and oviposition period, mortality and duration of the life cycle phases. , the data were used for statistical analysis. Larvae (Generation F1) from crossing F0 were monitored throughout their life cycle to assess possible transgenerational effects on progeny, biological parameters such as mortality and duration of life cycle phases were evaluated daily. The results obtained indicated morphological alterations in the cells of the investigated organs, as well as some statistically significant differences between the experimental groups in relation to the control, both in the F0 generation and in the F1 generation. Statistical differences were identified in the fecundity and fertility of F0 generation insects and in the life cycle of F0 and F1 generation larvae. Intestinal epithelium and Malpighian tubule cells of experimental groups showed great cytoplasmic vacuolization and increased autophagic activity. In the mesenteric cells, apical cytoplasmic protrusions and detachment/basal spacing in relation to the basement membrane were also detected, in addition to the presence of a large amount of calcium granules in the cells of the organs of the experimental groups, mainly in the epithelial cells of the Malpighian tubules, the which may be related to the role of this ion in increasing the production of fluids for excretion and, consequently, for the cellular detoxification process. Despite the statistical results related to the biological and transgenerational parameters of *C. claveri* showed significant differences related to the effects of the insecticide in the experimental groups and the morphological results showed important cellular alterations, the impact of sulfoxaflor, in this bioassay model, was not expressive negatively, up to compromising the survival of the species in the environment where subdoses of this insecticide are used, which seems to indicate a tolerance of this insect to the evaluated insecticide.

Keywords: Toxicity, insect, pest predator, F1 generetion, cell morphology

Considerações Iniciais

1. Introdução

A busca por maior produtividade nos agroecossistemas abre portas para utilização de novas moléculas para o controle fitossanitário de insetos pragas que podem vir a comprometer a produção de alimentos. Recentemente temos observado o Brasil regularizar o comércio e produção de novos princípios ativos (MAPA, 2020), sendo necessário ensaios toxicológicos a fim de verificar a compatibilidade destas moléculas com os inimigos naturais permitindo utilizá-los de forma segura no manejo integrado de pragas.

O uso de inseticidas sintéticos ou naturais se mostra necessária, uma vez que os insetos pragas podem vir a ser um problema de segurança alimentar, prejudicando o agronegócio e consequentemente a economia, já que a economia brasileira é fundamentada no setor agrícola, sendo um dos maiores exportadores de soja e um dos maiores cultivadores de cana-de-açúcar, segundo os dados do Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro. De acordo com o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), da Esalq/USP em parceria com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), o agronegócio brasileiro teve crescimento recorde no ano de 2020, e um aumento de 5,35% no primeiro trimestre de 2021, ou seja, danos na agricultura tem um reflexo imediato no dia a dia da sociedade, como o aumento de preço (CEPEA, 2021).

A presença de insetos pragas podem vir a comprometer a produção de alimentos, e além de causar danos fisicos as plantas podem causar danos indiretos, através da contaminação por vírus, fungos e outras doenças. (Wang *et al*., 2019; Denecke, 2018). O combate a esses organismos é inegável, e cada vez mais desafiador, já que diversas espécies, incluindo insetos sugadores de seiva como os pulgões, desenvolveram resistência aos inseticidas circulantes no mercado, como os organofosfatos, carbamatos e neonicotinoides (Sparks *et al*., 2013; Chen *et al*., 2016; Ma *et al*., 2019a; Ma *et al*., 2019b).

Os neonicotinoides são uma classe de inseticidas derivados da nicotina, é uma das classes de inseticidas mais utilizadas no mundo. O uso desse componente tem aumentado drasticamente ao longo dos anos, pois apesar de ter sua eficácia comprovada no controle de pragas que são sugadoras de seiva, a resistência desenvolvida pelos insetos a muitos desses inseticidas acaba limitando a sua utilidade (Zhu *et al*., 2021). Os neonicotinoides atuam como antagonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina

(nAChRs) no sistema nervoso central (Sâmia *et al*., 2019). As sufoxaminas, considerada uma quarta geração de neonicotinoides, foram descobertas de maneira precoce, mostrando resultados satisfatórios nos bioensaios, na tentativa de maximizar a potência e o espectro inseticida, originando assim o sulfoxaflor. (Babcock *et al*., 2011).

Porém as sulfoxaminas diferem dos outros inseticidas da classe dos neonicotinoides. Segundo Sparks *et al.* (2013) esse inseticida, apesar da semelhança de atividade com os outros neonicotinoides, possui aspectos de interações com os receptores nicotínicos e sua estrutura química diferente dos demais, mantendo seu poder inseticida, mesmo que não possua a mesma afinidade de ligações que outros inseticidas, inclusive seus análogos. (Sparks *et al*., 2013; Zhen *et al*., 2018).

O sulfoxaflor é o primeiro inseticida comercializado da classe das sulfoxaminas, desenvolvido pela Dow AgroSciences em 2010 e classificado pelo Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas no grupo 4C (Grupo dos Moduladores Competitivos de receptores nicotínicos de acetilcolina) (IRAC-BR, 2020; Watson *et al*., 2021). Assim como os neonicotinoides, o sulfoxaflor tem ação no sistema nervoso central dos insetos, interagindo com os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (Longhurst *et al*., 2013; Chen *et al*., 2016; Zhen *et al*., 2018; Ma *et al*., 2019a; Ma *et al*., 2019b). Tais receptores desempenham essencial papel na neurotransmissão rápida no sistema nervoso (Taillebois *et al*., 2018) e em condições normais, o neurotransmissor acetilcolina se liga aos receptores nicotínicos na célula pós-sináptica sendo posteriormente degradada pela enzima acetilcolinesterase em ácido acético e colina. O sulfoxaflor e outros neonicotinóides simulam o efeito da acetilcolina, ligando-se aos receptores nicotínicos, porém a enzima acetilcolinesterase não atua sobre a molécula do inseticida e não a degrada, o que leva a uma hiper-excitação do sistema nervoso. Os sintomas de um inseto intoxicado com sulfoxaflor podem ser comportamentais, incluindo a redução do período de vida, taxa de desenvolvimento, fertilidade, fecundidade e oviposição, além de tremores, ondulações antenais e extensão ou enrolamento das pernas, paralisia e por fim morte (Sparks *et al*., 2013; Zhen *et al*., 2018). Ação muscular por

Por possuir uma ampla eficácia contra pragas, o sulfoxaflor tem se tornado popular entre os agricultores do mundo todo, podendo ser utilizado em diversos tipos de culturas, além de se mostrar eficiente contra insetos que já adquiriram resistência aos inseticidas já utilizados no mercado, e não ser nocivo aos mamíferos (Watson *et al.*, 2011; Zhu *et al*., 2011; Sparks *et al*., 2013; Lu *et al.*, 2020). No Brasil o seu uso foi regularizado segundo a Portaria n. 3179 (MAPA, 2020), possibilitando o comercio dos inseticidas:

Verter SC., Exor SC., Closer SC. Exor e Verter pela Dow AgroSciences.

Dentre os inseticidas comerciais, sulfoxaflor se mostra promissor contra pragas sugadoras de seiva, muito comuns em culturas de algodão, citros, culturas onde estão presentes também insetos não alvos do gênero *Ceraeochrysa sp*. Avaliar os possíveis efeitos subletais do uso de inseticidas em insetos não alvo tem contribuído grandemente para o conhecimento de possíveis impactos negativos no controle natural de pragas de um agroecossistema, o que gera efeitos prejudiciais para insetos benéficos, pois compromete as suas funções biológicas, fisiológicas e de manutenção no ambiente, e consequentemente desbalanceia o controle natural exercido por estes insetos contra as pragas (Cloyd, 2012; Scudeler *et al.* 2016, 2019).

Por serem predadores encontrados em muitas culturas de interesse econômico, os crisopídeos exercem importante papel no controle biológico, reduzindo a densidade populacional de diversos artrópodes considerados praga. Os crisopídeos, forma popular de denominar os insetos pertencentes a família Chrysopidae engloba atualmente aproximadamente 1423 espécies se destacando como segunda maior família em termos de número e diversidade de espécies dentro da ordem Neuroptera (Oswald, 2018). Também conhecidos como “bicho lixeiro”, por possuir a caracteristica de carregar detritos em seu dorso em sua fase de larva, apresenta potencial no sistema agrícola, pois possui uma grande voracidade em seu estágio larval, podendo ser utilizado em programas de controle integrado de pragas (Pappas *et al.*, 2011; Scudeler *et al.*, 2016).

Os crisopídeos são insetos holometábolos, possuindo uma metamorfose completa, onde as larvas diferem completamente dos adultos não apenas na aparência, mas também nos hábitos, habitats e nichos, o que permite a estes insetos uma ampla capacidade de exploração e variedade de presas. Possui três instares larvais, onde sua duração é influenciada pela temperatura, umidade e alimentação (Freitas e Penny, 2001; Almeida *et al*., 2009; Bezerra *et al*., 2009; Scudeler *et al.,* 2016).

As larvas recém eclodidas são predadoras, e possuem esse hábito até o seu terceiro instar, os quais exibem maior voracidade, sendo eficientes contra diversas pragas, como pulgões, ácaros fitófagos, cochonilhas, cigarrinhas, mosca branca, psilideos, tripes, ovos e larvas de insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera, Diptera (Albuquerque, 2009, Pappas *et al.,* 2011). Larvas de crisopídeos apresentam canibalismo, se alimentando dos ovos e larvas da mesma espécie quando há escassez de alimento. As larvas de terceiro instar, após seu desenvolvimento tecem um casulo de seda produzida nos túbulos de Malpighi e excretada pelo ânus, estágio denominando de pré-pupa, e realizam a última

ecdise no interior do casulo, que é possível identificar através da exúvia, que se apresenta como um disco escurecido em uma das extremidades do casulo (Freitas e Penny, 2001; Bezerra *et al*., 2009).

Os adultos possuem coloração verde no geral, antenas filiformes e asas hialinas. (Gallo *et al.*, 2002; Bezerra *et al.*, 2009). Seus hábitos alimentares são variados, podendo se alimentar de pólen, exsudados açucarados de plantas, "*honeydew"*, néctar; outras podem ser predadoras (Albuquerque, 2009). Em laboratório a alimentação das larvas consiste em ovos de outras espécies de insetos, facilmente criadas em cativeiro, como *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Cambridae), *Sitotroga cerealella, Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Gelechiidae). Para os adultos é adotada uma dieta a base de mel e levedo de cerveja (1:1) (Biagioni; Freitas, 2001; Freitas e Penny 2001; Bezerra *et al*., 2009; Scudeler *et al.*, 2016).

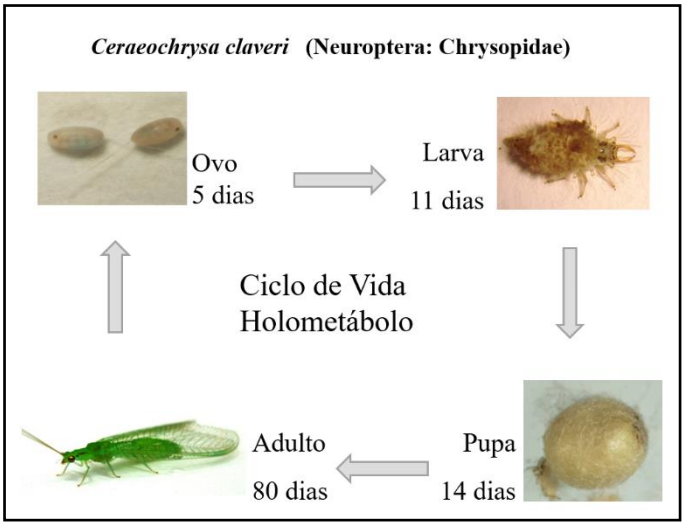


Figura 1. Esquema representando o ciclo de vida de *Ceraeochrysa claveri* e a duração dos estágios de desenvolvimento (Garcia, 2021)

Os crisopídeos estão presentes em diversos ecossistemas do planeta. A espécie *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861); está presente por um amplo território, que se estende desde o Sudoeste dos Estados Unidos até a Argentina, sua maioria ocorre na região Neotropical (Freitas e Penny, 2001). Entre os crisopídeos, o gênero *Chrysoperla* conta com quatro espécies no Brasil, *C. externa*; *Chrysoperla defreitasi* (Brooks, 1994); *Chrysoperla raimundoi* (Freitas e Penny 2001) e *Chrysoperla genanigra* (Freitas, 2003) (Dantas *et al*., 2021).

Nos ecossistemas agrícolas brasileiros Freitas e Penny (2001) capturaram 15 espécies do gênero *Ceraeochrysa*, dentre as espécies, *Ceraeochrysa claveri*, nosso

modelo de investigação neste estudo.

Para avaliar uma possível ação entomotóxica do sulfoxaflor sobre os crisopídeos, caracterizada por efeitos subletais, torna-se necessário caracterizar seus efeitos tóxicos sobre órgãos alvos de diferentes sistemas que desempenham funções essenciais nos insetos, tais como o intestino (canal alimentar), e os túbulos de Malpighi (excreção. Alterações morfológicas e ultraestruturais neste órgão são úteis na avaliação e caracterização de efeitos subletais (Scudeler *et al.*, 2016). O intestino dos insetos pode ser dividido em três regiões distintas, intestino anterior responsável por filtrar e digerir parcialmente os alimentos, intestino médio, onde a digestão e absorção ocorrem e intestino posterior que tem por função a absorção de água e homeostase (Candan *et al*., 2020; Dantas *et al*., 2021). A morfologia do intestino anterior e do intestino posterior podem divergir significativamente de um inseto para outro. Entre essas regiões do intestino existe o intestino médio, também chamado de mesêntero, considerado o local onde ocorre a maior parte de absorção de inseticidas orais (Denecke, 2018).

O epitélio intestinal é composto por três tipos celulares, células digestivas que são responsáveis pela secreção de enzimas e absorção, células endócrinas com funções de regulação hormonal, e as células regenerativas que desempenham um papel na reposição de epitélio (Rost *et al*., 2005; Terra *et al*., 2006; Teixeira *et al*., 2014). As células do intestino médio em alguns insetos produzem uma estrutura composta por uma fina rede de quitina, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e proteínas chamada membrana peritrófica, que além de desempenhar uma função de revestimento protetor, é importante também na absorção de nutrientes, e é a primeira barreira as toxinas ingeridas. (Kuraishi *et al*., 2011; Levy *et al*., 2011; Liu *et al*., 2012; Teixeira *et al*., 2014).

Quando avaliamos os sintomas histopatológicos presentes no intestino médio devido ingestão de inseticidas, toxinas e substâncias tóxicas derivadas de plantas, um conjunto de alterações morfológicas pode ser notado especialmente nas células colunares, tipo celular predominante do mesêntero. Dentre as alterações patológicas destacamos a dilatação celular (hipertrofia celular), alterações nas microvilosidades (irregularidade na sua distribuição), emissão de protusões citoplasmáticas e lise celular (Scudeler e Santos, 2013; Almeida *et al.*, 2014; Scudeler *et al*., 2014, 2016).

Assim como o intestino, os túbulos de Malpighi também constituem um importante órgão para avaliação de toxicidade e ensaios ecotoxicológicos nos insetos. Os túbulos são responsáveis pelo sistema excretor do inseto, mantendo a homeostase, detoxificação e eliminação de xenobióticos (Chahine; O'Donnell, 2014; Terhzaz *et al.*,

2015; Nocelli *et al.,* 2016). Os insetos possuem um número variável de túbulos de Malpighi, que se conectam ao intestino, nas suas porções proximais e se estendem em fundo cego, livres na hemolinfa, nas suas porções distais (Catae *et al.*, 2014; Giglio, 2017). Os túbulos são responsáveis por produzir um filtrado da hemolinfa, denominada de urina primária, apresentada como fluido iso-osmótico que transporta resíduos como compostos tóxicos ou íons em excesso, desempenhando papel fundamental na desintoxicação do inseto, descartando substâncias que não são metabolizadas ou que estão em excesso (Cruz-Landim, 2009; Rossi *et al*., 2013; Catae *et al.*, 2014). Os túbulos de Malpighi em muitos insetos são compostos por um epitélio com dois tipos celulares (célula principal e célula estrelada) e um lúmen central. As células principais são mais abundantes e possuem microvilosidades regulares e grande quantidade de mitocôndrias, devido às funções celulares relacionadas a excreção. A importância dos túbulos de Malpighi na sobrevivência do inseto sob estresse ambiental, como estresse oxidativo, xenobióticos ou toxinas, tem sido demonstrada em diferentes insetos (Tapardia e Verma, 2012; Terhzaz *et al*., 2015; Giglio, 2017).

Embora vários efeitos adversos tenham sido identificados nos modelos biológicos usados em estudos ecotoxicológicos com sulfoxaflor, a maioria dos trabalhos se concentra nos efeitos presentes na geração F0 dos insetos expostos aos inseticidas e pouco se conhece sobre os efeitos transgeracionais em termos de mortalidade e efeitos subletais na progênie (F1) dos insetos expostos (Lu *et al.*, 2020), principalmente quando se trata de insetos benéfico não alvos dos inseticidas.

O termo transgeracional se refere ao que pode ser passado de uma geração para outra nos organismos. O sucesso ou não dessa transmissão de informações de progenitores para prole está associado aos mecanismos epigenéticos. (Alyea *et al*., 2013; Kalichak, 2018). Modificações epigenéticas hereditárias podem estar relacionados a evolução da resistência dos insetos aos inseticidas, já que o uso de inseticida pode levar à seleção de genótipos (Brevik *et al*., 2018). Assim os efeitos induzidos pelo uso de inseticidas têm importância adaptativa, pois podem ser transferidos para as próximas gerações. (Brevik *et al*., 2018). Os efeitos transgeracionais podem ser mais frequentemente vistos entre mães e filhos, isso se deve, ao fato de as fêmeas poderem contribuir com uma variedade de insumos, de fatores imunológicos e mecanismos epigenéticos via nutrição do ovo. (Mousseau e Fox, 1998).

Até o momento, apenas alguns trabalhos tratam sobre os efeitos dos inseticidas em espécies não alvo (Jiang *et al.,* 2019; Siviter *et al.,* 2019; Chakrabarti *et al.,* 2020;

Zhang *et al.*, 2020), assim nota-se a importância da avaliação dos efeitos do princípio ativo sulfoxaflor por ser uma novidade promissora no mercado brasileiro por ser efetivo no combate de pragas que já adquiriram resistência a outros tipos de inseticidas.

Caracterizar os efeitos citotóxicos e subletais em exposições subcrônicas tornam-se essenciais para dimensionar a ação entomotóxica que o sulfoxaflor pode apresentar sobre insetos não alvos, assim como, verificar possíveis efeitos subletais em seus descendentes, desde alterações fisiológicas, como modificações no período de desenvolvimento, longevidade e fecundidade destes insetos, podendo prejudicar a reprodução, sobrevivência e a manutenção destes animais no ambiente (Scudeler *et al.*, 2014).

2. Objetivo

Considerando:

(1) a importância econômica de *C. claveri* na agricultura face aos benefícios gerados por este predador nos agroecossistemas;

(2) a necessidade de ampliar e aprofundar o conhecimento a respeito da biologia deste inseto, visando colaborar com estudos científicos direcionados a ampliar o desenvolvimento de novas metodologias de uso do controle biológico e

(3) o potencial do uso do sulfoxaflor no controle e repelência de insetos pragas

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos subletais e transgeracionais do sulfoxaflor no inseto não alvo *Ceraeochrysa claveri*, através da:

- Determinação da CL50 para larvas de *C. claveri* após 10 dias de exposição por ingestão ao sulfoxaflor;
- Avaliação do efeito citotóxico do sulfoxaflor no intestino médio (mesêntero) e túbulos de Malpighi das larvas de *C. claveri* expostos por 10 dias ao sulfoxaflor nas concentrações correspondentes a 10, 30 e 50% da CL50;
- Avaliação dos parâmetros biológicos como longevidade dos adultos, fertilidade e fecundidade, período de pré-oviposição e ovoposição, mortalidade e duração das fases do ciclo de vida de insetos da geração F0;
- Avaliação dos parâmetros biológicos como mortalidade e duração das fases do ciclo de vida de insetos da geração F1.

3. Referências Bibliográficas

Albuquerque, G.S. Crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae). 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, cap. 23, p. 969-1022.

Almeida, G.D.; Zanuncio, J.C.; Senthil-Nathan, S.; Pratissoli, D.; Polanczyk, R.A.; Azevedo, D.O.; Serrão, J.E. Cytotoxicity in the midgut and fat body of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extracts. **Invertebrate Survival Journal**. J., 11:79- 86, 2014.

Almeida, M.F.; Barros, R.; Junior, M.G.C.G.; Freitas, S.; Bezerra, A.L. Biologia de Ceraeochrysa claveri Navás (Neuroptera: Chrysopidae) predando Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Ciência Rural**, 39(2): 313-318, 2009.

Alyea, R.A.; Gollapudi, B.B.; Rasoulpour, R.J. Are we ready to consider transgenerational epigenetic effects in human health risk assessment? **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 55: 292-298, 2014.

Babcock, J.M.; Gerwick, C.B.; Huang, J.X.; Loso, M.R.; Nakamura, G.; Nolting, S.P.; Rogers, R.B.; Sparks, T.C.; Thomas, J.; Watson, G.B.; Zhu, Y. Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide. **Pest Management. Science**., 67: 328-334, 2011.

Bezerra, C.E.S.; Nogueira, C.H.F.; Sombra, K.D.S.; Demartelaere, A.C.f.; Araujo, E.L. Crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae): Aspectos biológicos, potencial de utilização e perspectivas futuras. **Revista Caatinga**, 22(3): 1-5, 2009.

Biagioni, A.; Freitas, S. Efeito de diferentes dietas sobre o desenvolvimento Pós-Embrionário de Chrysoperla defreitasi Brooks (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotropical Entomology,** 2(30): 333-336, 2001.

Brevik, K; Lindstrom, L; McKay, S.D; Chen, Y.H. Transgenerational effects of insecticides — implications for rapid pest evolution in agroecosystems. **Science Direct**. 26: 34-40, 2018.

Catae, A.F.; Roat, T.C.; Oliveira, R.A.; Nocelli, R.C.F.; Malaspina, O. Cytotoxic effects of Thiamethoxam in the midgut and malphighian tubules of Africanized Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, 77: 274-281, 2014.

Candan, S., Kocakoglu, N.O., Gullu, M., Caglar, U. Anatomical and histological studies of the alimentary canal of adult maize leaf weevil, Tanymecus dilaticollis Gyllenhal,

1834 (Coleoptera: Curculionidae). Microscopy Researche Technique 83:1153-1162, 2020.

CEPEA (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada). Esalq/USP. Acesso em 15 de março de 2021. Disponível em https://www.cepea.esalq.usp.br/br.

Chahine, S.; O'Donnell, M.J. Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of Drosophila melanogaster. **The Journal of Experimental Biology**, 214: 462-468, 2011.

Chakrabarti, P.; Carlson, E.A.; Lucas, H.M.; Melathopoulos, A.P.; Sagili, R.R. Field rates of Sivanto (flupyradifurone) and Transform (Sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honeybees (Apis mellifera L.). **Plos One,** 2020.

Chen, X.; Ma, K.; Li, F.; Liang, P.; Liu, Y.; Guo, T.; Song, D.; Desneux, N.; Gao, X. Sublethal and transgenerational effects of sulfoxaflor on the biological traits of the cotton aphid, Aphis gossypii Glover (Hemiptera: Aphididae). **Ecotoxicology**, 10: 1841-1848, 2016.

Cloyd, R.A. Indirect effects of pesticides on natural enemies. In: Soundararajan, R.P. (Ed), Pesticides-advances in chemical and botanical pesticides. Intech, Rijeka, **Croatia,** 127- 150p, 2012.

Cruz-landim, C. Abelhas: morfologia e função de sistemas**. Editora Unesp**, São Paulo, 2009.

Dantas, P.C; Serrão J.E; Santos, H.C.P; Carvalho G.A. Anatomy and histology of the alimentary canal of larvae and adults of Chrysoperla externa (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). **Arthropod Structure & Development** 60: 101000, 2021.

Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., Vontas, J. How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium?. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 103, 22-35, 2018.

Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.M. The subletal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**., 52: 81-106, 2007.

Freitas, S.; Penny, N.D. The green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of Brazilian agro- ecossystems. Proceedings of the California**. Academy of Sciences**, 52(19): 245-395, 2001.

Gallo, D.; Nakano, O.; Neto, S.S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C.; Filho, E.B.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramin, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. **Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ**, 920p., 2002.

Garcia, A. Análise comparativa dos efeitos do biopesticida azadiractina e do inseticida sintético piriproxifem nos testículos de Ceraeochrysa claveri (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). Uma abordagem morfológica, ultraestrutural e molecular. Tese (Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, 2021.

Giglio, A; Brandmayr, P. Structural and functional alterations in Malpighian tubules as biomarkers of environmental pollution: synopsis and prospective. **Journal of Applied Toxicology**, 37: 889–894, 2017.

IRAC-BR (Comitê de ação à resistência a inseticidas). Modo de Ação de Inseticidas e Acaricidas. Acesso em 03 de março 2021. Disponível https://www.irac-br.org/modo-de-acao.

Jiang, J.G.; Zhang, Z.Q.; Yu, X.; Yu, C.H.; Liu, F.; Mu, W. Sublethal and transgenerational effects of thiamethoxam on the demographic fitness and predation performance of the seven-spot ladybeetle Coccinella septempunctata L. (Coleoptera: Coccinellidae). **Chemosphere**. 216, 168–178, 2019.

Kalichak, F. Resíduos de risperidona no ambiente: efeitos persistentes e transgeracionais. 2018. Tese (Pós-graduação em Farmacologia Aplicada a Produção Animal) - Universidade Federal de Santa Maria, 2018.

Kuraishi, T., Binggeli, O., Opota, O., Buchon, N., Lemaitre, B. Genetic evidencefor a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infec-tion in Drosophila melanogaster. **Procedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 108, 15966–15971, 2011.

Levy, S.M., Falleiros, A.M.F., Moscardi, F., Gregório, E.A. The role of peritrophicmembrane in the resistance of Anticarsia gemmatalis larvae (Lepidoptera: Noctu-idae) during the infection by its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). **Arthropod Structure & Development**. 40, 429–434, 2011.

Liu, X., Zhang, H., Li, S., Zhu, K.Y., Ma, E., Zhang, J. Characterization of a midgut-specific chitin synthase gene (LmCHS2) responsible for biosynthesis of chitin ofperitrophic matrix in Locusta migratoria**. Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 42, 902–910, 2012.

Longhurst, C; Babcock, J.M; Denholm, I; Gorman, K; Thomas, J.D; Spark, T.C. Cross-resistance relationships of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor with neonicotinoids and other insecticides in the whiteflies Bemisia tabaci and Trialeurodes vaporariorum. **Pest Management Science**, 69: 809–813, 2013.

Lu, Z.; Dong, S.; Li, C.; Li, L.; Yu, Y.; Ying, S.; Men, X. Sublethal and transgenerational effects of sulfoxaflor on the demography and feeding behaviour of the mirid bug Apolygus lucorum**. Plos One**, 2020.

Ma, K.; Tang, Q.; Xia, J.; Lv, N.; Gao, X. Fitness costs of sulfoxaflor resistance in the cotton aphid, Aphis gossypii Glover. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 158: 40-46, 2019.

Ma, K.; Tang, Q.; Zhang, B.; Liang, P.; Wang, B.; Gao, X. Overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with sulfoxaflor resistance in Aphis gossypii Glover. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 157: 204-210, 2019.

Malaspina, O.; Zacarin E.C.M.S. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian journal of morphological sciences**, 23(3/4): 303-309, 2006.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Agrofit. Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA, Brasília, DF, Brasil. Acesso em 20 de junho 2020. Disponível: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

Mousseau, T.A.; Fox, C.W. Maternal effects as adaptations. **Oxford University Press**, 400p., 1998.

Nocelli, R.C.F.; Socolowski, P.C.; Roat, T.C.; Zacarin, E.C.M.S.; Malaspina, O. Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. **Insect Physiology**, 6: 13-23, 2016.

Oswald, J.D. Neuropterida Species of the World. Texas**. Department of Entomology College Station,** 2018.

Pappas, M.L.; Broufas, G.D.; Koveos, D.S. Chrysopid predators and their role in biological control**. Journal of Entomology**, 8(3): 301-326, 2011.

Rossi, C.A.; Roat, T.C.; Socolowski, P.C.; Malaspina, O. Effects of Sublethal Doses of Imidacloprid in Malpighian Tubules of Africanized Apis mellifera (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, 76: 552–558, 2013.

Rost, M.M., Kuczera, M., Malinowska, J., Polak, M., Sidor, B. Midgut epitheliumformation in Thermobia domestica (Packard) (Insecta, Zygentoma). **Tissue and Cell**. 37:135–143, 2005.

Sâmia, R.R.; Gonjito, P.C.; Oliveira, R.L.; Carvalho, G.A. Sublethal and transgenerational effects of thiamethoxam applied to cotton seed on Chrysoperla externaand Harmonia axyridis. **Pest Management Science**, 75: 694-701, 2019.

Scudeler, E.L.; Garcia, A.S.G.; Padovani, C.R.; Pinheiro, P.F.F.; Santos, D.C. Cytotoxic effects of neem oil in the midgut of the predator Ceraeochrysa claveri. **Micron**, 80: 96-111, 2016.

Scudeler, E.L.; Garcia, A.S.G.; Padovani, C.R.; Santos, D.C. Pest and natural enemy: how the fat bodies of both the Southern armyworm Spodoptera eridania and the predator Ceraeochrysa claveri react to azadirachtin exposure. **Protoplasma** 256:839–856, 2019.

Scudeler, E.L.; Padovani, C.R.; Santos, D.C. Effects of neem oil (Azadirachta indica A. Juss) on the replacement of the midgut epithelium in the lacewing Ceraeochrysa claveri during larval- pupal metamorphosis. **Acta Histochemica**, 116: 771-780, 2014.

Scudeler, E.L.; Santos, D.C. Effects of neem oil (Azadirachta indica A. Juss) on midgut cells of predatory larvae Ceraeochrysa claveri (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, 44: 125-132, 2013.

Siviter, H.; Horner, J.; Brown, M.J.F.; Leadbeater, E. Sulfoxaflor exposure reduces egg laying in bumblebees Bombus terrestris. **Journal of Applied Ecology**, 57: 160-169, 2019.

Sparks, T.C.; Watson, G.B.; Loso, M.R.; Geng, C.; Babcock, J.M.; Thomas, J.D. Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of actionand basis for efficacy on resistant insects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 107: 1-7, 2013.

Taillebois, E; Cartereau, A; Jones, A.K; Thany, S.H. Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 151: 59-66, 2018.

Tapardia M.G, Verma, P. Immune Response and Anti-Microbial Peptides Expression in Malpighian Tubules of Drosophila melanogaster Is under Developmental Regulation. **Plos One**, 7, 2012.

Teixeira, A.D; Marques-Araújo, S; Zanuncio, J.C; Serrão, J.E. Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera):Immunolocalization. **Micron**, 2014.

Terhzaz, S.; Cabrero, P.; Brinzer, R.A.; Halberg, K.A.; Dow, J.A.T. A novel role of Drosophila cytochrome P450-4e3 in permethrin insecticide tolerance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 67: 38-46, 2015.

Terra, W.R., Costa, R.H., Ferreira, C. Plasma membranes from insect midgutcells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 78, 255–269, 2006.

Wang, X.G; Ruan, Y.W; Gong, G.W; Xiang, X; Xu, X; Zhang, Y.M; Shen, L.T. Transcriptome Analysis of Sogatella furcifera (Homoptera: Delphacidae) in Response to Sulfoxaflor and Functional Verification of Resistance-Related P450 Genes. **International Journal of Molecular Sciences**, 20:4573, 2019.

Watson, G.B.; Losoa, M.R.; Babcock, J.M.; Haslera, J.M.; Letherera, T.J.; Young, C.D.; Zhu, Y.; Casidab, J.E.; Sparks, T.C. Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 41: 432-439, 2011.

Watson, G.B.; Siebert, M.W.; Wang, N.X.; Loso, M.R.; Sparks, T.C. Sulfoxaflor – A sulfoximine insecticide: Review and analysis of mode of action, resistance and cross-resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 178: 104924, 2021.

Zhang, X.; Wang, X.; Liu, Y.; Fang, K.; Liu, T. The toxic effects of Sulfoxaflor induced in earthworms (Eisenia fetida) under effective concentrations. **International journal of Environmental Research and Public Health**, 17: 1740, 2020.

Zhen, C.; Miao, L.; Gao, Z. Sublethal effects of sulfoxaflor on biological characteristics and vitellogeningene (AlVg) expression in the mirid bug, Apolygus lucorum (Meyer-Dür). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 144: 57-63, 2018.

Zhu, Y.; Loso, M.R.; Watson, G.B.; Sparks, T.C.; Rogers, R.B.; Huang, J.X.; Gerwick, B.C.; Babcock, J.M.; Kelley, D.; Hegde, V.B.; Nugent, B. M.; Renga, J.M.; Denholm, I.; Gorman, K.; Deboer, G.J.; Hasler, J.; Meade, T.; Thomas, J.D. Discovery and Characterization of Sulfoxaflor, a Novel InsecticideTargeting Sap-Feeding Pests. J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 59: 2950–295, 2011.

4. Resultados

Os resultados obtidos estão apresentados na forma de um artigo científico, que será submetido para o periódico PROTOPLASMA, fator de impacto: 3.356, após ser traduzido e revisado para a língua inglesa.

O artigo científico está denominado como Capítulo 1.

4.1 CAPÍTULO 1

Efeitos subletais e transgeracionais do princípio ativo Sulfoxaflor no inseto não alvo *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae)

Aime Giovanna Pereira[a], Elton Luiz Scudeler[a], Ana Silvia Gimenes Garcia[a], Brenda Gillian Pereira[c], Carlos Roberto Padovani[b], Daniela Carvalho dos Santos [a]

[a]Laboratório de Insetos, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil. [b]Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil

Abstract

The first commercially available sulfoximine insecticide, the sulfoxaflor, has been used for the control of target sap-feeding insect on a variety of crops were no-target insects, such as lacewings, are also present. The sublethal and transgeracioanl effects on the pest predator *Ceraeochrysa claveri* have not been investigated yet and this knowledge is necessary to ensure the maintenance of natural pest control in the environment and thus contribute to integrated pest management systems aimed at reducing the use of pesticides. We evaluated biological parameters, transgerational effects and sublethal impact of sulfoxaflor in insects exposed during larval period. The pilot test showed that the LC50 of sulfoxaflor against larvae of this insect were 150,181 mg a.i $L^{-1}$and the bioassays were performed using 10, 30 and 50% of LC50. The sugarcane borer eggs embeded in these insecticide solutions were offered ad libitum to first instar larvae of *C. claveri* for 10 days. After this ingestion exposure, the midgut and Malpighian tubules of the larvae were collected for morphological analysis. Adults (F0 Generation) were separated into couples to evaluate biological parameters and larvae (Generation F1) from crossing F0 were monitored throughout their life cycle to assess possible transgenerational effects on progeny. The results obtained indicated morphological alterations in the cells of the investigated organs, as well as some statistically significant differences between the experimental groups in relation to the control, both in the F0 generation and in the F1 generation. Statistical differences were identified in the fecundity and fertility of F0 generation insects and in the life cycle of F0 and F1 generation larvae. Intestinal epithelium and Malpighian tubule cells of experimental groups showed great cytoplasmic vacuolization and increased autophagic activity. In the mesenteric cells, apical cytoplasmic protrusions and detachment/basal spacing in relation to the basement membrane were also detected, in addition to the presence of a large amount of calcium granules mainly in the epithelial cells of the Malpighian tubules, the which may be related to the role of this ion in increasing the production of fluids for excretion and, consequently, for the cellular detoxification process. Despite the statistical results showed significant differences related to the effects of the insecticide in the experimental groups and the morphological results showed important cellular alterations, the impact of sulfoxaflor, in this bioassay model, was not expressive negatively, up to compromising the survival of the species in the environment where subdoses of this insecticide are used, which seems to indicate a tolerance of this insect to the evaluated insecticide.

Keywords : Toxicity, insect, pest predator, F1 generetion, cell morphology

4.1.1 Introdução

O uso dos neonicotinoides tem eficácia comprovada no controle de insetos pragas sugadoras de seiva, entretanto, a resistência desenvolvida pelos insetos a muitos desses inseticidas acaba limitando a sua utilidade (Zhu *et al*., 2011). Considerados como a classe de inseticidas mais utilizados no mundo, os neonicotinóides pertencem ao grupo de inseticidas derivados da nicotina, atuando como agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) no sistema nervoso central (Sâmia *et al*., 2019). As sufoxaminas, considerada a quarta geração de neonicotinoides mostram resultados satisfatórios nos bioensaios, na tentativa de maximizar a potência e o espectro inseticida, originando assim o sulfoxaflor (Babcock *et al*., 2011).

O sulfoxaflor é o primeiro inseticida comercializado da classe das sulfoxaminas, desenvolvido pela Dow AgroSciences em 2010 e classificado pelo Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas no grupo 4C. O sulfoxaflor também atua no sistema nervoso central dos insetos, interagindo com os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (Longhurst *et al*., 2013; Chen *et al*., 2016; Zhen *et al*., 2018; Ma *et al*., 2019a; Ma *et al*., 2019b), porém, as sulfoxaminas diferem dos outros inseticidas da classe dos neonicotinoides por possuir aspectos de interações com os receptores nicotínicos e estrutura química diferente dos demais, mantendo seu poder inseticida por mais tempo, mesmo que não possua a mesma afinidade de ligações que outros inseticidas, inclusive seus análogos. (Sparks *et al*., 2013; Zhen *et al*., 2018).

Por possuir uma ampla eficácia contra pragas, o sulfoxaflor tem se tornado popular entre os agricultores do mundo todo, podendo ser utilizado em diversos tipos de culturas, além de se mostrar eficiente contra insetos que já adquiriram resistência aos inseticidas já utilizados no mercado, e não ser nocivo aos mamíferos (Watson *et al*., 2011; Zhu *et al*., 2011; Sparks *et al*., 2013; Lu *et al*., 2020). No Brasil o seu uso foi regularizado segundo a Portaria n. 3179 (MAPA, 2020), possibilitando o comercio dos inseticidas: Verter SC., Exor SC., Closer SC. Exor e Verter pela Dow AgroSciences. Os sintomas de um inseto intoxicado com sulfoxaflor podem ser comportamentais, incluindo a redução do período de vida, taxa de desenvolvimento, fertilidade, fecundidade e oviposição, além de tremores, ondulações antenais e extensão ou enrolamento das pernas, paralisia e por fim morte (Sparks *et al*., 2013; Zhen *et al*., 2018).

Dentre os inseticidas comerciais, sulfoxaflor se mostra promissor contra pragas sugadoras de seiva, muito comuns em culturas de tomate, citros, feijão, algodão, culturas

onde estão presentes também insetos não alvos do gênero *Ceraeochrysa sp*. Avaliar os possíveis efeitos subletais do uso de inseticidas em insetos não alvo tem contribuído grandemente para o conhecimento de possíveis impactos negativos no controle natural de pragas de um agroecossistema, o que gera efeitos prejudiciais para insetos benéficos, pois compromete as suas funções biológicas, fisiológicas e de manutenção no ambiente, e consequentemente desbalanceia o controle natural exercido por estes insetos contra as pragas (Desneux *et al*., 2007; Cloyd, 2012; Scudeler *et al.* 2016, 2019).

Por serem predadores encontrados em muitas culturas de interesse econômico, os insetos da espécie *C.claveri,* também conhecidos como crisopídeos ou bicho lixeiro, exercem importante papel no controle biológico, reduzindo a densidade populacional de diversos artrópodes considerados pragas. Os crisopídeos são insetos holometábolos, possuindo uma metamorfose completa, onde as larvas diferem completamente dos adultos não apenas na aparência, mas também nos hábitos, habitats e nichos, o que permite a estes insetos uma ampla capacidade de exploração e variedade de presas. Possui três instares larvais, onde sua duração é influenciada pela temperatura, umidade e alimentação. As larvas recém eclodidas são predadoras, e possuem esse hábito até o seu terceiro instar, os quais exibem maior voracidade, sendo eficientes contra diversas pragas (Freitas e Penny, 2001; Almeida *et al*., 2009; Bezerra *et al*., 2009; Albuquerque, 2009, Pappas *et al.*, 2011; Scudeler *et al.*, 2016).

Para avaliar uma possível ação entomotóxica do sulfoxaflor sobre os crisopídeos, torna-se necessário caracterizar seus efeitos tóxicos sobre órgãos alvos de diferentes sistemas que desempenham funções essenciais nos insetos, tais como o intestino (canal alimentar), e os túbulos de Malpighi (excreção). O intestino tem se tornado um importante órgão alvo nos estudos ecotoxicológicos por ser um dos primeiros órgãos dos insetos a entrar em contato quando se avalia os efeitos da ingestão de inseticidas (Malaspina; Silva-Zacarin, 2006; Catae *et al.,* 2014). Alterações morfológicas e ultraestruturais neste órgão são úteis na avaliação e caracterização de efeitos subletais (Scudeler *et al.,* 2016). Assim como o intestino, os túbulos de Malpighi também constituem um importante órgão para avaliação de toxicidade e ensaios ecotoxicológicos nos insetos, uma vez que os túbulos são responsáveis pelo sistema excretor do inseto, mantendo a homeostase, detoxificação e eliminação de xenobióticos (Chahine; O'Donnell, 2014; Terhzaz *et al.,* 2015; Nocelli *et al.,* 2016). Os túbulos são responsáveis por produzir um filtrado da hemolinfa, denominada de urina primária, apresentada como fluido osmótico que transporta resíduos como compostos tóxicos, desempenhando papel

fundamental na desintoxicação do inseto, descartando substâncias que não são metabolizadas ou que estão em excesso, como por exemplo, íon (Cruz-Landim, 2009; Rossi *et al*., 2013; Catae *et al.*, 2014).

Embora vários efeitos adversos tenham sido identificados nos modelos biológicos usados em estudos ecotoxicológicos com sulfoxaflor, a maioria dos trabalhos se concentra nos efeitos presentes na geração F0 dos insetos expostos aos inseticidas e pouco se conhece sobre os efeitos transgeracionais em termos de mortalidade e efeitos subletais na progênie (F1) dos insetos expostos (Lu *et al.*, 2020), principalmente quando se trata de insetos benéfico não alvos dos inseticidas. O termo transgeracional se refere ao que pode ser passado de uma geração para outra nos organismos. O sucesso ou não dessa transmissão de informações de progenitores para prole está associado aos mecanismos epigenéticos (Alyea *et al*., 2013; Kalichak, 2018). Modificações epigenéticas hereditárias podem estar relacionados a evolução da resistência dos insetos aos inseticidas, já que o uso de inseticida pode levar à seleção de genótipos (Brevik *et al*., 2018). Assim os efeitos induzidos pelo uso de inseticidas têm importância adaptativa, pois podem ser transferidos para as próximas gerações. (Brevik *et al*., 2018).

Caracterizar os efeitos citotóxicos e subletais em exposições subcrônicas tornam-se essenciais para dimensionar a ação entomotóxica que o sulfoxaflor pode apresentar sobre insetos não alvos, assim como, verificar possíveis efeitos subletais em seus descendentes, desde alterações fisiológicas, como modificações no período de desenvolvimento, longevidade e fecundidade destes insetos, podendo prejudicar a reprodução, sobrevivência e a manutenção destes animais no ambiente (Scudeler *et al.*, 2014).

Desta forma, considerando a importância econômica de *C. claveri* na agricultura face aos benefícios gerados por este predador de pragas nos agroecossistemas e a necessidade de ampliar e aprofundar o conhecimento a respeito da biologia deste inseto, visando colaborar com estudos científicos direcionados a ampliar o desenvolvimento de novas metodologias de uso do controle biológico, esta investigação teve como objetivo avaliar os efeitos subletais e transgeracionais do sulfoxaflor nesta espécie não alvo através da caracterização morfológica e ultraestrutural do possível efeito citotóxico do sulfoxaflor no intestino médio (mesêntero) e túbulos de Malpighi das larvas de *C. claveri* expostas às concentrações correspondentes a 10%, 30% e 50% da CL50; além de avaliar os parâmetros biológicos como longevidade dos adultos, fertilidade e fecundidade, período de pré-oviposição e ovoposição, mortalidade e duração das fases do ciclo de vida de

insetos da geração F0 e mortalidade e duração das fases do ciclo de vida de insetos da geração F1.

4.1.2 Material e Métodos

Material Biológico

A criação dos insetos *C. claveri* é realizada no Laboratório de Insetos, no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do IBB- UNESP, onde os insetos são mantidos em biotério com condições controladas: temperatura (25±1ºC), umidade (70±10%) e fotoperíodo (12hL:12hE). As larvas de *C. claveri* são alimentadas com ovos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Cambridae) e os adultos recebem uma dieta base de levedura de cerveja e mel (1:1). Os insetos adultos são mantidos em gaiolas de polietileno. Essas gaiolas têm a superfície superior internamente revestida com papel sulfite branco, servindo como substrato para postura dos ovos e colocação da dieta. Esses ovos são retirados nos dias de limpeza e a manutenção das gaiolas, e posteriormente acondicionados em caixas plásticas até a eclosão das larvas. As larvas são individualizadas em potes plásticos. As pupas são mantidas no pote em que já estavam na fase larval, uma vez que os casulos ficam aderidos à superfície do pote. Com a emergência dos adultos, estes são transferidos para gaiolas formando casais, para manutenção da criação.

Determinação da Concentração Letal Média (CL_{50}) do Sulfoxaflor para *C. claveri* (teste piloto)

Larvas recém emergidas foram separadas aleatoriamente em 6 grupos experimentais, um grupo controle e cinco grupos tratamentos que foram expostas por ingestão por meio de ovos de *D. saccharalis* tratados com diferentes concentrações de sulfoxaflor (formulação comercial Verter SC®, 240 g a.i. L^{-1}, Dow AgroSciences Industrial Ltda, que foram escolhidas com base na maior e menor dose recomendada na bula para *Aphis gossypii* de 100 - 200 mL/ha (chegando as concentrações de 24 mg a.i L^{-1}; 48 mg a.i L^{-1}; 96 mg a.i L^{-1}; 192 mg a.i L^{-1} e 288 mg a.i L^{-1}) diluído em água destilada e expostas durante 10 dias. Os ovos foram tratados através da técnica de imersão (20 min), secos a temperatura ambiente (2h) (adaptado a partir de Lu *et al*., 2020) e colocados nos potes que continham as larvas. Ovos tratados foram fornecidos *ad libitum* para as larvas, sendo substituídos por novos ovos tratados após três dias, evitando a desidratação

excessiva dos ovos. O grupo controle foi realizado com larvas alimentadas com ovos de *D. saccharalis* imersos em água destilada (20 min) e secos a temperatura ambiente (2h). Para cada concentração utilizamos 50 larvas a fim de avaliarmos a CL50 após 10 dias de exposição. A taxa de mortalidade obtida para cada concentração foi utilizada para análise estatística onde estimamos o valor da CL50 por meio da análise de Probit (Finney, 1971).

Instalação dos Bioensaios

Larvas de *C. claveri* de primeiro instar (0-12h) foram alimentadas durante 10 dias com ovos de *D. saccharalis* tratados em 3 diferentes concentrações de sulfoxaflor, correspondendo a 10%, 30% e 50% da CL50 obtida anteriormente no teste piloto, correspondendo as concentrações de 15,02 mg a.i L^{-1}; 45,05 mg a.i L^{-1} e 75,10 mg a.i L^{-1}.

Análise Estatística (parâmetros biológicos – geração F0 e F1)

Para a realização dos testes estatísticos as variáveis quantitativas obtidas após os tratamentos foram examinadas com análise de variância, neste caso os testes escolhidos foram com base em dados que não tem aderência a normalidade. A técnica de análise de variância de uma via (one-way) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (Zar, 2009), foi realizado para detectar diferenças no período de oviposição, fecundidade, fertilidade, viabilidade dos ovos e longevidade dos adultos entre as concentrações de sulfoxaflor e o grupo controle. Para a avaliação do acúmulo de mortes, tanto em F0 quanto em F1, foi utilizado o teste de homogeneidade de Goodman envolvendo contrastes entre proporções multinominais (Goodman, 1964). Para avaliar o tempo de desenvolvimento das larvas, pré-pupas e pupas, a razão sexual dos adultos e o período de pré-oviposição, o procedimento foi não paramétrico, contemplando o teste de Comparações múltiplas de Dunn (Zar, 2009).

Análise Morfológica e Ultraestrutural (larvas – geração F0)

Coleta e Processamento do Mesêntero e Túbulos de Malpighi

Larvas provenientes do grupo controle e dos grupos tratados foram dissecados depois de transcorridos os 10 dias de exposição, via ingestão, de sulfoxaflor. Os espécimes foram resfriados e dissecados pela região dorsal, com solução salina para insetos (0,1 mol L^{-1} NaCl; 0,1 mol L^{-1} Na2HPO4; 0,1 mol L^{-1} H2PO4) sob microscópio

estereoscópico. O mesêntero e túbulos de Malpighi foram imediatamente pré-fixados no local pelo gotejamento do fixador adequado, e posteriormente recolhidos e transferidos para recipiente contendo o mesmo fixador.

Microscopia de Luz

Após a dissecção (n = 10 espécimes por grupo), os órgãos foram fixados (24h) em soluções fixadoras: (1) paraformaldeido 4% e glutaraldeido 2,5% em tampão fosfato 0,1 mol L-1, pH 7,3 para amostras submetidas à técnica de coloração por Hematoxilina e Eosina (H.E.) (Pearse, 1972) para morfologia geral das células e (2) paraformaldeido 4% em tampão fosfato 0,1 mol L-1, pH 7,3 para amostras submetidas à técnica de Von Kossa (Junqueira e Junqueira, 1983) para detecção de cálcio intracelular.

Análise Citoquímica

Após a fixação inicial por 24 h, o material será submetido à técnica de inclusão em metacrilato-glicol (historesina). Cortes histológicos (3 µm) serão submetidos a coloração de Hematoxilina e Eosina (H.E.) (PEARSE, 1972) para evidenciar a ocorrência de lesões histopatológicas, tais como dilatação celular, emissão de protusões citoplasmáticas e lise celular. Para a detecção de cálcio, um importante indicador de resposta citoprotetora, o material biológico será submetido à técnica de inclusão em paraplast. Cortes histológicos de (6 µm) serão submetidos posteriormente a técnica de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

H.E

- Coloração com Hematoxilina de Harris (15 min);
- Lavagem dos cortes em água corrente (12 min);
- Passagem em álcool etílico 95%;
- Coloração com Eosina alcoólica (1min);
- Diafanização em xilol;
- Montagem em meio de Permount;

Von Kossa

- Desparafenar, hidratar;
- Passar 3 vezes em água destilada;

- Gotejar sobre o corte na lamina o nitrato de prata;
- Submeter a luz solar 30 min

Para análise e documentação fotográfica dos cortes obtidos após a realização das técnicas citoquimicas utilizamos microscópio óptico Leica DM 500 com sistema de captação de imagens digital LAS EZ.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Após a dissecção (n = 5 espécimes por grupo), os órgãos foram fixados (24h) em solução fixadora contendo: glutaraldeido 2,5% e paraformaldeido 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3. Após fixação, as amostras dos órgãos foram submetidas ao protocolo de rotina de processamentos do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB (UNESP): pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão (2h); lavagem em água destilada (3 vezes de 5 min); contrastação em bloco em solução de acetato de uranila 0,5% (2h); desidratação em séries crescentes de soluções de acetona; embebição em mistura de resina (Araldite®) e acetona 100% (1:1) (12h); embebição em resina pura em estufa a 37°C (1h) e inclusão em resina pura e polimerização em estufa a 60°C (72h). Cortes ultrafinos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e posteriormente analisados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai Spirit da FEI Company.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após fixação em glutaraldeido 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3, as amostras dos órgãos foram submetidas ao protocolo de rotina de processamentos do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB (UNESP): pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 2h, desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico, secas em ponto crítico CPD 020 (Balzer Union) e finalmente metalizadas com pó de ouro no metalizador SCD 050 (BAL-TEC). Em seguida as amostras foram analisadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura QUANTA 200 da FEI Company.

4.1.3 Resultados

A Concentração Letal Média (CL50) de sulfoxaflor para larvas de *C. claveri* foi determinada através do Modelo de Regressão Probit (PROBIT(p)= -1,1121+ 0,0074) e chegou-se à concentração letal média CL50 = 150,181 mg a.i L^{-1} (intervalo de confiança 95%: 101,141 - 227,598 mg a.i L^{-1}). A partir desta determinação, os grupos experimentais (bioensaios) foram tratados com 10, 30 e 50% da dose obtida para CL50, correspondendo as concentrações de 15,02 mg a.i L^{-1}; 45,05 mg a.i L^{-1} e 75,10 mg a.i L^{-1}.

Parâmetros Biológicos (efeitos subletais e transgeracionais)

Longevidade dos Adultos F0

Os valores da mediana da longevidade das fêmeas e machos adultos da geração F0, alimentados na fase larval com diferentes concentrações de sulfoxaflor, estão apresentados na Tabela I. Os dados mostram pequena variação nos períodos de longevidade dos insetos dos grupos controle em comparação aos grupos experimentais, o que não refletiu em uma diferença estatística significante, onde a longevidade das fêmeas resultantes do grupo experimental de maior dosagem (75mg), apresentou a menor longevidade para fêmeas (54 dias). Os dados relativos à longevidade dos machos mostraram ainda menor variação entre os grupos, sendo detectado apenas um discreto aumento de 5 dias a mais para o período de longevidade dos insetos do grupo experimental de 15mg em relação ao controle. Desta forma, o inseticida não interferiu no período de longevidade dos insetos da geração F0.

Fecundidade e Fertilidade F0

Para análise de fecundidade (número de ovos da postura) e fertilidade (viabilidade dos ovos – eclosão das larvas) foram utilizados os dados referentes aos 15 casais formados, onde ambos os insetos (fêmea e macho) foram tratados com as três doses de sulfoxaflor. Todos os tratamentos mostraram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle. Com 470 ovos, o Controle teve a maior mediana de ovos: 47% maior que o tratamento de 45mg, que teve a menor mediana de ovos: 319. A maior divergência da relação de ovos e larvas foi no tratamento de 75mg, onde houve a maior inviabilidade de larvas com uma diferença de 380 ovos e apenas 295 larvas emergidas. Apesar da diferença estatística em relação ao controle os grupos experimentais não divergiram entre

si. Ainda que tenha havido uma diferença estatística significante na relação ovos e larvas, a viabilidade destes ovos, ou seja, a eclosão de larvas não foi prejudicada, mantendo-se semelhante à do grupo controle, como podemos ver na Tabela I.

Pré-ovoposição e Ovoposição F0

Período da pré-oviposição dos insetos dos grupos experimentais apresentou diferença significativa em relação aos insetos do grupo controle, já no período de oviposição, apesar dos insetos dos grupos experimentais apresentarem uma discreta diminuição no período da postura dos ovos em relação ao grupo controle, não houve diferença estatística significativa, como podemos ver na Tabela I.

Mortalidade Acumulada F0 e F1

As mortes foram contabilizadas através do acúmulo ao longo das fases do ciclo de vida dos insetos, tanto de F0 quanto de F1. Os dados referentes a mortalidade acumulada estão apresentados em porcentagem, em ambas as condições (F0 e F1). Em F0 todos os grupos experimentais apresentaram resultados com diferença estatística significante em relação ao controle, já em F1, apenas os grupos experimentais provenientes de pais tratados com as maiores doses (45mg e 75mg) de sulfoxaflor apresentaram resultados com diferença estatística significante; mesmo assim mantiveram um padrão próximo ao grupo controle como podemos observas nas tabelas II e III.

Duração do Ciclo de Vida F0 e F1

Foi possível observar mudanças significativas no tempo (em dias) da duração das fases de larva à adulto de *C. claveri* como podemos ver nas tabelas IV e V. Em F0 todos os grupos experimentais diferiram estatisticamente do controle, mas não diferiram entre si. Já em F1 as larvas provenientes dos grupos experimentais, apesar da diferença estatística, mantiveram um padrão muito próximo ao controle.

Parâmetros Morfológicos (Efeitos subletais)

O epitélio intestinal (mesêntero) dos insetos submetidos ao tratamento com o sulfoxaflor durante o presente estudo apresentou importantes alterações na morfologia das células, observadas tanto pela microscopia de luz, como pela microscopia eletrônica. Nos três grupos experimentais foi possível observar irregularidades na altura, forma e organização das células epiteliais, exibindo grandes protusões citoplasmáticas da

superfície celular apical, em direção ao lúmen e intensa vacuolização citoplasmática, observadas pela microscopia de luz (Figura 2). A microscopia eletrônica de transmissão revelou ainda o descolamento/espaçamento basal das células epiteliais em relação a membrana basal, presença de grandes vacúolos citoplasmáticos e invaginações basais dilatadas (Figura 3). A microscopia eletrônica de varredura evidenciou leve desorganização das microvilosidades nas células absortivas, protusões citoplasmáticas e áreas de ruptura da membrana plasmática apical nestas células (Figura 5).

Assim como o mesêntero, os túbulos de Malpighi dos insetos submetidos ao tratamento com o sulfoxaflor também apresentaram alterações na morfologia das células, porém, bem mais discretas do que àquelas observadas nas células do epitélio intestinal. Pela microscopia eletrônica de transmissão, nos três grupos experimentais, foi possível observar grandes vacúolos citoplasmáticos com conteúdo floculado e discreta dilatação nas invaginações basais das células principais (Figura 4). Já pela microscopia eletrônica de varredura não foi possível observar alterações morfológicas nas células epiteliais, uma vez que não conseguimos expor este epitélio durante a preparação dos túbulos, que por serem extremamente finos, não foi possível fraturá-lo longitudinalmente para que pudéssemos fazer a varredura da superfície interna. Externamente não houve modificação nos túbulos de Malpighi (Figura 5)

Também foi possível a detecção de grânulos de cálcio nas células intestinais e dos túbulos de Malpighi de *C. claveri* submetidas a ingestão de sulfoxaflor, um importante indicador de resposta citoprotetora. Avaliamos a presença destes grânulos por meio da coloração com Von Kossa nos insetos dos grupos experimentais e observamos marcação positiva para grânulos de cálcio no citoplasma das células epiteliais do mesêntero e nas células dos túbulos de Malpighi, as quais exibiram uma grande quantidade destes grânulos no citoplasma, em especial no grupo submetido ao tratamento com 75mg de sulfoxaflor (Figura 6).

4.1.4 Discussão

Os dados estatísticos relacionados aos parâmetros biológicos e transgeracionais de *C. claveri* submetido ao tratamento com sulfoxaflor mostraram que, apesar de existir algumas diferenças significativas relacionadas aos efeitos do inseticida nos grupos experimentais, o impacto do sulfoxaflor, no modelo de bioensaio desenvolvido no laboratório, não foi expressivo negativamente, a ponto de comprometer a sobrevivência da espécie no ambiente onde se faz uso deste inseticida.

De acordo com Garzón *et al*., (2015), nos insetos da espécie *Chrysoperla carnea* submetidos ao tratamento com sulfoxaflor, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada para fecundidade e, apesar de ter sido encontrada diferença significativa para a fertilidade dos ovos, os autores ressaltam um papel inofensivo deste inseticida para larvas de *C. carnea,* o que também foi destacado por Barbosa *et al*., (2017) para a mesma espécie, que mencionam a baixa susceptibilidade das larvas de crisopídeos para o sulfoxaflor. Da mesma forma, outros estudos realizados com inimigos naturais submetidos aos tratamentos com azadiractina (Bernardi *et al.*, 2013; Rugno *et al.*, 2016), fipronil (Medina *et al.*, 2004) e sulfoxaflor (Linguadoca *et al*., 2021) também não encontraram diferenças significativas na reprodução, fecundidade e fertilidade dos insetos. Entretanto Garzón *et al*. (2015) mostram que o sulfoxaflor pode trazer diferenças significativas para o período de pupação, emergência dos adultos e mortalidade acumulada dos insetos, sendo que, uma pequena parcela no acúmulo de mortes consiste em adultos emergentes que não conseguiram expandir com sucesso suas asas, e por conseguinte, acabam morrendo. Este efeito de má formação das asas parece ser um indicativo de desidratação na fase larval, em função do efeito anti-alimentar causado por alguns inseticidas ou estresse por conta do contato com o agente químico (Barbosa *et al.*,2017).

Com relação aos efeitos transgeracionais, a literatura descreve impactos negativos na geração F1 de *Apolygus lucorum*, quando exposta a doses subletais de sulfoxaflor, o que acelerou o tempo médio da geração F1, além de alterar os padrões de alimentação da espécie e no processo de oviposição e embriogênese (Zhen *et al.*, 2018; Lu, *et al.*,2020), além disso, tais estudos mostram uma redução significativa na taxa de desenvolvimento ninfal, fecundidade e período de oviposição na geração F0 de *Apolygus lucorum*. Já Chen *et al.*, (2016) e Brevik *et al.*, (2018) mencionam uma possível resistência aos inseticidas que pode ser desenvolvida por insetos da geração F1 de pais

expostos a tratamentos subletais; esses estudos foram realizados em insetos pragas, onde se espera uma alta mortalidade ao menos na geração F0, que é alvo principal dos inseticidas.

Porém, investigações com inimigos naturais mostram influências negativas significativas dos inseticidas na fecundidade e na eclosão de ovos de *Harmonia axyridis*, como relatado em investigação realizada em adultos desta espécie, onde se avaliou o efeito do tiametoxame, que também é um inseticida da classe dos neonicotinoides, o qual impactou negativamente na taxa de sobrevivência, emergência de adultos e fecundidade da espécie (Yu *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2019). Recentes contribuições sobre os efeitos do sulfoxaflor, trazem informações de que o princípio ativo deste novo inseticida gera efeitos transgeracionais na taxa de sobrevivência e no tempo de desenvolvimento de *Harmonia.axyridis* (Daí *et al*., 2021). Já para Barbosa *et al* (2017), que também realizou bioensaios com os inseticidas sulfoxaflor e flupiradifurona em *Crysoperla carnea*, demostraram baixo impacto negativo destes inseticidas para larvas desta espécie de crisopídeo. Apesar do potencial efeito negativo do sulfoxaflor, (Barbosa *et al*., 2017; Daí *et al*., 2021; Linguadoca *et al*., 2021), para vários insetos, tanto pragas quanto predadores naturais, os efeitos transgeracionais deste inseticida ainda permanecem desconhecidos para a grande maioria dos insetos alvos e não alvos, sendo necessária a ampliação no conhecimento deste contexto para que se possa relacionar isto à possibilidade de resistência ao inseticida em gerações futuras de insetos.

Somado a isto, os resultados morfológicos encontrados para as células do intestino médio e para os túbulos de Malpighi de *C claveri* tratado com sulfoxaflor, exibem alterações celulares importantes, porém sem nenhuma indicação de morte celular induzida ou mesmo desestruturação da integridade tecidual dos órgãos investigados, o que parece indicar uma tolerância deste inseto ao inseticida avaliado.

As alterações celulares descritas neste estudo para *C. claveri* após a ingestão do sulfoxaflor foram mais evidentes nas células do epitélio intestinal, quando comparadas com àquelas vistas nas células dos túbulos de Malpighi. Tal resultado é esperado em função do intestino ser o primeiro órgão a interagir diretamente com o inseticida ingerido, o qual realiza uma alta absorção de substâncias presentes no lúmen (Jimenez e Gilliam, 1990, Cruz-Landim 2009, Catae *et al.,* 2014, Castro *et al.*, 2020) e, portanto, pode estar associado ao aumento da atividade autofágica para reciclagem e digestão celular (Yoshimori, 2004; Rossi *et al.*,2013). Scudeler *et al.*, 2013, 2016 e 2019 observaram alterações morfológicas semelhantes, em relação aos vacúolos, nesta mesma espécie de

inimigo natural quando submetida ao tratamento com a formulação sintética azadiractina e o óleo de nim; além disso, estes autores também relataram a presença de grandes protusões citoplasmáticas na superfície apical das células intestinais, relacionando-as com a perda da integridade do citoesqueleto do córtex apical. Dados de alterações morfológicas nas células epiteliais do intestino médio de insetos submetidos a tratamentos com substâncias tóxicas, como os inseticidas, tem contribuído, constantemente, com o conhecimento destes efeitos subletais na morfologia destas células (Catae *et al.*,2014; Chen *et al.*,2016; Fiaz *et al.*,2018; Castro *et al.*,2020).

Os túbulos de Malpighi não são inervados, e seu controle fino fica sob a influência do sistema neuroendócrino que libera aminas e neuropeptídeos como hormônios diuréticos ou antidiuréticos. Esses hormônios agem sobre os túbulos de Malpighi por meio de uma variedade de receptores acoplados à proteína G ligados a sistemas de segundos mensageiros que influenciam transportadores de íons e aquaporinas; regulando assim a secreção de fluido (Orchard *et al.*,2021). Estas vias permitem um controle iônico mais refinado, assim como a composição osmótica e a manutenção do volume da hemolinfa e a eliminação dos excessos de íons, água e substâncias tóxicas, como os inseticidas. Vários neuropeptídeos já foram identificados fornecendo a informação de que eles são liberados para otimizar a homeostase dos insetos (Davies, *et al.*,1995; Yu e Beyenbach, 2002; MacPherson *et al.*,2004; Cohen *et al.*,2020; Orchard *et al.*,2021).

Segundo Scudeler *et al.*,2016, a presença de grânulos de cálcio no citoplasma das células epiteliais do mesêntero está associada a uma ação citoproterora e de detoxificação celular (Nogarol e Fontanetti 2010; Souza e Fontanetti 2011). Já para os túbulos de Malpighi, o aumento nos grânulos de cálcio parece estar relacionado a uma cascata de reações metabólicas que elevam a concentração de cálcio intracelular, através da ação de neuropeptídeos (por exemplo: CAPA1 e 2 para *Drosophilas* e Leucocininas para *Aedes aegypti*) que regulam a formação de fluidos nos túbulos. Essas reações resultam na ativação da V-ATPase, aumentando o volume de fluidos e consequentemente auxiliando na eliminação de substâncias tóxicas (Davies, *et al.*,1995; Yu e Beyenbach, 2002; MacPherson *et al.*, 2004; Browne e O'Donnell, 2018; Cohen *et al.*,2020). Este fato pode então ser considerado para justificar a presença de grande quantidade de grânulos de cálcio no citoplasma das células dos túbulos de Malpighi de *C. claveri* expostos ao inseticida, além de poder estar relacionado a observação de discretas alterações

morfológicas nestas células nos grupos experimentais, diferente do que foi observado nas células do mesêntero destes animais.

As alterações morfológicas observadas nas células dos túbulos de Malpighi de *C. claveri* submetidos ao tratamento com sulfoxaflor foram mais discretas do que àquelas descritas para as células intestinais. Apesar de ser um tubo com epitélio simples, os túbulos de Malpighi tem funcionalidades complexas, apresentando um padrão celular comum para insetos como *Drosophila melanogaster* (Beyenbach, *et al.*,2010), *Myrmeleon sp.* (Penha, 2011), *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (Piermarini, *et al.*,2017), *Terrobittacus implicatus* (Liu e Hua, 2018), entre outros. De acordo com a literatura, a morfologia das células dos túbulos de Malpighi nos insetos pode variar entre as espécies, mas as características básicas são semelhantes, desta forma, nas células principais, a superfície apical apresenta microvilosidades, a porção basal do epitélio tem invaginações em sua membrana plasmática, que são perpendiculares à lâmina basal e possuem grande quantidade de mitocôndrias, além de complexos de Golgi, vacúolos e retículo endoplasmático bem desenvolvido. A maioria das mitocôndrias estão associadas às invaginações basais, suprindo a necessidade energética para o processo de transporte de material da hemolinfa para o epitélio tubular (Nocelli *et al*., 2016), semelhante ao que foi observado em *C. claveri*.

A vacuolização citoplasmática também foi relatada em *Apis mellifera* como um dos efeitos subletais de imidaclopride e tiametoxame nos túbulos de Malpighi destes insetos não alvos (Rossi, *et al.*,2013, Catae *et al.*,2014). Da mesma forma *Scaptotrigona postica* (Ferreira *et al.*,2013*),* tratadas com ácido bórico e fipronil, também apresentaram vacuolização citoplasmática e aumento do nível de condensação da cromatina; e *Africanized honey bee,* tratadas com Spinosad (Lopes *et al.*,2018) mostrou desorganização do epitélio celular nos túbulos de Malpighi, ampla vacuolização, degradação no citoplasma, cromatina condensada e área nuclear diminuída. A vacuolização pode indicar uma fase de autofagia, em resposta ao estresse químico sofrido pela célula, porém ele não necessariamente resulta em morte celular, esse processo é considerado natural para reciclagem de proteínas e organelas (Yoshimori, 2004; Ferreira, *et al.,* 2013*;* Rossi, *et al.*,2013*;* Catae *et al.*,2014).

Através dos resultados morfológicos e biológicos foi possível concluir que o uso de inseticidas que contêm como princípio ativo principal o sulfoxaflor sugere que, mesmo sendo indicado como inseticida neurotóxico, ele pode causar danos em outros órgãos,

ainda que em baixas concentrações, entretanto tais danos parecem não causar um impacto negativo tão acentuado nos insetos da geração F0 e nem nos da geração F1. Investigações adicionais sobre os efeitos deste inseticida a longo prazo na lavoura devem ser realizados para se obter dados de campo e relacioná-los aos dados obtidos em bioensaios de laboratório, visando o conhecimento destes efeitos para monitorar e manter a espécie *C. Claveri* no controle natural de pragas no ambiente.

4.1.5 Referencias

Albuquerque, G.S. Crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae). 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, cap. 23, p. 969-1022.

Almeida, M.F.; Barros, R.; Junior, M.G.C.G.; Freitas, S.; Bezerra, A.L. Biologia de Ceraeochrysa claveri Navás (Neuroptera: Chrysopidae) predando Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Ciência Rural,** 39(2): 313-318, 2009.

Alyea, R.A.; Gollapudi, B.B.; Rasoulpour, R.J. Are we ready to consider transgenerational epigenetic effects in human health risk assessment? **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 55: 292-298, 2014.

Babcock, J.M.; Gerwick, C.B.; Huang, J.X.; Loso, M.R.; Nakamura, G.; Nolting, S.P.; Rogers, R.B.; Sparks, T.C.; Thomas, J.; Watson, G.B.; Zhu, Y. Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide. **Pest Management. Science**., 67: 328-334, 2011.

Barbosa, P. R. R; Michaud, J. P; Bain, C.L; Torres, J.B. Toxicity of three aphicides to the generalist predators Chrysoperla carnea (Neuroptera: Chrysopidae) and Orius insidiosus (Hemiptera: Anthocoridae). **Ecotoxicology**, 2017.

Bernardi, D.; Botton, M.; Cunha, U.S.; Bernardi, O.; Malausa, T.; Garcia, M.S.; Nava, D.E. Effects of azadirachtin on Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae) and its compatibility with predatory mites (Acari: Phytoseiidae) on strawberry. **Pest Management Science**, 69: 75-80, 2013.

Beyenbach, K.W; Skaer, H; Dow, J.A.T. The Developmental, Molecular, and Transport Biology of Malpighian Tubules. **Annual Review of Entomology**. 55:351–74, 2010.

Bezerra, C.E.S.; Nogueira, C.H.F.; Sombra, K.D.S.; Demartelaere, A.C.f.; Araujo, E.L. Crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae): Aspectos biológicos, potencial de utilização e perspectivas futuras. **Revista Caatinga**, 22(3): 1-5, 2009.

Brevik, K; Lindstrom, L; McKay, S.D; Chen, Y.H. Transgenerational effects of insecticides — implications for rapid pest evolution in agroecosystems. **Science Direct**. 26: 34-40, 2018.

Browne, A; O'Donnell. M.J. Mechanisms of calcium sequestration by isolated Malpighian tubules of the house cricket Acheta domesticus. **Insect Biochem. Physiol**. 97:e21431, 2018.

Catae, A.F.; Roat, T.C.; Oliveira, R.A.; Nocelli, R.C.F.; Malaspina, O. Cytotoxic effects of Thiamethoxam in the midgut and malphighian tubules of Africanized Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, 77: 274-281, 2014.

Castro, M.B.A, Martinez, L.C, Cossolin, J.F.S; Serra, R.S.S; Serrão, J.E. Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of Apis mellifera honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. **Chemosphere** 248, 126075, 2020.

Chahine, S.; O'Donnell, M.J. Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of Drosophila melanogaster. **The Journal of Experimental Biology**, 214: 462-468, 2011.

Chen, X.; Ma, K.; Li, F.; Liang, P.; Liu, Y.; Guo, T.; Song, D.; Desneux, N.; Gao, X. Sublethal and transgenerational effects of sulfoxaflor on the biological traits of the cotton aphid, Aphis gossypii Glover (Hemiptera: Aphididae). **Ecotoxicology**, 10: 1841-1848, 2016.

Cloyd, R.A. Indirect effects of pesticides on natural enemies. In: Soundararajan, R.P. (Ed), Pesticides-advances in chemical and botanical pesticides. **Intech, Rijeka, Croatia**, 127- 150p, 2012.

Cohen, E; Sawyer, J.K; Peterson, N.G; Dow, J.A.T; Fox, D.T. **Physiology, Development, and Disease Modeling in the Drosophila Excretory Genetics**, 214, 235–264, 2020

Cruz-landim, C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. **Editora Unesp**, São Paulo, 2009.

Daí, C; Ricupero, M; Wang, Z; Desneux , N; Biondi, A; Lu, Y. Transgenerational Effects of a Neonicotinoid and a Novel Sulfoximine Insecticide on the Harlequin Ladybird. **Insects,** 12, 681, 2021.

Davies, S.A; Huesmann, G.R; Maddrell, S.H.P; O'Donnell, M.J; Skaer, N.J.V; Dow, J.A.T; Tublitz, N.J. CAP2b, a cardioacceleratory peptide, is present in DrosophiZa and stimulates tubule fluid secretion via cGMP. **The American Physiological**, 95, 0363-6119, 1995.

Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.M. The subletal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**., 52: 81-106, 2007.

Ferreira, R.A.C; Zacarin, E.C.M.S; Malaspina, O; Bueno, O.C; Tomotake, M.E.M; Pereira, A.M. Cellular responses in the Malpighian tubules of Scaptotrigona postica (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. **Micron** 46, 57–65, 2013.

Fiaz, M; Martínez, L.C; Costa, M.S; Cossolin, J.F.S; Rueda, A.P; Gonçalves, W.G; Sant'Ana, A.E.G; Zanuncia, J.C; Serrão, J.E. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae**). Ecotoxicology and Environmental Safety**. 156, 1–8, 2018.

Finney, D.J. Probit Analysis. 3rd Edition, Cambridge University Press, 1971.

Freitas, S.; Penny, N.D. The green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of Brazilian agro- ecossystems. Proceedings of the California. **Academy of Sciences**, 52(19): 245-395, 2001.

Garzón, A; Medina, P; Amor, F; Vinuela, E; Budia, F. Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the biocontrol agents Chrysoperla carnea (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) and Adalia bipunctata (L.) (Coleoptera: Coccinellidae), **Chemosphere** 132 : 87–93, 2015.

Goodman, L.A. Simultaneous confidence curtervals fon contrests among multinomial populations. **Annals of Mathematical Statistics**, 35(2), 716-25, 1964.

Jiang, J.G.; Zhang, Z.Q.; Yu, X.; Yu, C.H.; Liu, F.; Mu, W. Sublethal and transgenerational effects of thiamethoxam on the demographic fitness and predation performance of the seven-spot ladybeetle Coccinella septempunctata L. (Coleoptera: Coccinellidae). **Chemosphere.** 216, 168–178, 2019.

Jimenez, D.R., Gilliam, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, Apis mellifera (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alcaline phosphatase, and nonspecific esterase**. Cell and Tissue Research**. 261, 431- 443, 1990.

Junqueira, L.C.U.; Junqueira, L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia. **Livraria Editora Santos**, São Paulo, 123p., 1983.

Kalichak, F. Resíduos de risperidona no ambiente: efeitos persistentes e transgeracionais. 2018**. Tese (Pós-graduação em Farmacologia Aplicada a Produção Animal) - Universidade Federal de Santa Maria**, 2018.

Linguadoca, A; Rizzi, C; Villa, S; Brown, M. Sulfoxaflor and nutritional deficiency synergistically reduce survival and fecundity in bumblebees, **Science of the Total Environment** 795, 148680, 2021.

Liu, L; Hua, B.Z. Ultrastructure of the larval Malpighian tubules in Terrobittacus implicatus (Mecoptera: Bittacidae). **Protoplasma**, 255:1121–1128, 2018.

Longhurst, C; Babcock, J.M; Denholm, I; Gorman, K; Thomas, J.D; Spark, T.C. Cross-resistance relationships of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor with neonicotinoids and other insecticides in the whiteflies Bemisia tabaci and Trialeurodes vaporariorum. **Pest Management Science**, 69: 809–813, 2013.

Lopes, M.P; Fernandes, K.M; Vaner, H; Tomé, V; Gonçalves, W.G; Miranda, F.R; Serrão, J.E; Martins, G.F. Spinosad-mediated effects on the walking ability,midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers**. Pest Management Science**. 2018; 74: 1311–1318, 2018.

Lu, Z.; Dong, S.; Li, C.; Li, L.; Yu, Y.; Ying, S.; Men, X. Sublethal and transgenerational effects of sulfoxaflor on the demography and feeding behaviour of the mirid bug Apolygus lucorum. **Plos One**, 2020.

Ma, K.; Tang, Q.; Xia, J.; Lv, N.; Gao, X. Fitness costs of sulfoxaflor resistance in the cotton aphid, Aphis gossypii Glover. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 158: 40-46, 2019.

Ma, K.; Tang, Q.; Zhang, B.; Liang, P.; Wang, B.; Gao, X. Overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with sulfoxaflor resistance in Aphis gossypii Glover. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 157: 204-210, 2019.

Malaspina, O.; Zacarin E.C.M.S. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian journal of morphological sciences**, 23(3/4): 303-309, 2006.

MacPherson, M.R.; Broderick, K.E.; Graham, S.; Day, J.P.; Houslay, M.D.; Dow, J.A.T.; Davies, S.A. The dg2 (for) gene confers a renal phenotype in Drosophila by modulation of cGMP-specific phosphodiesterase. **The Journal of Experimental Biology** 207: 2769-2776, 2004.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Agrofit. Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA, Brasília, DF, Brasil. Acesso em 20 de junho 2020. Disponível: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

Medina, P; Budia, F; Del Estal, P; Adán A; Viñuela, E. Toxicity of Fipronil to the Predatory Lacewing Chrysoperla carnea (Neuroptera: Chrysopidae), **Biocontrol Science and Technology**, 14(3), 261-268, 2004.

Nocelli, R.C.F.; Socolowski, P.C.; Roat, T.C.; Zacarin, E.C.M.S.; Malaspina, O. Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. **Insect Physiology**, 6: 13-23, 2016.

Nogarol, L.R; Fontanetti, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: tissular responses of the midgut. **Micron** 41:239–246, 2010.

Orchard, I; Leyria, J; Dailami, A.A; Lange, A.B. Fluid Secretion by Malpighian Tubules of Rhodnius prolixus: Neuroendocrine Control With New Insights From a Transcriptome Analysis. **Frontiers in Endocrinology**, 12, 722487, 2021.

Pearse, A.G.E. Histochemistry: theoretical and applied, 3 ed., Churchill Livingtsone, Edinburgh, 759p., 1972.

Penha, C.A.P.V. Alterações Morfofisiológicas Em Células Dos Túbulos De Malpighi Durante O Desenvolvimento De Myrmeleon Sp (Neuroptera, Myrmeleontidae). 2011. **Tese (Doutorado) - Curso de Genética, Unesp, São José do Rio Preto**, 2011.

Piermarini, P.M; Esquivel, C.J; Denton, J.S. Malpighian Tubules as Novel Targets for Mosquito Control. **Journal of Environmental Research and Public Health**, 14, 111, 2017.

Rossi, C.A.; Roat, T.C.; Socolowski, P.C.; Malaspina, O. Effects of Sublethal Doses of Imidacloprid in Malpighian Tubules of Africanized Apis mellifera (Hymenoptera, Apidae) **Microscopy Research and Technique**, 76: 552–558, 2013.

Rugno, G.R.; Zanardi, O.Z.; Cuervo, J.B.; Morais, M.R.; Yamamoto, P.T. Impact of insect growth regulators on the predator Ceraeochrysa cincta (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). **Ecotoxicology**, 25: 940-949, 2016.

Pappas, M.L.; Broufas, G.D.; Koveos, D.S. Chrysopid predators and their role in biological control. **Journal of Entomology**, 8(3): 301-326, 2011.

Sâmia, R.R.; Gonjito, P.C.; Oliveira, R.L.; Carvalho, G.A. Sublethal and transgenerational effects of thiamethoxam applied to cotton seed on Chrysoperla externaand Harmonia axyridis. **Pest Management Science**., 75: 694-701, 2019.

Scudeler, E.L.; Garcia, A.S.G.; Padovani, C.R.; Pinheiro, P.F.F.; Santos, D.C. Cytotoxic effects of neem oil in the midgut of the predator Ceraeochrysa claveri. **Micron,** 80: 96-111, 2016.

Scudeler, E.L.; Garcia, A.S.G.; Padovani, C.R.; Santos, D.C. Pest and natural enemy: how the fat bodies of both the Southern armyworm Spodoptera eridania and the

predator Ceraeochrysa claveri react to azadirachtin exposure. **Protoplasma** 256:839–856, 2019.

Scudeler, E.L.; Padovani, C.R.; Santos, D.C. Effects of neem oil (Azadirachta indica A. Juss) on the replacement of the midgut epithelium in the lacewing Ceraeochrysa claveri during larval- pupal metamorphosis. **Acta Histochemica**, 116: 771-780, 2014.

Scudeler, E.L.; Santos, D.C. Effects of neem oil (Azadirachta indica A. Juss) on midgut cells of predatory larvae Ceraeochrysa claveri (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, 44: 125-132, 2013.

Souza, T.S; Fontanetti, C.S. Morphological biomarkers in the Rhinocricus padbergi midgut exposed to contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 74:10–18, 2011.

Sparks, T.C.; Watson, G.B.; Loso, M.R.; Geng, C.; Babcock, J.M.; Thomas, J.D. Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of actionand basis for efficacy on resistant insects**. Pesticide Biochemistry and Physiology**, 107: 1-7, 2013.

Terhzaz, S.; Cabrero, P.; Brinzer, R.A.; Halberg, K.A.; Dow, J.A.T. A novel role of Drosophila cytochrome P450-4e3 in permethrin insecticide tolerance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology,** 67: 38-46, 2015.

Watson, G.B.; Losoa, M.R.; Babcock, J.M.; Haslera, J.M.; Letherera, T.J.; Young, C.D.; Zhu, Y.; Casidab, J.E.; Sparks, T.C. Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor**. Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 41: 432-439, 2011.

Xiao, D.; Zhao, J.; Guo, X.J.; Chen, H.Y.; Qu, M.M.; Zhai, W.G.; Desneux, N.; Biondi, A.; Zhang, F.; Wang, S. Sublethal effects of imidacloprid on the predatory seven-spot ladybird beetle Coccinella septempunctata. **Ecotoxicology** 25, 1782–1793, 2016.

Yoshimori T. Autophagy: A regulated bulk degradation process inside cells **Biochemical and Biophysical Research Communications** 313:453–458, 2004.

Yu, C.H.; Lin, R.H.; Fu, M.R.; Zhou, Y.M.; Zong, F.L.; Jiang, H.; Lv, N.; Piao, X.Y.; Zhang, J.; Liu, Y.Q.; Brock, T.C.M. Impact of imidacloprid on life-cycle development of Coccinella septempunctata in laboratory microcosms. Ecotoxicology and **Environmental Safety.** 110, 168–173, 2014.

Yu M.J; Beyenbach, K.W. Leucokinin activates Ca2 -dependent signal pathway in principal cells of Aedes aegypti Malpighian tubules. **American Journal Physiology Renal Physiology** 283: 499–508, 2002.

Zar, T.H. Biostatistical analysis, 5ed. New Jersey: Preutice-Hall, 994p, 2009. 41

Zhen, C.; Miao, L.; Gao, Z. Sublethal effects of sulfoxaflor on biological characteristics and vitellogeningene (AlVg) expression in the mirid bug, Apolygus lucorum (Meyer-Dür). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 144: 57-63, 2018.

Zhu, Y.; Loso, M.R.; Watson, G.B.; Sparks, T.C.; Rogers, R.B.; Huang, J.X.; Gerwick, B.C.; Babcock, J.M.; Kelley, D.; Hegde, V.B.; Nugent, B. M.; Renga, J.M.; Denholm, I.; Gorman, K.; Deboer, G.J.; Hasler, J.; Meade, T.; Thomas, J.D. Discovery and Characterization of Sulfoxaflor, a Novel InsecticideTargeting Sap-Feeding Pests. J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 59: 2950–295, 2011.

5. Lista de Tabelas

Tabela I. Longevidade de fêmeas e machos, fecundidade, fertilidade, viabilidade dos ovos, período de préoviposição e oviposição [mediana (valor mínimo; máximo)] de adultos de *C. claveri* que foram alimentados com sulfoxaflor durante o desenvolvimento larval.

	Controle	**15mg**	**45mg**	**75mg**	**p-valor**
Fêmeas (dias)	70 (30;128)	64 (26;99)	65 (43;90)	54 (31;70)	p>0,05
Machos (dias)	65 (36;96)	70 (30;104)	61 (39;81)	63 (46;93)	p>0,05
Fecundidade[a]	470 (348;676) **b**	377 (215;634) **a**	319 (204;526) **a**	380 (255;559) **a**	P<0,05
Fertilidade[b]	395 (209;615) **b**	309 (142;543) **a**	269 (146;424) **a**	295 (94;447) **a**	P<0,05
Viabilidade (%)[c]	82,4 (10,1)	75,8 (13,3)	75,8 (13,7)	76,6 (15,7)	p>0,05
Preoviposição(dias)	12 (11;14) **ab**	11 (8;17) **a**	13 (10;18) **b**	12 (10;19) **ab**	P<0,05
Oviposição(dias)	33 (13;45)	26 (13;31)	23 (15;37)	26 (14;39)	p>0,05

Dados seguidos por letras diferentes dentro das linhas são estatisticamente significativos (p<0,05, teste de Tukey). n = 15 casais por concentração.

[a] Fecundidade: Mediana de números de ovos postos por fêmea durante o período de oviposição

[b] Fertilidade: Mediana de número de larvas que emergiram

[c] Viabilidade (%): Média (Desvio Padrão). Cálculo: [(fertilidade /fecundidade) x 100]

Tabela II. Porcentagem de mortalidade acumulada ao longo dos instares da geração F0 (larvas de *C.claveri* que foram tratadas em seu período de desenvolvimento por 10 dias)

	Larvas (Geração F0)					
Grupos	1 instar	2 instar	3 instar	Pré-pupa	Pupa	Adulto
Controle	0 a	2,5 a	5,0 a	6,7 a	7,5 a	7,5 a
15mg	0 a	6,2 a	8,4 a	19,6 b	20 b	22,7 b
45mg	0 a	3,7 a	8,7 a	13,8 ab	15,6 ab	23,4 b
75mg	0 a	5,1 a	7,6 a	6,7 a	10,2 ab	16,9 ab

Dados seguidos por letras diferentes dentro das colunas são estatisticamente significativos (p<0,05, teste de homogeneidade de Goodman).

Tabela III. Porcentagem de mortalidade acumulada ao longo dos instares da geração F1 (**prole** das larvas de *C.claveri* que foram tratadas em seu período de desenvolvimento por 10 dias)

Transgeracional (Geração F1)						
Grupos	1 instar	2 instar	3 instar	Pré-pupa	Pupa	Adulto
Controle	0 a	2,3 a	4,3 a	8 a	8 a	9 a
15mg	0 a	1,3 a	3,0 a	6,3 a	6,7 a	7,3 a
45mg	0 a	3,3 a	5,7 a	16,3 b	16,3 b	17 b
75mg	0 a	3,3 a	3,7 a	6,7 a	6,7 a	12,3 ab

Dados seguidos por letras diferentes dentro das colunas são estatisticamente significativos (p<0,05, teste de homogeneidade de Goodman).

Tabela IV. Número de dias em cada instar [mediana (valor mínimo; máximo)] da geração F0 (Larvas de *C.claveri* que foram tratadas em seu período de desenvolvimento por 10 dias)

Dados seguidos por letras diferentes dentro das colunas são estatisticamente significativos

Estágio Larval Geração F0					
Grupos	1 instar	2 instar	3 instar	Pré-pupa	Pupa
Controle	4(1;7) a	4(3;7) a	5(4;7) a	4(3,5) a	9(7;11) a
15mg	4(1;10) ab	5(1;10) b	5(2;21) ab	4(3;15) ab	9(7;19) b
45mg	4(1;7) a	5(1;9) b	6(4; 12) b	5(3;11) b	9(7;18) b
75mg	4(3;10) b	5(3;8) b	5(3;12) ab	4(3;6) a	9(7;15) ab
P-valor	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05

(p<0,05, teste de Dunn).

Tabela V. Número de dias em cada instar [mediana (valor mínimo; máximo)] da geração F1 (**Prole** das larvas de *C.claveri* que foram tratadas em seu período de desenvolvimento por 10 dias)

Estágio Larval Geração F1					
Grupos	1 instar	2 instar	3 instar	Pré-pupa	Pupa
Controle	4(1;8) b	5(1;11) b	5(3;10) a	4(3,5) b	9(6;14) b
15mg	3(2;9) a	5(1;13) b	6(1;13) b	4(2;6) ab	9(1;11) a
45mg	5(1;12) c	5(1;12) b	5(1; 12) a	4(2;4) a	9(6;19) b
75mg	4(1;7) b	4(1;9) a	5(1;17) a	4(3;7) b	9(7;24) b
P-valor	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05

Dados seguidos por letras diferentes dentro das colunas são estatisticamente significativos (p<0,05, teste de Dunn).

6. Lista de Imagens

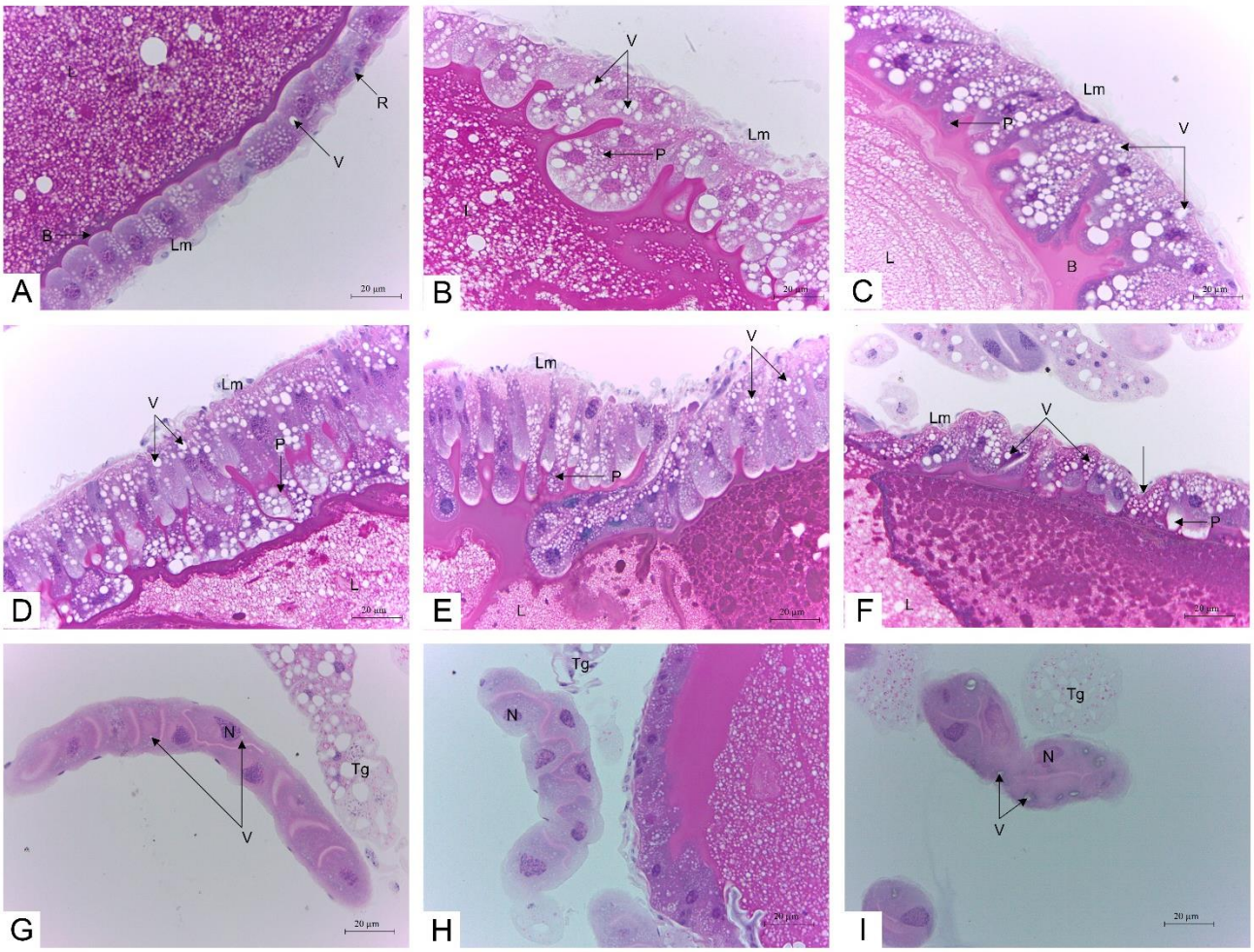


Fig. 2 Microscopia de Luz, coloração Hematoxilina-eosina. **(de A à F)** Instestino médio (mesêntero). (**A**) Grupo controle. Epitélio pseudoestratificado composto por células colunares com borda estriada acidofílica **(**B), células regenerativas (R) com citoplasma levemente basofílico, musculatura longitudinal (Lm). **(B)** Grupo Experimental (15mg). (**C-D**) Grupo Experimental (45mg). (**E-F**) Grupo Experimental (75mg). De B a F notar epitélio com células colunares alongadas, dilatação da superfície apical destas células, protusões citoplasmáticas (P), grande quantidade de vacúolos (V) e áreas de provável ruptura/lise celular (F – seta). **(de G à I)** Túbulos de Malpighi. (**G**) Grupo controle. Epitélio com células principais, núcleo (N), vacúolos (V). Tecido gorduroso (Tg). (**H-I**) Grupos Experimentais (45 e 75mg respectivamente) exibindo discreto aumento na quantidade e no tamanho de vacúolos citoplasmáticos em relação ao controle

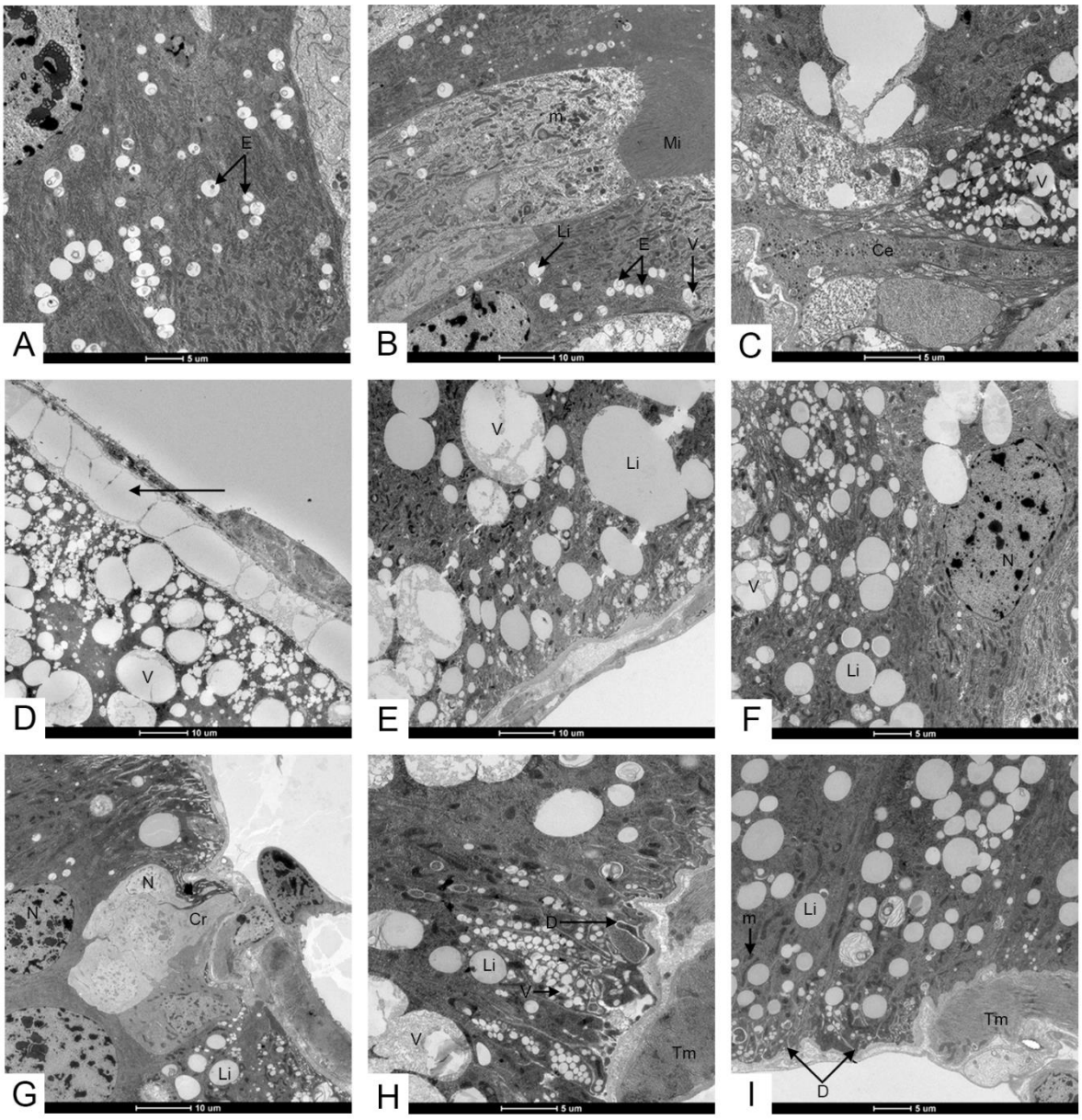


Fig. 3 Microscopia Eletrônica de Transmissão. Instestino médio (mesêntero). (**A-C**) Grupo controle. Células colunares com microvilosidades integras e longas (Mi), esferitos (E), mitocôndrias (m), gotas lipídicas (Li), vacúolos (V) e células endócrinas (Ce). (**D-I**) Grupos Experimentais. **(D)** Grupo tratado com 15mg. Notar descolamento/espaçamento da superfície celular basal em relação à membrana basal (seta), vacuolização celular (V). (**E-F**) Grupo tratado com 45mg. Aumento da vacuolização citoplasmática (V), gotas lipídicas (Li), núcleo (N). (**G-H-I**). Grupo tratado com 75mg. Invaginações basais em grande quantidade e dilatadas (D), grande vacuolização citoplasmática (V), células regenerativas (Cr), túnica muscular (Tm).

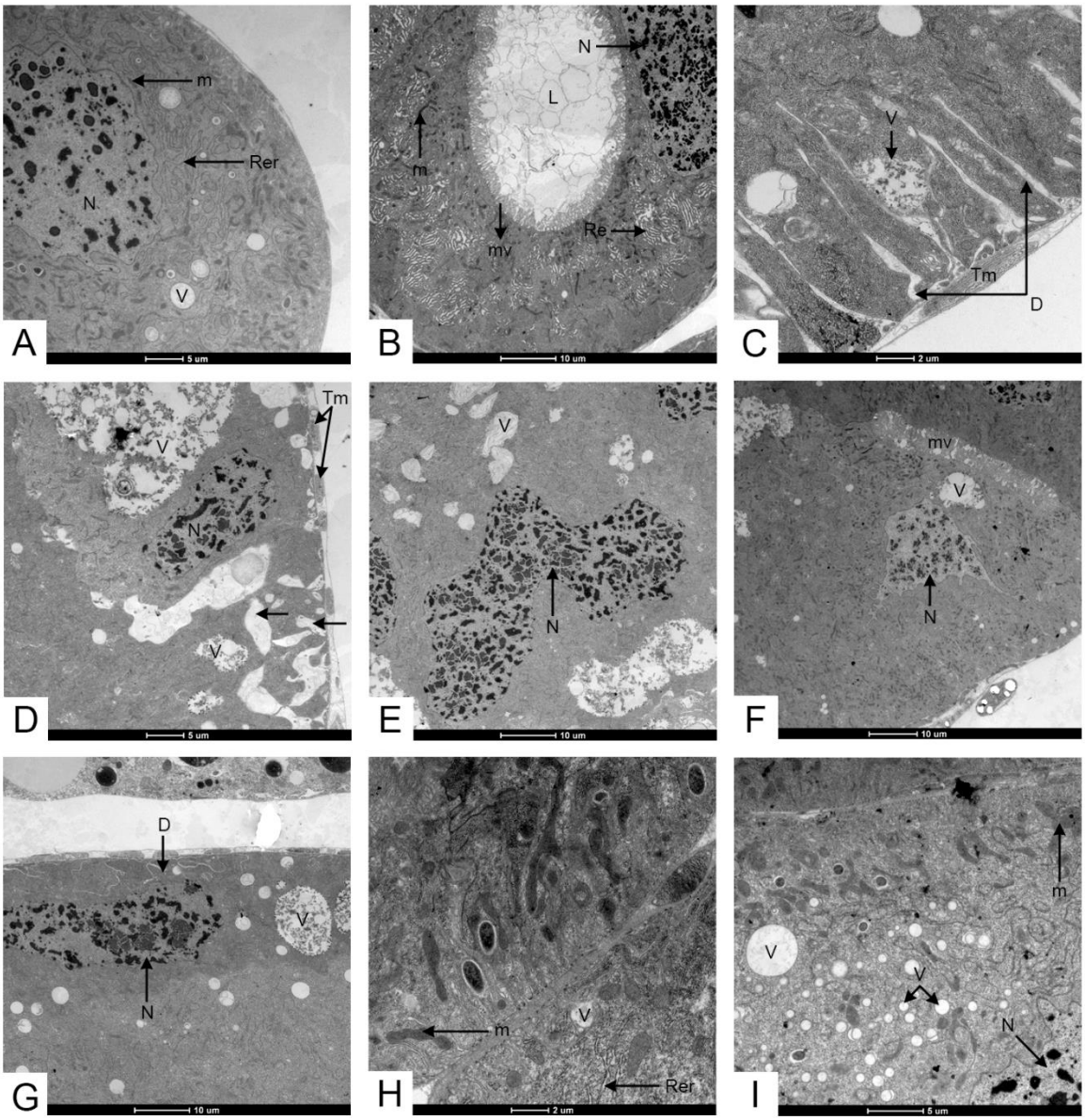


Fig. 4 Microscopia Eletrônica de Transmissão. Túbulos de Malpighi. (**A-B**) Grupo Controle. Células epiteliais com microvilosidades (Mv), mitocôndrias (m), retículo endoplasmático rugoso (Rer), núcleo (N), raros vacúolos (V); lúmen (L). (**C-E)** Grupo Experimental tratado com 15mg. Aparecimento de grandes vacúolos citoplasmáticos (V) e espaçamento/dilatação entre as células D). Túnica/tecido muscular (Tm). (**F-I**) Grupos Experimentais tratados com 45 e 75mg. **(F-G)** 45mg. **(H-I)** 75mg. Mantiveram as características ultraestruturais observadas no grupo tratado com 15 mg e próximas às características do Grupo controle.

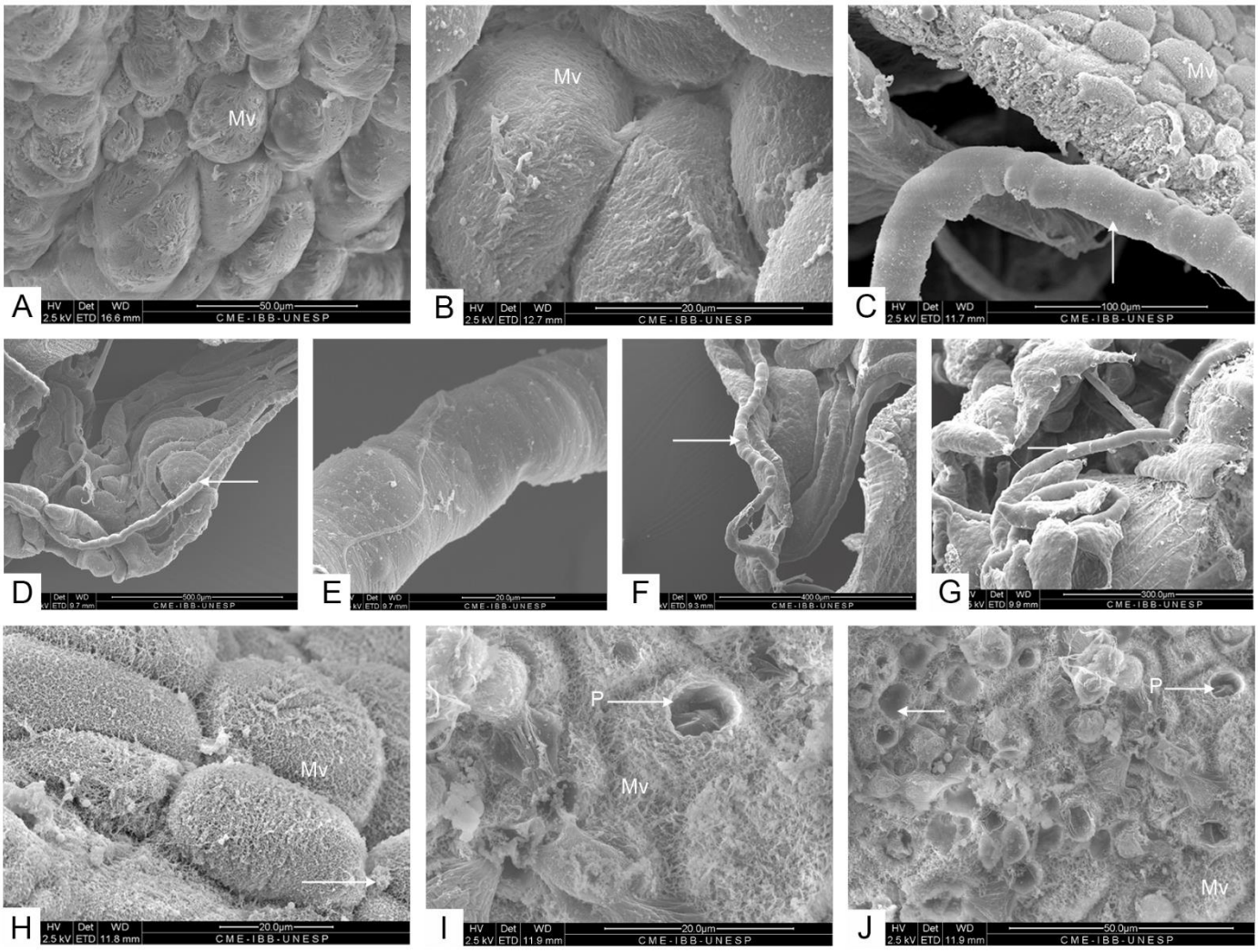


Fig. 5 Microscopia Eletrônica de Varredura. (**A-B**) Instestino médio (mesêntero). Grupo controle. Células colunares com microvilosidades (Mv) abundantes e longas. **(C)** Grupo controle. Células intestinais com microvilosidades (Mv) e túbulo de Malpighi (seta). (**H-J**) Grupos Experimentais (15, 45 e 75mg respectivamente). Notar microvilosidades (Mv) mais curtas e desorganizadas, protusões citoplasmáticas (seta) e áreas de ruptura de membrana apical (P). **(D-G) Túbulos de Malpighi.** (D) Grupo controle. (E-G) Grupos Experimentais (15, 45 e 75mg respectivamente). Notar morfologia externa integra e sem nenhuma alteração ultraestrutural em relação ao grupo controle (setas).

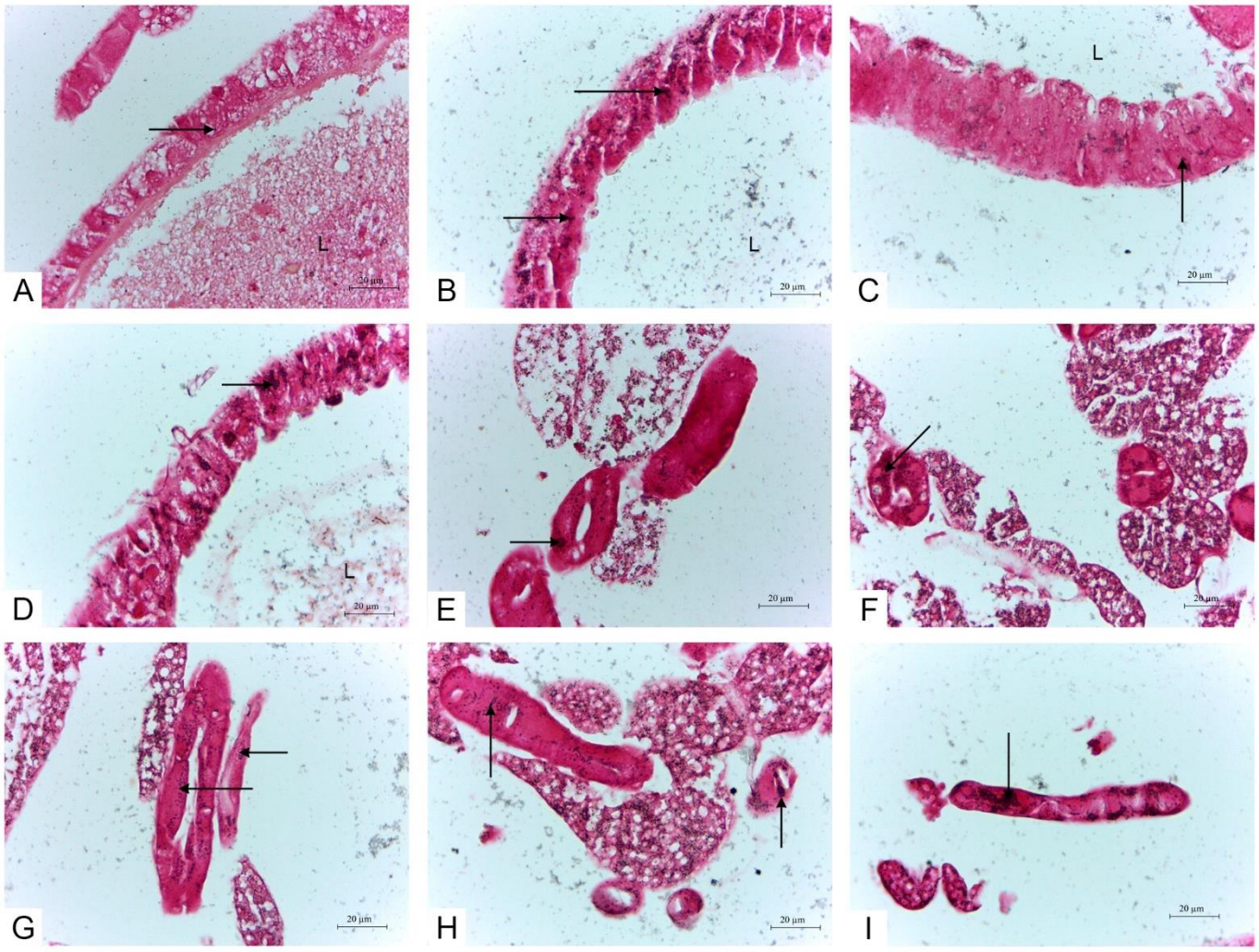


Fig. 6 Microscopia de Luz, técnica de Von Kossa. **(de A à D)** Instestino médio (mesêntero). (**A**) Grupo controle. Epitélio com raras marcações positivas para grânulos de Cálcio (seta). (**B-D**) Grupos Experimentais (15, 45 e 75mg respectivamente). Notar aumento de marcação positiva para grânulos de Cálcio (setas). (**de E à I**) Túbulos de malpighi. **(E)** Grupo Controle. Marcação positiva para grânulos de Cálcio nas células epiteliais **(F-I**) Grupos Experimentais (15, 45, 45 e 75mg respectivamente). Aumento na marcação positiva para grânulos de Cálcio (setas).

Considerações Finais

7. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que o sulfoxaflor pode causar efeitos subletais e transgeracionais discretos no inseto não alvo *Ceraeochrysa claveri*, em bioensaios de laboratório, sugerindo a compatibilidade de uso deste inseticida em culturas onde o inimigo natural *C. claveri* esteja presente.

Entretanto, investigações adicionais sobre os efeitos deste inseticida a longo prazo no campo devem ser realizadas para se obter dados de aplicação direta no ambiente e assim relacioná-los aos dados obtidos em bioensaios de laboratório, visando a manutenção da espécie *C. Claveri* no controle natural de pragas no ambiente.