

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INTERAÇÕES ENTRE ACARICIDA E INSETICIDAS
ISOLADOS OU COMBINADOS EM *Brevipalpus yothersi* E
Brevipalpus californicus (ACARI: TENUIPALPIDAE):
ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

Jaqueline Franciosi Della Vechia

Engenheira Agrônoma

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INTERAÇÕES ENTRE ACARICIDA E INSETICIDAS
ISOLADOS OU COMBINADOS EM *Brevipalpus yothersi* E
Brevipalpus californicus (ACARI: TENUIPALPIDAE):
ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

Jaqueline Franciosi Della Vechia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Júnior de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Entomologia Agrícola).

2021

V411i	Vechia, Jaqueline Franciosi Della Interações entre acaricida e inseticidas isolados ou combinados em <i>Brevipalpus yotheri</i> e <i>Brevipalpus californicus</i> (Acari: Tenuipalpidae): estudo dos efeitos biológicos e bioquímicos / Jaqueline Franciosi Della Vechia. -- Jaboticabal, 2021 131 p. : tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Daniel Júnior de Andrade Coorientador: Guilherme Duarte Rossi 1. Ácaro de plantas. 2. Enzimas Indução. 3. Inseticidas. 4. Pragas Controle. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INTERAÇÕES ENTRE ACARICIDA E INSETICIDAS ISOLADOS OU COMBINADOS EM *Brevipalpus yothersi* E *Brevipalpus californicus* (ACARI: TENUIPALPIDAE): ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

AUTORA: JAQUELINE FRANCIOSI DELLA VECHIA

ORIENTADOR: DANIEL JUNIOR DE ANDRADE

COORIENTADOR: GUILHERME DUARTE ROSSI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANIEL JUNIOR DE ANDRADE (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola (Fitossanidade) / FCAV / UNESP - Jaboticabal



p/ Prof. Dr. RAPHAEL DE CAMPOS CASTILHO (Participação Virtual)
Departamento de Entomologia e Acarologia / ESALQ/USP - Piracicaba/SP



p/ Pesquisador Dr. MÁRIO EIDI SATO (Participação Virtual)
Instituto Biológico de Campinas / Campinas/SP



p/ Profa. Dra. VALDENICE MOREIRA NOVELLI (Participação Virtual)
Instituto Agronômico de Campinas-IAC. / Cordeirópolis/SP



p/ Prof. Dr. ODIMAR ZANUZO ZANARDI (Participação Virtual)
Instituto Federal de Santa Catarina - Câmpus São Miguel do Oeste / São Miguel do Oeste/SC



Jaboticabal, 07 de julho de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Jaqueline Franciosi Della Vechia – Natural de Monte Alto - SP, nascida em 13 de março de 1992, filha de Elves Della Vechia e de Marlene Franciosi Della Vechia. Engenheira Agrônoma graduada pelo Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, no ano de 2014. Durante a graduação, desenvolveu atividades de pesquisa na área de Ecotoxicologia, com ênfase em plantas bioindicadoras para avaliação ecotoxicológica de herbicidas, inseticidas e fungicidas, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, de 2013 a 2014, sob a orientação do Prof. Dr. Claudinei da Cruz. Em agosto de 2015, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola) pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal - SP, atuando em pesquisas relacionadas à Tecnologia de Aplicação de Produtos Fitossanitários, com ênfase no controle químico de insetos e ácaros. Durante o Mestrado, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo da Costa Ferreira e do Prof. Dr. Daniel Júnior de Andrade. Em agosto de 2017, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia (Entomologia Agrícola) pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal - SP, onde atuou com pesquisas em controle químico de ácaros *Brevipalpus*, sob a orientação do Prof. Dr. Daniel Júnior de Andrade e do Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi, com bolsa cedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, de 2017 a 2019 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, de 2019 a 2021.

E-mail: jaquelinefdv@gmail.com

DEDICO

Aos meus pais Elves Della Vechia e Marlene Franciosi Della Vechia, e a minha irmã Patrícia Franciosi Della Vechia, pelo amor, incentivo, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, coragem e proteção durante toda esta longa caminhada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida e apoio financeiro a esta pesquisa realizada no Brasil (Processo 2018/06174-4) e à pesquisa realizada durante o estágio de pesquisa no exterior (Processo 2019/08384-9).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Júnior de Andrade, pelo apoio, conhecimentos transmitidos, incentivo, valiosa orientação e contribuição em meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi, pela ajuda, conhecimentos transmitidos, atenção, disponibilidade e ajuda na realização deste trabalho.

Ao meu supervisor durante o estágio de pesquisa no exterior, Prof. Dr. Thomas Van Leeuwen, pela orientação, atenção e infraestrutura disponibilizada.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade concedida e apoio fornecido.

À Ghent Univeristy (UGhent), Ghent, Bélgica, pela oportunidade da realização do estágio de pesquisa, por todo conhecimento adquirido e infraestrutura.

Ao Departamento de Ciências da Produção Agrícola, em especial ao setor de Fitossanidade da FCAV/Unesp, por toda a infraestrutura fornecida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), pelos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas ministradas.

Aos Professores Dr. Raphael de Campos Castilho e Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, pela participação e colaboração em meu Exame Geral de Qualificação.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), pelo apoio intelectual e financeiro oferecidos durante o desenvolvimento da tese. Em especial ao Dr. Renato Beozzo Bassanezi, pesquisador do Fundecitrus, pelo apoio intelectual oferecido.

À Dra. Aline Tassi e Me. Thaís Sinico, pela ajuda na identificação dos ácaros utilizados nos experimentos realizados na Universidade de Ghent (Bélgica).

Ao Dr. Odimar Zanuzo Zanardi, do Instituto Federal de Santa Catarina, pela parceria e apoio na realização das análises estatísticas.

Aos integrantes do Laboratório do Grupo de Estratégias e Manejo de Ácaros Neotropicais (GEMAN), Ana Beatriz Piai Kapp, Claudiane Martins da Rocha, Daiana Paixão Nogueira Silva, Leilane Martins Lacerda, Sidneia Terezinha Soares de Matos, Patrice Jacob Savi e Matheus Cardoso de Castro, pelo auxílio em todos os momentos necessários, companheirismo, conselhos e, principalmente, pela amizade construída ao longo dos anos.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica dos Insetos da FCAV/UNESP, Ana Letícia Zéro, Ciro Guidotti e Sandy Fonseca, pela amizade, conselhos e suporte.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da FCAV/Unesp, pela convivência e participação junto às disciplinas e cursos realizados.

Aos funcionários do Setor de Fitossanidade, Cibele da Silva Anton, Natalina Donizeti Curci e Dionísio Celso de Figueiredo Neto, pela atenção e auxílio prestado.

Ao Prof. Vitório Barato Neto, pela revisão gramatical da tese.

À minha família, que me incentivou na constante busca pelo conhecimento. Em especial aos meus pais Elves Della Vechia e Marlene Franciosi Della Vechia, por terem-me proporcionado essa oportunidade de um futuro promissor, dando-me todo apoio e força, inculcando valores sem os quais jamais me teria tornado a pessoa que sou hoje.

À minha irmã, Patrícia Franciosi Della Vechia, por permanecer sempre presente na partilha de minhas conquistas e frustrações.

Ao meu noivo, Rafael Gomes de Azevedo, pelo apoio, ajuda na realização dos experimentos, companheirismo e compreensão a mim dedicados a todo momento.

Às minhas amigas, Renata Thaysa da Silva Santos e Ana Letícia Zero dos Santos, pelo carinho, conselhos valorosos em momentos de dificuldade, parceria e amizade sincera, que facilitaram esta caminhada.

A todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO –.....	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Citricultura.....	3
2.2. Os ácaros <i>Brevipalpus yothersi</i> e <i>Brevipalpus californicus</i>	4
2.3. Manejo do ácaro da leprose.....	5
2.4. Fatores que influenciam o manejo do ácaro da leprose dos citros	6
2.5. Formas de exposição dos ácaros aos agrotóxicos	7
2.6. Mecanismos envolvidos na resposta aos agrotóxicos	9
2.6.1. Incompatibilidade da calda	10
2.6.2. Fatores biológicos	10
2.6.3. Fatores bioquímicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Locais de execução dos experimentos	16
3.2. Criação dos ácaros	16
3.2.1. <i>Brevipalpus yothersi</i>	16
3.2.2. <i>Brevipalpus californicus</i>	17
3.3. Agrotóxicos utilizados nos experimentos	18
3.4. Toxicidade de inseticidas isolados e combinados com espirodiclofeno sobre fases do ciclo biológico de <i>Brevipalpus yothersi</i>	19
3.4.1. Toxicidade sobre ovos.....	19
3.4.2. Toxicidade sobre fases móveis	20
3.5. Efeito de diferentes concentrações de acaricida, inseticidas e de misturas na fecundidade e na fertilidade de <i>Brevipalpus yothersi</i>	21
3.5.1. Experimento em laboratório.....	22
3.5.2. Experimento em casa de vegetação	24
3.6. Efeito dos produtos isolados e em mistura sobre parâmetros biológicos e demográficos de <i>Brevipalpus yothersi</i>	26
3.6.1. Análise dos dados	27
3.7. Efeito da mistura de inseticidas na eficiência de espirodiclofeno para o controle de <i>Brevipalpus yothersi</i> em condições de campo	30
3.7.1. Análise dos dados	33

3.8. Teor de espiroclorfenol em calda do acaricida isolado ou combinado aos inseticidas	34
3.8.1. Análise dos dados	35
3.9. Atividade enzimática em <i>Brevipalpus yothersi</i> expostos às misturas de acaricida e inseticidas	35
3.9.1. Tratamentos	35
3.9.2. Obtenção dos extratos enzimáticos	35
3.9.3. Determinação do conteúdo proteico	37
3.9.4. Atividade de esterases	37
3.9.5. Atividade de glutatona-S-transferase	38
3.9.6. Quantificação de proteínas contendo grupos heme	38
3.9.7. Análise dos dados	39
3.10. Atividade enzimática de ácaros <i>Brevipalpus yothersi</i> expostos aos inseticidas ao longo do tempo	39
3.10.1. Análise dos dados	40
3.11. Toxicidade de espiroclorfenol em <i>Brevipalpus yothersi</i> expostos previamente aos inseticidas	40
3.11.1. Análise dos dados	41
3.12. Curva de concentração-resposta de espiroclorfenol para <i>Brevipalpus californicus</i>	42
3.13. Toxicidade de espiroclorfenol ao <i>Brevipalpus californicus</i> expostos previamente a inibidores de enzima de detoxificação	43
3.13.1. Análise dos dados	44
3.14. Atividade enzimática em <i>Brevipalpus californicus</i> expostos às misturas de acaricida e inseticida	45
3.14.1. Determinação da atividade de mono-oxigenases em <i>Brevipalpus californicus</i> pelo método fluorimétrico	46
4. RESULTADOS	47
4.1. Toxicidade de inseticidas isolados e combinados com o espiroclorfenol sobre as fases do ciclo biológico de <i>Brevipalpus yothersi</i>	47
4.1.1. Toxicidade sobre ovos de <i>Brevipalpus yothersi</i>	47
4.1.2. Toxicidade sobre larvas de <i>Brevipalpus yothersi</i>	48
4.1.3. Toxicidade sobre ninfas de <i>Brevipalpus yothersi</i>	49
4.1.4. Toxicidade sobre adultos de <i>Brevipalpus yothersi</i>	51
4.2. Efeito de diferentes concentrações de acaricida, inseticidas e de misturas sobre a fecundidade e a fertilidade de <i>Brevipalpus yothersi</i>	52

4.3. Efeito de produtos isolados e em mistura sobre os parâmetros biológicos e demográficos de <i>Brevipalpus yothersi</i>	61
4.4. Efeito de misturas de inseticidas sobre a eficiência de espirodiclofeno no controle de <i>Brevipalpus yothersi</i> em condições de campo	72
4.5. Teor de espirodiclofeno em caldas do acaricida isolado ou combinado aos inseticidas	79
4.6. Atividade de enzimas de detoxificação em <i>Brevipalpus yothersi</i> expostos ao espirodiclofeno e aos inseticidas isolados e em mistura	80
4.7. Toxicidade de espirodiclofeno em <i>Brevipalpus yothersi</i> após diferentes tempos de exposição aos inseticidas	84
4.8. Influência de inibidores de enzimas de detoxificação no controle proporcionado por espirodiclofeno isolado e misturado aos inseticidas sobre <i>Brevipalpus californicus</i>	87
4.9. Atividade de enzimas de detoxificação em ácaros <i>Brevipalpus californicus</i> expostos ao acaricida e aos inseticidas isolados e em mistura	91
5. Discussão	93
5.1. Efeito biológico de espirodiclofeno, cipermetrina, fosmete e imidacloprido, isolados e combinados, em <i>Brevipalpus yothersi</i>	93
5.2. Efeito toxicológico de espirodiclofeno, cipermetrina, fosmete e imidacloprido, isolados e combinados, sobre <i>Brevipalpus yothersi</i> em condições de campo	101
5.3. Atividade de enzimas de detoxificação em ácaros <i>Brevipalpus yothersi</i> expostos aos produtos isolados e misturados	103
5.4. Atividade de enzimas de detoxificação e efeito de inibidores em ácaros <i>Brevipalpus californicus</i> expostos a espirodiclofeno, fosmete e imidacloprido, isolados e misturados	108
6. CONCLUSÕES	112
7. REFERÊNCIAS	114

INTERAÇÕES ENTRE ACARICIDA E INSETICIDAS ISOLADOS OU COMBINADOS EM *Brevipalpus yothersi* E *Brevipalpus californicus* (ACARI: TENUIPALPIDAE): ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

RESUMO – A intensa pulverização de agrotóxicos para o controle de artrópodes pragas em citros tem afetado negativamente o manejo de ácaros vetores de vírus (*Brevipalpus yothersi* e *Brevipalpus californicus*) que causam a leprose dos citros. Além dos casos de resistência de ácaros a acaricidas, falhas de controle de populações do ácaro da leprose suscetíveis a acaricidas têm sido associadas a exposição desses organismos a inseticidas utilizados para o manejo de insetos pragas dos citros. Alguns desses inseticidas não apresentam toxicidade significativa ao ácaro da leprose, mas, quando aplicados em mistura com acaricidas, podem reduzir a toxicidade de acaricidas. Detalhes sobre os efeitos que exposições combinadas de inseticidas com acaricidas podem exercer sobre ácaros do gênero *Brevipalpus* não são detalhadamente conhecidos. Diante disso, o objetivo principal da tese foi estudar os efeitos biológicos e bioquímicos do acaricida espirodiclofeno e inseticidas isolados ou combinados sobre os ácaros *B. yothersi* e *B. californicus* em condições de laboratório e campo. A atividade de enzimas de detoxificação foi caracterizada nesses ácaros, e o efeito de inibidores de enzima de detoxificação foi estudado em *B. californicus*. Verificou-se que o espirodiclofeno e os inseticidas cipermetrina, fosmete e imidacloprido alteraram parâmetros biológicos e demográficos importantes de *B. yothersi*. A combinação do espirodiclofeno com os inseticidas reduziram, substancialmente, a eficiência do acaricida sobre ovos e adultos de *B. yothersi*. Nos experimentos realizados a campo, a adição dos inseticidas à calda de espirodiclofeno reduziu o período de reinfestação de *B. yothersi* comparado ao acaricida aplicado isoladamente. Contudo, o teor de espirodiclofeno não foi alterado quando inseticidas foram adicionados à calda. A indução ou a inibição da atividade de enzimas de detoxificação em *B. yothersi* foi dependente do inseticida ou da mistura realizada, bem como do tempo de exposição aos inseticidas. Para os experimentos com *B. californicus*, a combinação do inseticida imidacloprido em mistura com espirodiclofeno resultou em efeito antagônico para controle, e os ácaros expostos a essa mistura apresentaram aumento na atividade de P450s, esterases e glutathione-S-transferases (GST). A adição de PBO (um inibidor da mono-oxigenase P450) à mistura de espirodiclofeno e imidacloprido resultou em efeito sinérgico sobre a mortalidade de *B. californicus*, mas a adição de DEM (um inibidor de GST) resultou em efeito antagônico. As consequências das misturas de espirodiclofeno com os inseticidas avaliados sobre o manejo dos ácaros *Brevipalpus* sp. e formas para minimizar os prejuízos das misturas antagônicas são discutidas.

Palavras-chave: Antagonismo, *Citrus* spp., enzimas de detoxificação, leprose dos citros, mistura em tanque

INTERACTIONS BETWEEN ACARICIDE AND INSECTICIDES ISOLATED OR COMBINED IN *Brevipalpus yothersi* AND *Brevipalpus californicus* (ACARI: TENUIPALPIDAE): A STUDY OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS

ABSTRACT - The intense spraying of pesticides for the citrus pest control has negatively affected the management of virus vector mites (*Brevipalpus yothersi* and *Brevipalpus californicus*) that cause citrus leprosis. In addition to cases of mite resistance to acaricides, failure to control leprosis mite populations susceptible to acaricides has been associated with the exposure of these organisms to insecticides used for the management of citrus pest insects. Some of these insecticides are not toxic to leprosis mite, but when sprayed in a mixture with acaricides, they can reduce the toxicity of acaricides. Details on the effects that combined exposures of insecticides with acaricides on mites of the genus *Brevipalpus* are not known in detail. Therefore, the main objective of the thesis was to study the biological and biochemical effects of acaricide spiroticlofen and insecticides isolated or combined on *B. yothersi* and *B. californicus* mites in laboratory and field conditions. The detoxification enzyme activity was characterized in these mites and the effect of detoxification enzyme inhibitors was studied in *B. californicus*. It was found that spiroticlofen and the insecticides cypermethrin, phosmet, and imidacloprid altered important biological and demographic parameters of *B. yothersi*. The combination of spiroticlofen with insecticides substantially reduced the efficiency of the acaricide on eggs and adults of *B. yothersi*. In experiments carried out in the field, the addition of insecticides to the spiroticlofen solution reduced the period of reinfestation of *B. yothersi* compared to the acaricide sprayed alone. However, the spiroticlofen concentration was not changed when insecticides were added to the spray solution. The induction or inhibition of the detoxification enzyme activity in *B. yothersi* was dependent on the insecticide or the mixture, as well as on the time of exposure to the insecticides. For the experiments with *B. californicus*, the combination of the imidacloprid in a mixture with spiroticlofen resulted in an antagonistic effect for mite control and the mites exposed to this mixture showed an increase in the activity of P450s, esterases, and glutathione-S-transferases (GST). The addition of PBO (a P450 monooxygenase inhibitor) to the mixture of spiroticlofen and imidacloprid resulted in a synergistic effect on the *B. californicus* mortality, but the addition of DEM (a GST inhibitor) resulted in an antagonistic effect. The consequences of mixtures of spiroticlofen with the insecticides evaluated on the management of *Brevipalpus* sp. mites and ways to minimize the damage from antagonistic mixtures are discussed.

Keywords: Antagonism, *Citrus* spp., detoxification enzymes, citrus leprosis, tank mixture

1. INTRODUÇÃO

A leprose dos citros é uma das principais doenças viróticas na citricultura da América Latina. Essa doença pode ser causada por vários tipos de vírus que afetam o citoplasma ou o núcleo das células das plantas (Kitajima et al., 2014; Ramos-González et al., 2017). Dentre esses, o tipo citoplasmático (citrus leprosis virus C-CiLV-C) é considerado o mais importante, devido aos prejuízos econômicos e social causados e pela maior prevalência nos pomares cítricos do Brasil (Bastianel et al., 2010).

No Brasil, até 2015, a transmissão de vírus causadores da leprose foi atribuída exclusivamente ao ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). No entanto, essa espécie foi revisada e, a partir do uso de marcadores moleculares e da inclusão de novas características taxonômicas, foi comprovado que *B. phoenicis* se tratava de um complexo de espécies crípticas (Navia et al., 2013; Beard et al., 2015). A partir destes trabalhos, Mineiro et al. (2015) constataram que *Brevipalpus yothersi* Baker (Acari: Tenuipalpidae) é a espécie de *Brevipalpus* mais frequente e abundante nos pomares comerciais do Estado de São Paulo. Além disso, comprovou-se que *B. yothersi* é o principal vetor de CiLV-C no Brasil (Sánchez-Velázquez et al., 2015; Tassi et al., 2017).

Além de *B. yothersi*, outras espécies de *Brevipalpus* são conhecidas mundialmente como vetoras de vírus, com destaque para *Brevipalpus californicus* (Banks) (Acari: Tenuipalpidae) (Childers et al., 2003). *Brevipalpus californicus* infesta diversas plantas, incluindo plantas cítricas (Childers et al., 2003; Roy et al., 2015; García-Escamilla et al., 2018). Esta espécie está associada à transmissão de vírus em plantas cítricas em diversos países, como México, Colômbia, Panamá e, mais recentemente, na África do Sul (Dominguez et al., 2001; Cruz-Jaramillo et al., 2014; Roy et al., 2014; Cook et al., 2019). Além disso, é vetor do vírus orchid fleck virus (OFV) em orquídeas e de isolados deste mesmo vírus em plantas cítricas,

considerado este o vírus transmitido por *Brevipalpus* (VTB) mais amplamente distribuído pelo mundo (Cook et al., 2019).

O controle de *B. yothersi* nos pomares de citros do Estado de São Paulo é pautado quase que exclusivamente no uso de acaricidas sintéticos (Andrade et al., 2018; Della Vechia et al., 2018). No entanto, a eficiência desses produtos vem sendo comprometida ao longo dos anos devido a múltiplos fatores (Andrade et al., 2013; Carvalho et al., 2014; Della Vechia et al., 2018; Vieira, 2019; Rocha et al., 2021). Entre os principais fatores, destaca-se a ocorrência simultânea de várias pragas e fitopatógenos que expõem os ácaros a inúmeros agrotóxicos durante a safra. A exposição de organismos não alvos aos agrotóxicos pode desencadear alterações fisiológicas e biológicas, como, por exemplo, alterações no desenvolvimento biológico e nas taxas de fecundidade e de fertilidade (Stark e Banks 2003), que, por sua vez, afetam diretamente a eficiência de acaricidas específicos (Della Vechia et al., 2018).

Frente à ocorrência concomitante de várias pragas e como uma das formas de reduzir os custos de produção, frequentemente, os produtores misturam no tanque do pulverizador acaricidas e outros produtos, como inseticidas, visando ao controle de diferentes pragas ao mesmo tempo e na mesma operação (Della Vechia et al., 2018). Entretanto, em condições de laboratório, sabe-se que a eficiência do acaricida espiroclorfenol no controle de *B. yothersi* é reduzida quando este é misturado aos inseticidas imidacloprido ou fosmete (Della Vechia et al., 2018). O efeito antagônico entre agrotóxicos pode ser explicado por alterações nas características físico-químicas dos produtos (Tarwater, 1984) ou por alterações fisiológicas nos organismos-alvo (Reffstrup et al., 2010).

Dentre as alterações fisiológicas, a modulação da atividade de enzimas, principalmente aquelas que desempenham papel importante nos processos de detoxificação, pode contribuir para o antagonismo entre os produtos (Abou-Donia, 2014). Esterases, glutatona-S-transferases (GST's) e mono-oxigenases dependentes do citocromo P450 (P450's) são enzimas de detoxificação que

metabolizam produtos químicos em artrópodes e estão frequentemente associadas resistência em pragas (Feyereisen et al., 2015; Van Leeuwen e Dermauw, 2016; Pavlidi et al., 2018). Essas enzimas participam da biotransformação de produtos químicos endógenos ou exógenos e o aumento de sua atividade faz com que os organismos tolerem doses de produtos que, em doses maiores, seriam letais (Li et al., 2007; Hodgson, 2012). A medição da atividade de enzimas de detoxificação pode fornecer informações sobre os mecanismos relacionados à tolerância e resistência aos agrotóxicos, assim como sobre interações sinérgicas ou antagônicas durante a exposição aos vários xenobióticos (Yao et al., 2018).

Tendo em vista a importância de *B. yothersi* e de *B. californicus* em culturas de importância econômica e o desconhecimento sobre os efeitos biológicos e fisiológicos que a mistura de espirodiclofeno com inseticidas, comumente utilizados para o manejo de insetos pragas, podem exercer sobre esses ácaros, o presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos biológicos e bioquímicos do acaricida espirodiclofeno e dos inseticidas cipermetrina, fosmete e imidacloprido, isolados ou combinados, sobre os ácaros *B. yothersi* e *B. californicus* em condições de laboratório e campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citricultura

A citricultura possui papel fundamental para a economia mundial. No Brasil, está entre as principais atividades agrícolas, destacando o País como o maior produtor mundial de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], com uma produção de 15.881.003 toneladas e uma área plantada de 643.996 hectares na última safra (IBGE, 2021). O Brasil também é o maior exportador de suco de laranja do mundo,

seguido pelo México, União Europeia, África do Sul e Estados Unidos (USDA, 2021).

2.2. Os ácaros *Brevipalpus yothersi* e *Brevipalpus californicus*

Brevipalpus yothersi e *B. californicus*, conhecidos como ácaros planos, são espécies cosmopolitas, estritamente fitófagas e polífagas (Childers et al., 2003). São considerados pragas importantes devido principalmente à capacidade de transmitirem vírus para plantas cultivadas e ornamentais (Childers e Derrick, 2003; Moraes e Flechtmann, 2008; Bastianel et al., 2010). Na citricultura, estes ácaros destacam-se por serem vetores dos vírus causadores da leprose dos citros (CiLV e OFV-citrus), principal doença de caráter viral dessa cultura (Jeger et al., 2017, Freitas-Astúa et al., 2018).

A leprose dos citros caracteriza-se pela presença de lesões cloróticas, geralmente circundadas por um halo amarelado em frutos e folhas que, com o passar do tempo, tornam-se escuras e necróticas (Kitajima et al., 1972). Em ramos, as lesões são corticosas e podem levar à seca completa dos ramos, devido à obstrução dos vasos condutores de seiva, podendo inclusive levar à morte da planta (Rossetti et al., 1997). No Brasil, o CiLV-C é considerado o mais importante devido à predominância nos pomares cítricos e pela severidade dos sintomas causados nas plantas (Kitajima et al., 2003; Bastianel et al., 2010; Ramos-González et al., 2016).

Estudos indicaram que o CiLV-C atua de forma não sistêmica nas plantas, nos quais os vírus estão presentes somente nas lesões da doença ou muito próximos destas, sendo, portanto, a transmissão de vírus na própria planta ou entre plantas atribuída exclusivamente aos ácaros *Brevipalpus* contaminados (Bastianel et al., 2010). Recentemente, *B. yothersi* foi confirmado como o principal vetor do CiLV-C nos pomares comerciais de laranja-doce do Brasil (Tassi et al., 2017). Essa espécie pode adquirir e transmitir o vírus CiLV-C (Ramos-Gonzalez et al., 2016;

Tassi et al., 2017). Por outro lado, *B. californicus* está associado principalmente à transmissão de vírus do tipo nuclear (OFV), causadores de sintomas da leprose dos citros em diversas partes do mundo (Roy et al., 2014; Cook et al., 2019).

2.3. Manejo do ácaro da leprose

No manejo da leprose dos citros, diversas práticas são recomendadas para evitar a transmissão e a disseminação da doença nos pomares. Entre as práticas, citam-se a utilização de mudas saudáveis isentas de vírus e de ácaros-vetores, o manejo sistemático do vetor, as podas de ramos sintomáticos, a utilização de cercas vivas e de quebra-ventos com plantas não hospedeiras de ácaros e vírus, e controle de plantas espontâneas hospedeiras de ácaros e de vírus (Bastianel et al., 2010; Andrade et al., 2013; Miranda et al., 2017). Contudo, a utilização exclusiva de acaricidas sintéticos é a principal tática de manejo utilizada pelos citricultores para reduzir os níveis populacionais do vetor e a disseminação da doença nos pomares (Andrade et al., 2010; Carvalho et al., 2014; Della Vechia et al., 2018).

Vários acaricidas possuem registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle do ácaro da leprose *B. yothersi* (*B. phoenicis*) na cultura dos citros, como por exemplo, abamectina, propargito, bifentrina, etoxazol, flufenoxurom, clorfenapir, enxofre, fenpropatrina, espiroclorfen, óxido de fentotatina, fenpiroximato, ciflumetofeno, piridabem, acrinatrina e hexitiazoxi (Agrofit, 2021). No entanto, alguns desses acaricidas registrados possuem baixa eficiência no controle desse ácaro, principalmente devido à existência de populações resistentes a estes produtos (Miranda et al., 2017). Entre os acaricidas registrados, espiroclorfen tem sido amplamente utilizado na citricultura brasileira para controle de *B. yothersi*, em razão da elevada eficiência proporcionada. É um acaricida inibidor da acetil-coenzima A carboxilase, responsável pela biossíntese de lipídeos (Wachendorff et al., 2002; Van Pottelberge et al., 2009).

2.4. Fatores que influenciam o manejo do ácaro da leprose dos citros

Diversos fatores podem influenciar o manejo dos ácaros *B. yothersi* e *B. californicus*, com destaque para o uso não adequado de determinados agrotóxicos que podem causar alterações biológicas e comportamentais em populações de ácaros (Della Vechia et al., 2018). Por exemplo, as aplicações sucessivas de uma mesma molécula acaricida ou de moléculas com o mesmo mecanismo de ação no organismo aceleram o processo de seleção de populações de ácaros resistentes. Neste contexto, casos de resistência do ácaro da leprose a acaricidas já foram reportados, tais como ao dicofol (Omoto et al., 2000), ao hexythiazox (Campos e Omoto, 2002), ao propargite (Franco, 2002), à calda sulfocálcica (Casarin, 2010) e ao espirodiclofeno (Rocha et al., 2021).

Após a detecção das bactérias associadas ao Huanglongbing, aplicações de inseticidas para o controle do inseto vetor *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) aumentou cerca de 600% (Neves et al., 2011), passando de 2 a 4 para até 25 pulverizações/aplicações anuais (De Carli et al., 2018; Bassanezi et al., 2020). O aumento da pulverização desses produtos pode interferir no manejo do ácaro da leprose, por exemplo, por meio da redução de seus inimigos naturais (Stark e Banks, 2003; Silva et al., 2011) ou devido às alterações comportamentais causadas nesses ácaros (Costa, 2019).

Devido ao alto custo de acaricidas e inseticidas, bem como à alta demanda por esses, o uso de misturas entre esses produtos tem sido frequentemente utilizado pelos citricultores para reduzir os custos de produção, racionalizar o uso da água, diminuir a demanda de equipamentos de pulverização e otimizar a capacidade operacional do sistema de produção (Andrade et al., 2013; Della Vechia et al., 2018). De acordo com Andrade (1997), em um levantamento realizado na década de 90 com produtores de citros, mais de 120 combinações de produtos no tanque do pulverizador eram utilizadas, envolvendo principalmente acaricidas com

inseticidas, fungicidas, fertilizantes foliares e adjuvantes. Embora a mistura em tanque seja vantajosa, esta também pode trazer consequências negativas, como redução de eficiência de controle, opondo-se aos objetivos dessa prática.

2.5. Formas de exposição dos ácaros aos agrotóxicos

Na agricultura, os agrotóxicos são aplicados simultaneamente, ou seja, misturados no tanque, ou um após o outro, para a proteção da cultura contra problemas fitossanitários. No entanto, pode haver interações negativas ou positivas entre os agrotóxicos, independentemente da forma como foram aplicados (Thompson, 1996). Com relação à mistura em tanque, essa consiste na combinação de diferentes produtos, agrotóxicos, fertilizantes e adjuvantes no recipiente do equipamento aplicador, realizada pouco antes da aplicação, visando principalmente ao controle de mais de um problema fitossanitário e manejo de resistência (Thompson, 1996; Cloyd, 2011).

A prática de mistura em tanque apresenta diversas vantagens, principalmente de âmbito econômico, tais como maior espectro de ação, menor quantidade de pulverizações na área, menor compactação do solo, maior eficiência de trabalho, menor tempo de exposição do aplicador aos agrotóxicos, menor número de máquinas para realizarem o mesmo serviço, economia de água, controle fitossanitário em menor tempo e menor gasto com combustível (Gazziero, 2015). Contudo, em determinadas situações, pode haver desvantagens, opondo-se ao objetivo principal da prática. Dentre as desvantagens da mistura em tanque, destacam-se os efeitos adversos desconhecidos das misturas, principalmente aqueles relacionados à incompatibilidade física, química e biológica, alterações na toxicidade e na ecotoxicologia dos ingredientes ativos (Petter et al., 2013; Tornisiello et al., 2013; Della Vechia et al., 2018).

No Brasil, desde 2017, com a consulta pública para a alteração da legislação referente ao uso da mistura de agrotóxicos em tanque (Portaria nº 148, de 26 de

dezembro de 2017), ficou clara a importância da realização de pesquisas científicas para viabilizar as combinações de agrotóxicos em tanques, no momento da aplicação. Visto que os critérios estabelecidos pela instrução normativa, anexa à Portaria n. 148, fornecem diretrizes para procedimentos a serem adotados para recomendações de misturas de agrotóxicos em tanque e sua prescrição em receituário agrônomo. Isto posto, as recomendações de misturas de agrotóxicos devem ser realizadas por: instituições públicas ou privadas de ensino, de pesquisa ou de extensão rural; associação de produtores, cooperativas de agricultores; empresa registrante de agrotóxicos e afins, e a prescrição será feita por um engenheiro agrônomo, com base em dados de estudos de pesquisas científicas ou no uso comprovado em literatura sobre as combinações ou as misturas (Brasil, 2017). Ademais, a portaria determina que as informações sobre: ingredientes ativos; tipos de formulações; incompatibilidades físico-químicas; toxicidade e ecotoxicidade; precauções, cuidados e advertências de uso adicionais devem constar para a inclusão e também os ingredientes devem estar cadastrados para a cultura-alvo.

A regularização das misturas de agrotóxicos em tanque é uma iniciativa bem-vinda a fim de mitigar problemas decorrentes de incompatibilidades físico-químicas e biológicas que afetam o controle dos organismos-alvo. Entretanto, é fato que os organismos-alvo, em sua maioria, são expostos às misturas de produtos também quando aplicados de maneira isolada. Por exemplo, na citricultura, o ácaro da leprose, por estar presente durante todo o ano sobre as plantas, é exposto continuamente aos inúmeros agrotóxicos utilizados na cultura (Oliveira e Pattaro, 2008; Belasque-Jr. et al., 2010).

Neste contexto, Della Vechia et al. (2018) verificaram que a mistura do acaricida espirodiclofeno com os inseticidas imidacloprido e fosmete reduziu a eficiência do acaricida de 28 a 44%, respectivamente. Além disso, Della Vechia et al. (2019) verificaram reduções de 7 a 22% na eficiência de espirodiclofeno no

controle de *B. yothersi* quando foi adicionado cipermetrina ou bifentrina à calda, respectivamente.

Andrade et al. (2013) verificaram que os fertilizantes foliares fosfito de potássio, sulfato de magnésio e a mistura dos cloretos de zinco e de manganês com o sulfato de magnésio reduziram a eficiência dos acaricidas propargite e acrinatrina no controle do ácaro da leprose. Van Leeuwen et al. (2007) verificaram que a aplicação sequencial de bifenazato e de inseticidas carbamato e os organofosforados reduziram a eficiência de controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) pelo bifenazato.

2.6. Mecanismos envolvidos na resposta aos agrotóxicos

A exposição de organismos-alvo a mais de um agrotóxico, em curto período, pode resultar em efeitos imprevistos (Cloyd, 2011). A múltipla exposição pode ocorrer por meio da pulverização de produtos em mistura, ou por meio de pulverizações sequenciais na mesma cultura (Thompson, 1996).

Quando misturados no tanque do pulverizador, os produtos podem interagir de três formas: (i) aditiva, a mistura apresenta efeitos semelhantes aos esperados pela soma dos efeitos esperados para cada produto individualmente $[(1+1)=2]$; (ii) sinérgica, quando a mistura apresenta efeitos superiores aos esperados pela soma da aplicação de cada produto individualmente $[(1+1)>2]$; e (iii) antagônica, quando a mistura apresenta efeitos inferiores aos esperados pela soma dos efeitos esperados para cada um dos produtos individualmente $[(1+1)<2]$ (Lindquist, 2002; Ikeda, 2013). Um ou mais mecanismos podem estar atrelados ao sucesso, ou não, dessas misturas, como, por exemplo, fatores inerentes à calda, incompatibilidade físico-química da calda e fatores biológicos ou fisiológicos da praga-alvo (Marer 1988; Van Leeuwen et al., 2007; Della Vechia et al., 2018).

2.6.1. Incompatibilidade da calda

Incompatibilidade da calda é uma condição na qual os produtos misturados no tanque de pulverização não formam soluções ou suspensões homogêneas (Marer, 1988). Em vez disso, flocos, cristais ou aglomerados são formados ou a separação entre os produtos é visível na calda. A incompatibilidade da calda pode ocorrer devido às propriedades químicas e/ou físicas dos princípios em mistura, impurezas na água ou devido à composição das formulações dos produtos misturados (Marer, 1988; Silva et al., 2007). A incompatibilidade química ocorre quando a reação química da mistura reduz a eficácia de um ou de ambos os produtos, ou quando os produtos químicos reagem para formar um precipitado (Ebeing, 1963). Incompatibilidade física entre agrotóxicos pode resultar em formação de espuma, grumos, flocos e cristais que podem danificar o equipamento (Petter et al., 2012).

No entanto, a compatibilidade físico-química entre produtos em mistura não é suficiente para prever a eficiência dos produtos no controle do alvo. Por exemplo, misturas do acaricida espirodiclofeno com os inseticidas fosmete e imidacloprido apresentaram compatibilidade físico-química, com valores de pH e condutividade elétrica adequados, mas a eficiência de espirodiclofeno no controle de *B. yotheresi* foi reduzida quando misturado com ambos os inseticidas (Della Vechia et al., 2018).

2.6.2. Fatores biológicos

Inseticidas pulverizados na cultura dos citros para o controle de insetos, como psílídeos, lagartas e cigarrinhas, geralmente não causam mortalidade do ácaro da leprose, *B. yotheresi* (Della Vechia et al., 2019). Porém, a exposição a xenobióticos estressores pode induzir alterações no metabolismo dos organismos.

A maioria dos organismos, em condições não estressantes, aloca recursos energéticos no metabolismo basal, de crescimento e de reprodução (Bendis e Relyea, 2014). Em condições de estresse, como a exposição a substâncias tóxicas, o metabolismo desses organismos é alterado para que os mesmos possam lidar com a condição estressante (Bendis e Relyea, 2014). Consequentemente, essa alteração do metabolismo resulta em diminuição das reservas de energia para investimento das mesmas em mecanismos que auxiliarão a sobrevivência do indivíduo exposto à condição estressante (Sancho et al., 2009).

Alterações biológicas ou comportamentais, exemplificadas por alterações reprodutivas ou locomotoras, podem estar relacionadas com a resposta à exposição de um organismo a um xenobiótico (Adesanya et al., 2019). A reprodução envolve uma série complexa de eventos comportamentais e fisiológicos, que são coordenados de maneira precisa pelos sistemas nervoso e hormonal de artrópodes (Haynes, 1988). Os xenobióticos (como inseticidas e acaricidas) podem perturbar essa coordenação e contribuir para a redução de geração de novos indivíduos, ou, até mesmo, aumentar o número de descendentes (Guedes e Cutler, 2013).

Neste contexto, é relativamente comum a realização de pesquisas relacionadas ao efeito hormese, fenômeno referente ao aumento populacional repentino de organismos expostos a doses subletais de um determinado xenobiótico. Esse fenômeno tem sido estudado em ácaros e sabe-se que várias características biológicas podem ser alteradas, como a redução do tempo de desenvolvimento, o aumento da fecundidade, da fertilidade e da longevidade (Cohen, 2006; Cutler, 2013).

O efeito hormese foi relatado para várias espécies de ácaros, principalmente para aquelas pertencentes à família Tetranychidae, como *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), *T. urticae* e *Oligonychus ilicis* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) (Acari: Tetranychidae), quando expostas a determinados inseticidas (Saini e Cutkomp, 1966; Dittrich et al., 1974; Cohen, 2006; Cordeiro et al., 2013; Alves et al., 2018; Zanardi et al., 2018).

Diversos trabalhos demonstraram que o inseticida imidacloprido (neonicotinoide) induz o aumento da oviposição de *T. urticae* (James e Price, 2002; Ako et al., 2004; Ako et al., 2006; Szczepaniec et al., 2011). O inseticida cipermetrina (piretroide), pulverizado em baixas concentrações, aumentou a fecundidade e a sobrevivência dos estágios imaturos de *P. citri* (Costa et al., 1988). A aplicação do inseticida cipermetrina também resultou no aumento da população de *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae) (Liu et al., 1998) e a aplicação de organofosforados, como dimetoato, induziu o aumento da população de *P. citri* e *T. urticae* (Leigh e Wynholds, 1980; Phillips et al., 1987).

Por outro lado, a exposição de ácaros a inseticidas pode reduzir o número de descendentes. Por exemplo, a aplicação de imidacloprido reduziu a fertilidade de *T. urticae*, e a fecundidade de *Euseius concordis* (Chant) (Mesostigmata: Phytoseiidae) foi reduzida pelos inseticidas imidacloprido e betacipermetrina (Ako et al., 2004).

2.6.3. Fatores bioquímicos

A exposição de artrópodes aos agrotóxicos, isolados ou em mistura, quando não causa mortalidade total, pode desencadear mecanismos bioquímicos de detoxificação ou ativação nesses organismos (Desneux et al., 2007). Essas respostas bioquímicas são dadas pelo aumento do metabolismo dos xenobióticos após a indução da expressão de enzimas que irão alterar a estrutura química de tais compostos.

A indução das respostas bioquímicas é o processo em que o organismo inicia a produção de enzimas adicionais após a exposição a um xenobiótico (Terrieri, 1984). Portanto, a exposição a um ou mais compostos xenobióticos pode alterar as taxas de ativação e de detoxificação de inseticidas e acaricidas (Van Leeuwen e Dermauw, 2016).

A detoxificação de xenobióticos, como inseticidas e acaricidas, de maneira geral, envolve a conversão de substâncias lipossolúveis em metabólitos excretáveis solúveis em água, sendo comumente dividida em três fases: fase I (solubilização), fase II (conjunção) e fase III (excreção). Na fase I, a estrutura do xenobiótico é alterada enzimaticamente, tornando-a incapaz de interagir com os receptores lipofílicos alvos. Essa funcionalização é efetuada principalmente pelas monooxigenases do citocromo P450 (P450) e esterases, embora outras enzimas também possam contribuir (Xu et al., 2013). As reações da fase II envolvem a conjugação de produtos da detoxificação da fase I para solubilização e transporte. Enzimas glutathione-S-transferases (GST) são as principais enzimas da fase II, embora também possam funcionar como enzimas da fase I. A detoxificação da fase III envolve o transporte dos conjugados da fase II para fora das células, para posterior excreção. Entre as proteínas envolvidas nesta última fase, estão os transportadores do tipo ABC (ATP-binding cassette) (Dermauw e Van Leeuwen, 2014).

Três grupos de enzimas, esterases, P450s e GSTs, desempenham papel importante na detoxificação de xenobióticos de diferentes modos de ação (Feyereisen et al., 2015; Van Leeuwen e Dermauw, 2016; Pavlidi et al., 2018). Essas enzimas participam da biotransformação de produtos químicos endógenos ou exógenos, e sua atividade induzida permite que organismos tolerem doses do produto que, em doses superiores, seriam letais (Li et al., 2007; Hodgson, 2012).

Embora todos os artrópodes apresentem potencial detoxificação, o poder de detoxificar pode variar de acordo com a espécie, com o estágio de desenvolvimento e com as interações da espécie com o ambiente (Terrieri, 1984; Yang et al., 2013). A amplitude na capacidade de detoxificação observada entre as espécies é, pelo menos em parte, responsável pela toxicidade seletiva de inseticidas e acaricidas, pelo desenvolvimento de resistência a esses produtos em determinadas populações e pela seleção de plantas hospedeiras (Terrieri, 1984; Ahmad, 2004).

Interações complexas, como sinergismo e antagonismo, podem ocorrer em misturas de agrotóxicos. Dois ingredientes ativos misturados podem competir ou

inibir a mesma enzima de forma a reduzir ou a aumentar a toxicidade da mistura (Kulkarni e Hodgson, 1980). Como exemplo de antagonismo, a aplicação prévia de inseticidas carbamatos e organofosforados resultou na redução da eficiência do acaricida bifenzato para o controle de *T. urticae* (Van Leeuwen et al., 2007). Os autores justificaram o antagonismo com a observação de que a exposição aos inseticidas também implicou a redução da expressão de esterases nos ácaros. Como as esterases atuam na ativação de bifenazato, a menor expressão das esterases nos ácaros resultou em menor ativação do acaricida e, consequentemente, em menor eficiência de controle do acaricida.

Por outro lado, o sinergismo pode ocorrer quando, por exemplo, um produto reduz a detoxificação metabólica de outro pela inibição de enzimas que o detoxificariam antes do contato com o sítio-alvo (Corbett, 1974; Kulkrani e Hodgson, 1980). Certos inseticidas organofosforados ligam-se ao sítio ativo de esterases responsáveis pela detoxificação de inseticidas à base de piretroides e impedem a detoxificação desses piretroides (Ahmad, 2004; Zalom et al., 2005; Ahmad et al., 2008; Ahmad, 2009). Dessa forma, os inseticidas organofosforados podem ser considerados sinergistas para os piretroides (Martin et al., 2003; Zalom et al., 2005; Attique et al., 2006).

Além dos próprios inseticidas e acaricidas, existem outros sinergistas conhecidos por serem úteis em estudos do envolvimento dos principais grupos de enzimas na detoxificação de produtos, como, por exemplo, butóxido de piperonila (PBO), S,S,S-tributil-fosforotritioato (DEF) e maleato de dietila (DEM), que são inibidores de mono-oxigenases, esterases e glutathione-S-transferases, respectivamente (Snoeck et al., 2017).

Sinergistas são definidos como compostos que aumentam a toxicidade de um agrotóxico, embora geralmente sejam praticamente não tóxicos quando aplicados isolados (Matsumura, 1985). Eles podem atuar como substrato substituto ou como inibidor de enzimas de detoxificação e transportadores. Logo, são substâncias importantes para investigar os mecanismos de detoxificação de

xenobióticos (Snoeck et al., 2017). Os sinergistas também são de interesse comercial, pois combiná-los com inseticidas ou acaricidas pode aumentar a eficácia, auxiliar a utilização mínima de agrotóxicos, bem como no manejo da resistência de pragas a táticas de controle (Casida, 1970; Raffa e Priestner, 1985; Bernard e Philogéne, 1993).

O sinergista comercial mais conhecido e amplamente utilizado é o metilenodioxifenil butóxido de piperonila (PBO), que inibe as P450s. O PBO é usado comercialmente desde 1940, principalmente em combinação com piretroides. O mecanismo de inibição do PBO consiste em duas fases, sendo que a primeira fase se inicia com a ligação de PBO ao sítio ativo de P450; e a segunda fase, pela formação de um complexo inibidor quase irreversível entre a fração carbeno eletrofílica de PBO e o ferro ferroso de P450. Isso resulta em diminuição da atividade catalítica das P450s (Casida, 1970; Feyereisen et al., 1984; Correia e Montellano, 2005).

Sinergistas como DEF e trifetil fosfato (TEP) são conhecidos como inibidores da carboxil esterases (Plapp et al., 1963; Yeoh et al., 1982). Esses compostos organofosforados comportam-se como o substrato natural das esterases e ligam-se covalentemente ao grupo de serina -OH do sítio ativo. O composto carbonil maleato dietílico (DEM) conjuga-se à glutatona reduzida (GSH), exaurindo assim as células deste tripeptídeo. Como consequência, a disponibilidade reduzida de GSH na célula implica menor disponibilidade desse substrato para ser conjugado com inseticidas, acaricidas ou com os produtos do estresse oxidativo pelas GSTs (Boyland e Chasseaud, 1970; Fujioka e Casida, 2007; Che-Mendoza et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de execução dos experimentos

A pesquisa foi realizada no Departamento de Ciências da Produção Agrícola da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil (Unesp/FCAV) e no Laboratório de Zoologia da Universidade de Ghent, Bélgica (UGent). Além disso, foram realizados experimentos em pomares comerciais de citros localizados no município de Monte Alto, São Paulo, Brasil e na empresa Plantec Laboratórios (Iracemápolis, São Paulo, Brasil).

3.2. Criação dos ácaros

3.2.1. *Brevipalpus yothersi*

Os ácaros *B. yothersi* foram provenientes de uma criação mantida no Laboratório de Acarologia da Unesp/FCAV, desde 2010. A criação foi iniciada com ácaros *Brevipalpus* spp. coletados em um pomar de laranja-doce localizado no Câmpus da Unesp/FCAV, que nunca havia recebido pulverização de agrotóxicos. A identificação de *B. yothersi* foi confirmada molecular e morfolologicamente, conforme descrito por Navia et al. (2013) e Beard et al. (2015), respectivamente.

Os ácaros foram mantidos em frutos de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck – variedades Pera ou Valência], previamente lavados em água corrente e parcialmente parafinados. Para impedir a fuga dos ácaros, uma arena sem parafina foi circundada com uma fina camada de cola “tipo entomológica” (Pega-insetos, PROMIP, Brasil). Em cada arena, foi adicionada uma mistura de gesso, farinha de trigo, areia fina e água, na proporção de 1:1:1:1, com o intuito de proporcionar saliências sobre os frutos e de estimular a oviposição e a permanência dos ácaros

sobre os frutos (Chiavegato, 1986; Albuquerque et al., 1997) (Figura 1A). Após o preparo, fêmeas de *B. yothersi* foram transferidas para as arenas, com auxílio de um pincel de apenas um pelo, sob microscópio estereoscópico. Os frutos foram colocados em bandejas e permaneceram em sala climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; umidade relativa de $60 \pm 10\%$; 12 horas de fotoperíodo). Os frutos foram renovados sempre que perdiam a turgidez, e os ácaros foram transferidos, encostando-se um fruto velho em um fruto novo, para a migração dos ácaros.

3.2.2. *Brevipalpus californicus*

A criação de *B. californicus* foi iniciada a partir de espécimes cedidos gentilmente pelo Dr. Hans Breeuwer da Universidade de Amsterdã, Holanda. Os ácaros da colônia original foram coletados em plantas de *Carica papaya* L. e *Acalypha wilkesiana* Muell. Arg., que não recebiam aplicações de agrotóxicos. Os ácaros foram transferidos para folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e encontravam-se em laboratório por mais de cinco anos sem aplicações de agrotóxicos. A identificação da espécie foi confirmada molecular e morfológicamente, conforme descrito por Navia et al. (2013) e Beard et al. (2015), respectivamente.

Os espécimes cedidos foram multiplicados em laboratório da Universidade de Ghent. Como substrato para a multiplicação dos ácaros, foram utilizadas folhas de feijão *P. vulgaris* L. cv. Prelude, dispostas com a face adaxial voltada para cima sobre algodão hidrofílico embebido em água para manter a turgescência das folhas e delimitadas por uma barreira de algodão hidrofílico para evitar a fuga de ácaros (Figura 1B). A colônia de ácaros foi mantida em estufa tipo BOD a 25°C ($\pm 0,5$), 60% de umidade relativa (UR) e fotoperíodo de 16/8 horas claro/escuro.

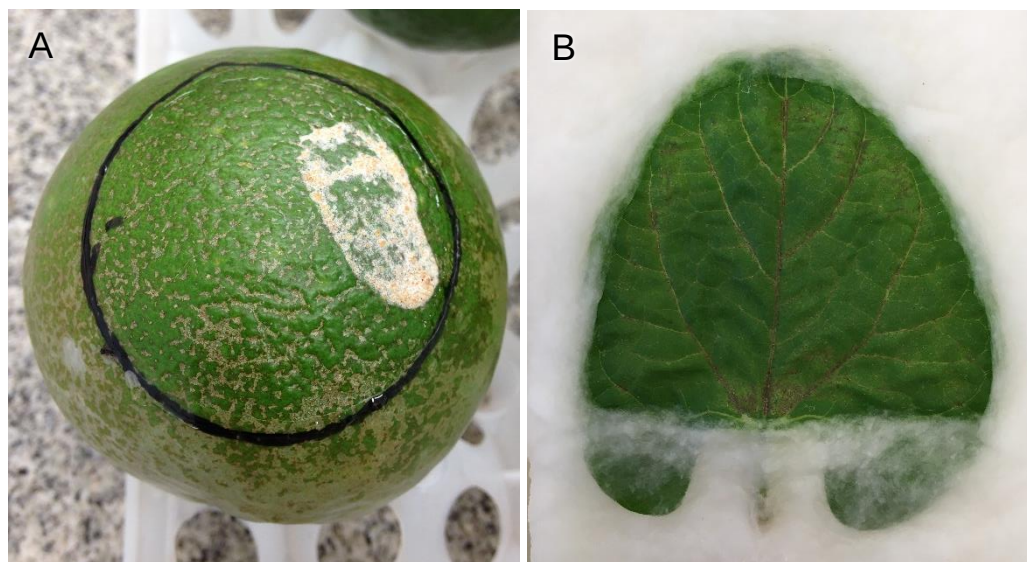


Figura 1. Criação dos ácaros em estudo. A) *Brevipalpus yothersi* sobre frutos de laranja-doce (*Citrus sinensis*). B) *Brevipalpus californicus* sobre folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

3.3. Agrotóxicos utilizados nos experimentos

Nos experimentos realizados no Brasil, foram estudados o acaricida espiroclorfenol (Envidor® 240 SC; Bayer CropScience AG, Alemanha) e os inseticidas cipermetrina (Mustang® 350EC; FMC, Brasil), fosmeto (Imidan® 500 WP; Cross Link, Brasil) e imidacloprido (Provado® 200 SC; Bayer CropScience AG, Alemanha). Na Bélgica, foram estudados o acaricida espiroclorfenol (Envidor® 240 SC; Bayer CropScience AG, Alemanha) e os inseticidas fosmeto (Boravi® 50 WG; BASF, Portugal) e imidacloprido (Confidor® 200 SC; Bayer CropScience AG, Alemanha).

O acaricida e os inseticidas foram selecionados para esta pesquisa por serem amplamente utilizados na citricultura para controle do ácaro da leprose e de insetos-praga, respectivamente (Tiwari et al., 2011; Miranda et al., 2017). Além disso, pesquisas desenvolvidas por Della Vechia et al. (2019) apontaram efeito

antagônico entre as combinações deste acaricida com os respectivos inseticidas mencionados.

3.4. Toxicidade de inseticidas isolados e combinados com espirodiclofeno sobre fases do ciclo biológico de *Brevipalpus yothersi*

Foi avaliado, isoladamente, o efeito dos inseticidas e do acaricida, bem como a combinação desses produtos sobre fases do ciclo biológico de *B. yothersi* (ovos, larvas, protoninfas, deutoninfas e adultos). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial $2 \times 3 + 1$ tratamento adicional, totalizando sete tratamentos, com cinco repetições, em que o fator A correspondeu às diferentes caldas (isolado ou em mistura), o fator B aos tipos de inseticidas e o tratamento adicional ao acaricida isolado.

Os tratamentos estabelecidos foram: 1) espirodiclofeno (60,0 mg por litro de água); 2) cipermetrina (35,0 mg por litro de água); 3) fosmete (250,0 mg por litro de água); 4) imidacloprido (40,0 mg por litro de água); 5) espirodiclofeno + cipermetrina (60,0 + 35,0 mg por litro de água); 6) espirodiclofeno + fosmete (60,0 + 250,0 mg por litro de água), e 7) espirodiclofeno + imidacloprido (60,0 + 40,0 mg por litro de água). Como tratamento-controle, foi utilizada água deionizada.

3.4.1. Toxicidade sobre ovos

Inicialmente, foram confeccionadas arenas a partir de folhas de laranjeira (*C. sinensis* var. Pera) mantidas em vasos contendo solo, areia e esterco bovino (2:1:1), sem aplicações de agrotóxicos. Cada folha foi colocada individualmente com a superfície adaxial voltada para cima em placas de Petri de 15,0 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura, contendo no fundo espuma de 1,0 cm de espessura e algodão hidrófilo embebidos em água, a fim de manter a turgescência das folhas. As

margens das folhas foram circundadas com algodão hidrófilo para impedir a fuga dos ácaros, conforme metodologia adaptada de Omoto et al. (2000).

Após o preparo das arenas, foram transferidas 15 fêmeas adultas de *B. yothersi* por arena com auxílio de um pincel de apenas um pelo, sob microscópio estereoscópico. Após 48 horas, as fêmeas foram removidas, deixando-se 15 ovos por arena. Em seguida, os tratamentos foram aplicados sobre as placas de Petri contendo os ovos. As aplicações dos produtos foram realizadas em torre de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, Herts, Reino Unido), calibrada a 34,5 kPa, utilizando volume de 2,0 mL de calda em cada pulverização, o que correspondeu à deposição média de 1,56 mg.cm² (Figura 3A). As placas foram mantidas em câmara climatizada nas mesmas condições mencionadas para a criação de *B. yothersi*. As avaliações foram realizadas a partir do oitavo dia após as aplicações até à eclosão de todas as larvas do controle, com água deionizada, em aproximadamente 10 dias.

3.4.2. Toxicidade sobre fases móveis

No total, foram realizados quatro experimentos, sendo o primeiro para avaliar o efeito dos tratamentos sobre larvas, o segundo sobre protoninfas, o terceiro sobre deutoninfas e o quarto sobre adultos de *B. yothersi*. Nestes experimentos, foram confeccionadas arenas de folhas de laranja de forma idêntica ao descrito no item anterior (3.4.1). Contudo, nesses experimentos, foi utilizado o método de contato residual, nos quais a transferência dos ácaros ocorreu após as aplicações dos produtos sobre as arenas. As pulverizações foram realizadas em torre de Potter ajustada, conforme mencionado no item anterior (3.4.1), e volume de calda de 2,0 mL por aplicação. Após a secagem da calda sobre as folhas (aproximadamente uma hora), foram transferidos 15 ácaros para cada arena, conforme a fase do ciclo biológico do ácaro correspondente a cada experimento. As placas foram mantidas em câmara climatizada nas mesmas condições mencionadas para a criação de *B. yothersi*.

As avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente, a partir de 24 horas após a transferência dos ácaros, e seguiram até que o controle (somente água deionizada) apresentasse 10% de mortalidade natural. Com auxílio de pincel de um pelo, os ácaros foram dispostos com a parte dorsal voltada para baixo, e aqueles que não voltaram à posição normal e caminharem foram considerados mortos.

3.4.3. Análise dos dados

Com os dados de sobrevivência de cada uma das fases dos ácaros, foi calculada a eficiência dos tratamentos pela fórmula proposta por Abbott (1925), em que a taxa de mortalidade de cada tratamento foi corrigida a partir dos dados de mortalidade do tratamento-controle (água). Para análise estatística, quando necessário, os dados foram transformados em arco-seno $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas entre si, utilizando o teste de Tukey, e comparadas com o tratamento adicional (espirodiclofeno), utilizando-se do teste de Dunnett; ambos os testes a 5% de probabilidade de erro ($P < 0,05$), por meio do software SAS (SAS Institute, 2015).

3.5. Efeito de diferentes concentrações de acaricida, inseticidas e de misturas na fecundidade e na fertilidade de *Brevipalpus yothersi*

Foram realizados experimentos em laboratório e em casa de vegetação para avaliar o efeito de concentrações de espirodiclofeno isolado e combinado aos inseticidas sobre a fecundidade e sobre a fertilidade de *B. yothersi*. As concentrações dos inseticidas foram selecionadas a partir da concentração comercial empregada para o controle de *D. citri* (Tabela 1).

3.5.1. Experimento em laboratório

Neste experimento, como substrato para os ácaros, foram utilizados frutos de laranja-doce (variedade Valência) coletados em pomar sem uso de agrotóxicos. Os frutos foram lavados em água corrente e parcialmente parafinados, deixando-se uma arena de 5,0 cm de diâmetro sem parafina e delimitada com cola “tipo entomológica” (Pega-insetos, PROMIP, Brasil). A arena foi dividida ao meio com cola “tipo entomológica”, obtendo-se duas arenas de 2,5 cm de diâmetro (duas unidade experimentais) por fruto (Figura 2A). Em cada arena, foi adicionada uma mistura de gesso, farinha de trigo, areia fina e água, na proporção de 1:1:1:1, com o intuito de proporcionar saliências sobre os frutos e de estimular a oviposição e a permanência dos ácaros sobre os frutos (Chiavegato, 1986; Albuquerque et al., 1997).

Os produtos foram pulverizados sobre os frutos, em torre de Potter (Figura 3A), calibrada a 34,5 kPa, gastando-se volume de calda de 2,0 mL em cada pulverização (Tabela 1). Cada tratamento foi repetido 6 vezes. No tratamento-controle, utilizou-se de água deionizada. Após as aplicações, 10 fêmeas adultas de *B. yothersi* recém-emergidas foram transferidas para cada unidade experimental. Foram realizadas, diariamente, avaliações de contabilização do número de ovos, larvas, ninfas (protoninfas e deutoninfas) até o décimo dia após a transferência das fêmeas para as unidades experimentais.

Tabela 1. Inseticidas e acaricidas e suas respectivas concentrações utilizados nos experimentos.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Dose (mg.L ⁻¹) ²					
		C2	C1 ¹	C3	C4	C5	C6
Cipermetrina	Mustang 350 EC	70,0	35,0	17,5	8,7	4,4	2,2
Fosmete	Imidan 500 WP	500,0	250,0	125,0	62,5	31,2	15,6
Imidacloprido	Provado 200 SC	80,0	40,0	20,0	10,0	5,0	2,5
Espirodiclofeno ³	Envidor 240 SC	3,5	1,7	0,9	0,4	0,2	0,1
Espirodiclofeno + cipermetrina	Envidor + Mustang	3,5 + 70,0	1,7 + 35,0	0,9 + 17,5	0,4 + 8,7	0,2 + 4,4	0,1 + 2,2
Espirodiclofeno + fosmete	Envidor + Imidan	3,5 + 500,0	1,7 + 250,0	0,9 + 125,0	0,4 + 62,5	0,2 + 31,2	0,1 + 15,6
Espirodiclofeno + imidacloprido	Envidor + Provado	3,5 + 80,0	1,7 + 40,0	0,9 + 20,0	0,4 + 10,0	0,2 + 5,0	0,1 + 2,5

¹C1- dose comercial²C2 = C1 vezes 2; C3 = C1/2; C4 = C1/4; C5 = C1/8; C6 = C1/16.³Espirodiclofeno – dose comercial = 60 mg i.a.L⁻¹; C1= dose comercial/32; C2 = C1/16; C3 = C1/64; C4 = C1/128; C5 = C1/256; C6 = C1/512

3.5.2. Experimento em casa de vegetação

O delineamento experimental adotado nesse experimento realizado em casa de vegetação foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 6, com seis repetições, em que o fator A correspondeu aos diferentes produtos (inseticida, acaricida e mistura entre eles), o fator B às seis doses de cada um dos produtos, conforme descritos na Tabela 1. Neste estudo, foram utilizadas plantas de laranjeira-doce 'Valência' obtida a partir de sementes (*seedlings*) germinadas e mantidas em tubetes de 25 cm³, preenchidos com substrato à base de fibra de coco (Golden Mix granulado T11, Amafibra, Brasil) (Figura 2B).

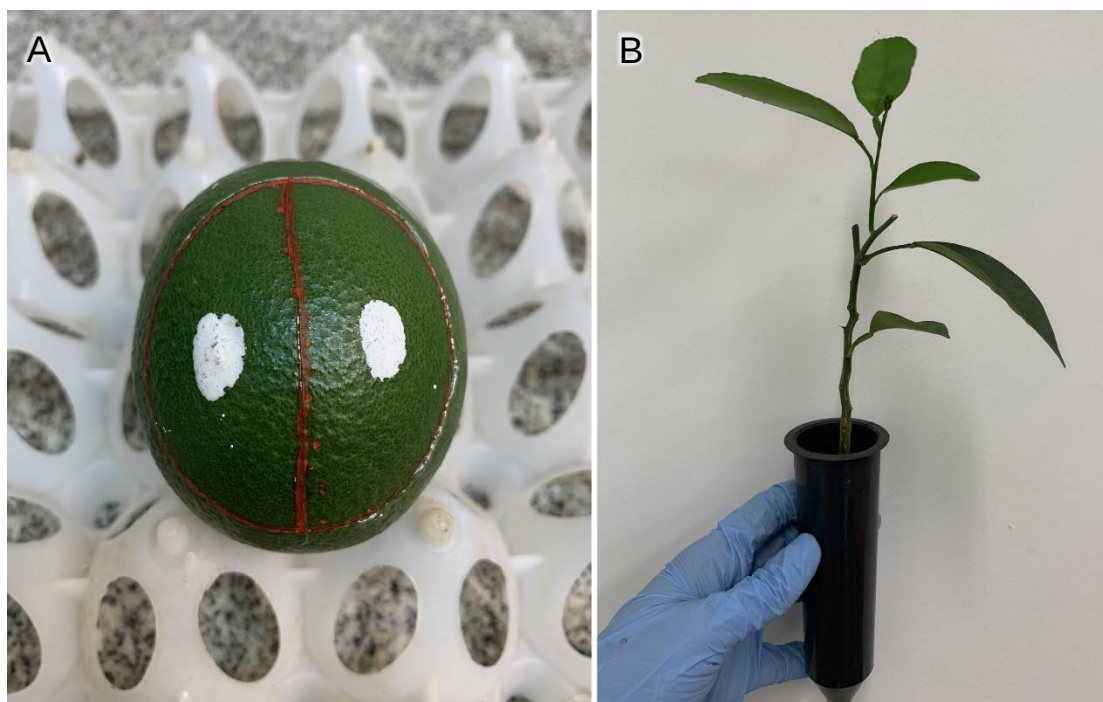


Figura 2. Unidades experimentais utilizadas nos experimentos para avaliar o efeito de diferentes concentrações do acaricida e inseticidas, isolados e combinados, na população de *Brevipalpus yotheresi* em laboratório (Fig. A) e casa de vegetação (Fig. B).

Cada tratamento foi composto por seis plantas. Os produtos foram pulverizados sobre as plantas com pulverizador manual (Brudden ® Practical) até ao ponto de escorrimento (Figura 3B). Após a secagem das folhas, 15 fêmeas

adultas de *B. yothersi* foram transferidas para cada planta. A avaliação do número de ácaros [ovos, larvas, ninfas (protoninfas e deutonifas) e adultos] vivos foi realizado 28 (vinte e oito) dias após a transferência das fêmeas para as plantas.



Figura 3. Equipamentos utilizados para a pulverização dos tratamentos. A) Torre de Potter (Burkard Manufacturing); B) Pulverizador manual (Bruden® Practical).

3.5.3. Análise dos dados

Os dados obtidos no experimento realizado em laboratório, referentes ao número de ovos por fêmea, por dia e porcentagem de fertilidade, foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, por meio do software SAS (SAS Institute, 2015). No experimento realizado em casa de vegetação, os dados relativos ao total de ácaros contabilizados (ovos + larvas + ninfas + adultos) no final do estudo foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, e comparados com o tratamento adicional (água), utilizando-se do teste de Dunnett; ambos os testes a 5% de probabilidade de erro ($P < 0,05$).

Ainda com base no número de ácaros obtidos em cada unidade experimental do experimento realizado em casa de vegetação, foi determinada a taxa instantânea de crescimento (ri) da população utilizando a fórmula proposta por Stark e Banks (2003):

$$ri = \frac{\ln \left(\frac{Nf}{No} \right)}{\Delta t}$$

Em que: Nf = número total de ácaros (fêmeas, ovos, larvas e/ou ninfas) obtidos na avaliação realizada aos 28 dias após a transferência das fêmeas para as unidades experimentais; No = número de fêmeas transferidas para as unidades experimentais; e Δt = intervalo de tempo (em dias) transcorrido entre a transferência das fêmeas e a avaliação final. Valores positivos e negativos de ri indicam que houve aumento ou decréscimo da população, respectivamente, enquanto valores de $ri = 0$ indicam que a população se manteve estável durante o período de avaliação.

3.6. Efeito dos produtos isolados e em mistura sobre parâmetros biológicos e demográficos de *Brevipalpus yothersi*

Inicialmente, para determinar o efeito dos tratamentos sobre parâmetros biológicos e demográficos de *B. yothersi*, a fim de garantir uma quantidade mínima de ácaros vivos, estimou-se a CL_{25} de espiroclorfenol sobre este ácaro. A CL_{25} estimada correspondeu a 6,8 mg i.a.L⁻¹. Em seguida, foram coletados frutos em pomar sem pulverização de agrotóxicos, que foram devidamente preparados para servir como substrato aos ácaros. Os frutos foram lavados em água corrente e parcialmente parafinados, deixando-se uma arena de 5 cm² (2,5 cm de diâmetro) sem parafina e delimitada com cola “tipo entomológica” (Pega-insetos, PROMIP, Brasil).

Foram estabelecidos oito tratamentos, sendo: 1) espiroclorfenol (4,5 mg

i.a.L⁻¹); 2) cipermetrina (35,0 mg i.a.L⁻¹); 3) fosmete (250,0 mg i.a.L⁻¹); 4) imidacloprido (40,0 mg i.a.L⁻¹); 5) espiroclorfenol + cipermetrina (4,5 + 35,0 mg de i.a.L⁻¹); 6) espiroclorfenol + fosmete (4,5 + 250,0 mg de i.a.L⁻¹); 7) espiroclorfenol + imidacloprido (4,5 + 40,0 mg de i.a.L⁻¹), e 8) água deionizada (controle). Os produtos foram aplicados em torre de Potter, gastando-se 2,0 mL de calda por fruto.

Após as aplicações, uma fêmea adulta de *B. yotheresi* foi transferida para cada fruto, onde permaneceu por 24 horas em contato com o resíduo dos tratamentos pulverizados. Após esse período, as fêmeas foram retiradas dos frutos, deixando-se apenas um ovo por fruto. Uma coorte de 30 ovos (30 repetições) foi estabelecida para cada tratamento. Posteriormente, esses frutos foram mantidos em câmara climatizada (25 ± 1°C, 60 ± 10% UR e fotofase de 12 h). Diariamente, as unidades experimentais foram avaliadas para determinar a duração do desenvolvimento biológico e a sobrevivência em cada estágio. Após a emergência das fêmeas adultas, estas foram mantidas nos frutos para avaliar a sobrevivência e a fecundidade. Os dados foram registrados diariamente até à morte de cada indivíduo.

3.6.1. Análise dos dados

A duração dos estágios de ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e pré-adulto foi determinada para cada tratamento. Os períodos de pré-oviposição (APOP: período entre a emergência do adulto e a primeira oviposição), pré-oviposição total (TPOP: período de ovo à primeira oviposição), fecundidade, longevidade, longevidade total (dia da oviposição até à morte do adulto) e dias de oviposição (O_d) foram determinados para cada tratamento (Chen et al., 2018). O_d foi calculado pela seguinte fórmula:

$$O_d = \frac{\sum_{x=1}^{N_{fr}} D_x}{N_{fr}}$$

Na qual: N_{fr} é o número de fêmeas reprodutoras, e D_x é o número de dias de oviposição de cada fêmea.

Os parâmetros biológicos e demográficos de *B. yothersi* foram estimados usando todos os indivíduos avaliados, incluindo aqueles que morreram antes de completar o desenvolvimento biológico, como proposto por Chi (1988). Os seguintes parâmetros foram estimados conforme metodologia de Chi e Liu (1985): taxa de sobrevivência para cada idade-estágio específica (S_{xj}) (em que: x é a idade e j é o estágio de desenvolvimento), taxa de sobrevivência na idade específica (l_x), fecundidade na idade específica (m_x), expectativa de sobrevivência na idade-estágio específica (e_{xj}) e valor da reprodução na idade-estágio específica (V_{xj}). Além disso, foram calculados a taxa líquida de reprodução (R_0), a taxa intrínseca de crescimento (rm), a razão finita de aumento (λ) e o tempo médio entre gerações (T) para a construção da Tabela de vida de fertilidade. Os dados originais de todos os indivíduos foram analisados com o auxílio do programa computacional TWSEXMSChart (Chi, 2020).

Taxa de sobrevivência específica por idade-estágio:

$$S_{xj} = \frac{n_{xj}}{n_{01}}$$

Na qual, n_{01} é o número total de indivíduos utilizados no início do estudo da Tabela de vida de fertilidade, e n_{xj} é o número de indivíduos que sobrevivem até à idade x e estágio j .

Taxa de sobrevivência específica por idade:

$$l_x = \sum_{j=1}^k S_{xj}$$

Fecundidade específica por idade:

$$m_x = \frac{\sum_{j=1}^k S_{xj} f_{xj}}{\sum_{j=1}^k S_{xj}}$$

Taxa líquida de reprodução, definida como o número total de descendentes que um indivíduo pode produzir durante sua vida:

$$R_0 = \sum_{x=0}^{\infty} l_x m_x$$

A taxa intrínseca de crescimento foi estimada usando o método de bissecção interativa com a idade indexada a 0 (Godman, 1982), pela equação de Euler-Lotka:

$$\sum_{i=x}^{\infty} e^{-r(i+1)} l_x m_x = 1$$

Razão finita de aumento:

$$\lambda = e^r$$

Tempo médio entre gerações:

$$T = \frac{\ln R_0}{r}$$

Expectativa de vida específica por idade-estágio refere-se à expectativa de vida de um indivíduo com idade x e estágio y :

$$e_{xj} = \sum_{i=x}^{\infty} \sum_{y=1}^k S'_{iy}$$

Em que: S'_{iy} é a probabilidade de indivíduos com idade x sobreviverem até à idade i e estágio y . A e_{xj} foi calculada de acordo com o método proposto por Chi e Su (2006).

O valor reprodutivo específico por idade-estágio é a contribuição de indivíduos com idade x e estágio y para a população futura (Huang e Chi, 2011; Tuan et al., 2014) e foi calculado como:

$$v_{xj} = \frac{e^{r(x+1)}}{S_{xj}} \sum_{i=x}^{\infty} e^{-r(i+1)} \sum_{y=1}^k S'_{iy} f_{iy}$$

As médias e os erros-padrão de cada parâmetro foram estimados pelo método de *bootstrap*, seguindo o procedimento proposto por Huang e Chi (2012). Durante o procedimento de *bootstrap*, os dados de cada um dos parâmetros analisados foram reamostrados 100.000 vezes. As médias de cada população foram comparadas pelo teste de *bootstrap* pareado (Efron e Tibshirani, 1993).

3.7. Efeito da mistura de inseticidas na eficiência de espirodiclofeno para o controle de *Brevipalpus yothersi* em condições de campo

Foram realizados dois experimentos em condições de campo, com o intuito de avaliar a eficiência e o período residual dos produtos isolados e das combinações entre o acaricida e os inseticidas. Os experimentos foram realizados em pomares comerciais de lima-ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka), irrigados, no município de Monte Alto, São Paulo, Brasil. Estes pomares foram escolhidos para a instalação dos experimentos devido à presença de *B. yothersi* em alta infestação, uma vez que plantas de lima-ácida 'Tahiti' são imunes ao vírus da leprose CiLV-C (Arena et al., 2016), não exigindo controle do ácaro da leprose.

O primeiro experimento foi instalado no ano de 2020, em um pomar com 6 anos de idade de lima-ácida 'Tahiti' enxertada em citrumelo 'Swingle', cultivado em espaçamento de 6,0 × 2,0 m (21°16'42" S, 48°33'23" O). Enquanto o segundo experimento foi instalado em 2021, em pomar de lima ácida 'Tahiti' enxertada em limoeiro 'Cravo' de 3 anos de idade, com espaçamento de 6,0 × 3,0 m (21°16'29" S, 48°33'22" O) (Figuras 4A e B).

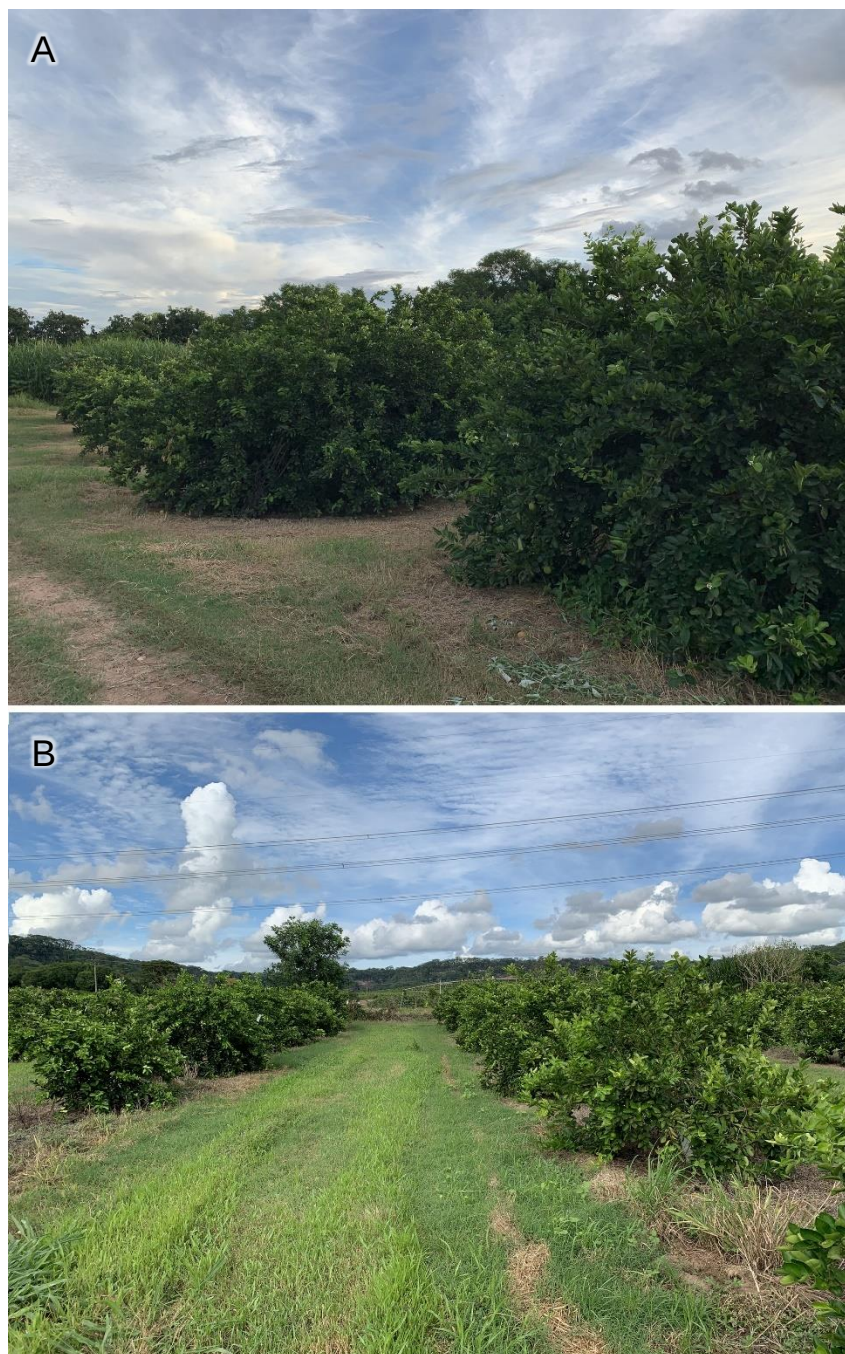


Figura 4. Áreas experimentais localizadas no município de Monte Alto – SP, onde foram conduzidos os experimentos de eficiência de espiroclorfenol isolado e combinado aos inseticidas.

Em ambos os experimentos, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com oito tratamentos e cinco repetições (parcelas). Cada parcela experimental foi composta por seis plantas em linha, nos quais as quatro plantas centrais das parcelas foram utilizadas para as avaliações, e as duas plantas da extremidade, como bordaduras. Os tratamentos avaliados foram: 1) espirodiclofeno (60,0 mg de i.a. por litro de água); 2) cipermetrina (35,0 mg de i.a. por litro de água); 3) fosmete (250,0 mg de i.a. por litro de água); 4) imidacloprido (40,0 mg de i.a. por litro de água); 5) espirodiclofeno + cipermetrina (60,0 + 35,0 mg de i.a. por litro de água); 6) espirodiclofeno + fosmete (60,0 + 250,0 mg de i.a. por litro de água); 7) espirodiclofeno + imidacloprido (60,0 + 40,0 mg de i.a. por litro de água), e 8) controle sem aplicação de quaisquer produtos.

No primeiro experimento, os tratamentos foram aplicados com um turbo pulverizador Jacto Arbus de 4.000 L (Jacto do Brasil SA, Pompeia - SP, Brasil), equipado com pontas do tipo cônico (Disc & Core®, Jacto, Pompéia, SP, Brasil), tracionado por um trator MF-283, com velocidade de trabalho de 3,27 km/h, unilateral. O volume de calda correspondeu a 150,0 mL/m³. Enquanto no segundo experimento, os produtos foram aplicados com um pulverizador hidráulico estacionário KPS-26 (Kawashima), acionado por um motor a gasolina de 25,4 cilindradas, acoplado a uma mangueira de 50 m de comprimento e equipado com pontas do tipo cônico (Disc & Core®, Jacto, Pompeia - SP, Brasil). O volume de calda utilizada também foi de 150,0 mL/m³.

Foram realizadas avaliações para estimar o nível populacional de *B. yothersi* antes e após a aplicação dos tratamentos. Para isso, foram coletados quatro frutos por parcela (um fruto por planta) que foram colocados em sacos de papel e acondicionados em uma caixa de isopor. Em seguida, os frutos foram transportados até ao Laboratório de Acarologia da Unesp/FCAV, para a contabilização do número de ácaros *B. yothersi* presente em cada fruto, sob microscópio estereoscópio. No primeiro experimento, foram realizadas avaliações antes da aplicação (prévia) e aos 7; 14; 21; 35 e 42 dias após a aplicação dos tratamentos, enquanto no segundo experimento foram realizadas avaliações antes da aplicação (prévia) e aos 7; 21; 35; 48 e 62 após a aplicação. As avaliações foram realizadas até à reinfestação no

tratamento com espiroclorfenol isolado.

A eficiência de controle (E_c) dos tratamentos foi calculada com base no número médio de ácaros obtidos na prévia e nas avaliações realizadas após a aplicação dos tratamentos, utilizando-se da fórmula proposta por Henderson e Tilton (1955):

$$E_c(\%) = 1 - \left(\frac{N_{ic} \times N_{ft}}{N_{fc} \times N_{it}} \right) \times 100$$

Em que: N_{ic} = número médio de ácaros vivos registrados no controle na avaliação prévia; N_{fc} = número médio de ácaros vivos registrados nos frutos no controle após a aplicação; N_{it} = número médio de ácaros vivos registrados no tratamento, na avaliação prévia, e N_{ft} = número médio de ácaros vivos registrados no tratamento, após a aplicação.

Calculou-se, também, a taxa instantânea de crescimento populacional (ri) do ácaro, como proposto por Stark e Banks (2003):

$$ri = \frac{\ln \left(\frac{N_f}{N_o} \right)}{\Delta t}$$

Valores positivos e negativos de ri indicam um incremento e um decréscimo na população do ácaro, respectivamente, enquanto valores de $ri = 0$ indicam que a população do ácaro se manteve estável durante o período de avaliação.

Além disso, foi determinado o período de controle ou de reinfestação do ácaro nos tratamentos. O período de controle ou de reinfestação refere-se ao período entre a não detecção de nenhum ácaro da leprose após a aplicação do tratamento (“população zerada”) até ao aparecimento de, pelo menos, um ácaro (exceto ovo) em 5% dos frutos avaliados (Silva Júnior, 2021).

3.7.1. Análise dos dados

Modelos lineares generalizados (GLM) (Nelder e Wedderburn, 1972) com distribuição do tipo quase-Poisson e Gaussiana foram utilizados para a análise dos dados de contagem (número de ácaros nos frutos) e da porcentagem de redução populacional e período de recolonização do ácaro nas plantas, respectivamente. A

qualidade do ajuste foi verificada pelo gráfico meio-normal de probabilidades, com envelope de simulação (Demétrio et al., 2014). Quando houve diferença significativa entre os tratamentos, comparações múltiplas (teste de Tukey, $P < 0,05$) foram realizadas, utilizando-se da função "glht" do pacote "multcomp", com o ajuste dos valores de P . Nos casos em que houve dependência dos erros (período de controle), os dados foram analisados por meio de modelos lineares generalizados mistos (GLMM), utilizando o pacote "lme4" (Bates et al., 2015). Todas as análises foram realizadas no software estatístico "R", versão 3.4.4 (R Development Core Team, 2018).

3.8. Teor de espirodiclofeno em caldas do acaricida isolado ou combinado aos inseticidas

Foram preparadas caldas do acaricida e das misturas (acaricida + inseticida), minutos antes da análise. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, onde quatro tratamentos foram estabelecidos: 1) espirodiclofeno (Envidor® - 60,0 mg de i.a. por litro de água); 2) espirodiclofeno + cipermetrina (Envidor® + Mustang® - 60,0 e 35,0 mg de i.a. por litro de água); 3) espirodiclofeno + fosmete (Envidor® + Imidan® - 60,0 e 250,0 mg de i.a. por litro de água), e 4) espirodiclofeno + imidacloprido (Envidor® + Provado® - 60,0 e 40,0 mg de i.a. por litro de água). O teor de espirodiclofeno nas caldas foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector *Diode Array* (DAD). O HPLC-DAD permite a determinação química, a qualitativa e a quantitativa, de compostos de elevado peso molecular, e instáveis termicamente. Por meio desse equipamento e seguindo as Normas Brasileiras da Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT NBR 14029:2016 (Agrotóxicos e afins – validação de métodos analíticos) (ABNT, 2016), foi determinada a concentração do ingrediente ativo espirodiclofeno em cada uma das caldas. As análises foram realizadas pela empresa Plantec Laboratórios (Iracemápolis, São Paulo, Brasil), um laboratório certificado pelo INMETRO, com a acreditação ISO 17025 (CRL 0297).

3.8.1. Análise dos dados

Os dados de teor de espirodiclofeno em cada um dos tratamentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA); e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), por meio do software SAS (SAS Institute, 2015).

3.9. Atividade enzimática em *Brevipalpus yothersi* expostos às misturas de acaricida e inseticidas

3.9.1. Tratamentos

Foram realizados três experimentos em delineamento inteiramente casualizado, visando a avaliar a atividade das enzimas esterase e GST, e a quantificação mono-oxigenases (P450) em fêmeas adultas de *B. yothersi*. Foram estabelecidos os seguintes tratamentos: 1) espirodiclofeno (60,0 mg de i.a. por litro de água); 2) cipermetrina (35,0 mg de i.a. por litro de água); 3) fosmete (250,0 mg de i.a. por litro de água); 4) imidacloprido (40,0 mg de i.a. por litro de água); 5) espirodiclofeno + cipermetrina (60,0 + 35,0 mg de i.a. por litro de água); 6) espirodiclofeno + fosmete (60,0 + 250,0 mg de i.a. por litro de água); 7) espirodiclofeno + imidacloprido (60,0 + 40,0 mg de i.a. por litro de água), e 8) água deionizada (controle), totalizando oito tratamentos. Cada tratamento foi repetido três vezes, nos quais cada repetição foi composta por um fruto de laranja com aproximadamente 250 ácaros.

3.9.2. Obtenção dos extratos enzimáticos

Inicialmente, foram preparados frutos de laranja-doce variedade Pera, conforme descrito no item 3.2.1, para servirem como substrato aos ácaros. Os tratamentos foram aplicados em torre de Potter, calibrada a 34,5 kPa, gastando-se 2,0 mL de volume de calda em cada pulverização. Imediatamente após a secagem

dos resíduos sobre os frutos, foram transferidos aproximadamente 250 ácaros fêmeas adultas de *B. yothersi* para cada unidade experimental (fruto).

Após seis horas de exposição, os ácaros foram coletados com auxílio de uma bomba de vácuo, conectada a um tubo de plástico de 1,5 mL (Eppendorf®) modificado e uma ponteira azul tipo Gilson® de 1000 µL (Figura 5), e acondicionados em tubos de plástico de 1,5 mL (Eppendorf®). As amostras de ácaros foram mantidas em freezer a -20°C até ao momento de uso. Cada amostra foi padronizada com 230 ácaros, sendo realizada três replicatas por amostra.

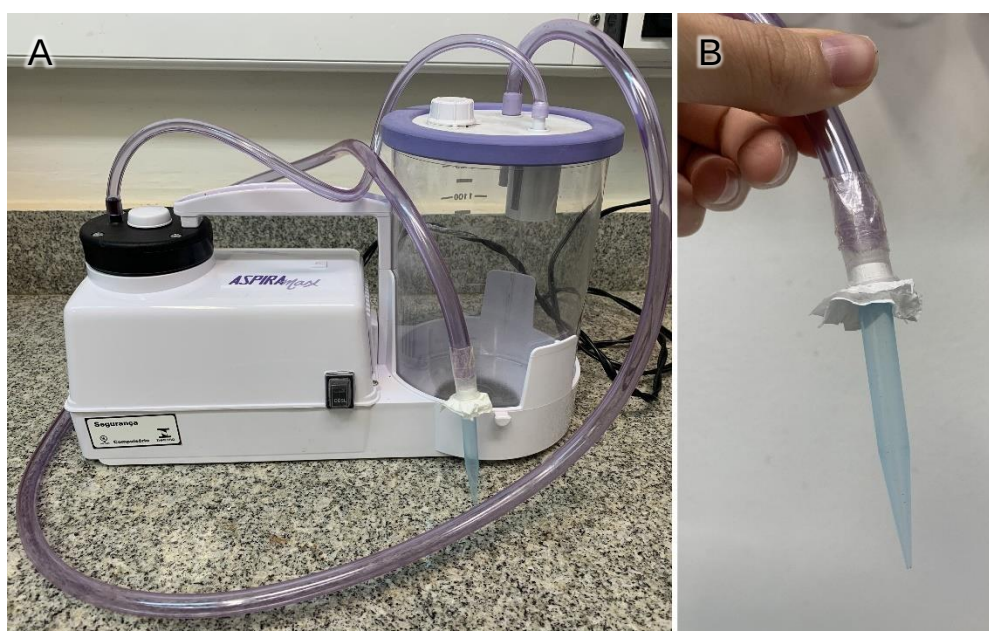


Figura 5. A. Bomba de vácuo (Aspira Max) adaptada para coletar os ácaros para ensaio enzimático; B. Detalhe para a ponteira adaptada ao equipamento para facilitar a coleta dos ácaros.

Para a determinação da atividades de esterases, os ácaros de cada repetição foram macerados em 350 µL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5), utilizando um pistilo plástico e, em seguida, centrifugados (10.000 x g; 10 min; 4°C). Para o ensaio de atividade de GST, os ácaros foram macerados em 350 µL de tampão Tris (0,1 M, pH 8,5) suplementado com glutathione reduzida (GSH) 10 mM e, na sequência, as amostras foram centrifugadas (20.000 x g; 15 min; 4°C). Por fim, para a quantificação das mono-oxigenases, a maceração foi realizada em tampão fosfato

de potássio (90 mM, pH 7,2), e as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante (extrato enzimático) em cada repetição foi coletado e transferido para um novo microtubo, que foi mantido em gelo durante todo o processo de análise.

3.9.3. Determinação do conteúdo proteico

A concentração de proteína, em todas as amostras, foi obtida pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando-se como padrão solução de albumina de soro bovino (BSA) a 0,2 mg/mL (Thermo Scientific). Para isso, 10 µL do extrato enzimático foram misturados a 250 µL de Coomassie Blue G-250 (Thermo Scientific). Como branco, foi utilizada a solução tampão de extração enzimática dos ácaros no lugar da enzima. A leitura de absorbância foi feita a 595 nm, em espectrofotômetro (Multiskan Sky, Thermo Scientific).

3.9.4. Atividade de esterases

Para a avaliação da atividade de esterases, foi utilizada a metodologia adaptada de Mozes-Koch et al. (2000) e Van Leeuwen et al. (2005). A atividade de esterases no extrato enzimático de ácaros deve ser proporcional ao aumento da concentração de p-nitrofenol (p-NP), causado pela hidrólise de p-nitrofenil acetato (p-NPA). Para medir essa atividade, foram preparadas reações contendo 100 µL do extrato de ácaros, contendo aproximadamente 66 ácaros, 80 µL de tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) e 20 µL de solução de 4-nitrofenil acetato (p-NA) a 0,5 mM em tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5). Uma curva-padrão de concentração de p-NP em tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) foi gerada com diferentes concentrações de substrato (concentração final de 0,05-0,5 mM).

A formação de 4-nitrofenol foi monitorada a 30°C em um leitor de placas (Multiskan Sky, Thermo Scientific), regulado no comprimento de onda de 405 nm. Leituras contínuas, em intervalos de 15 s, foram realizadas durante cinco minutos.

A curva padrão de 4-nitrofenol em tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) foi utilizada para os cálculos de atividade.

3.9.5. Atividade de glutathione-S-transferase

As atividades de conjugação de glutathione (GST) foram medidas usando como substrato o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Sigma Aldrich) (Habig e Jakoby, 1981). Cada reação consistiu em 100 μ L do extrato enzimático dos ácaros, que foi incubado por 10 minutos, a 25°C, com 160 μ L de GSH 10 mM preparada em tampão Tris (0,1 M pH 8,5). A reação foi iniciada pela adição de 40 μ L de solução de CDBN (12 mg de CDBN dissolvidos em 1 mL de etanol absoluto e homogeneizados em 9 mL de tampão Tris 0,1 M, pH 8,5). A alteração na absorbância foi registrada a 340 nm com um leitor de placas (Multiskan Sky, Thermo Scientific), a 25°C. As leituras foram realizadas pelo modo cinético do espectrofotômetro, de forma contínua, em intervalos de 15 segundos, durante um período de reação de dois minutos. Todos os ensaios foram corrigidos pelos valores de conjugação não enzimática que ocorreu em poços de uma placa de microtitulação, sendo o extrato de ácaros substituído pelo tampão (branco). A quantidade de CDBN conjugada, formada a 340 nm, foi calculada usando-se o coeficiente de extinção de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, corrigido para o comprimento do caminho ótico de 0,552 cm (Habig e Jakoby, 1981).

3.9.6. Quantificação de proteínas contendo grupos heme

Para avaliar a atividade das mono-oxigenases do citocromo P450, foi utilizado um método indireto, que consistiu em medir o nível de proteínas que contém grupos heme, o que inclui as monooxigenases do citocromo P450. A concentração de proteínas que apresentam grupo heme pode ser correlacionado com a concentração das monooxigenases (Brogdon et al., 1997). A reação consistiu em 20 μ L de extrato enzimático dos ácaros, 60 μ L de tampão fosfato de potássio

(90 mM, pH 7,2), 200 µL de 3,3',5,5'-tetra-metilbenzidina (TMBZ) (Sigma Aldrich) (0,012 g dissolvido em 6 mL de etanol e diluído em 18 mL de tampão acetato de sódio (0,25 M, pH 5,0) e 25 µL de H₂O₂ 3%. Para calibrar o espectrofotômetro, a enzima foi substituída pelo tampão de extração ("branco"), e como controle positivo, foi feita uma reação utilizando 20 µL de citocromo-C de coração de cavalo (Sigma Aldrich) a 0,01 mg/mL, em tampão acetato de sódio (0,25 M, pH 5,0), para substituir o extrato enzimático. Após 30 minutos de incubação, foi feita a leitura da absorbância a 650 nm em espectrofotômetro (Multiskan Sky, Thermo Scientific). Uma curva-padrão, obtida pela média de três curvas, foi preparada, utilizando-se de diferentes concentrações de citocromo C, que permitiu a conversão dos valores de absorbância em conteúdo de citocromo equivalente nos extratos enzimáticos dos ácaros adultos. A quantidade de citocromo P450 foi expressa como ng de citocromo equivalente por ácaro, utilizando-se da curva padrão do citocromo C como referência (Brasil, 2006).

3.9.7. Análise dos dados

Os dados de atividade de cada grupo de enzimas (esterase, GSTs e mono-oxigenases) em cada tratamento, obtidos em cada um dos experimentos, foram submetidos à análise de variância (ANOVA); e as médias dos tratamentos, comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.10. Atividade enzimática de ácaros *Brevipalpus yotheri* expostos aos inseticidas ao longo do tempo

A atividade e o perfil enzimático de esterases, GSTs e mono-oxigenases foram estudados em ácaros *B. yotheri* expostos ao acaricida e aos inseticidas. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, sendo que os tratamentos estabelecidos foram: 1) espirodiclofeno (60,0 mg de i.a. por litro de água); 2) cipermetrina (35,0 mg de i.a. por litro de água); 3) fosmete (250,0 mg de

i.a. por litro de água); 4) imidacloprido (40,0 mg de i.a. por litro de água), e 5) água deionizada (controle). Cada tratamento foi repetido três vezes, sendo que cada repetição foi composta por um fruto de laranja com aproximadamente 250 ácaros. Previamente, os frutos foram preparados da mesma forma como mencionado no item 3.2.1.

Após seis; 12; 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos, os ácaros foram coletados com auxílio de uma bomba de vácuo e transferidos para tubos de plástico de 1,5 mL (Eppendorf®). Cada amostra foi composta por 230 ácaros e mantidas em freezer a -20°C, até ao momento de uso. A metodologia de extração e de quantificação de cada grupo de enzimas foi realizada de forma idêntica ao descrito no item 3.9.2.

3.10.1. Análise dos dados

Os dados foram analisados em esquema fatorial 5 x 4, com três repetições, em que o fator A correspondeu aos tratamentos (controle, cipermetrina, fosmete, imidacloprido e espirodiclofeno), e o fator B correspondeu aos quatro tempos de exposição (seis; 12; 24 e 48 horas). Os dados de atividade de cada grupo de enzimas (esterases, GSTs e mono-oxigenases) foram submetidos à análise de variância (ANOVA); e as médias dos tratamentos, comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), pelo software SAS (SAS Institute, 2015).

3.11. Toxicidade de espirodiclofeno em *Brevipalpus yotheri* expostos previamente aos inseticidas

Neste estudo, foram preparadas arenas de forma idêntica ao que foi descrito no item 3.4.1. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com os seguintes tratamentos: 1) cipermetrina (35,0 mg de i.a. por litro de água); 2) fosmete (250,0 mg de i.a. por litro de água); 3) imidacloprido (40,0 mg de i.a. por litro de água); 4) sem aplicação de inseticida e de qualquer outra

substância, e 5) água deionizada (controle). Cada tratamento foi repetido cinco vezes, nos quais cada repetição foi composta por uma arena de folha de laranja. Esses tratamentos foram aplicados sobre as arenas, sem a presença de ácaros (método de contato-residual), em torre de Potter calibrada a 34,5 kPa, gastando-se o volume de aplicação de 2,0 mL de calda em cada pulverização.

Imediatamente após a secagem superficial das folhas, foram transferidos 15 ácaros adultos fêmeas de *B. yothersi* para cada arena de folha. Após seis; 12; 24 e 48 horas de exposição a esses produtos, o acaricida espiroclorfenol (60,0 mg de i.a. por litro de água) foi pulverizado sobre os ácaros (método de contato direto), exceto no tratamento com água, que novamente recebeu água deionizada. Em seguida, as placas foram mantidas em câmara climatizada, nas mesmas condições mencionadas para a criação de *B. yothersi*.

As avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente, a partir de 24 horas após a transferência dos ácaros, e seguiram até que tratamento somente com água (controle) apresentasse 10% de mortalidade natural. Com auxílio de pincel de um pelo, os ácaros foram dispostos com a parte dorsal voltada para baixo, e aqueles que não voltaram à posição normal e reiniciarem o caminhar foram considerados mortos.

3.11.1. Análise dos dados

A eficiência de controle nos tratamentos foi calculada com os dados de sobrevivência em cada tratamento e tempo de exposição pela fórmula proposta por Abbott (1925) para correção da taxa de mortalidade de cada tratamento em função da mortalidade observada no tratamento controle (água). Para as análises estatísticas, os dados foram submetidos à análise de variância; e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro ($P < 0,05$), por meio do software SAS (SAS Institute, 2015). As médias dos tratamentos também foram comparadas com o tratamento somente com espiroclorfenol, utilizando-se do teste de Dunnett, a 5% de probabilidade de erro ($P < 0,05$).

3.12. Curva de concentração-resposta de espiroclorfenol para *Brevipalpus californicus*

Para a execução do experimento, foram utilizadas folhas de feijão (*P. vulgaris* L. cv. Prelude) como substrato para os ácaros. As folhas foram mantidas em bandejas contendo uma camada de algodão hidrófilo embebido em água, a fim de manter a turgescência das folhas, e circundadas com algodão hidrófilo para impedir a fuga dos ácaros. O método de contato-residual foi utilizado para expor os ácaros às concentrações de espiroclorfenol. Para isso, seis concentrações de espiroclorfenol, entre 0,0 e 14,0 mg de i.a. por litro de água, foram pulverizadas sobre as folhas, a um volume de 0,8 mL de calda, em torre de pulverização do “tipo Cornelis” (Figura 6), a um bar. O depósito de calda sobre as folhas correspondeu a 2,0 mg.cm².



Figura 6. Equipamento torre de pulverização do “tipo Cornelis” utilizado para a aplicação dos tratamentos.

Posteriormente, 100 fêmeas adultas de *B. californicus* foram transferidas para as folhas de feijão. As bandejas foram então colocadas em um incubador, a 25°C ($\pm$ 0,5), 60% de umidade relativa (UR) e fotoperíodo de 16/8 horas claro/escuro. A mortalidade foi avaliada diariamente até cinco dias após as

pulverizações. Com os dados de mortalidade dos ácaros expostos às seis concentrações de espirodiclofeno, foi estabelecida a curva de concentração-mortalidade. Os dados agrupados foram submetidos à análise Probit (Finney, 1971), por meio do software SAS (SAS Institute, 2015).

3.13. Toxicidade de espirodiclofeno ao *Brevipalpus californicus* expostos previamente a inibidores de enzima de detoxificação

Três inibidores da enzima de detoxificação, o inibidor de esterase S,S,S tributil-fosforotritioato (DEF) (10 mg L^{-1}), o inibidor de mono-oxigenase, dependente do citocromo P450 piperonilbutóxido (PBO) (150 mg L^{-1}), e o inibidor de GST dietilmaleato (DEM) (150 mg L^{-1}) foram utilizados para investigar a participação dessas enzimas de detoxificação sobre as alterações da eficiência de espirodiclofeno misturado aos inseticidas, no controle de *B. californicus*. Cada concentração dos inibidores escolhida apresentou até 5% de mortalidade de ácaros.

Os inibidores foram dissolvidos em 1% (v/v) de N, N-dimetilformamida e emulsificante W (3:1). Após a diluição, as caldas contendo os inibidores foram pulverizadas sobre folhas de feijão *P. vulgaris*, em torre de pulverização “tipo Cornelis”, ajustada a um bar e gastando-se 0,8 mL de calda em cada pulverização. O depósito de calda sobre as folhas correspondeu a $2,0 \text{ mg cm}^{-2}$. Em seguida, 120 fêmeas adultas foram transferidas para as folhas, onde permaneceram por quatro horas em contato com os inibidores de enzima de detoxificação.

Ao final de quatro horas de exposição aos inibidores, novas folhas de feijão foram pulverizadas com os seguintes tratamentos: 1) espirodiclofeno (8,2 mg de i.a. por litro de água, correspondente a CL_{25}); 2) fosmete (250,0 mg de i.a. por litro de água); 3) imidacloprido (40,0 mg de i.a. por litro de água); 4) espirodiclofeno + fosmete (8,2 + 250,0 mg de i.a. por litro de água); 5) espirodiclofeno + imidacloprido (8,2 + 40,0 mg de i.a. por litro de água); 6) água deionizada (controle), e 7) sem aplicação de quaisquer substâncias. Após a secagem das folhas, os ácaros que tiveram contato com os inibidores de enzima de detoxificação foram transferidos para as folhas pulverizadas com cada um dos tratamentos. O experimento foi

instalado em delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento repetido quatro vezes, no qual cada repetição foi composta por 30 ácaros, totalizando 120 ácaros por tratamento. Ácaros que foram expostos apenas aos sinergistas e ácaros expostos somente à água deionizada serviram como controle.

As avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente, a partir de 24 horas após a transferência dos ácaros, e seguiram até ao quinto dia após a aplicação dos tratamentos. Com auxílio de pincel de um pelo, os ácaros foram dispostos com a parte dorsal voltada para baixo, e aqueles que não voltarem à posição normal e caminharem foram considerados mortos.

3.13.1. Análise dos dados

Com os dados de sobrevivência, foi calculada a eficiência dos tratamentos, pela fórmula proposta por Abbott (1925), onde a taxa de mortalidade de cada tratamento foi corrigida a partir dos dados de mortalidade do tratamento-controle (água). Os dados foram submetidos aos testes de Bartlett para constatação de homocedasticidade (PROC GLM) e de Cramer Von Mises para normalidade (PROC UNIVARIATE). Por apresentarem tais requisitos foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a um nível de significância de 5% ($P < 0,05$), com auxílio do software SAS 14.1 (SAS, 2015).

A interação entre o acaricida com os respectivos inseticidas, com ou sem pré-tratamento com inibidores de enzima de detoxificação, foi verificada comparando a eficiência observada e a esperada dos tratamentos (isolados e combinados), por meio do teste de qui-quadrado (χ^2) (Morales-Rodriguez e Peck, 2009). O valor de mortalidade esperada da interação (ME) para produtos em mistura foi calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$ME = (MI + MA) \times \left(\frac{1 - MI}{100} \right)$$

Em que: MI é a eficiência (%) do inseticida isolado, e MA é a eficiência (%) do acaricida isolado. A mesma fórmula foi utilizada nos experimentos com ácaros que foram pré-tratados com inibidores, em que MI é a eficiência do inseticida após

o pré-tratamento com um inibidor, e MA é a eficiência do acaricida após o pré-tratamento com o mesmo inibidor. Os resultados do teste χ^2 foram comparados aos valores do χ^2 tabelado (3,841) para um grau de liberdade (1 df), usando-se a fórmula:

$$\chi^2 = \frac{MIA - ME^2}{ME}$$

Em que: MIA é a eficiência observada para a combinação do acaricida com um inseticida. Foi considerado efeito não aditivo entre os produtos quando o valor do χ^2 ultrapassou o valor da tabela (3,841). A interação entre os produtos foi considerada sinérgica quando a diferença entre MIA e ME resultou em valor positivo, e antagônica quando o valor foi negativo (Morales-Rodriguez e Warnner, 2015).

3.14. Atividade enzimática em *Brevipalpus californicus* expostos às misturas de acaricida e inseticida

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, no qual fêmeas adultas de *B. californicus* foram expostas a doses comerciais de: 1) fosmete (250,0 mg de i.a. por litro de água); 2) imidacloprido (40,0 mg de i.a. por litro de água); 3) espirodiclofeno + fosmete (60,0 + 250,0 mg de i.a. por litro de água); 4) espirodiclofeno + imidacloprido (60,0 + 40,0 mg de i.a. por litro de água), e 5) água (controle). Cada tratamento foi repetido três vezes, e cada repetição foi composta por 230 ácaros. Após seis horas de exposição aos tratamentos, os ácaros foram coletados com auxílio de uma bomba de vácuo (Figura 7) e acondicionados em tubos de plástico de 1,5 mL (Eppendorf®). As amostras foram mantidas em freezer a -80°C.

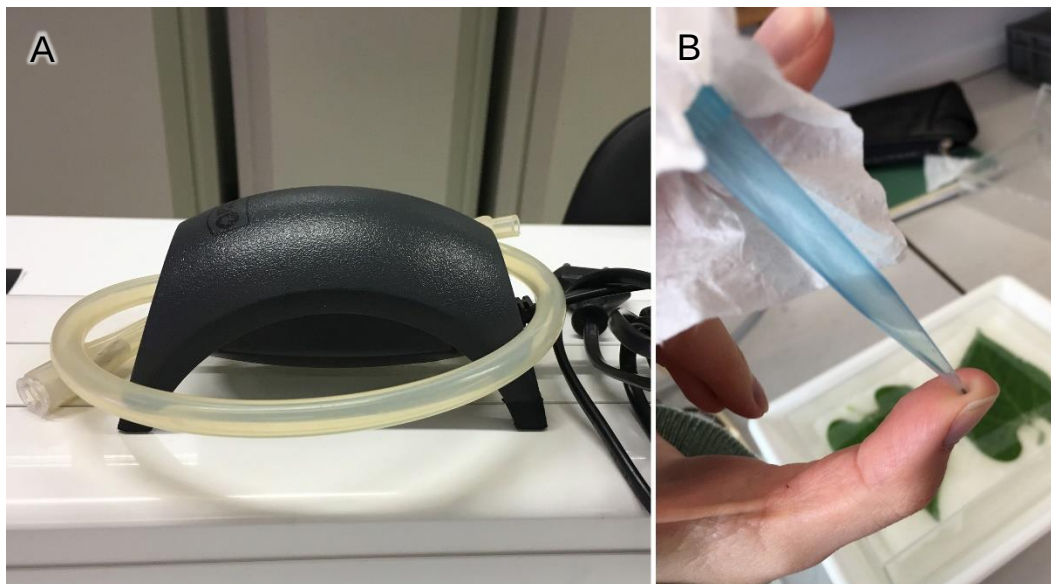


Figura 7. A) Equipamento usado para coletar ácaros *Brevipalpus californicus* após a aplicação dos tratamentos. B) Detalhe da ponteira azul (tipo Gilson®) com ácaros no seu interior.

A condução dos experimentos enzimáticos com *B. californicus* foi semelhante aos descritos para *B. yothersi* (item 3.9), exceto para a quantificação da atividade de mono-oxigenases, no qual foi determinada pelo método fluorimétrico (descrito no próximo item).

3.14.1. Determinação da atividade de mono-oxigenases em *Brevipalpus californicus* pelo método fluorimétrico

Para *B. californicus*, foi utilizado o método fluorimétrico para quantificação desse grupo de enzimas. Para isso, 230 ácaros adultos foram macerados e homogeneizados em 350 μ L tampão de fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,6). O homogeneizado foi centrifugado (1.000 g; 4°C; 15 min), e o sobrenadante foi coletado e transferido para novos microtubos e mantidos em gelo durante todo o processo da análise. A O-deetilação de 7-etoxi-4-trifluorometilcoumarina (7-EFC) foi medida de acordo com o método proposto por DeLuca et al. (1988) e Buters et al. (1993); porém, redimensionado e adaptado para placas de 96 células. Uma fonte de enzima de 50 μ L foi adicionada a 50 μ L de substrato (7-EFC 0,4 mM, glucose-6-

fosfato 1 mM, NADP⁺ 0,2 mM e 0,014 U de glucose-6-fosfato desidrogenase em tampão fosfato de sódio, pH 7,4) em poços de uma placa de microtitulação.

A placa foi colocada em um agitador automático e incubada durante 30 min a 37°C no escuro. A O-deetilação de 7-EFC resulta em 7-hidroxi-4-trifluorometilcumarina fluorescente (7-HFC). A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de uma solução a 50% de acetonitrila + TRIZMA 0,05 M, pH 10. Para o controle não enzimático, o extrato enzimático foi substituído por tampão. A fluorescência de 7-HFC foi medida em um espectrofluorômetro de placa de microtitulação de dupla varredura SPECTRAmax® GEMINI XS, com emissão a 510 nm e excitação a 410 nm. A atividade específica de 7-EFC-O-deetilação foi determinada usando uma curva-padrão 7-HFC (0,02-0,2 µM 7-HFC).

4. RESULTADOS

4.1. Toxicidade de inseticidas isolados e combinados com o espirodiclofeno sobre as fases do ciclo biológico de *Brevipalpus yothersi*

4.1.1. Toxicidade sobre ovos de *Brevipalpus yothersi*

Os resultados obtidos nos dois experimentos (A e B) foram semelhantes ($F=0,02$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,8801$) e permitiram avaliar o efeito da combinação entre o acaricida e os inseticidas sobre os ovos (Tabela 2).

No experimento A, não houve efeito significativo para o fator calda (isolado e mistura) ($F = 1,57$; $g.l. = 6, 14$; $P = 0,2431$) e para o fator inseticidas ($F = 3,11$; $g.l. = 6, 14$; $P = 0,0997$) sobre o controle de ovos, aos 14 dias após a aplicação (DAA). Também não houve interação entre os fatores ($F = 1,43$; $g.l. = 6, 14$; $P = 0,2719$). No experimento B, houve efeito significativo para o fator calda (isolado e mistura) ($F= 26,83$; $g.l. = 6, 14$; $P = 0,0001$) e não significativo para o fator inseticidas ($F=1,21$; $g.l. = 6, 14$; $P = 0,3264$), aos 14 DAA. Não houve interação entre os fatores ($F = 0,24$; $g.l. = 6, 14$; $P = 0,7922$).

As maiores porcentagens de mortalidade de controle sobre ovos foram verificadas nos tratamentos com aplicações somente do acaricida espirodiclofeno (73,0% e 84,5%, experimentos A e B, respectivamente) e na combinação de espirodiclofeno com imidacloprido (44,9% e 31,1%, experimentos A e B, respectivamente). A mortalidade da combinação de espirodiclofeno com cipermetrina ou fosmete foi inferior ao acaricida isolado. Inseticidas aplicados isoladamente não apresentaram mortalidade significativa no controle de ovos (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagens de controle (média $\pm$ erro-padrão) de ovos de *Brevipalpus yothersi* expostos a espirodiclofeno e inseticidas isolados e em mistura, ao 14º dia após as aplicações.

Tratamento	Experimento A		Experimento B	
	Isolado	Mistura	Isolado	Mistura
Cipermetrina	6,1 $\pm$ 6,1 aA*	10,3 $\pm$ 5,2 aA*	0,0 $\pm$ 0,0 aB*	19,1 $\pm$ 11,0 aA*
Fosmete	9,4 $\pm$ 7,6 aA*	10,1 $\pm$ 5,1 aA*	0,3 $\pm$ 0,3 aB*	27,3 $\pm$ 1,5 aA*
Imidacloprido	6,2 $\pm$ 3,6 aB*	44,9 $\pm$ 21,9 aA	2,6 $\pm$ 1,7 aB*	31,1 $\pm$ 12,7 aA*
Espirodiclofeno	73,0 $\pm$ 14,3		84,5 $\pm$ 7,2	
C.V. (%)	66,3		44,9	

Médias seguidas por letras maiúsculas, diferentes nas linhas, e minúsculas nas colunas diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente da testemunha (espirodiclofeno), a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Na tabela foram apresentados os dados reais de porcentagem de mortalidade, e para análise estatística, os dados foram transformados em arco-seno $\sqrt{x/100}$.

C.V. = Coeficiente de variação.

4.1.2. Toxicidade sobre larvas de *Brevipalpus yothersi*

Não houve diferença significativa entre os experimentos A e B ($F = 2,22$; $g.l. = 6, 56$; $P = 0,1870$) para o efeito da combinação entre o acaricida e os inseticidas sobre larvas de *B. yothersi* (Tabela 3).

Foi observado efeito significativo para o fator calda (isolado e mistura), em ambos os experimentos ($F = 296,57$; $g.l. = 6, 28$; $P < 0,0001$ e $F = 180,92$; $g.l. = 6, 28$; $P < 0,0001$, para os experimentos A e B, respectivamente), e não significativo para o fator inseticidas ($F = 1,90$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,1677$, $F = 0,54$; $g.l. = 6, 28$; $P =$

0,5887, para os experimentos A e B, respectivamente), no controle de larvas de *B. yothersi*, aos 4 DAA. Não houve interação entre os fatores no experimento A ($F = 2,61$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,0916$) e no experimento B ($F = 0,54$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,5894$).

A maior mortalidade (100,0%) foi verificada no tratamento com aplicação somente do acaricida espiroclorfenol. A mortalidade da combinação de espiroclorfenol com cipermetrina ou fosmete foi semelhante ao acaricida isolado, enquanto a combinação de imidacloprido com o espiroclorfenol foi inferior ao espiroclorfenol apenas no experimento A. Inseticidas aplicados isolados causaram mortalidade menor que 50,0% no controle de larvas (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagens de mortalidade (média $\pm$ erro-padrão) de larvas de *Brevipalpus yothersi* expostas a espiroclorfenol e inseticidas isolados e em mistura, ao quarto dia após as aplicações.

Tratamentos	Experimento A		Experimento B	
	Isolado	Mistura	Isolado	Mistura
Cipermetrina	3,6 $\pm$ 1,6 bB*	94,2 $\pm$ 2,4 aA	2,8 $\pm$ 1,8 aB*	81,6 $\pm$ 9,6 aA
Fosmete	8,6 $\pm$ 3,9 bB*	89,7 $\pm$ 4,7 aA	0,0 $\pm$ 0,0 aB*	86,6 $\pm$ 8,5 aA
Imidacloprido	7,0 $\pm$ 2,3 aB*	79,6 $\pm$ 7,4 aA*	4,5 $\pm$ 1,1 aB*	86,8 $\pm$ 9,9 aA
Espiroclorfenol	100,0 $\pm$ 0,0		98,3 $\pm$ 1,7	
C.V. (%)	19,9		29,9	

Médias seguidas por letras maiúsculas, diferentes nas linhas, e minúsculas nas colunas diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente da testemunha (espiroclorfenol), a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Na tabela, foram apresentados os dados reais de porcentagem de mortalidade, e para análise estatística, os dados foram transformados em arco-seno $\sqrt{x/100}$.

C.V. = Coeficiente de variação.

4.1.3. Toxicidade sobre ninfas de *Brevipalpus yothersi*

4.1.3.1. Protoninfas

Os resultados obtidos nos dois experimentos (A e B) com protoninfas foram semelhantes ($F = 3,84$; $g.l. = 6, 56$; $P = 0,0978$). Em ambos os experimentos, houve efeito significativo apenas para o fator calda (isolado e mistura) ($F = 596,17$; $g.l. = 6, 28$; $P < 0,0001$ e $F = 12917,72$; $g.l. = 6, 28$; $P < 0,0001$, para os experimentos A e

B, respectivamente). Para o fator inseticidas ($F = 2,22$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,1268$ e $F=0,60$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,5539$) e para a interação dos fatores ($F = 3,32$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,0510$ e $F = 0,60$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,5539$), não houve efeito significativo sobre a mortalidade de protoninfas, aos 6 DAA.

As porcentagens de mortalidade dos tratamentos com inseticidas combinado com o acaricida variaram entre 77,0 e 96,4%, não diferindo do acaricida isolado (Tabela 4). Inseticidas aplicados isolados não causaram mortalidade significativa para protoninfas (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagens de mortalidade (média $\pm$ erro padrão) de protoninfas de *Brevipalpus yothersi* expostas a espirodiclofeno e inseticidas isolados e em mistura, ao sexto dia após as aplicações.

Tratamentos	Experimento A		Experimento B	
	Isolado	Mistura	Isolado	Mistura
Cipermetrina	3,1 $\pm$ 2,1 aB*	96,4 $\pm$ 2,3 aA	3,8 $\pm$ 1,7 aB*	100,0 $\pm$ 0,0 aA
Fosmete	2,7 $\pm$ 1,9 aB*	85,8 $\pm$ 5,6 abA	3,7 $\pm$ 1,7 aB*	100,0 $\pm$ 0,0 aA
Imidacloprido	5,1 $\pm$ 3,5 aB*	77,0 $\pm$ 7,0 bA	1,8 $\pm$ 1,4 aB*	100,0 $\pm$ 0,0 aA
Espirodiclofeno	92,0 $\pm$ 3,9		100,0 $\pm$ 0,0	
C.V. (%)	17,9		4,6	

Médias seguidas por letras maiúsculas, diferentes nas linhas, e minúsculas nas colunas diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente da testemunha (espirodiclofeno), a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

C.V. = Coeficiente de variação.

4.1.3.2. Deutoniinfas

No experimento com deutoniinfas, não houve diferença entre os dois experimentos (A e B) ($F = 4,99$; $g.l. = 6, 56$; $P = 0,0669$). Houve efeito significativo para o fator calda ($F = 863,91$; $g.l. = 6, 28$; $P < 0,0001$ e $F = 156,96$; $g.l. = 6, 28$; $P < 0,0001$, para os experimentos A e B, respectivamente) e para a interação dos fatores ($F = 4,58$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,0189$ e $F = 4,44$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,0211$, para os experimentos A e B, respectivamente), em ambos os experimentos. Para o fator inseticidas ($F = 0,83$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,4454$ e $F = 1,56$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,2271$,

para os experimentos A e B, respectivamente), o efeito foi não significativo sobre a mortalidade de deutoninfas, aos 9 DAA.

As respostas das combinações de espirodiclofeno com fosmete ou imidacloprido foram semelhantes ao acaricida isolado, em ambos os experimentos. No entanto, no experimento B, a combinação de cipermetrina com espirodiclofeno resultou em redução (32,5%) na mortalidade causada por espirodiclofeno, enquanto no experimento A, não houve diferença (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagens de mortalidade (média $\pm$ erro padrão) de deutoninfas de *Brevipalpus yothersi* expostas a espirodiclofeno e de inseticidas isolados e em mistura, ao oitavo dia após as aplicações.

Tratamentos	Experimento A		Experimento B	
	Isolado	Mistura	Isolado	Mistura
Cipermetrina	9,3 $\pm$ 3,9 aB*	81,8 $\pm$ 5,4 bA	8,6 $\pm$ 4,0 aB*	60,5 $\pm$ 18,0 bA*
Fosmete	2,5 $\pm$ 1,9 aB*	95,4 $\pm$ 2,1 aA	0,0 $\pm$ 0,0 aB*	92,5 $\pm$ 4,8 aA
Imidacloprido	6,0 $\pm$ 3,2 aB*	93,7 $\pm$ 4,8 abA	1,3 $\pm$ 1,3 aB*	91,2 $\pm$ 5,8 aA
Espirodiclofeno	100,0 $\pm$ 0,0		93,0 $\pm$ 3,0	
C.V. (%)	14,16		34,44	

Médias seguidas por letras maiúsculas, diferentes nas linhas, e minúsculas nas colunas diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente da testemunha (espirodiclofeno), a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

C.V. = Coeficiente de variação.

4.1.4. Toxicidade sobre adultos de *Brevipalpus yothersi*

Os experimentos A e B apresentaram respostas semelhantes ($F = 0,85$; $g.l.=6, 56$; $P = 0,3910$). No experimento A, houve efeito significativo apenas para o fator calda (isolado e mistura) ($F = 48,61$; $g.l. = 6, 28$; $P < 0,0001$). Para o fator inseticidas ($F = 2,30$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,1192$) e para a interação dos fatores ($F = 1,03$; $g.l.= 6, 28$; $P = 0,3702$), o efeito não foi significativo sobre a mortalidade de adultos, aos 10 DAA. No experimento B, houve efeito significativo para o fator calda (isolado e mistura) ($F = 144,86$; $g.l. = 6, 28$; $P < 0,0001$), para o fator inseticidas ($F=13,52$; $g.l. = 6,28$; $P < 0,0001$) e para a interação dos fatores ($F = 5,00$; $g.l. = 6, 28$; $P = 0,0139$).

No experimento A, a combinação de imidacloprido com espiroclorfenol resultou em redução de 34,2% na mortalidade causada por espiroclorfenol quando comparado ao acaricida isolado, enquanto a mortalidade de adultos, nas combinações dos inseticidas cipermetrina e fosmete com o acaricida, não diferiu de espiroclorfenol (Tabela 6). Os inseticidas isolados causaram baixa mortalidade de adultos.

Tabela 6. Porcentagens de mortalidade (média $\pm$ erro-padrão) de adultos de *Brevipalpus yotheresi* expostos a espiroclorfenol e inseticidas isolados e em mistura, ao décimo dia após as aplicações.

Tratamentos	Experimento A		Experimento B	
	Isolado	Mistura	Isolado	Mistura
Cipermetrina	19,3 $\pm$ 8,8 aB*	77,6 $\pm$ 8,6 aA	20,9 $\pm$ 3,1 aB*	73,5 $\pm$ 7,6 aA*
Fosmete	32,0 $\pm$ 2,2 aB*	75,7 $\pm$ 4,6 aA	3,2 $\pm$ 2,0 bB*	40,2 $\pm$ 5,6 bA*
Imidacloprido	7,1 $\pm$ 2,3 aB*	59,9 $\pm$ 13,3 aA*	2,5 $\pm$ 1,5 bB*	80,3 $\pm$ 5,1 aA*
Espiroclorfenol	94,1 $\pm$ 3,7		97,9 $\pm$ 2,1	
C.V. (%)	30,9		23,1	

Médias seguidas por letras maiúsculas, diferentes nas linhas, e minúsculas nas colunas diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente da testemunha (espiroclorfenol), a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Na tabela, foram apresentados os dados reais de porcentagem de mortalidade, e para análise estatística, os dados foram transformados em arco-seno $\sqrt{x/100}$.

C.V. = Coeficiente de variação.

No experimento B, a mortalidade causada por espiroclorfenol foi significativamente menor nos tratamentos contendo as combinações entre acaricida e inseticidas. Reduções de 24,4; 57,7 e 17,6% foram observadas para as combinações de cipermetrina, fosmete e imidacloprido comparado ao espiroclorfenol, respectivamente (Tabela 6).

4.2. Efeito de diferentes concentrações de acaricida, inseticidas e de misturas sobre a fecundidade e a fertilidade de *Brevipalpus yotheresi*

Nos testes realizados em laboratório, cipermetrina não afetou a fecundidade de fêmeas de *B. yotheresi*, e a fertilidade dos ovos não diferiu do controle, exceto na

dose de 2,2 mg.L⁻¹ (Tabela 7) ($F = 0,98$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,4544$ e $F = 3,22$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,0126$). A exposição ao espiroclorfenol não interferiu na fecundidade de *B. yothersi* comparado ao controle ($F = 1,64$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,1665$), porém interferiu na fertilidade de ovos na dose de 3,5 mg.L⁻¹ ($F = 42394$; $g.l. = 6, 35$; $P < 0,0001$) (Tabela 7). As demais concentrações foram semelhantes ao controle. Ácaros expostos ao espiroclorfenol em mistura com cipermetrina não apresentaram alteração na fecundidade e na fertilidade dos ovos ($F = 0,94$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,4758$ e $F = 2,6$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,0365$, respectivamente) (Tabela 7).

Ácaros expostos a todas as doses de fosmeto colocaram menos ovos em comparação aos ácaros expostos apenas ao controle com água deionizada, exceto nas doses de 250,0 mg.L⁻¹ e 31,2 mg.L⁻¹, as quais foram semelhantes ao controle ($F = 6,91$; $g.l. = 6, 35$; $P < 0,0001$) (Tabela 8). No entanto, a fertilidade dos ovos não foi alterada ($F = 1,05$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,4084$). A fecundidade e a fertilidade de ovos de *B. yothersi* expostos à combinação de espiroclorfenol com fosmeto não diferiram do controle ($F = 3,74$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,0056$ e $F = 2,10$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,0755$, respectivamente) (Tabela 8).

Imidacloprido, em todas as concentrações testadas, não afetou a oviposição das fêmeas, bem como não reduziu a fertilidade dos ovos ($F = 2,15$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,0717$ e $F = 0,88$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,5210$, respectivamente) (Tabela 9). Resposta semelhante a essa foi observada para ácaros expostos ao espiroclorfenol misturado ao imidacloprido ($F = 1,84$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,1193$ para fecundidade e $F = 0,41$; $g.l. = 6, 35$; $P = 0,8670$ para fertilidade).

Tabela 7. Efeito da exposição de cipermetrina, espirodiclofeno e de espirodiclofeno + cipermetrina sobre a fecundidade e a fertilidade (média $\pm$ erro-padrão) de fêmeas de *Brevipalpus yotheresi*.

Dose (mg.L ⁻¹)	Cipermetrina		Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno		Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno + cipermetrina	
	Fecundidade ¹	Fertilidade (%)		Fecundidade	Fertilidade (%)		Fecundidade	Fertilidade (%)
70,0	0,7 $\pm$ 0,1 a	97,0 $\pm$ 1,1 a	3,5	0,8 $\pm$ 0,1 a	9,2 $\pm$ 0,6 b	3,5 + 70,0	0,4 $\pm$ 0,1 a	97,9 $\pm$ 1,0 a
35,0	0,6 $\pm$ 0,1 a	97,5 $\pm$ 1,2 a	1,7	0,8 $\pm$ 0,1 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	1,7 + 35,0	0,5 $\pm$ 0,0 a	98,7 $\pm$ 0,8 a
17,5	0,6 $\pm$ 0,0 a	98,7 $\pm$ 0,6 a	0,9	0,9 $\pm$ 0,1 a	99,8 $\pm$ 0,2 a	0,9 + 17,5	0,5 $\pm$ 0,0 a	99,2 $\pm$ 0,5 a
8,7	0,6 $\pm$ 0,0 a	96,6 $\pm$ 1,8 ab	0,4	0,7 $\pm$ 0,1 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,4 + 8,7	0,4 $\pm$ 0,1 a	98,7 $\pm$ 0,6 a
4,4	0,7 $\pm$ 0,1 a	96,8 $\pm$ 1,8 ab	0,2	0,9 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,2 + 4,4	0,4 $\pm$ 0,1 a	95,5 $\pm$ 2,0 a
2,2	0,6 $\pm$ 0,1 a	86,0 $\pm$ 6,0 b	0,1	0,8 $\pm$ 0,0 a	99,8 $\pm$ 0,2 a	0,1 + 2,2	0,5 $\pm$ 0,0 a	95,8 $\pm$ 1,1 a
0,0	0,7 $\pm$ 0,1 a	97,2 $\pm$ 1,2 a	0,0	0,8 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,0	0,5 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a
C.V.	40,4	14,5		176,1	0,49		27,7	2,67

¹Número de ovos por fêmea por dia.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente (Tukey, $P < 0,05$).

C.V. = Coeficiente de variação.

Tabela 8. Efeito da exposição de fosmete, espirodiclofeno e de espirodiclofeno + fosmete sobre a fecundidade e a fertilidade (média $\pm$ erro-padrão) de fêmeas de *Brevipalpus yothersi*.

Dose (mg.L ⁻¹)	Fosmete		Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno		Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno + fosmete	
	Fecundidade ¹	Fertilidade (%)		Fecundidade	Fertilidade (%)		Fecundidade	Fertilidade (%)
500,0	0,6 $\pm$ 0,1 b	99,8 $\pm$ 0,2 a	3,5	0,8 $\pm$ 0,1 a	9,2 $\pm$ 0,6 b	3,5 + 500,0	0,5 $\pm$ 0,1 b	98,7 $\pm$ 0,9 a
250,0	1,0 $\pm$ 0,1 a	99,7 $\pm$ 0,2 a	1,7	0,8 $\pm$ 0,1 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	1,7 + 250,0	0,7 $\pm$ 0,1 ab	100,0 $\pm$ 0,0 a
125,0	0,6 $\pm$ 0,0 b	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,9	0,9 $\pm$ 0,1 a	99,8 $\pm$ 0,2 a	0,9 + 125,0	0,6 $\pm$ 0,1 ab	100,0 $\pm$ 0,0 a
62,5	0,6 $\pm$ 0,0 b	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,4	0,7 $\pm$ 0,1 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,4 + 62,5	0,9 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a
31,2	0,8 $\pm$ 0,1 ab	99,4 $\pm$ 0,3 a	0,2	0,9 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,2 + 31,2	0,6 $\pm$ 0,0 ab	100,0 $\pm$ 0,0 a
15,6	0,6 $\pm$ 0,0 b	99,7 $\pm$ 0,2 a	0,1	0,8 $\pm$ 0,0 a	99,8 $\pm$ 0,2 a	0,1 + 15,6	0,8 $\pm$ 0,1 a	100,0 $\pm$ 0,0 a
0,0	0,9 $\pm$ 0,1 a	99,7 $\pm$ 0,2 a	0,0	0,8 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,0	0,6 $\pm$ 0,0 ab	100,0 $\pm$ 0,0 a
C.V.	187,3	1,44		176,1	0,49		48,8	2,3

¹Número de ovos por fêmea por dia.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente (Tukey, $P < 0,05$).

C.V. = Coeficiente de variação.

Tabela 9. Efeito da exposição de imidacloprido, espirodiclofeno e de espirodiclofeno + imidacloprido sobre a fecundidade e a fertilidade (média $\pm$ erro-padrão) de fêmeas de *Brevipalpus yothersi*.

Dose (mg.L ⁻¹)	Imidacloprido		Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno		Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno + imidacloprido	
	Fecundidade ¹	Fertilidade (%)		Fecundidade	Fertilidade (%)		Fecundidade	Fertilidade (%)
80,0	0,8 $\pm$ 0,1 ab	99,4 $\pm$ 0,4 a	3,5	0,8 $\pm$ 0,1 a	9,2 $\pm$ 0,6 b	3,5 + 80,0	0,5 $\pm$ 0,0 a	98,7 $\pm$ 0,9 a
40,0	0,5 $\pm$ 0,1 b	93,3 $\pm$ 4,5 a	1,7	0,8 $\pm$ 0,1 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	1,7 + 40,0	0,5 $\pm$ 0,1 a	99,4 $\pm$ 0,5 a
20,0	0,9 $\pm$ 0,1 a	87,6 $\pm$ 11,4 a	0,9	0,9 $\pm$ 0,1 a	99,8 $\pm$ 0,2 a	0,9 + 20,0	0,5 $\pm$ 0,0 a	98,1 $\pm$ 1,5 a
10,0	0,8 $\pm$ 0,0 ab	97,9 $\pm$ 0,3 a	0,4	0,7 $\pm$ 0,1 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,4 + 10,0	0,6 $\pm$ 0,0 a	99,6 $\pm$ 0,4 a
5,0	0,8 $\pm$ 0,1 ab	99,7 $\pm$ 0,3 a	0,2	0,9 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,2 + 5,0	0,7 $\pm$ 0,1 a	98,9 $\pm$ 0,6 a
2,5	0,8 $\pm$ 0,1 ab	98,5 $\pm$ 0,5 a	0,1	0,8 $\pm$ 0,0 a	99,8 $\pm$ 0,2 a	0,1 + 2,5	0,7 $\pm$ 0,1 a	99,0 $\pm$ 0,4 a
0,0	0,8 $\pm$ 0,1 ab	99,4 $\pm$ 0,3 a	0,0	0,8 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	0,0	0,6 $\pm$ 0,0 a	99,4 $\pm$ 0,4 a
C.V.	92,9	19,2		176,1	0,49		52,4	5,5

¹Número de ovos por fêmea por dia.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente (Tukey, $P < 0,05$).

C.V. = Coeficiente de variação.

Em casa de vegetação, houve diferença significativa entre as doses de espirodiclofeno ($F = 3,7571$; $g.l. = 2, 90$; $P = 0,0039$), entre cipermetrina, espirodiclofeno e a mistura desses produtos ($F = 22,366$; $g.l. = 2, 90$; $P < 0,0001$) (Tabela 10). Porém, não houve interação entre os fatores ($F = 1,5914$; $g.l. = 2, 90$; $P = 0,1219$) (Tabela 10). Na maioria das doses, *seedlings* pulverizadas com espirodiclofeno misturado a cipermetrina apresentaram maior número de ácaros do que espirodiclofeno e cipermetrina isolados. Apenas espirodiclofeno nas doses de $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentaram menor número de ácaros do que o controle (Tabela 10).

Tabela 10. Número de ácaros (média $\pm$ erro-padrão) em *seedlings* de laranjeira-doce 'Valência', 28 dias após a pulverização de cipermetrina, espirodiclofeno, espirodiclofeno + cipermetrina.

Dose (mg.L ⁻¹)	Cipermetrina	Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno	Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno + cipermetrina
70,0	53,3 $\pm$ 9,3 aAB	3,5	31,2 $\pm$ 5,4 abB	3,5 + 70,0	118,0 $\pm$ 41,8 aA
35,0	32,7 $\pm$ 9,3 aA	1,7	44,5 $\pm$ 8,6 abA	1,7 + 35,0	58,2 $\pm$ 10,0 aA
17,5	27,5 $\pm$ 4,7 aB	0,9	21,5 $\pm$ 5,3 bB*	0,9 + 17,5	88,8 $\pm$ 20,5 aA
8,7	18,7 $\pm$ 3,9 aB	0,4	30,2 $\pm$ 10,6 bAB*	0,4 + 8,7	60,7 $\pm$ 17,1 aA
4,4	33,2 $\pm$ 5,0 aB	0,2	91,0 $\pm$ 25,6 aAB	0,2 + 4,4	92,8 $\pm$ 13,8 aA
2,2	33,0 $\pm$ 7,2 aAB	0,1	14,3 $\pm$ 2,5 bB*	0,1 + 2,2	77,7 $\pm$ 17,8 aA
0,0			73,2 $\pm$ 5,5		
C.V.			20,2		

Médias seguidas por letras maiúsculas, diferentes nas linhas, e minúsculas nas colunas diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente do controle (água), a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

C.V. = Coeficiente de variação.

Para o inseticida fosmete, houve diferença significativa para os fatores doses ($F = 5,4980$; $g.l. = 2, 90$; $P = 0,0002$), produtos ($F = 16,866$; $g.l. = 2, 90$; $P < 0,0001$) e para a interação entre os fatores ($F = 2,9299$; $g.l. = 2, 90$; $P = 0,0032$) (Tabela 11). Todas as doses de fosmete proporcionaram menor número de ácaros do que o controle, exceto $500,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $15,6 \text{ mg.L}^{-1}$, que foram semelhantes. Espirodiclofeno nas doses de $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentaram menor número de ácaros do que o controle, enquanto espirodiclofeno misturado a fosmete, na dose $0,2 + 31,2 \text{ mg.L}^{-1}$, apresentou maior número de ácaros do que o controle e as demais doses (Tabela 11).

Tabela 11. Número de ácaros (média $\pm$ erro-padrão) em *seedlings* de laranjeira-doce 'Valência', 28 dias após a pulverização de fosmete, espirodiclofeno, espirodiclofeno + fosmete.

Dose (mg.L ⁻¹)	Fosmete	Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno	Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno + fosmete
500,0	35,7 $\pm$ 9,7 aA	3,5	31,2 $\pm$ 54 abcA	3,5 + 500,0	59,0 $\pm$ 5,4 abA
250,0	21,7 $\pm$ 6,7 aA*	1,7	44,5 $\pm$ 8,6 abA	1,7 + 250,0	43,0 $\pm$ 2,1 bA
125,0	16,2 $\pm$ 3,4 aB*	0,9	21,5 $\pm$ 5,3 bcAB*	0,9 + 125,0	50,2 $\pm$ 14,7 bA
62,5	32,5 $\pm$ 4,9 aA	0,4	30,2 $\pm$ 10,6 bcA*	0,4 + 62,5	48,2 $\pm$ 11,3 bA
31,2	24,7 $\pm$ 4,9 aB*	0,2	91,0 $\pm$ 25,6 aA	0,2 + 31,2	119,5 $\pm$ 16,6 aA*
15,6	41,2 $\pm$ 5,4 aA	0,1	14,3 $\pm$ 2,5 cB*	0,1 + 15,6	43,7 $\pm$ 11,3 bA
0,0			73,2 $\pm$ 5,5		
C.V.			25,2		

Médias seguidas por letras maiúsculas, diferentes nas linhas, e minúsculas nas colunas diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente do controle (água), a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

C.V. = Coeficiente de variação.

Para imidacloprido, houve diferença significativa para o fator produtos ($F=23,991$; $P < 0,0001$), e para a interação dos fatores ($F = 3,8209$; $g.l. = 2, 90$; $P = 0,0003$), enquanto para o fator doses não houve diferença ($F = 0,5972$; $g.l.=2, 90$; $P = 0,7021$) (Tabela 12). Imidacloprido nas doses de 40,0 mg.L⁻¹ e 5,0 mg.L⁻¹, e espirodiclofeno, nas doses de 0,9 mg.L⁻¹, 0,4 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹, apresentaram menor número de ácaros do que o controle, enquanto as demais doses foram semelhantes ao controle (Tabela 12).

Tabela 12. Número de ácaros (média $\pm$ erro-padrão) em *seedlings* de laranja-doce 'Valência', 28 dias após a pulverização de imidacloprido, espirodiclofeno, espirodiclofeno + imidacloprido.

Dose (mg.L ⁻¹)	Imidacloprido	Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno	Dose (mg.L ⁻¹)	Espirodiclofeno + imidacloprido
80,0	38,3 $\pm$ 7,4 aA	3,5	31,2 $\pm$ 54 abA	3,5 + 80,0	61,3 $\pm$ 8,6 aA
40,0	19,0 $\pm$ 6,2 aB*	1,7	44,5 $\pm$ 8,6 abAB	1,7 + 40,0	75,7 $\pm$ 16,5 aA
20,0	53,7 $\pm$ 12,9 aAB	0,9	21,5 $\pm$ 5,3 bB*	0,9 + 20,0	88,8 $\pm$ 15,4 aA
10,0	45,2 $\pm$ 15,2 aAB	0,4	30,2 $\pm$ 10,6 bB*	0,4 + 10,0	73,0 $\pm$ 2,8 aA
5,0	21,2 $\pm$ 7,0 aB*	0,2	91,0 $\pm$ 25,6 aA	0,2 + 5,0	49,0 $\pm$ 10,7 aAB
2,5	23,3 $\pm$ 9,7 aB*	0,1	14,3 $\pm$ 2,5 bB*	0,1 + 2,5	102,5 $\pm$ 20,4 aA
0,0			73,2 $\pm$ 5,5		
C.V.			27,7		

Médias seguidas por letras maiúsculas, diferentes nas linhas, e minúsculas nas colunas diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente do controle (água), a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

C.V. = Coeficiente de variação.

A estimativa da taxa instantânea de crescimento populacional foi positiva em todos os tratamentos (produtos e doses), exceto espirodiclofeno na menor dose, o qual foi negativa, indicando redução na população de *B. yothersi* (Figura 8).

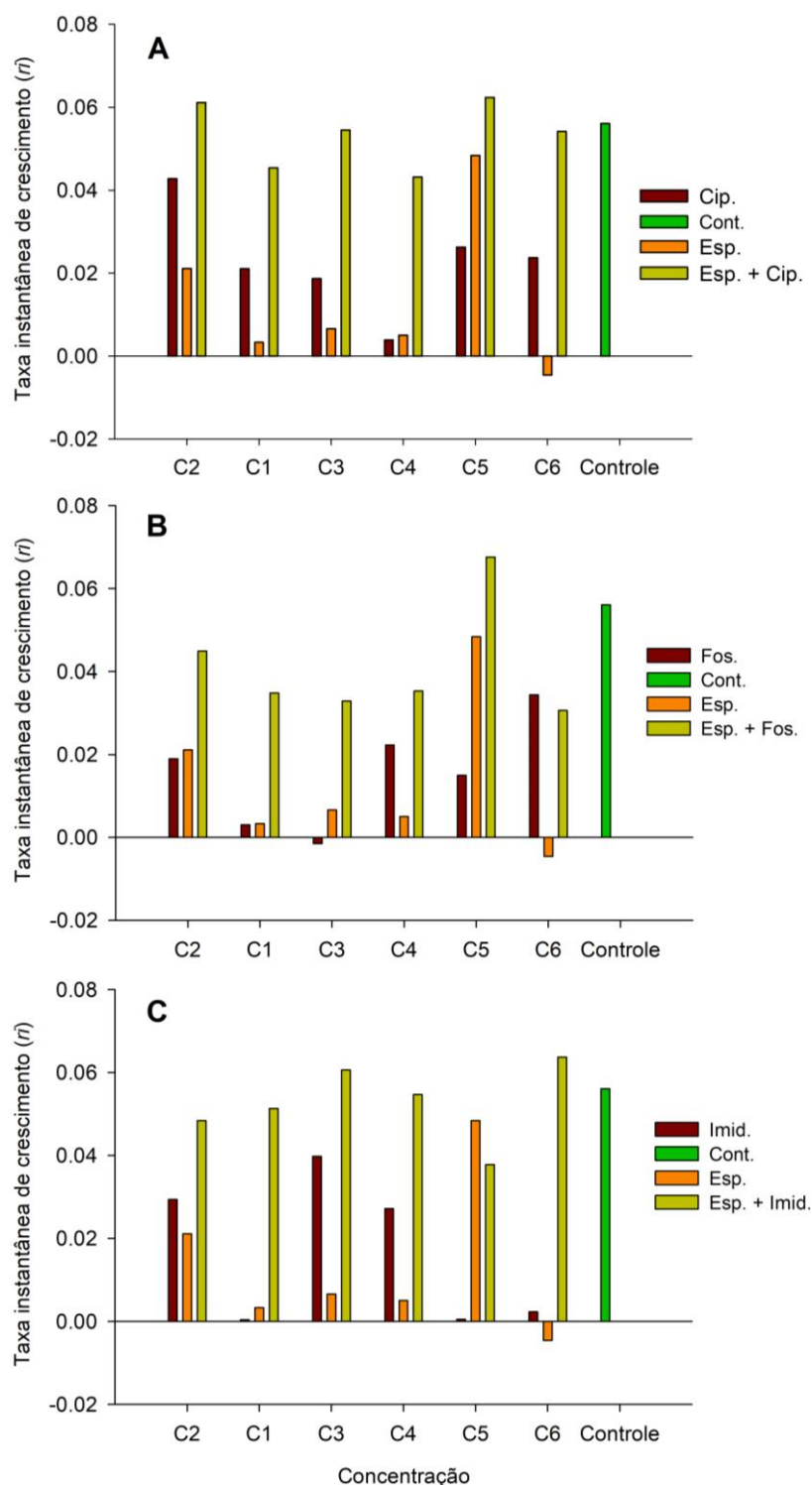


Figura 8. Estimativa da taxa instantânea de crescimento populacional de *Brevipalpus yothersi* em seedlings de laranja-doce 'Valência', 28 dias após a pulverização de espirodiclofeno (Esp.) isoladamente ou em mistura com cipermetrina (Cip.) (A), fosmete (Fos.) (B) e imidacloprido (Imid.) (C). C1 - dose comercial; C2 = C1 vezes 2; C3 = C1/2; C4 = C1/4; C5 = C1/8; C6 = C1/16. Para espirodiclofeno, C1 = dose comercial/32; C2 = C1/16; C3 = C1/64; C4 = C1/128; C5 = C1/256; C6 = C1/512

4.3. Efeito de produtos isolados e em mistura sobre os parâmetros biológicos e demográficos de *Brevipalpus yothersi*

Para verificar o efeito de espirodiclofeno isolado e combinado aos inseticidas sobre os parâmetros biológicos de *B. yothersi*, foi necessário obter uma concentração baixa (CL_{25}) de espirodiclofeno. Diante disso, os resultados de mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda de espirodiclofeno forneceram uma curva de concentração-mortalidade exibindo baixo valor de χ^2 (162,14) e alto valor de P (0,1434), indicando sua adequação para o modelo Probit. A concentração letal, que causou 25% de mortalidade da população, foi de 6,78 mg.L⁻¹.

Ovos provenientes de ácaros que tiveram contato com espirodiclofeno e com os inseticidas isolados e em mistura apresentaram menor tempo de incubação do que os ovos do controle (Tabela 13). O tempo de incubação de ovos no tratamento com espirodiclofeno não diferiu de fosmete. Cipermetrina e imidacloprido proporcionaram maior período de incubação do que espirodiclofeno. Todas as combinações do acaricida com os inseticidas proporcionaram maior período de incubação do que espirodiclofeno isolado. Quando comparado o período de incubação de ovos nos tratamentos contendo as misturas e os inseticidas isolados, observaram-se respostas diferentes, nos quais foram dependentes do tipo de mistura e do inseticida. Por exemplo, o período de incubação de ovos no tratamento espirodiclofeno em mistura com cipermetrina foi menor do que no tratamento cipermetrina; no tratamento espirodiclofeno em mistura com fosmete, foi maior do que no tratamento fosmete; e no tratamento espirodiclofeno em mistura com imidacloprido, foi similar a imidacloprido.

A duração do período larval foi menor do que o controle em todos os tratamentos, exceto cipermetrina, imidacloprido, espirodiclofeno em mistura com imidacloprido (Tabela 13). As combinações dos inseticidas ao acaricida não diferiram dos inseticidas isolados. Cipermetrina, imidacloprido e espirodiclofeno, em mistura com imidacloprido, proporcionaram maior duração do período larval do que espirodiclofeno. A duração do período de protoninfas foi menor do que o controle em todos os tratamentos (Tabela 13). Não houve diferença entre os

inseticidas, bem como entre as misturas e os inseticidas isolados. Ácaros expostos a qualquer um dos tratamentos proporcionaram maior duração da fase de protoninfas do que espirodiclofeno, exceto fosmete. Para o período de deutoninfas, apenas os tratamentos espirodiclofeno, fosmete e espirodiclofeno, em mistura com fosmete, foram maiores do que o controle (Tabela 13). Todas as misturas proporcionaram menor período de deutoninfas do que os inseticidas e acaricida isolados. A duração total do estágio pré-adulto foi menor em ácaros expostos a todos os tratamentos, comparada ao controle (Tabela 13). Espirodiclofeno, em mistura com cipermetrina e imidacloprido não diferiram de espirodiclofeno isolado; no entanto, ácaros expostos ao espirodiclofeno misturado a cipermetrina apresentaram menor período pré-adulto do que espirodiclofeno.

Tabela 13. Duração (dias) (média $\pm$ erro-padrão) de *Brevipalpus yothersi* exposto ao acaricida e aos inseticidas isolados e combinados. Temperatura de 25 ± 1 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 L: 12 E horas.

Tratamento	Parâmetro				
	Ovo	Larva	Protoninfa	Deutoninfa	Pré-adulto
Controle	11,3 $\pm$ 0,5 a	5,6 $\pm$ 0,3 a	5,2 $\pm$ 0,2 a	5,8 $\pm$ 0,2 cd	27,5 $\pm$ 0,6 a
Espirodiclofeno	7,9 $\pm$ 0,2 d	4,0 $\pm$ 0,0 c	3,8 $\pm$ 0,2 d	6,1 $\pm$ 0,3 bc	22,1 $\pm$ 0,5 c
Cipermetrina	9,1 $\pm$ 0,1 b	4,8 $\pm$ 0,2 ab	4,7 $\pm$ 0,2 bc	7,1 $\pm$ 0,4 ab	25,8 $\pm$ 0,3 b
Espirodiclofeno + cipermetrina	8,6 $\pm$ 0,2 c	4,4 $\pm$ 0,2 bc	4,3 $\pm$ 0,2 c	3,8 $\pm$ 0,2 e	20,4 $\pm$ 0,6 d
Fosmete	7,2 $\pm$ 0,2 d	4,1 $\pm$ 0,1 c	4,2 $\pm$ 0,2 cd	6,2 $\pm$ 0,2 c	21,8 $\pm$ 0,4 cd
Espirodiclofeno + fosmete	8,8 $\pm$ 0,1 bc	4,5 $\pm$ 0,2 bc	4,4 $\pm$ 0,3 bc	5,1 $\pm$ 0,4 d	22,5 $\pm$ 0,6 c
Imidacloprido	9,0 $\pm$ 0,2 b	5,2 $\pm$ 0,2 a	4,7 $\pm$ 0,2 bc	6,8 $\pm$ 0,2 b	25,8 $\pm$ 0,4 b
Espirodiclofeno + imidacloprido	9,1 $\pm$ 0,1 b	5,4 $\pm$ 0,2 a	4,7 $\pm$ 0,1 b	3,5 $\pm$ 0,3 e	22,8 $\pm$ 0,4 c

Todos os parâmetros referem-se às fêmeas ($n_i = 30$). Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de *bootstrap* pareado ($P > 0,05$).

A duração do período de pré-oviposição não diferiu entre os tratamentos (Tabela 14). O período de pré-oviposição total do controle, de cipermetrina e de imidacloprido foi maior do que nos demais tratamentos (Tabela 14). Todos os tratamentos que continham espirodiclofeno foram semelhantes, bem como todas as misturas não diferiram dos inseticidas isolados, exceto para espirodiclofeno em mistura com cipermetrina, que foi menor do que cipermetrina. A longevidade dos adultos, no tratamento-controle, não diferiu dos demais tratamentos, exceto nos tratamentos espirodiclofeno em mistura com fosmete e imidacloprido, os quais foram menores que o controle (Tabela 14). Com relação à longevidade total, todos os tratamentos foram menores do que o controle (Tabela 14). A resposta observada para os dias de oviposição (O_d) e de fecundidade total foi semelhante. Para esses parâmetros, os tratamentos espirodiclofeno, cipermetrina, espirodiclofeno, em mistura com cipermetrina e fosmete, não diferiram do controle. As combinações de espirodiclofeno com fosmete e espirodiclofeno com imidacloprido proporcionaram menor fecundidade total e dias de oviposição.

A curva de sobrevivência específica por idade-estágio (S_{xj}) demonstrou que a probabilidade de um ovo recém-ovipositado nos tratamentos sobreviveu até à idade x e estágio j . Foram constatadas sobreposições entre os estágios de desenvolvimento dos ácaros devido às variações nas taxas de desenvolvimento dos indivíduos (Figura 9). A taxa de sobrevivência específica na idade-estágio de fêmeas foi afetada nos ácaros dos tratamentos espirodiclofeno, cipermetrina e cipermetrina + espirodiclofeno, em comparação com o controle. A probabilidade de um ovo recém-ovipositado passar para o estágio de larva foi semelhante entre os tratamentos, exceto para ácaros expostos a cipermetrina, a qual foi menor do que nos demais tratamentos. Ácaros expostos ao espirodiclofeno, espirodiclofeno em mistura com cipermetrina, e espirodiclofeno, em mistura com fosmete, apresentaram a menor probabilidade de passar para a fase de protoninfa e para as demais fases. Todos os tratamentos reduziram o tempo de sobrevivência dos ácaros comparados ao controle.

Tabela 14. Parâmetros de tabela de vida (média $\pm$ erro-padrão), períodos de pré-oviposição (APOP), pré-oviposição total (TPOP), longevidade, dias de oviposição (Od) e fecundidade de *Brevipalpus yothersi* expostos ao acaricida e aos inseticidas isolados e combinados. Temperatura de 25 ± 1 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 L:12 E horas.

Tratamento	Parâmetros					
	APOP	TPOP	Longevidade	Longevidade total	Dias de oviposição (Od)	Fecundidade total (ovos/fêmea)
Controle	4,1 $\pm$ 0,4 a	31,6 $\pm$ 0,8 a	42,8 $\pm$ 3,4 a	60,6 $\pm$ 5,2 a	26,0 $\pm$ 2,7 a	30,2 $\pm$ 3,6 a
Espirodiclofeno	4,2 $\pm$ 1,9 a	26,4 $\pm$ 1,1 bc	41,0 $\pm$ 5,3 a	28,5 $\pm$ 4,6 c	19,4 $\pm$ 3,7 ab	22,6 $\pm$ 4,4 ab
Cipermetrina	5,9 $\pm$ 1,8 a	31,7 $\pm$ 1,7 a	36,1 $\pm$ 2,5 a	28,4 $\pm$ 3,9 c	17,1 $\pm$ 3,9 abc	19,0 $\pm$ 4,8 abc
Espirodiclofeno + cipermetrina	3,1 $\pm$ 0,3 a	23,5 $\pm$ 0,8 c	33,7 $\pm$ 4,5 a	30,0 $\pm$ 3,6 c	19,8 $\pm$ 3,5 ab	24,0 $\pm$ 4,9 ab
Fosmete	4,6 $\pm$ 0,3 a	26,4 $\pm$ 0,5 bc	35,7 $\pm$ 1,9 a	44,6 $\pm$ 4,6 b	20,1 $\pm$ 1,6 ab	24,1 $\pm$ 2,3 ab
Espirodiclofeno + fosmete	3,9 $\pm$ 0,7 a	26,2 $\pm$ 1,0 bc	19,4 $\pm$ 3,8 b	25,9 $\pm$ 2,8 c	10,2 $\pm$ 2,2 c	11,1 $\pm$ 2,6 c
Imidacloprido	3,7 $\pm$ 0,4 a	29,4 $\pm$ 0,6 ab	36,1 $\pm$ 2,5 a	42,5 $\pm$ 4,7 b	18,4 $\pm$ 1,3 b	18,7 $\pm$ 1,8 b
Espirodiclofeno + imidacloprido	3,8 $\pm$ 0,4 a	26,6 $\pm$ 0,7 bc	22,2 $\pm$ 2,6 b	29,4 $\pm$ 3,0 c	10,8 $\pm$ 1,8 c	12,5 $\pm$ 2,5 c

Os erros-padrão (EP) foram estimados usando 100.000 *bootstraps* e comparados pelo teste de *bootstrap* pareado com nível de significância de 5%. Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem.

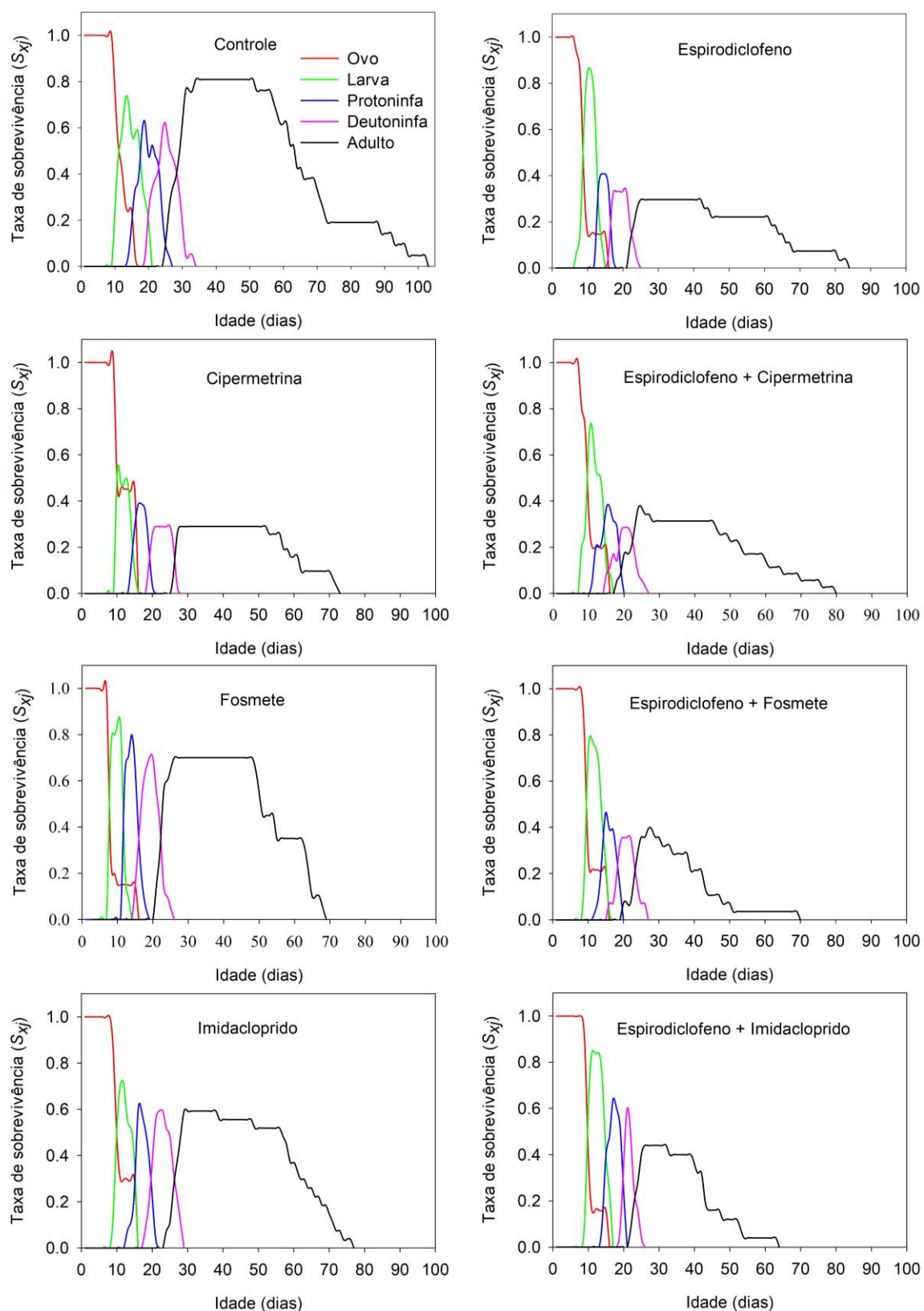


Figura 9. Taxa de sobrevivência específica por estágio-idade (S_{xj}) de ácaros *Brevipalpus yothersi* expostos ao acaricida e aos inseticidas isolados e combinados.

A taxa de sobrevivência específica por idade (l_x) evidencia a probabilidade de um ácaro sobreviver até à idade x considerando todos os estágios de desenvolvimento juntos (Figura 10). A curva de l_x demonstrou que 38,0% dos indivíduos do tratamento-controle morreram antes de 60 dias. Para o espiroclorfenol, esse valor foi de 77,8%, para cipermetrina 84,0%, para espiroclorfenol em mistura com cipermetrina 85,7%, para fosmeto 70%, para espiroclorfenol em mistura com fosmeto 96,4%, para imidacloprido 66,8%, para espiroclorfenol em mistura com imidacloprido 96,0% (Figura 10). Portanto, todos os tratamentos que continham inseticidas e acaricidas, isolados ou combinados, reduziram a taxa de sobrevivência dos ácaros comparado ao controle. Com relação à fecundidade específica por idade (m_x), os maiores picos de oviposição de fêmeas ocorreram no 74º e 80º dia no tratamento-controle, no 42º dia para espiroclorfenol, no 66º e 68º dia para cipermetrina, no 29º, 30º e 33º dia para espiroclorfenol em mistura com cipermetrina, no 60º dia para fosmeto, no 31º dia para espiroclorfenol em mistura com fosmeto, no 39º dia para imidacloprido e no 31º dia para espiroclorfenol em mistura com imidacloprido (Figura 10).

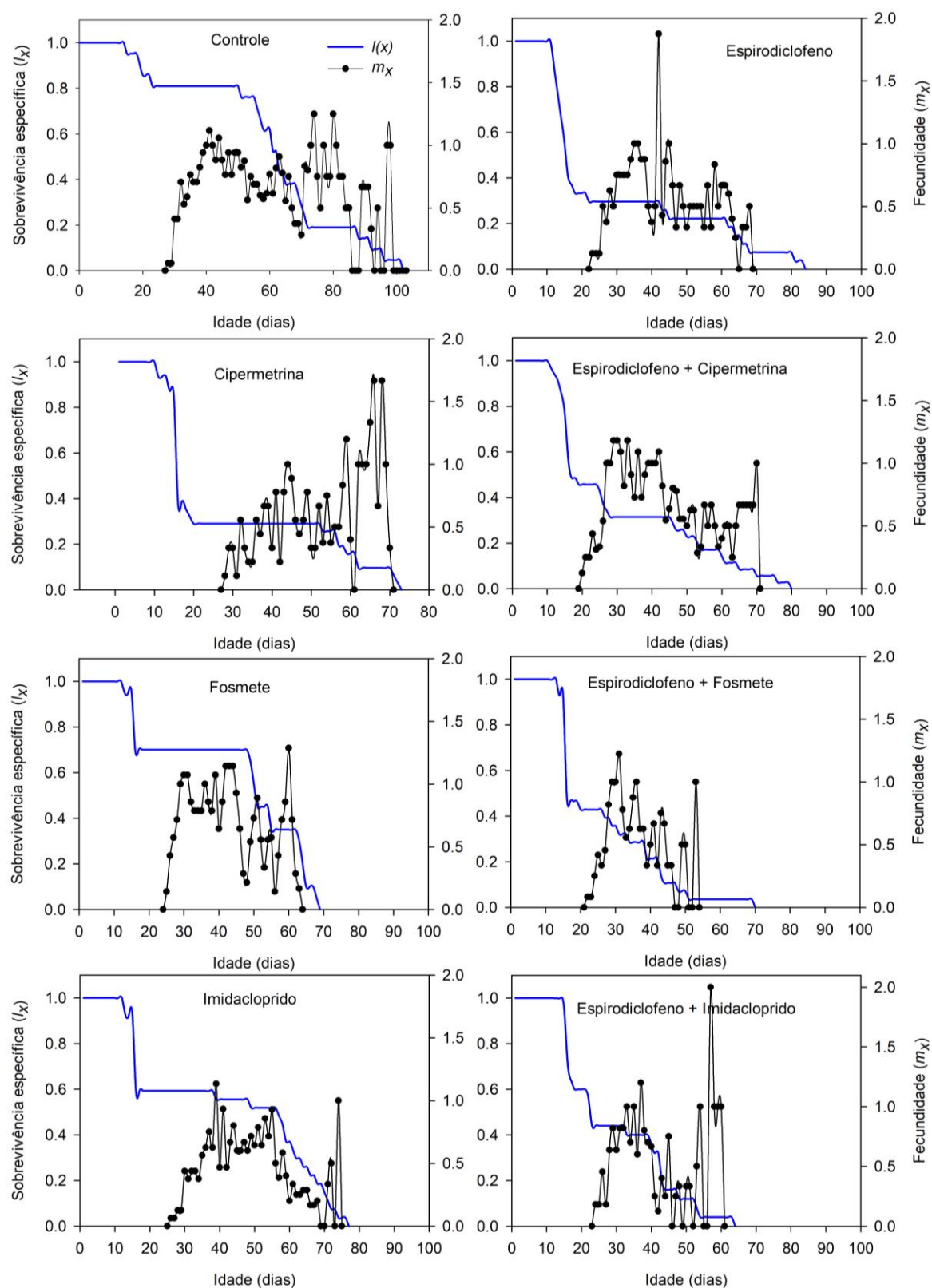


Figura 10. Taxa de sobrevivência específica por idade (l_x) e fecundidade específica por idade (m_x) de *Brevipalpus yothersi* expostos ao acaricida e aos inseticidas isolados e combinados.

Os dados de expectativa de vida por idade-estágio específica indicaram que o tempo de vida esperado para um ácaro recém-eclodido (e_1) foi menor em todos os tratamentos, comparado ao controle (Figura 11). Embora a expectativa de vida tenha sido menor nos ácaros expostos aos tratamentos contendo inseticidas e acaricida (isolados ou em mistura), essa taxa aumentou com o aumento de idade dos indivíduos, nos tratamentos espirodiclofeno, cipermetrina e espirodiclofeno, em mistura com cipermetrina ou imidacloprido. No tratamento espirodiclofeno em mistura com imidacloprido, a expectativa de vida diminuiu com o aumento da idade dos indivíduos. Nos demais tratamentos, a expectativa de vida foi semelhante entre os estágios.

O valor reprodutivo V_{xj} é a contribuição dos indivíduos de idade x e estágio j para a linhagem futura (Figura 12). Esse valor aumentou com as mudanças de estágios de desenvolvimento. A fase adulta foi a que mais contribuiu para o aumento populacional, em todos os tratamentos. O maior pico do valor reprodutivo foi observado aos 36 dias (10,8) para o controle, 28 dias (11,5) para espirodiclofeno, 35 dias (10,8) para cipermetrina, 28 dias (12,5) para espirodiclofeno em mistura com cipermetrina, 28 dias (10,3) para fosmete, 23 dias (7,4) para espirodiclofeno em mistura com fosmete, 35 dias (8,9) para imidacloprido e 28 dias (8,0) para espirodiclofeno em mistura com imidacloprido.

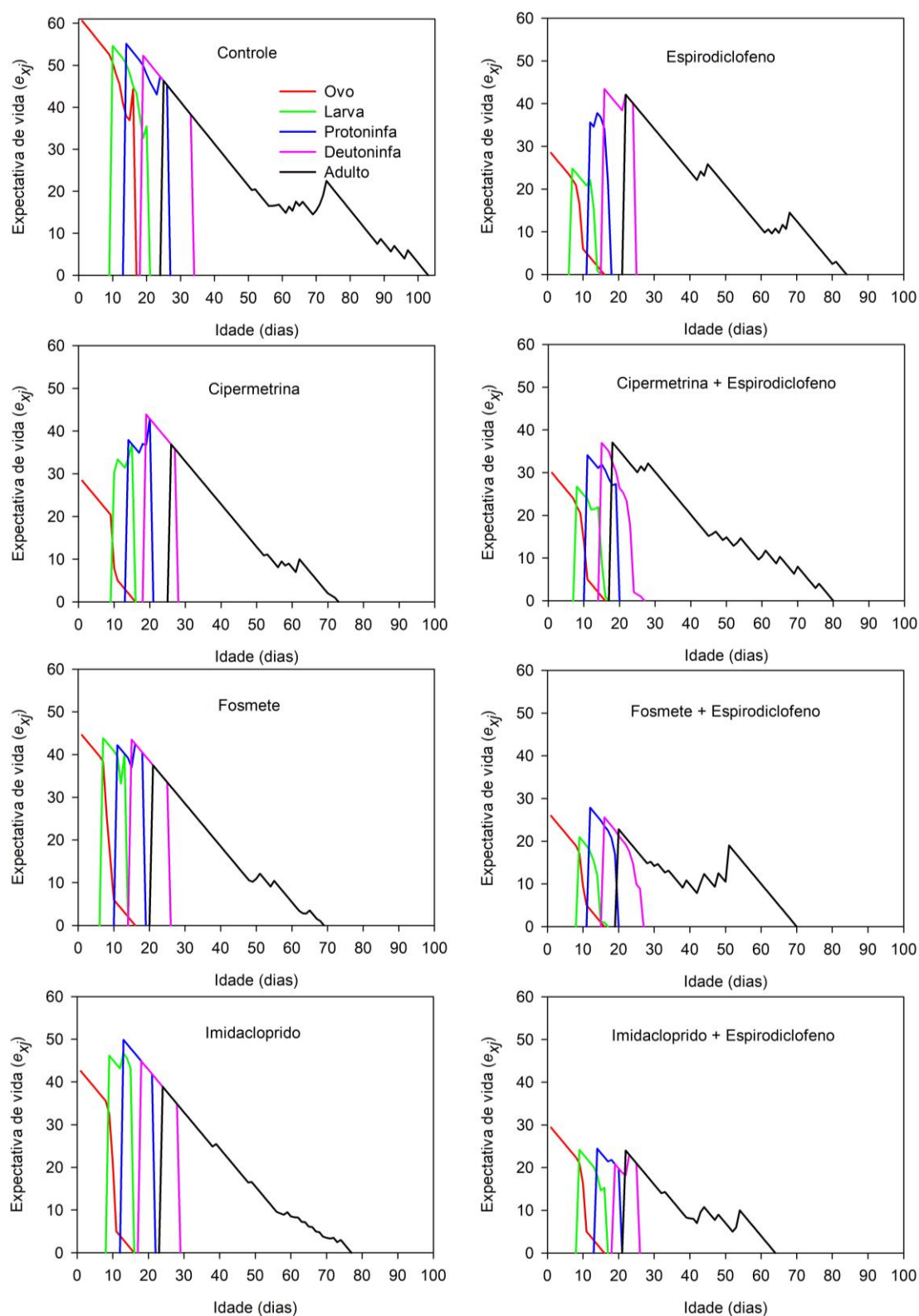


Figura 11. Expectativa de vida específica por idade-estágio (e_{xj}) de *Brevipalpus yothersi* expostos ao acaricida e aos inseticidas isolados e combinados.

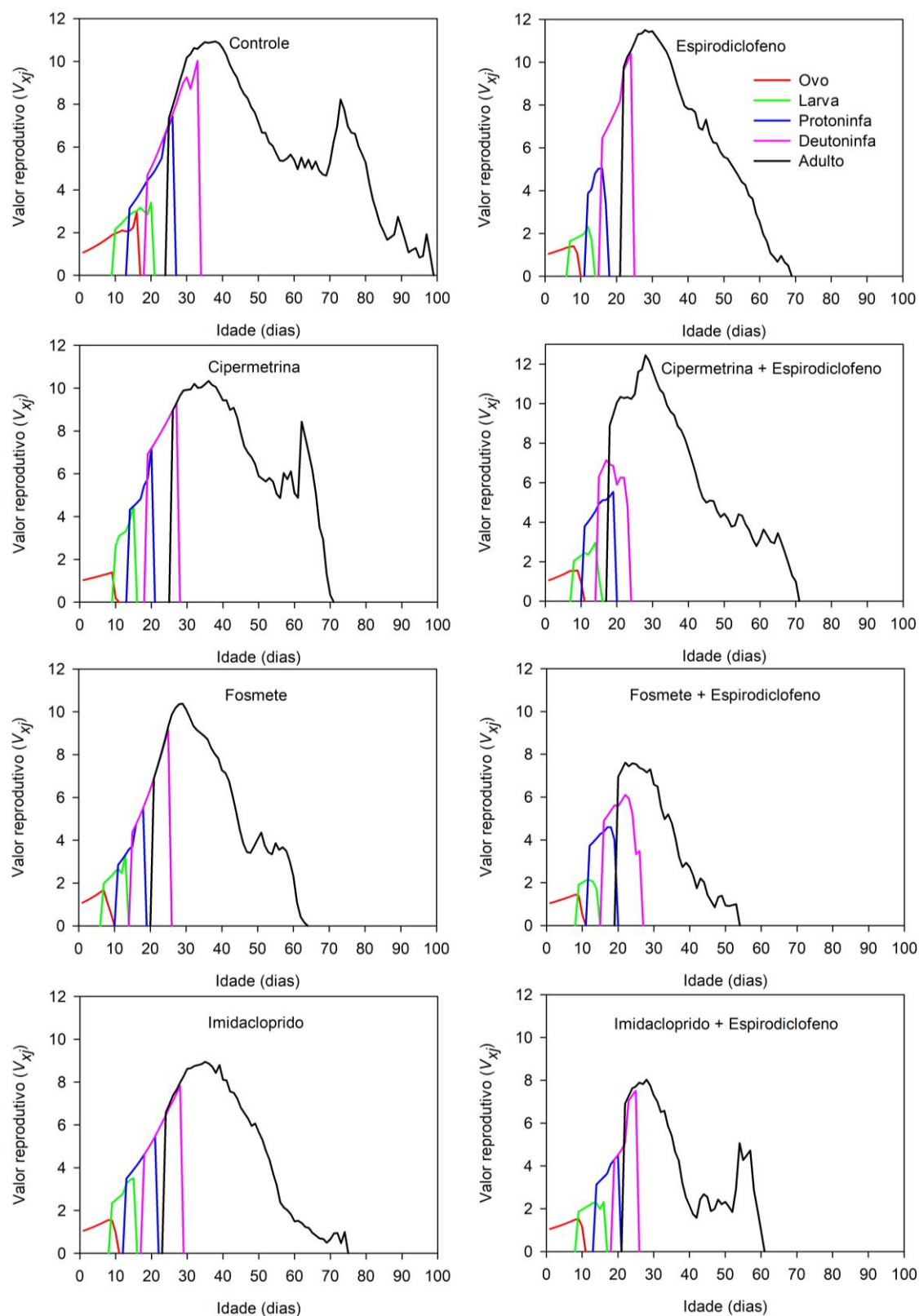


Figura 12. Valor reprodutivo por estágio-idade (V_{xj}) de *Brevipalpus yothersi* expostos ao acaricida e aos inseticidas isolados e combinados.

A estimativa dos parâmetros de Tabela de vida de fertilidade demonstrou que a taxa intrínseca de aumento populacional (rm) e a razão finita de aumento (λ) seguiram o mesmo padrão de resposta, nos quais a média desses parâmetros foi menor em todos os tratamentos, comparados ao controle, exceto cipermetrina + espirodiclofeno e fosmete, que foram semelhantes ao controle (Tabela 15). Os demais tratamentos não diferiram entre si. Para a taxa líquida de reprodução (R_0), a resposta de todos os tratamentos, exceto fosmete, foi menor do que no controle. O tempo médio entre gerações (T) foi maior para os ácaros expostos ao controle, cipermetrina e imidacloprido. Nos demais tratamentos, o T foi menor, sendo que, nos ácaros expostos às misturas, o tempo foi menor do que os expostos ao espirodiclofeno isolado.

Tabela 15. Parâmetros demográficos (média $\pm$ erro-padrão) de *Brevipalpus yothersi* expostos ao acaricida e aos inseticidas isolados e combinados.

Tratamento	Parâmetros demográficos			
	rm (d ⁻¹)	λ (d ⁻¹)	R_0	T (dias)
Controle	0,07 $\pm$ 0,00 a	1,07 $\pm$ 0,00 a	24,48 $\pm$ 3,86 a	45,67 $\pm$ 1,60 a
Espirodiclofeno	0,05 $\pm$ 0,01 bc	1,05 $\pm$ 0,01 bc	6,70 $\pm$ 2,33 cd	39,73 $\pm$ 1,44 b
Cipermetrina	0,04 $\pm$ 0,01 c	1,04 $\pm$ 0,01 c	5,52 $\pm$ 2,04 cd	46,41 $\pm$ 1,50 a
Espirodiclofeno + cipermetrina	0,06 $\pm$ 0,01 ab	1,06 $\pm$ 0,01 abc	8,91 $\pm$ 2,63 cd	35,69 $\pm$ 1,27 cd
Fosmete	0,07 $\pm$ 0,01 a	1,08 $\pm$ 0,01 a	16,85 $\pm$ 2,94 ab	37,70 $\pm$ 0,75 bc
Espirodiclofeno + fosmete	0,04 $\pm$ 0,01 bc	1,05 $\pm$ 0,01 bc	4,36 $\pm$ 1,43 d	32,32 $\pm$ 1,40 d
Imidacloprido	0,05 $\pm$ 0,01 b	1,06 $\pm$ 0,005 bc	11,11 $\pm$ 2,08 bc	43,03 $\pm$ 0,92 a
Espirodiclofeno + imidacloprido	0,05 $\pm$ 0,01 bc	1,05 $\pm$ 0,01 bc	5,52 $\pm$ 1,64 d	34,33 $\pm$ 1,19 d

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, são significativamente diferentes (teste de *bootstrap* pareado: $P < 0,05$). Os valores para cada parâmetro foram calculados usando o procedimento de *bootstrap* com 100.000 amostras.

rm = Taxa intrínseca de aumento populacional (dia⁻¹); λ = razão finita de aumento (dia⁻¹); R_0 = taxa líquida de reprodução (descendentes por indivíduo); T = tempo médio entre geração (dia⁻¹).

4.4. Efeito de misturas de inseticidas sobre a eficiência de espirodiclofeno no controle de *Brevipalpus yothersi* em condições de campo

No primeiro experimento (A) realizado em pomar comercial de lima-ácida 'Tahiti', não houve diferença significativa entre as plantas, na avaliação realizada antes da aplicação dos tratamentos (prévia) ($F = 0,48$; $g.l. = 7, 32$; $P = 0,8412$),

demonstrando que as plantas utilizadas como unidade experimental apresentavam nível de infestação homogêneo do ácaro da leprose (Tabela 16). No entanto, após a aplicação dos tratamentos, foi verificada interação significativa entre o tratamento e o tempo de avaliação (dias após a aplicação), indicando redução no número de ácaros após a aplicação dos tratamentos ($\chi^2=262,67$; g.l. = 7; $P < 0,0001$). A estimativa da taxa instantânea de crescimento populacional (r_i) indicou redução pronunciada (valores de $r_i < 0$) nos níveis populacionais do ácaro, ao longo do tempo, para todos os tratamentos, exceto para os tratamentos-controle, fosmete e imidacloprido (Figura 13A).

No primeiro experimento, aos 7 DAA, não houve redução significativa no número de ácaros por fruto em comparação ao controle. Foi possível observar redução significativa no número de ácaros por fruto, a partir de 14 DAA. Aos 14 DAA, espirodiclofeno, em mistura com imidacloprido, apresentou maior número de ácaros comparado ao acaricida isolado. Nessa mesma avaliação, apenas os tratamentos espirodiclofeno isolado e espirodiclofeno em mistura com cipermetrina diferiram do controle, apresentando redução significativa no número de ácaros, enquanto as combinações de espirodiclofeno com cipermetrina e espirodiclofeno com fosmete não diferiram do acaricida isolado. Aos 21 DAA, apenas espirodiclofeno e a mistura de espirodiclofeno com imidacloprido diferiram do controle, apresentando menores números de ácaros por fruto. As misturas não diferiram do acaricida isolado aos 21; 35 e 42 DAA (Tabela 16).

Tabela 16. Número médio de ácaros *Brevipalpus yotheresi* por fruto de lima-ácida 'Tahiti', no primeiro experimento, registrados na avaliação prévia (P) e aos 7; 14; 21; 35 e 42 dias após as pulverizações do acaricida espiroclorfenol (Esp.), isoladamente ou em mistura com cipermetrina (Cip.), fosmete (Fos.) e imidacloprido (Imid.).

Tratamento	Ácaros por fruto/Dias após a aplicação (DAA)					
	P	7	14	21	35	42
Controle	1,3 ± 0,3 a ¹	1,8 ± 1,2 ab	2,7 ± 0,3 a	2,2 ± 0,4 a	2,3 ± 0,4 a	2,3 ± 0,9 a
Esp.	1,8 ± 0,4 a	0,4 ± 0,3 ab	0,1 ± 0,1 c	0,3 ± 0,1 bc	0,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 b
Cip.	1,7 ± 0,4 a	0,9 ± 0,2 a	1,7 ± 0,7 ab	1,5 ± 0,6 ab	0,8 ± 0,2 b	1,7 ± 0,4 a
Esp. + Cip.	2,4 ± 0,8 a	0,6 ± 0,2 ab	0,7 ± 0,3 bc	0,6 ± 0,2 abc	0,1 ± 0,1 c	0,0 ± 0,0 b
Fos.	2,1 ± 0,6 a	0,6 ± 0,2 ab	2,9 ± 1,0 a	1,6 ± 0,4 ab	0,8 ± 0,1 ab	2,5 ± 0,4 a
Esp. + Fos.	1,8 ± 0,4 a	0,7 ± 0,1 ab	0,8 ± 0,2 abc	1,1 ± 0,5 ab	0,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 b
Imid.	1,6 ± 0,5 a	1,7 ± 0,4 a	1,7 ± 0,4 ab	2,5 ± 0,5 a	1,8 ± 0,3 ab	2,4 ± 0,7 a
Esp. + Imid.	1,9 ± 0,9 a	0,1 ± 0,1 b	1,0 ± 0,2 ab	0,1 ± 0,1 c	0,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 b
F	0,48	3,56	7,03	8,34	66,73	1119410
Valor de P	0,8412	0,0060	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Valores (média ± EP) seguidos pela mesma letra nas colunas, para uma mesma data de avaliação, não diferem significativamente (GLM com distribuição quase-Poisson, seguido por *post hoc* do teste de Tukey, $P < 0,05$).

No segundo experimento (B), não houve diferença significativa entre as plantas na avaliação prévia ($F = 1,22$; $g.l. = 7, 32$; $P = 0,3205$) (Tabela 17). Após a pulverização dos tratamentos, foi verificada interação significativa entre o tratamento e o tempo de avaliação (dias após a aplicação), indicando uma redução no número de ácaros após as aplicações ($\chi^2 = 296,29$; $g.l. = 7$; $P < 0,0001$). A estimativa da taxa instantânea de crescimento populacional (ri) indicou pronunciada redução (valores de $ri < 0$) nos níveis populacionais do ácaro, ao longo do tempo, para todos os tratamentos, exceto para o controle, cipermetrina, fosmete e imidacloprido (Figura 13B). Foi verificada redução significativa no número de ácaros a partir de 21 DAA, para o tratamento espirodiclofeno, comparado ao controle (Tabela 17).

Aos 21 DAA, espirodiclofeno, em mistura com imidacloprido, diferiu do acaricida isolado, apresentando maior número de ácaros. As demais misturas foram semelhantes ao acaricida isolado. Aos 35 DAA, nos tratamentos com as misturas de espirodiclofeno com cipermetrina e de espirodiclofeno com imidacloprido, o número de ácaros foi maior do que no tratamento com espirodiclofeno isolado. Aos 48 DAA, o número de ácaros por fruto, no tratamento espirodiclofeno em mistura com cipermetrina, foi semelhante ao espirodiclofeno, assim como fosmete + espirodiclofeno. Enquanto espirodiclofeno, em mistura com imidacloprido, permaneceu com maior número de ácaros do que espirodiclofeno. Aos 62 DAA, todos os tratamentos contendo espirodiclofeno apresentaram máxima redução no número de ácaros por fruto (Tabela 17).

Tabela 17. Número médio de ácaros *Brevipalpus yothersi* em frutos de lima-ácida 'Tahiti', no segundo experimento, registrados na avaliação prévia (P) e aos 7; 21; 35; 48 e 62 dias após a aplicação do acaricida espirodiclofeno (Esp.), isoladamente ou em mistura com cipermetrina (Cip.), fosmete (Fos.) e imidacloprido (Imid.).

Tratamento	Ácaros por fruto/Dias após a aplicação (DAA)					
	P	7	21	35	48	62
Controle	1,7 ± 0,6 a ¹	1,1 ± 0,4 a	2,4 ± 0,3 a	2,7 ± 0,1 a	3,5 ± 0,9 a	4,5 ± 0,8 a
Esp.	0,7 ± 0,4 a	0,2 ± 0,1 a	0,4 ± 0,1 b	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 b
Cip.	1,7 ± 0,4 a	1,7 ± 0,7 a	4,1 ± 1,3 a	2,6 ± 0,4 a	2,5 ± 0,7 a	3,6 ± 1,1 a
Esp. + Cip.	2,4 ± 0,7 a	1,2 ± 0,4 a	0,7 ± 0,3 ab	0,9 ± 0,3 abc	0,4 ± 0,3 cd	0,0 ± 0,0 b
Fos.	2,1 ± 0,6 a	1,3 ± 0,3 a	3,9 ± 2,4 a	1,9 ± 0,4 ab	1,7 ± 0,4 ab	3,2 ± 0,6 a
Esp. + Fos.	1,8 ± 0,4 a	0,7 ± 0,3 a	0,9 ± 0,3 ab	0,3 ± 0,2 cd	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 b
Imid.	1,6 ± 0,5 a	0,8 ± 0,2 a	2,7 ± 0,8 a	2,4 ± 0,9 ab	2,1 ± 0,4 ab	3,3 ± 0,8 a
Esp. + Imid.	1,9 ± 0,9 a	0,7 ± 0,3 a	4,1 ± 1,5 a	0,7 ± 0,2 bc	0,6 ± 0,3 bc	0,1 ± 0,1 b
F	1,22	1,58	4,97	13,82	20,42	30,27
Valor de P	0,3205	0,1762	0,0007	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Valores (média ± EP) seguidos pela mesma letra nas colunas, para uma mesma data de avaliação, não diferem significativamente (GLM com distribuição quase-Poisson, seguido por *post hoc* do teste de Tukey, $P < 0,05$).

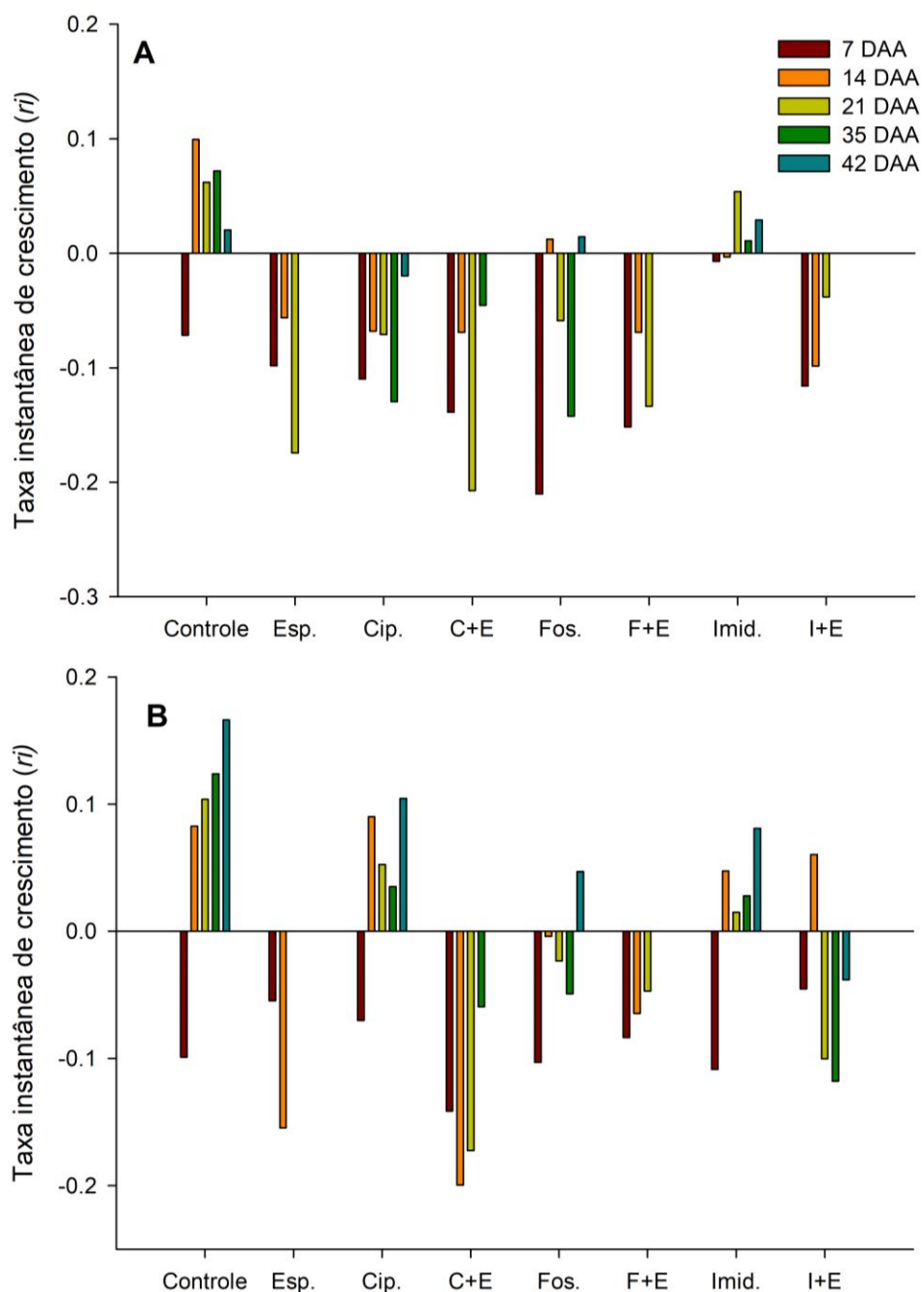


Figura 13. Estimativa da taxa instantânea de crescimento populacional de *Brevipalpus yothersi* em dois experimentos (A e B) realizados em pomar de lima-ácida 'Tahiti' expostos ao acaricida espiroclorfenol (Esp.), isoladamente ou em mistura com cipermetrina (Cip.), fosmete (Fos.) e imidacloprido (Imid.).

Com base na eficiência de controle de *B. yothersi*, os resultados indicaram que a aplicação de espiroclorfenol, combinado aos inseticidas cipermetrina, fosmete e imidacloprido não diferiram do acaricida isolado em nenhum dos experimentos (Figuras 14A e B) ($P > 0,05$).

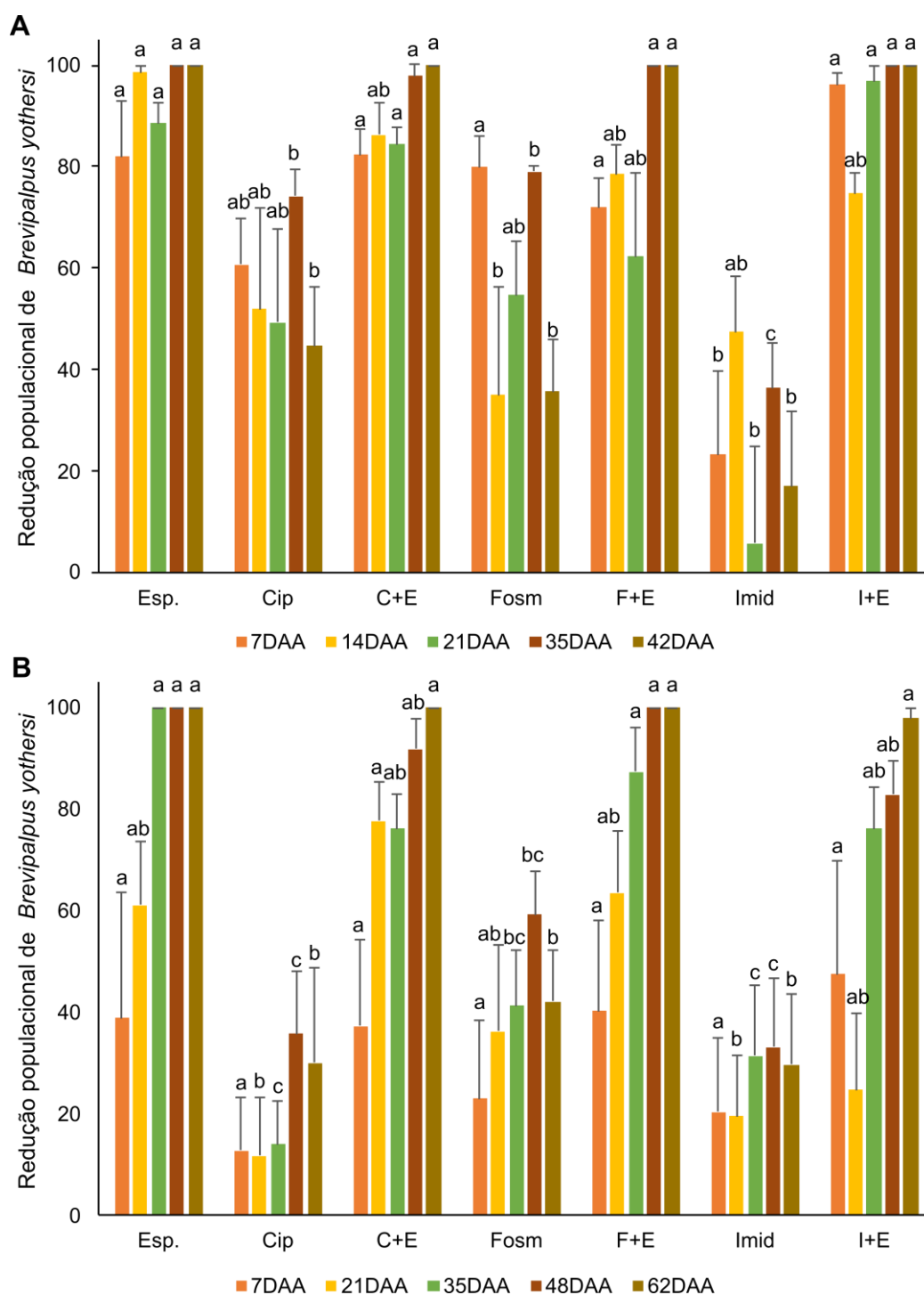


Figura 14. Eficiência de espirodiclofeno (Esp.), cipermetrina (Cip.), fosmete (Fos.) e imidacloprido (Imid.), isoladamente ou em mistura no controle de *Brevipalpus yothersi*, em dois experimentos (A e B) realizados em pomar de lima-ácida 'Tahiti', em diferentes dias após as aplicações (DAA). Barras verticais nas colunas indicam o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, para a mesma data de avaliação, não diferem significativamente (GLM com distribuição Gaussiana, seguido por *post hoc* do teste de Tukey, $P < 0,05$).

O período de reinfestação de ácaros *B. yothersi* foi estimado com base na frequência de frutos com, pelo menos, uma fase móvel do ácaro. Os resultados indicaram que a adição dos inseticidas cipermetrina, fosmete e imidacloprido ao acaricida espirodiclofeno proporcionou menores períodos para o restabelecimento populacional do ácaro nas plantas ($F = 4,50$; $g.l. = 3, 16$; $P = 0,0179$ e $F = 4,04$; $g.l. = 3, 16$; $P = 0,0257$, nas áreas A e B, respectivamente). Verificou-se que houve redução no período para reinfestação dos ácaros nos tratamentos, em mistura de 42 a 62 dias e de 25 a 42 dias, no primeiro e no segundo experimento, respectivamente (Figuras 15 A e B).

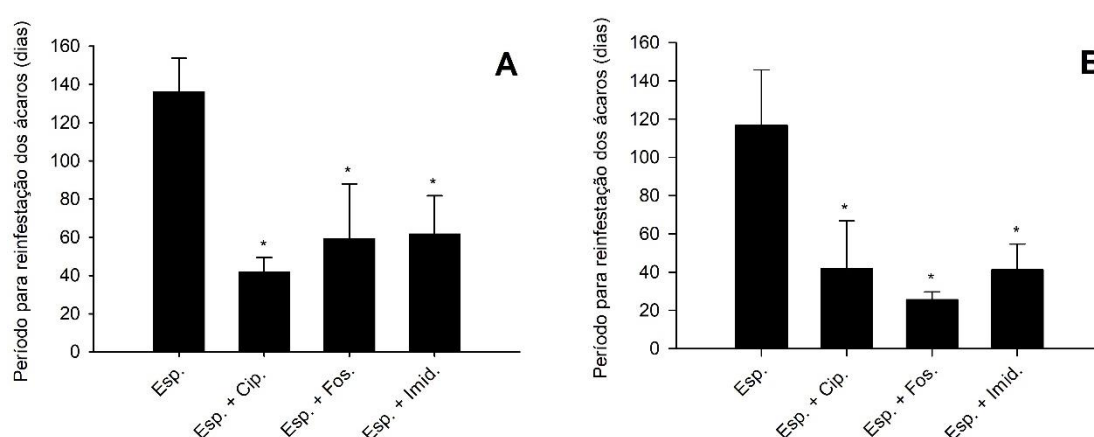


Figura 15. Estimativa do período de reinfestação de *Brevipalpus yothersi* em plantas de lima-ácidia 'Tahiti' de dois pomares (A e B), após a aplicação de espirodiclofeno (Esp.), cipermetrina (Cip.), fosmete (Fos.) e imidacloprido (Imid.), isoladamente ou em mistura. Barras verticais nas colunas indicam o erro-padrão da média. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente de espirodiclofeno, a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

4.5. Teor de espirodiclofeno em caldas do acaricida isolado ou combinado aos inseticidas

O teor de espirodiclofeno não diferiu entre as caldas avaliadas ($F = 0,15$; $g.l. = 3, 8$; $P = 0,9282$). A calda contendo apenas o acaricida apresentou teor de $59,7 \text{ mg L}^{-1}$ de espirodiclofeno. O teor de espirodiclofeno nas caldas às quais foram adicionados os inseticidas cipermetrina, fosmete e imidacloprido ao espirodiclofeno, foi de $56,0 \text{ mg L}^{-1}$, $53,6 \text{ mg L}^{-1}$ e $58,7 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

4.6. Atividade de enzimas de detoxificação em *Brevipalpus yotheresi* expostos ao espirodiclofeno e aos inseticidas isolados e em mistura

A atividade de esterases em ácaros *B. yotheresi* diferiu entre os tratamentos ($F = 6,31$; $g.l. = 7, 16$; $P = 0,0011$). Em relação aos ácaros expostos à água, a atividade de esterases foi superior em ácaros expostos ao espirodiclofeno, cipermetrina, espirodiclofeno em mistura com fosmete ou imidacloprido, quando comparado ao controle (Tabela 18). Aumentos de 1,8 vez, 1,4 vez, 1,7 vez e 1,6 vez foram observados para cada um desses tratamentos, respectivamente. De uma maneira geral, a presença de espirodiclofeno nas caldas inseticidas induziu a atividade de esterases nos ácaros (Tabela 18).

Tabela 18. Atividade de enzimas de detoxificação em *Brevipalpus yotheresi* expostos ao espirodiclofeno, cipermetrina, fosmete e imidacloprido, isoladamente ou em mistura. No controle utilizou-se de água deionizada.

Tratamento	Grupo de enzima de detoxificação		
	Esterases ¹	Glutathiona-S-transferases ²	Mono-oxigenases ³
Água (Controle)	4,6 ± 0,2 d	0,6 ± 0,03 a	4,2 ± 0,4 bc
Espirodiclofeno	8,4 ± 0,7 a	0,1 ± 0,01 c	4,9 ± 0,2 bc
Cipermetrina	6,5 ± 0,1 bc	0,5 ± 0,01 a	5,5 ± 0,3 b
Espirodiclofeno + cipermetrina	4,9 ± 1,4 cd	0,3 ± 0,01 b	3,8 ± 0,3c
Fosmete	6,3 ± 0,4 bcd	0,3 ± 0,02 b	4,7 ± 0,2 bc
Espirodiclofeno + fosmete	7,8 ± 0,4 ab	0,3 ± 0,01 b	3,4 ± 0,2 c
Imidacloprido	4,4 ± 0,1 d	0,1 ± 0,03 c	7,6 ± 0,4 a
Espirodiclofeno + imidacloprido	7,7 ± 0,6 ab	0,1 ± 0,02 c	4,2 ± 0,5 bc

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente umas das outras, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

¹nmol 4-nitrophenol min⁻¹ por ácaro (±erro-padrão (EP)).

²nmol glutathiona conjugada min⁻¹ por ácaro (±EP).

³conteúdo de grupo heme por ng de ácaro (±EP).

A atividade de conjugação de glutathiona e CDNB por GSTs em ácaros *B. yotheresi* diferiu entre os tratamentos ($F = 69,77$; $g.l. = 7, 40$; $P < 0,0001$). Ácaros expostos a cipermetrina e água (controle) apresentaram atividade de GSTs superiores às atividades dos demais tratamentos (Tabela 18). Valores intermediários de atividade de GSTs foram observados nos ácaros expostos ao

espiroclorfenol em mistura com cipermetrina, fosmeto e espiroclorfenol em mistura com fosmeto. Os menores valores de atividade de GSTs foram observados em ácaros expostos a espiroclorfenol, imidacloprido e espiroclorfenol em mistura com imidacloprido.

Ao utilizar o método indireto baseado na detecção de grupos heme nas amostras para correlação com o conteúdo de mono-oxigenases, observou-se que a concentração de mono-oxigenases aumentou 1,8 vez nos ácaros expostos a imidacloprido em relação aos demais tratamentos ($F = 14,20$; $g.l. = 7, 16$; $P < 0,0001$). Porém, quando em mistura com espiroclorfenol, a exposição a imidacloprido não implicou no aumento da concentração de mono-oxigenases nos ácaros (Tabela 18).

A concentração e atividade das enzimas de detoxificação nos ácaros expostos a espiroclorfenol, cipermetrina, fosmeto e imidacloprido variou ao longo do tempo e entre os tratamentos. De uma maneira geral, a atividade de esterases foi influenciada pelo fator tratamento (controle, acaricida e inseticidas) ($F = 30,41$; $g.l. = 4, 40$; $P < 0,0001$) e para o fator tempo de exposição ($F = 5,31$; $g.l. = 3, 40$; $P = 0,0035$). Os fatores tratamento e tempo de exposição foram dependentes, visto que a interação entre esses fatores foi significativa ($F = 4,60$; $g.l. = 12, 40$; $P = 0,0001$).

Para cipermetrina, a atividade de esterases aumentou com o aumento do tempo de exposição e reduziu às 48 horas (Figura 16). Ácaros expostos ao fosmeto apresentaram alta atividade de esterases às 6 e 12 horas de exposição. Após esse período, houve redução na atividade. Imidacloprido induziu a atividade de esterases a partir de 12 horas de exposição e permaneceu até às 48 horas. A atividade de esterases em ácaros expostos ao espiroclorfenol foi alta em todos os tempos de exposição avaliados. Comparando a atividade de esterases de ácaros expostos aos inseticidas e acaricida com o controle, às 6 horas de exposição, apenas cipermetrina e espiroclorfenol foram maiores do que o controle, 1,41 e 1,82 vez, respectivamente (Figura 16). Às 12 horas, todos os tratamentos foram maiores do que o controle, variando de 1,47 a 1,85 vez. Às 24 horas, esse aumento variou de 1,54 a 1,71 vez, exceto para fosmeto, que não diferiu do controle. E às 48 horas, apenas imidacloprido e espiroclorfenol

apresentaram atividade de esterases maior do que o controle, 1,37 e 1,60 vez, respectivamente.

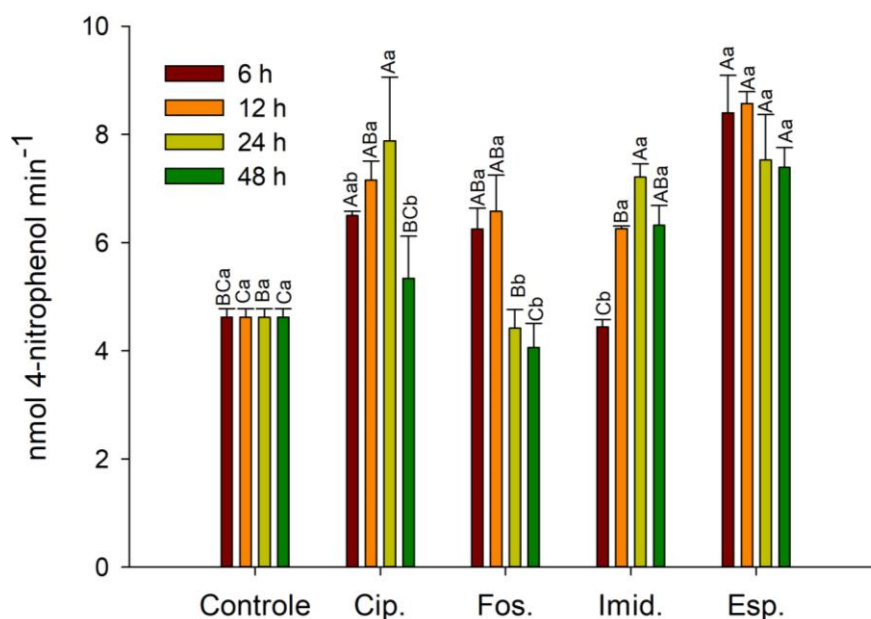


Figura 16. Atividade de esterases em *Brevipalpus yothersi* após 6; 12; 24 e 48 horas de exposição ao espirodiclofeno e aos inseticidas cipermetrina (Cip.), fosmete (Fos.) e imidacloprido (Imid.). Água foi utilizada como controle. Barras verticais nas colunas indicam o erro-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para os diferentes tratamentos, na mesma data, e letra minúscula para cada tratamento, em datas diferentes de avaliação, não diferem significativamente de acordo com Teste de Tukey ($P > 0,05$).

Para atividade de GSTs, houve efeito significativo para o fator tratamento (controle, inseticidas e acaricida) ($F = 66,37$; $g.l. = 4, 100$; $P < 0,0001$), para o fator tempo de exposição ($F = 280,95$; $g.l. = 3, 100$; $P < 0,0001$) e para a interação entre os fatores tratamento e tempo de exposição ($F = 37,41$; $g.l. = 12, 100$; $P < 0,0001$). A exposição à cipermetrina induziu a atividade de GSTs às 12 e 48 horas de exposição, sendo observado o maior pico de atividade às 48 horas (Figura 17). O mesmo perfil foi observado para fosmete e imidacloprido, nos quais o maior pico foi às 48 horas. Ácaros expostos ao espirodiclofeno apresentaram aumento na atividade de GSTs de 6 horas para 12 horas, sendo o maior pico observado às 12 horas; posteriormente, a atividade diminuiu às 24 horas e aumentou novamente às 48 horas. Comparando a atividade de GST de ácaros expostos aos inseticidas e acaricida com o controle, às 6 horas apenas

cipermetrina não diferiu do controle, enquanto os demais tratamentos foram menores (Figura 17). Às 12 horas, todos os tratamentos foram semelhantes ao controle, exceto cipermetrina, que foi 1,33 vez maior do que o controle. Às 24 horas, apenas fosmete não diferiu do controle, enquanto os demais apresentaram menor atividade. E, às 48 horas, ácaros expostos à cipermetrina, fosmete e imidacloprido foram de 1,34 a 1,78 vez maiores do que o controle.

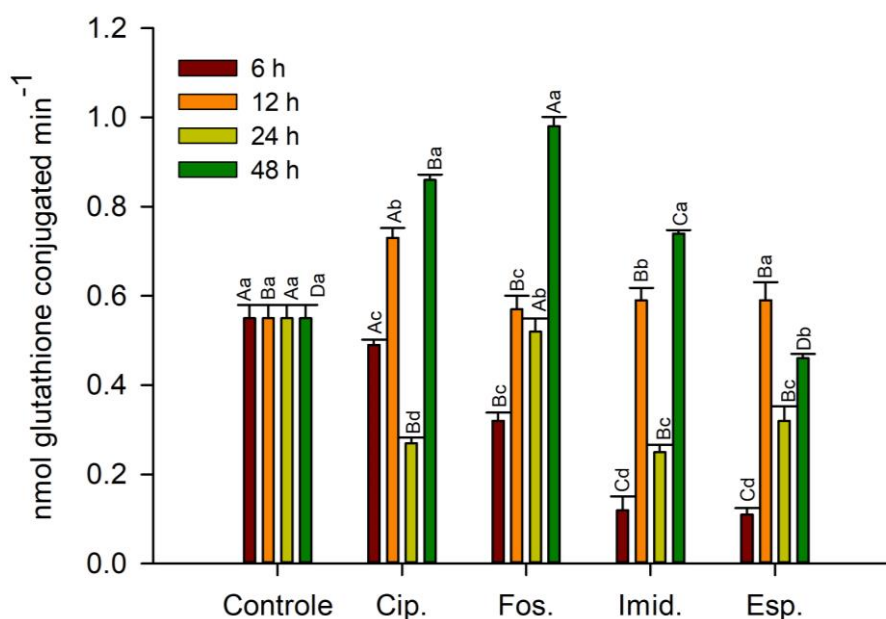


Figura 17. Atividade de glutathione-S-transferases em *Brevipalpus yothersi* após 6; 12; 24 e 48 horas de exposição ao espiroclorfen e aos inseticidas cipermetrina (Cip.), fosmete (Fos.) e imidacloprido (Imid.). Água foi utilizada como controle. Barras verticais nas colunas indicam o erro-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para os diferentes tratamentos, na mesma data, e letra minúscula para cada tratamento, em datas diferentes de avaliação, não diferem significativamente de acordo com Teste de Tukey ($P > 0,05$).

Para concentração de mono-oxigenases, houve efeito significativo para o fator tratamento (controle, inseticidas e acaricida) ($F = 17,72$; $g.l. = 4, 100$; $P < 0,0001$), para o fator tempo de exposição ($F = 8,12$; $g.l. = 3, 100$; $P = 0,0002$), e para a interação entre os fatores tratamento e tempo de exposição ($F = 5,57$; $g.l. = 12, 100$; $P < 0,0001$). Ao longo do tempo, a concentração de mono-oxigenases em ácaros expostos a cipermetrina, fosmete e espiroclorfen foi semelhante (Figura 18). Para imidacloprido, a atividade foi alta às 6; 12 e 48

horas, enquanto às 24 horas foi observada a menor concentração. Comparando a concentração de mono-oxigenases em ácaros expostos aos inseticidas e acaricida com o controle, às 6 e 12 horas, apenas imidacloprido diferiu do controle, apresentando 1,78 vez e 2,26 vezes maior concentração do que o controle, respectivamente (Figura 18). Às 24 horas, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Às 48 horas, fosmete e imidacloprido apresentaram 1,52 e 1,85 vez maior concentração de mono-oxigenases em relação ao controle.

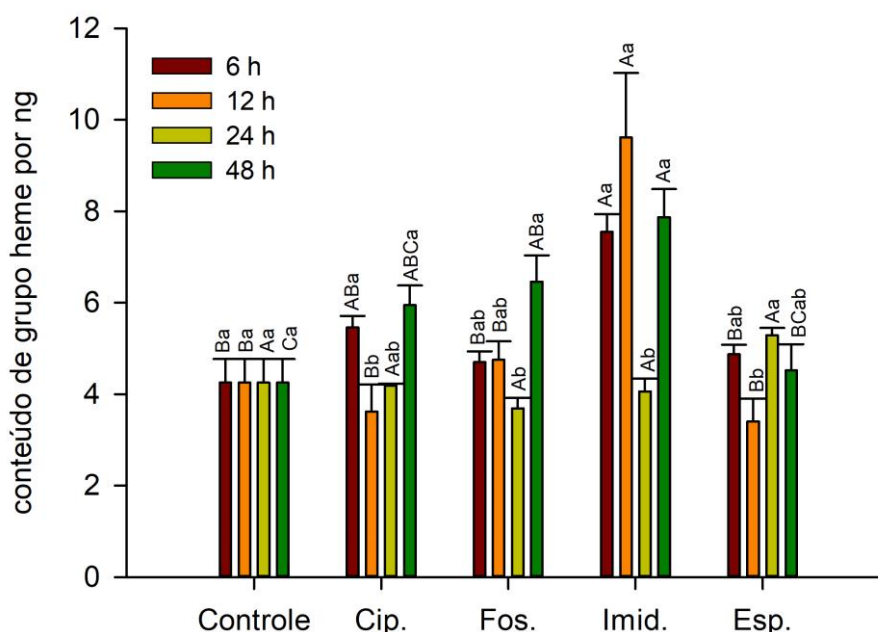


Figura 18. Concentração de mono-oxigenases em *Brevipalpus yothersi* após 6; 12; 24 e 48 horas de exposição ao espirodiclofeno e aos inseticidas cipermetrina (Cip.), fosmete (Fos.) e imidacloprido (Imid.). Água foi utilizada como controle. Barras verticais nas colunas indicam o erro-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para os diferentes tratamentos, na mesma data, e letra minúscula para cada tratamento, em datas diferentes de avaliação, não diferem significativamente de acordo com Teste de Tukey ($P > 0,05$).

4.7. Toxicidade de espirodiclofeno em *Brevipalpus yothersi* após diferentes tempos de exposição aos inseticidas

O controle de espirodiclofeno sobre ácaros *B. yothersi* expostos à cipermetrina por seis, 24 e 48 horas não diferiu do controle proporcionado por espirodiclofeno (Figura 19). No entanto, ácaros expostos à cipermetrina por 12

horas apresentaram menor mortalidade do que espiroclorfenol isolado ($F = 2,91$; $g.l. = 4, 20$; $P = 0,0479$). Não houve diferença entre a pulverização de espiroclorfenol misturado à cipermetrina e a pulverização separada desses produtos, independentemente do tempo de exposição ao inseticida ($F = 1,69$; $P = 0,1919$) (Figura 19).

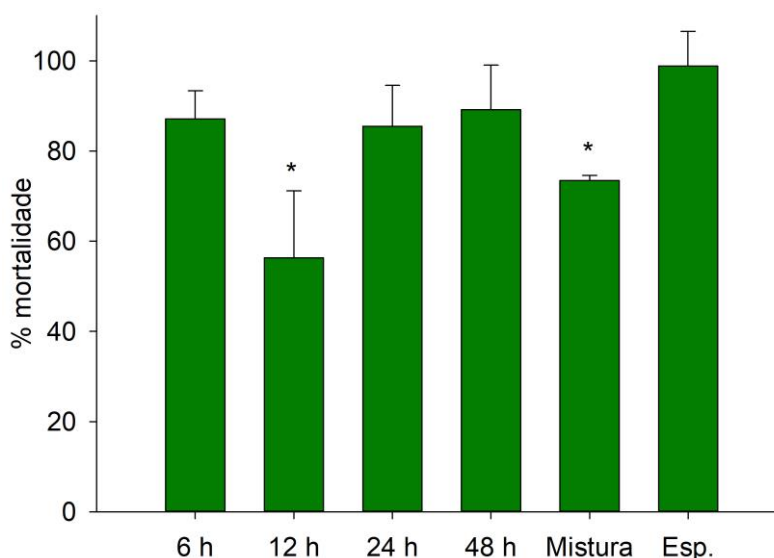


Figura 19. Mortalidade de *Brevipalpus yothersi* causada por espiroclorfenol (%) após seis; 12; 24 e 48 horas de exposição dos ácaros à cipermetrina. Barras verticais nas colunas indicam o erro-padrão da média. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente de espiroclorfenol, a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Ácaros expostos ao fosmete, independentemente do tempo, apresentaram mortalidade semelhante a espiroclorfenol isolado ($F = 1,15$; $g.l.=4, 20$; $P=0,3628$) (Figura 20). Não houve diferença entre a pulverização de espiroclorfenol misturado a fosmete e a pulverização separada desses produtos, exceto para a exposição de 6 horas a fosmete, a qual foi superior ao da mistura ($F = 3,48$; $P = 0,0260$) (Figura 20).

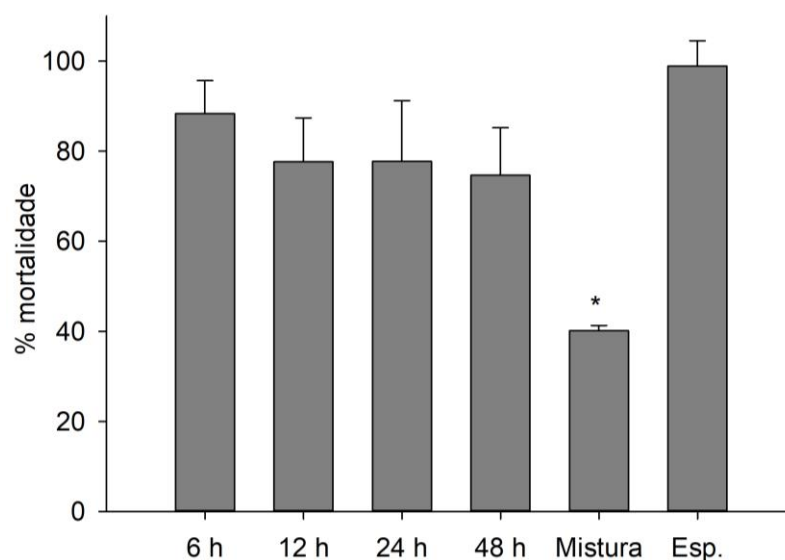


Figura 20. Mortalidade de *Brevipalpus yothersi* causada por espiroclorfen (%) após seis; 12; 24 e 48 horas de exposição dos ácaros à fosmete. Barras verticais nas colunas indicam o erro-padrão da média. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente de espiroclorfen, a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

A exposição de ácaros a imidacloprido, por seis e 12 horas, reduziu o controle de espiroclorfen quando comparado ao acaricida isolado ($F = 6,30$; $g.l. = 4, 20$; $P = 0,0019$) (Figura 21). Houve diferença entre a pulverização de espiroclorfen misturado a imidacloprido e a pulverização separada desses produtos apenas quando os ácaros ficaram expostos por 12 horas ao inseticida ($F = 3,92$; $P = 0,0175$) (Figura 21).

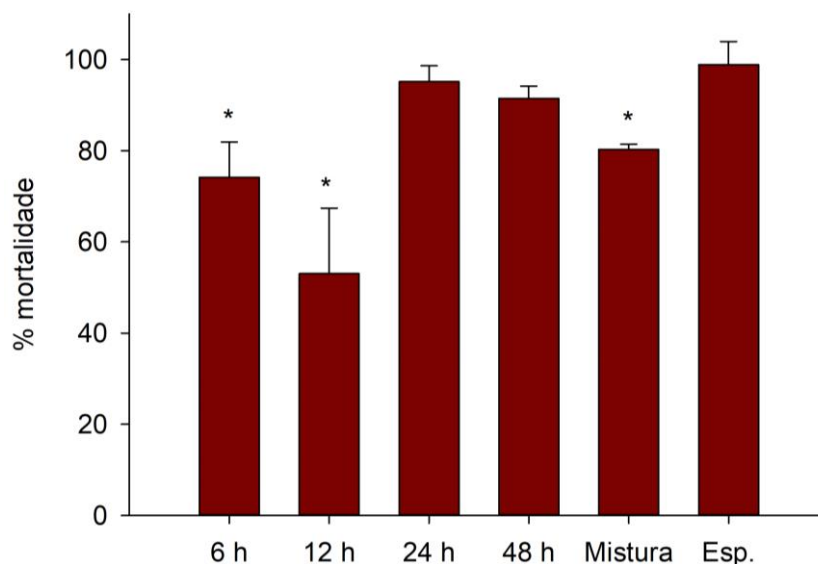


Figura 21. Mortalidade de *Brevipalpus yothersi* causada por espiroclorfenol (%) após seis; 12; 24 e 48 horas de exposição dos ácaros à imidacloprido. Barras verticais nas colunas indicam o erro-padrão da média. As médias seguidas por asterisco diferem significativamente de espiroclorfenol, a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

4.8. Influência de inibidores de enzimas de detoxificação no controle proporcionado por espiroclorfenol isolado e misturado aos inseticidas sobre *Brevipalpus californicus*

A análise da curva de concentração-resposta de ácaros expostos ao espiroclorfenol foi realizada com cinco concentrações do acaricida. O valor de χ^2 não foi significativo ($\chi^2 = 6,1$; *g.l.* = 3; $P = 0,1064$), como determinado pelo teste de Pearson. A concentração letal, que causou 25% de mortalidade da população ($8,2 \text{ mg L}^{-1}$), foi definida e selecionada para os bioensaios.

Três inibidores enzimáticos específicos foram pulverizados para estudar o papel de cada enzima na desintoxicação do espiroclorfenol isolado e combinado com inseticidas. A pulverização de inseticidas isolados não foi tóxica para os ácaros (<5%), mesmo com o uso de inibidores enzimáticos. A pulverização de fosmete isolado causou $2,5 \pm 2,3\%$ (média $\pm$ erro-padrão) de mortalidade de ácaros, e no pré-tratamento com sinergistas, a mortalidade foi de $4,2 \pm 2,1\%$; $0,0 \pm 0,0\%$ e $5,9 \pm 2,4\%$ para PBO, DEF e DEM, respectivamente. A mortalidade dos ácaros expostos apenas ao imidacloprido foi de $6,3 \pm 1,7\%$; $3,1$

$\pm 1,6\%$ quando os ácaros foram pré-tratados com PBO; $6,7 \pm 1,9\%$ para DEF e $6,3 \pm 1,9\%$ para DEM.

A mistura de espirodiclofeno com fosmete não foi antagônica para *B. californicus*, independentemente do inibidor que foi utilizado anteriormente ($F=2,0$; $P = 0,1439$) (Figura 22 e Tabela 19). Em contraste, a mistura de espirodiclofeno com imidacloprido reduziu a mortalidade de ácaros causada pelo acaricida ($F = 33,5$; $P < 0,0001$), sugerindo um antagonismo da mistura.

Os inibidores PBO e DEF não sinergizaram ou antagonizaram a toxicidade do espirodiclofeno (Figura 22 e Tabela 19). No entanto, DEM sinergizou o espirodiclofeno, resultando em maior toxicidade do que espirodiclofeno sem sinergista (Tabela 16). Não houve diferença na mortalidade dos ácaros quando eles foram pré-tratados com DEF e DEM e, posteriormente, com fosmete + espirodiclofeno (Figura 22 e Tabela 19).

O pré-tratamento com PBO, DEF e DEM e posterior a espirodiclofeno em mistura com imidacloprido mostraram maior mortalidade do que espirodiclofeno em mistura com imidacloprido sem os inibidores (Figura 22). No entanto, quando comparada à mortalidade observada e à mortalidade esperada para espirodiclofeno em mistura com imidacloprido, apenas PBO sinergizou esta combinação, enquanto DEM antagonizou (Tabela 19).

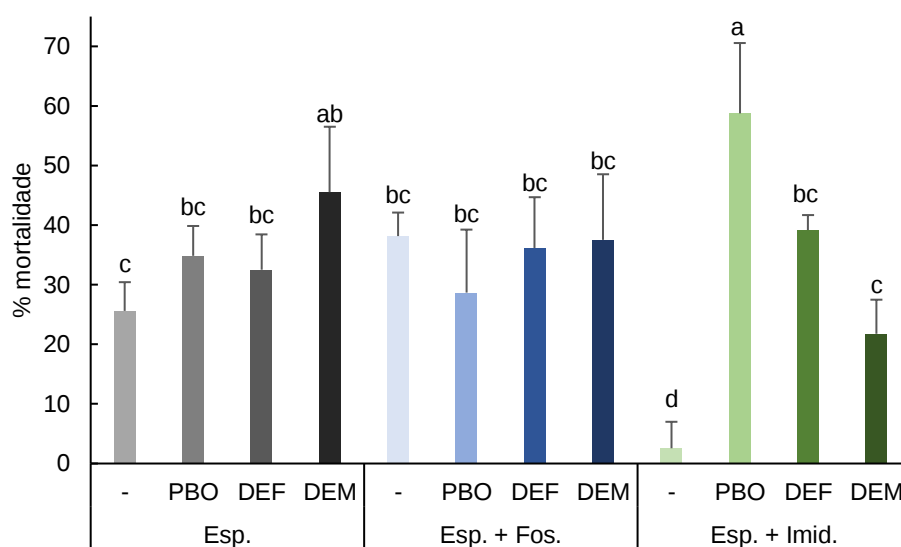


Figura 22. Mortalidade de *Brevipalpus californicus* cinco dias após a pulverização de espirodiclofeno (Esp.) isolado e combinado a fosmete (Fos.) e imidacloprido (Imid.), em ácaros expostos ou não aos inibidores de enzimas de detoxicação (sinergistas) butóxido de piperonila (PBO), S, S, S tributil-fosforotritioato (DEF) e maleato dietílico (DEM). Para análise estatística, os dados originais foram usados. Médias seguidas pelas mesmas letras em barras não são significativamente diferentes, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 19. Mortalidade observada e esperada (média $\pm$ erro-padrão) de *Brevipalpus californicus* e efeito da combinação da CL₂₅ de espirodiclofeno (Esp.) com as concentrações comerciais dos inseticidas fosmete (Fos.) e imidacloprido (Imid.), cinco dias após a pulverização sobre ácaros com ou sem exposição aos sinérgistas PBO, DEF, DEM.

Tratamento	Medição ^a	Mortalidade (%)	χ^2 ^b	Efeito (M _O -M _E)
Esp. + PBO	Observado	34,9 $\pm$ 5,0	1,6	Aditivo
	Esperado	28,2 $\pm$ 0,0		
Esp. + DEF	Observado	32,5 $\pm$ 5,9	1,1	Aditivo
	Esperado	27,0 $\pm$ 0,0		
Esp. + DEM	Observado	45,5 $\pm$ 5,5	11,7	Sinérgico (17,9)
	Esperado	27,6 $\pm$ 0,0		
Esp. + Fos.	Observado	38,2 $\pm$ 4,0	4,2	Sinérgico (10,8)
	Esperado	27,4 $\pm$ 0,0		
Esp. + Fos. + PBO	Observado	28,7 $\pm$ 10,6	2,0	Aditivo
	Esperado	37,4 $\pm$ 0,0		
Esp. + Fos. + DEF	Observado	36,2 $\pm$ 8,5	0,4	Aditivo
	Esperado	32,5 $\pm$ 0,0		
Esp. + Fos. + DEM	Observado	37,5 $\pm$ 11,0	2,5	Aditivo
	Esperado	48,4 $\pm$ 0,0		
Esp. + Imid.	Observado	2,6 $\pm$ 4,4	25,0	Antagônico (-27,3)
	Esperado	29,9 $\pm$ 0,0		
Esp. + Imid. + PBO	Observado	58,8 $\pm$ 11,8	13,1	Sinérgico (22,0)
	Esperado	36,8 $\pm$ 0,0		
Esp. + Imid. + DEF	Observado	39,2 $\pm$ 2,5	0,2	Aditivo
	Esperado	36,6 $\pm$ 0,0		
Esp. + Imid. + DEM	Observado	21,8 $\pm$ 11,0	14,8	Antagônico (-26,8)
	Esperado	48,6 $\pm$ 0,0		

^aObservado = mortalidade observada causada pelos produtos combinados com e sem pré-tratamento com inibidores de enzima de detoxificação; Esperado = soma da mortalidade proporcionada por cada produto pulverizado separadamente. ^bA comparação de qui-quadrado que excede 3,841, com df = 1 e α = 0,05, é considerado ser sinérgico ou antagônico; caso contrário, é considerado ser aditivo.

4.9. Atividade de enzimas de detoxificação em ácaros *Brevipalpus californicus* expostos ao acaricida e aos inseticidas isolados e em mistura

Foi observado aumento de 1,90 e 2,60 vezes na atividade de mono-oxigenases nos ácaros expostos ao imidacloprido e ao fosmete, respectivamente, em comparação ao controle ($F = 21,32$; $P < 0,0001$). Foi observado aumento semelhante na atividade de mono-oxigenases quando os ácaros foram expostos às misturas de inseticidas com o acaricida ($F = 21,32$; $P < 0,0001$). Observou-se o aumento de 2,41 vezes e 1,95 vez na atividade de mono-oxigenases em ácaros expostos às combinações de espirodiclofeno com imidacloprido ou fosmete, respectivamente (Tabela 20). Atividades de esterases medidas através de 4-nitrofenil acetato foram cerca de duas vezes mais altas em ácaros expostos ao imidacloprido e 1,62 vez maior em ácaros expostos ao espirodiclofeno em mistura com imidacloprido do que a atividade observada em ácaros do controle ($F = 28,76$; $P < 0,0001$). A atividade da esterase de ácaros expostos ao fosmete foi semelhante à observada para os ácaros expostos à água (Tabela 20). No entanto, a atividade de esterases em ácaros expostos ao espirodiclofeno, em mistura com fosmete, foi, aproximadamente, 0,55 vez menor do que em ácaros-controle ($F = 28,76$; $P < 0,0001$).

A conjugação de glutathiona e CNDB por glutathiona-S-transferases não diferiu entre ácaros expostos ao fosmete, espirodiclofeno em mistura com fosmete e ácaros do controle (Tabela 20). No entanto, ácaros expostos ao imidacloprido e espirodiclofeno, em mistura com imidacloprido apresentaram aumento de, aproximadamente, 1,3 vez na atividade de GSTs ($F = 8,20$; $P=0,0002$).

Tabela 20. Atividade de enzimas de detoxificação em adultos de *Brevipalpus californicus* expostos aos inseticidas (fosmete e imidacloprido) isoladamente ou em mistura com o acaricida (espirodiclofeno). A pulverização com água foi usada como controle.

Tratamento	Grupo de enzima de detoxificação					
	Mono-oxigenases ¹	Razão	Esterases ²	Razão	Glutathiona-S-transferases ³	Razão
Água (Controle)	426,8 ± 25,6 c	-	18811,8 ± 2609,3 b	-	435,2 ± 19,5 b	-
Fosmete	1107,7 ± 5,9 a	2,6	17297,1 ± 1642,9 bc	0,9	428,4 ± 11,9 b	1,0
Espirodiclofeno + fosmete	830,8 ± 22,6 b	2,0	10458,3 ± 301,3 c	0,6	437,1 ± 20,7 b	1,0
Imidacloprido	809,6 ± 114,0 b	1,9	40887,2 ± 1897,6 a	2,2	578,9 ± 32,7 a	1,3
Espirodiclofeno + imidacloprido	1028,9 ± 46,6 ab	2,4	30441,1 ± 3519,7 a	1,6	558,6 ± 37,0 a	1,3

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

¹pmol 7-hydroxicoumarina (30 min)⁻¹ mg⁻¹ proteína (± erro-padrão (EP)).

²nmol 4-nitrofenol min⁻¹ mg⁻¹ proteína (±EP).

³nmol glutathiona conjugada min⁻¹ mg⁻¹ proteína (±EP).

5. Discussão

A fim de reduzir custos operacionais e de garantir o manejo de diferentes pragas ao mesmo tempo, os agricultores geralmente misturam agrotóxicos no tanque do pulverizador. No entanto, muitas combinações são incompatíveis, resultando em falhas no controle dessas pragas (Della Vechia et al., 2018, 2019).

No presente trabalho, observou-se que o antagonismo entre o espirodiclofeno e determinados inseticidas (cipermetrina, fosmete ou imidacloprido), muitas vezes, é dependente do estágio de desenvolvimento de *B. yothersi*. Portanto, as misturas do acaricida com os inseticidas ou dos produtos isolados poderão influenciar em parâmetros biológicos e demográficos de *B. yothersi*. Em condições de campo, misturas de produtos são capazes de interferir no tempo para controlar a população de *B. yothersi* e no período de reinfestação.

Nesse contexto, a indução de enzimas de detoxificação pode fornecer respostas para entender melhor o antagonismo entre os produtos no controle de *B. yothersi*. As respostas toxicológicas observadas para determinadas misturas diferiram em função da espécie de ácaro estudada (*B. yothersi* ou *B. californicus*). No entanto, a observação de alterações das atividade ou concentrações de enzimas de detoxificação também auxiliou na compreensão dos efeitos observados.

5.1. Efeito biológico de espirodiclofeno, cipermetrina, fosmete e imidacloprido, isolados e combinados, em *Brevipalpus yothersi*

Os experimentos revelaram que os inseticidas cipermetrina, fosmete e imidacloprido não foram tóxicos para qualquer uma das fases de *B. yothersi* (Tabelas 2; 3; 4; 5 e 6). No entanto, as misturas de espirodiclofeno com cipermetrina, fosmete ou imidacloprido produziram diferentes níveis de antagonismo entre as fases de desenvolvimento desse ácaro. Cipermetrina é um inseticida piretroide que atua como modulador dos canais de sódio; fosmete é um inibidor da acetilcolinesterase, e imidacloprido é um agonista do receptor

nicotínico da acetilcolina, todos inseticidas são ativos no sistema nervoso de insetos (IRAC, 2021). No entanto, assim como observado nos resultados deste trabalho, esses inseticidas não são considerados letais aos ácaros nas concentrações registradas para controle de insetos (Mullins, 1993; Della Vechia et al., 2018).

O controle de espirodiclofeno sobre as fases de ovo e adulto de *B. yothersi* foi drasticamente reduzida quando foram pulverizados espirodiclofeno em mistura com cipermetrina, espirodiclofeno em mistura com fosmete e espirodiclofeno em mistura com imidacloprido, 64,0%, 60,0% e 41,0% de redução sobre ovos (Tabela 2) e 20,0%, 38,0% e 26,0% sobre adultos (Tabela 6), respectivamente. Um mesmo acaricida pode ser eficaz contra um ou mais estágios de desenvolvimento de um ácaro (Nauen et al., 2001; Saénz-de-Cabezón et al., 2006), como é o caso de espirodiclofeno, um acaricida derivado do ácido tetrônico, que pertence à classe química dos cetoenóis (IRAC, 2021). Seu mecanismo bioquímico envolve a inibição da acetil-coenzima A carboxilase, uma enzima essencial da via de síntese de ácidos graxos importantes (Lümmen et al., 2014). Dessa forma, atua principalmente sobre ovos e sobre todos os estágios de desenvolvimento de ácaros dos gêneros *Tetranychus*, *Panonychus*, *Brevipalpus*, *Phyllocoptruta* e *Aculops* (Wachendorff et al., 2000). Ainda, fêmeas adultas expostas ao espirodiclofeno são incapazes de colocar ovos e morrem poucos dias após a exposição devido ao acúmulo de ovos dentro de seu corpo (Cheon et al., 2007; Della Vechia et al., 2018). Ao final do processo de intoxicação, as fêmeas param de se alimentar e morrem (Nauen, 2005; Van Pottelberge et al., 2009; Marcic et al., 2010; Amaral et al., 2019).

No entanto, a sensibilidade a um acaricida pode diferir entre os diferentes estágios de desenvolvimento da mesma praga (Marcic, 2003; Kramer e Nauen, 2011). A diferença na toxicidade entre os estágios de desenvolvimento de *B. yothersi* foi semelhante aos resultados obtidos em outros trabalhos, os quais mostraram que, em populações suscetíveis, larvas de *T. urticae* eram mais sensíveis do que os adultos aos acaricidas abamectina, espirodiclofeno e clorpirifós (Nauen et al., 2001; Rauch e Nauen, 2003; Stumpf e Nauen, 2002; Khajehali et al., 2010; Ay e Kara, 2011). Rodrigues e Machado (1999) verificaram que a suscetibilidade de ovos de *B. phoenicis* é dependente da idade dos ovos,

devido a determinados fatores morfológicos e fisiológicos dos próprios ovos que alteram a toxicidade causada pelos acaricidas. Entretanto, pode-se dizer que esse fator não tenha sido o que prevaleceu no resultado encontrado para *B. yothersi* na presente pesquisa, devido à padronização na idade dos ovos utilizados nos experimentos. Outro fator que pode ter afetado a suscetibilidade de ovos observados neste trabalho, bem como a diferença na suscetibilidade das fases de desenvolvimento de *B. yothersi*, pode ter sido alterações na detoxificação metabólica, resultante de diferenças na atividade de enzimas detoxificantes em função das misturas (Yang et al., 2013).

A indução ou a inibição de mecanismos de detoxificação por xenobióticos já é bem conhecida em insetos e vem sendo mais estudada para ácaros-praga, principalmente tetraniquídeos (Van Leeuwen e Dermauw, 2016). O contato de organismos, como ácaros, com doses subletais de agrotóxicos pode favorecer a sobrevivência por meio da alteração de respostas fisiológicas. Um dos principais processos realizados pelas enzimas é a biotransformação de substâncias, também conhecida como metabolização e/ou detoxificação. Essas enzimas têm como função principal um conjunto de alterações químicas e/ou estruturais, transformando-as em derivados mais polares que resulta no aumento na velocidade de excreção e, conseqüentemente, menor permanência no organismo (Johnson, 2015).

Amenya et al. (2008) verificaram que, em ovos e adultos de uma população de *Anopheles funestus* Giles (Diptera: Culicidae) resistente a piretroides, um grupo de enzimas de detoxificação específico, do citocromo P450, foi altamente expresso nessas fases, enquanto em larvas não foi observado o mesmo resultado. Contudo, Shi et al. (2015) observaram que não houve diferença na expressão de mono-oxigenases entre os estágios de desenvolvimento de *T. cinnabarinus*, exceto para ovos, nos quais a expressão foi menor. Portanto, a resposta fisiológica induzida por xenobióticos difere entre espécies e até mesmo entre os estágios de desenvolvimento da mesma espécie. Diante disso, acredita-se que a indução de enzimas capazes de detoxificar o espiroclorfenol causada pela exposição conjunta com os inseticidas tenha tido um efeito expressivo na resposta toxicológica de ovos a esses produtos. No

entanto, mais estudos devem ser conduzidos para compreender os mecanismos envolvidos nessa resposta.

Em experimento realizado em laboratório, a fecundidade de *B. yothersi* foi reduzida apenas quando os ácaros foram expostos às doses de 500,0 mg.L⁻¹, 125,0 mg.L⁻¹, 62,5 mg.L⁻¹ e 15,6 mg.L⁻¹ de fosmete (Tabela 8). Nos demais tratamentos (produtos e doses), a fecundidade e a fertilidade de ovos de *B. yothersi* não diferiram do controle. Em casa de vegetação, a menor população desses ácaros foi encontrada em *seedlings* pulverizadas com fosmete (250; 125 e 31,2 mg.L⁻¹), espirodiclofeno (0,9 e 0,4 mg.L⁻¹) e imidacloprido (40,0 mg.L⁻¹) (Tabelas 11 e 12). No entanto, a mistura de espirodiclofeno com fosmete, na dose de 0,2 + 31,2 mg.L⁻¹, resultou em maior população dos ácaros, comparado ao controle. De forma geral, a mistura de espirodiclofeno com os inseticidas proporcionou maior população de *B. yothersi* do que o acaricida isolado, mas não diferiu do inseticida isolado. Diante disso, acredita-se que, na interação entre o acaricida com os inseticidas, o inseticida tenha forte influência no efeito da mistura, exceto na mistura de espirodiclofeno com fosmete, na qual o acaricida exerceu maior influência.

O efeito da exposição de ácaros às doses subletais de inseticidas vem sendo mais bem estudada, pois esses produtos podem contribuir para a alteração do comportamento reprodutivo de ácaros, levando à redução da geração de novos indivíduos ou, por outro lado, aumentando o número de descendentes (Guedes e Cutler, 2013). No entanto, esse efeito é mais relatado para ácaros da família Tetranychidae, como *P. citri*, *T. urticae* e *O. ilicis* (Saini e Cutkomp, 1966; Dittrich et al., 1974; Cohen, 2006; Cordeiro et al., 2013; Alves et al., 2018; Zanardi et al., 2018).

Diferentemente do efeito observado para *B. yothersi* na maioria das doses testadas de cipermetrina, fosmete e imidacloprido, vários trabalhos relataram efeito desses inseticidas na fecundidade e na fertilidade de ácaros tetraniquídeos. Por exemplo, James e Price (2002) e Castagnoli et al. (2005) observaram aumento significativo na fecundidade de *T. urticae* exposto ao imidacloprido. Liu et al. (1998) verificaram aumento da população de *T. cinnabarinus* quando eles foram expostos à cipermetrina. Dimetoato, um organofosforado inibidor da acetilcolinesterase, assim como fosmete, foi capaz

de induzir o aumento populacional de *P. citri* e de *T. urticae* (Phillips et al., 1987; Leigh e Wynholds, 1980). No entanto, um fator importante é que o efeito de concentrações subletais de inseticidas sobre artrópodes-praga depende do produto, da sua concentração e da espécie da praga (Holland et al., 1993). Embora existam relatos de inseticidas interferindo na reprodução de ácaros, esse efeito está mais associado a ácaros tetranychídeos, os quais têm alto potencial reprodutivo e maior capacidade de dispersão do que tenuipalpídeos, refletindo em comportamentos diferentes quando expostos a inseticidas.

Com relação ao efeito desses produtos no ciclo de desenvolvimento de *B. yothersi*, a exposição dos ácaros a dose subletal de espiroclorfenol (6,78 mg.L⁻¹), isolado ou combinado aos inseticidas, resultou em redução na duração de cada estágio (Tabela 13). Inseticidas pulverizados isoladamente também apresentaram efeito semelhante. Embora tenham apresentado menor período do que o controle, ácaros expostos ao espiroclorfenol misturado aos inseticidas apresentaram maior período do estágio de ovo e protoninfa do que o acaricida isolado, indicando que a adição de inseticida à calda acaricida tendeu a reduzir o efeito provocado pelo acaricida. Diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, Amaral et al. (2019) verificaram que não houve diferença na duração dos estágios de desenvolvimento de *B. yothersi* expostos a 0,48 mg.L⁻¹ de espiroclorfenol; no entanto, os autores verificaram aumento na fecundidade dos ácaros expostos a essa concentração.

Os parâmetros de tabela de vida também foram afetados quando os ácaros foram expostos aos produtos isolados e combinados (Tabela 14). A pré-oviposição (APOP) é o período entre a emergência da fêmea adulta até ela iniciar a oviposição, enquanto o período total de pré-oviposição (TPOP) ocorre entre a eclosão das larvas e a primeira reprodução das fêmeas (Gabre et al., 2005). TPOP é uma estatística mais apropriada do que APOP, porque TPOP reflete o efeito da primeira reprodução nos parâmetros da população, ou seja, a primeira idade reprodutiva desempenha importante função nos parâmetros populacionais (Chi et al., 2020). Embora não tenha havido diferença significativa no APOP de *B. yothersi* entre os tratamentos, os valores de TPOP foram significativamente menores em ácaros expostos ao espiroclorfenol isolado ou em mistura com os inseticidas.

A longevidade de adultos foi reduzida quase à metade quando os ácaros foram expostos ao espiroclorfenol misturado ao fosmeto ou ao imidacloprido, no qual influenciou também nos dias de oviposição e de fecundidade total. Ako et al. (2004) também verificaram que a fecundidade de *T. urticae* expostos à dose recomendada pelo fabricante de imidacloprido foi menor do que quando expostos à água.

Além da redução do período de desenvolvimento de cada estágio, consequentemente menor TPOP, as curvas de fecundidade dos ácaros que foram expostos a qualquer tratamento, comparado ao controle, apresentaram picos menores e menos frequentes de oviposição. A adição de inseticidas à calda acaricida proporcionou mais picos do que espiroclorfenol isolado, sendo espiroclorfenol misturado a fosmeto o que apresentou maior frequência, seguido de imidacloprido e cipermetrina. Uma possível razão para a redução foi que a inibição da acetil-CoA carboxilase pelo espiroclorfenol pode contribuir para a interferência nas vias lipogênicas, e os lipídios são considerados nutrientes essenciais para o desenvolvimento e reprodução de artrópodes (Arrese e Soulages, 2010).

A longevidade de adultos não foi influenciada pela exposição ao espiroclorfenol isolado ou ao espiroclorfenol misturado à cipermetrina (Tabela 14). O período de oviposição foi reduzido apenas nos tratamentos com espiroclorfenol misturado à fosmeto, imidacloprido isolado e espiroclorfenol misturado a imidacloprido; consequentemente, a fecundidade total também foi menor nesses tratamentos (Tabela 14). Amaral et al. (2019) verificaram que a exposição de *B. yothersi* a 0,48 mg.L⁻¹ de espiroclorfenol não causou efeito sobre a longevidade e a duração do período de oviposição. No entanto, Saber et al. (2018) verificaram que a exposição de fêmeas de ácaro-rajado, *T. urticae*, a CL₂₅ de espiroclorfenol (3,84 mg.L⁻¹) reduziu os parâmetros de tabela de vida, devido aos menores períodos de longevidade e de reprodução, bem como em razão da menor fecundidade em relação ao controle. Rocha et al. (2021) verificaram que uma população resistente de *B. yothersi* ao espiroclorfenol apresentou redução na taxa de crescimento populacional comparado à população suscetível. Os autores atribuíram essa redução ao declínio na fecundidade e na viabilidade dos ovos na população resistente.

A expectativa de vida também foi menor nos ácaros expostos a qualquer um dos tratamentos, e ácaros expostos às misturas apresentaram expectativa de vida ainda menor do que espirodiclofeno isolado (Figura 11). O valor reprodutivo específico por idade-estágio, o qual corresponde à contribuição de indivíduos com idade x e estágio y para a população futura, também apresentou resultado semelhante a expectativa de vida (Figura 12). Saber et al. (2018) observaram efeito semelhante em *T. urticae* exposto a CL_{25} de espirodiclofeno ($3,84 \text{ mg.L}^{-1}$).

O tempo médio entre gerações (T) também foi reduzido drasticamente, quando comparado ao controle, com exceção para cipermetrina e imidacloprido isolados (Tabela 15). A adição de inseticidas à calda acaricida reduziu ainda mais o tempo médio entre gerações. Isso significou que a população de *B. yothersi* poderia atingir uma distribuição estável no estágio por idade após aproximadamente 32 dias, dependendo do tratamento, enquanto ácaros sem exposição a esses produtos atingiriam esse tempo em 46 dias. Diferentemente, o tempo médio entre gerações de *T. urticae* expostas a CL_{25} de espirodiclofeno ($3,84 \text{ mg.L}^{-1}$) não diferiu de ácaros expostos apenas à água (Saber et al., 2018).

A taxa intrínseca de aumento populacional (rm) é o parâmetro mais importante para descrever o crescimento potencial de uma população de praga (Li et al., 2017). No presente trabalho, os valores de rm da população tratada com espirodiclofeno reduziram significativamente (Tabela 15). Rocha et al. (2021) também verificaram redução na taxa intrínseca de aumento populacional de *B. yothersi* resistente ao espirodiclofeno. Amaral et al. (2019) observaram efeito contrário quando os ácaros foram tratados com $0,48 \text{ mg.L}^{-1}$ de espirodiclofeno. Essa diferença de resultados, provavelmente, está relacionada à dose utilizada neste trabalho, a qual foi 14 vezes maior do que os autores utilizaram. Semelhantemente à taxa intrínseca de aumento, a taxa finita de aumento (λ) também é um parâmetro demográfico importante, pois reflete os efeitos combinados de características biológicas, como sobrevivência, desenvolvimento e reprodução (Li et al., 2017; Savi et al., 2019). Esses parâmetros são os que melhor descrevem a adaptação de populações, podendo ser usados para avaliar o crescimento populacional de uma determinada população (Steinbach et al., 2017). No presente estudo, a aptidão (*fitness*) das

populações expostas aos tratamentos apresentou os menores valores de rm e λ , indicando que, ao longo do tempo, haveria redução da geração de novos indivíduos.

Para melhor entender a relação entre a toxicidade e os parâmetros biológicos e demográficos observados em *B. yothersi* exposto ao espiroclorfenol, isolado ou combinado aos inseticidas, estudos envolvendo a resistência de artrópodes a agrotóxicos são úteis para entender as interações existentes. A teoria geral da história de vida (*life-table*) afirma que uma troca entre determinadas características de vida ocorre quando ambas as características são energeticamente caras (Zera e Denno, 1997; Tariq et al., 2015; Tariq et al., 2017). Para lidar com a toxicidade de um produto, um organismo precisa de energia e de recursos para conseguir adaptar-se e sobreviver (Kliot e Ghanim, 2012). A diminuição na longevidade e na fecundidade dos ácaros expostos aos produtos estudados neste trabalho pode ser devido ao estresse causado pela exposição aos produtos isolados ou combinados, demonstrando a troca de energia entre a adaptação e outras características, como longevidade e fecundidade, conforme proposto pela teoria da história de vida.

Os custos de aptidão foram amplamente estudados na última década, e vários estudos relataram os casos de custos adaptativos em muitas espécies de insetos que desenvolveram resistência contra diferentes inseticidas (Kliot e Ghanim, 2012; Gul et al., 2019; Ullah et al., 2020). Fatores moleculares também podem estar envolvidos na resposta aos produtos químicos, como observado por Ullah et al. (2021), que verificaram a redução na longevidade, período de desenvolvimento e fecundidade de uma população de *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) resistentes a acetamiprido. Esses autores verificaram, ainda, que o efeito sobre os parâmetros biológicos e demográficos estava associado à superexpressão de genes relacionados à reprodução e ao desenvolvimento desses insetos, como, por exemplo, EcR, JHBP, JHAMT e USP.

5.2. Efeito toxicológico de espiroclorfenol, cipermetrina, fosmeto e imidacloprido, isolados e combinados, sobre *Brevipalpus yotheresi* em condições de campo

Em pomar comercial de lima-ácida ‘Tahiti’, os resultados indicaram que a adição dos inseticidas, cipermetrina, fosmeto ou imidacloprido, à calda de espiroclorfenol aumentou o tempo para reduzir a população de *B. yotheresi* a níveis imperceptíveis, comparada à pulverização de espiroclorfenol isolado (Tabelas 17 e 18). As características físico-químicas das caldas podem ser um dos fatores relacionados à compatibilidade de mistura de produtos. No entanto, Della Vechia et al. (2019) verificaram que as caldas de espiroclorfenol misturado a cipermetrina, fosmeto ou imidacloprido não apresentaram características físico-químicas que caracterizassem incompatibilidade entre os produtos, sendo esse efeito observado pela homogeneidade das caldas e pelos valores de pH e de condutividade elétrica semelhantes à calda contendo apenas o espiroclorfenol.

O pH é um fator importante para a eficácia de agrotóxicos, pois pode interferir na toxicologia dos produtos, devido ao aumento nas concentrações de íons H^+ ou OH^- que reagem com os componentes da formulação, causando a dissociação dos ingredientes ativos/inertes, redução na estabilidade física das soluções, diminuição da concentração na calda e redução em sua toxicidade (Prado et al., 2011). Entretanto, diante dos resultados de Della Vechia et al. (2019), sugere-se que as características físico-químicas das caldas não tenham sido o fator que corroborou o efeito observado na eficiência de espiroclorfenol em mistura com os inseticidas a campo.

Outro fator inerente às características físico-químicas da calda é o teor do ingrediente ativo (Ebeling, 1963; Rahman et al., 2015). Interações entre os produtos presentes em uma calda podem resultar em indisponibilização do ingrediente ativo, ou até mesmo na degradação das moléculas (Waterman, 2008). No entanto, a adição de cipermetrina, fosmeto ou imidacloprido à calda de espiroclorfenol não reduziu significativamente o teor do acaricida nas caldas, variando de 53,6 a 58,7 $mg.L^{-1}$ de espiroclorfenol nas caldas contendo as misturas, enquanto a calda do acaricida isolado foi de 59,7 $mg.L^{-1}$.

Além do aumento no período para controle de *B. yothersi*, a adição de inseticidas à calda de espirodiclofeno reduziu o período de proteção das plantas contra reinfestações do ácaro da leprose (Figura 15). A adição de cipermetrina, fosmete e imidacloprido à calda acaricida reduziu o período de proteção das plantas para, em média, 42; 43 e 52 dias, respectivamente, enquanto na pulverização de espirodiclofeno isolado, o período de proteção das plantas foi de 127 dias. Vieira (2019) observou que o espirodiclofeno proporcionou período de controle do ácaro da leprose de, aproximadamente, 56 dias em plantas de laranjeira-doce 'Hamlin'. O período de controle proporcionado por acaricidas é dependente de diversos fatores, entre os quais a ocorrência de chuvas e a infestação inicial da praga (Ebeling, 1963; Andrade et al., 2010). Ainda, Vieira (2019) verificou que a adição de adjuvantes (copolímero de poliéster e silicone ou óleo mineral) reduziu o período de proteção de plantas de laranja contra o ácaro da leprose, provavelmente devido à perda por escorrimento observada na pulverização desses tratamentos.

A presença de adjuvantes nos ingredientes inertes dos agrotóxicos pode ser um fator que ajudaria a explicar a redução do período de controle proporcionado por espirodiclofeno misturado aos inseticidas. No entanto, informações precisas sobre os componentes presentes nas formulações desses produtos não são divulgadas pelas empresas fabricantes. O esclarecimento da função de ingredientes inertes na mistura de espirodiclofeno com os inseticidas poderia ser feito com a pulverização apenas dos ingredientes ativos. Para isso, mais estudos devem ser realizados para compreender essa função.

Outro fator que influencia na eficiência e, conseqüentemente, no período de reinfestação é o comportamento dos ácaros. O hábito de *B. yothersi* em buscar abrigos para colocar seus ovos dificulta o contato do acaricida com os ovos. O ácaro da leprose procura fendas e deformidades em frutos, folhas ou ramos para ovipositar (Chiavegato e Kharfan, 1993; Albuquerque et al., 1997). Neste estudo, a presença de qualquer fase dos ácaros nos frutos, principalmente dos ovos, foi predominantemente sob a região do pedúnculo, seguido da extremidade estilar (coroa) e de fissuras presentes na casca dos frutos. Geralmente nestes locais, os ovos ficam menos expostos aos produtos químicos aplicados. Reis et al. (2005) também reportaram a dificuldade na redução da

população de *B. phoenicis* em plantas de café devido à presença de ovos ser predominante em regiões de difícil acesso pelo acaricida pulverizado.

Outro fator que auxilia na interpretação dos resultados de campo são os resultados obtidos em laboratório, nos quais se demonstrou que as fases de ovo e adulto foram as menos suscetíveis ao espirodiclofeno quando os inseticidas foram adicionados à calda. A presença de ovos que não foram inviabilizados pelo acaricida, por motivos de exposição ou pela interação entre acaricida e inseticida, juntamente com o longo período de incubação (~10 dias), pode ter proporcionado às fases móveis desses ácaros o contato com menores concentrações do acaricida que foi inicialmente pulverizado, devido à degradação natural que esses produtos sofrem no ambiente (Baker et al., 1992; Lichiheb et al., 2016). Além desses fatores, a indução de mecanismos de detoxificação desses produtos pelos ácaros também é um fator que determina a sobrevivência dos ácaros no ambiente.

5.3. Atividade de enzimas de detoxificação em ácaros *Brevipalpus yotheresi* expostos aos produtos isolados e misturados

Os objetivos dessa etapa do estudo foram utilizar ensaios de toxicidade e análises bioquímicas para investigar a interferência dos inseticidas cipermetrina, fosmete e imidacloprido na toxicidade de espirodiclofeno e para determinar o período dessa interferência. Ácaros expostos ao espirodiclofeno misturado a cipermetrina apresentaram atividade de esterases e concentração de mono-oxigenases semelhante aos ácaros expostos apenas à água (controle) (Tabela 18). A quantificação da atividade de mono-oxigenases do citocromo P450 foi realizada pelo método indireto de quantificação de grupos heme nos ácaros, que foram convertidos em citocromo C (Brasil, 2006). As mono-oxigenases dependentes do citocromo P450, que também são consideradas oxidases de função mista (MFO), são um dos sistemas metabólicos mais vitais (fase I) em insetos e, supostamente, também em ácaros. Como o método utilizado é de quantificação de grupos heme em geral, a menor quantidade verificada pode não estar relacionada apenas a enzimas P450, mas também a outras hemoproteínas, como peroxidases. Assim, comparada ao controle, a exposição

ao espiroclorfenol misturado à cipermetrina, espiroclorfenol misturado ao fosmeto e espiroclorfenol misturado ao imidacloprido não alterou a quantidade de enzimas contendo grupo heme, entre as quais estão as P450. Apesar de não permitir que se faça a distinção entre os tipos de hemoproteínas, esse método é considerado útil para a detecção de alterações nos níveis de hemoproteínas, podendo indicar, indiretamente, alterações na quantidade de enzimas P450 (Brogdon et al., 1997).

Espiroclorfenol misturado ao fosmeto ou ao imidacloprido proporcionou aumento na atividade de esterases. Em todas as misturas, a atividade de GSTs foi reduzida. Esterases gerais, GSTs e mono-oxigenases são enzimas de detoxificação-chave na metabolização de agrotóxicos em artrópodes e podem ser induzidas após a exposição a esses produtos (Feyereisen et al., 2015; Van Leeuwen e Dermauw, 2016; Pavlidi et al., 2018). Embora a toxicidade de espiroclorfenol tenha sido reduzida devido à adição de inseticidas na calda, a atividade das enzimas de detoxificação não auxiliou na compreensão desse resultado, visto que a atividade de GSTs e mono-oxigenases foi reduzida ou não diferiu do controle.

Esterases são enzimas capazes de hidrolisar ou de sequestrar xenobióticos e podem desempenhar papel significativo na detoxificação de inseticidas organofosforados, piretroides e neonicotinoides (Anspaugh et al., 1995; Argentine et al., 1995; Valles, 1998). Com relação à função de esterases na metabolização de espiroclorfenol, devido a esse acaricida ser um pró-acaricida, ele precisa ser ativado por enzimas para atuar sobre o organismo, e as esterases são as enzimas que desempenham esse papel (Rauch e Nauen, 2003). Esse acaricida, por si só, é capaz de induzir a atividade de esterases em ácaros para que possa atuar sobre o organismo, como foi observado neste trabalho para *B. yothersi*. No entanto, o aumento da atividade de esterases em ácaros expostos ao espiroclorfenol, em mistura com fosmeto ou imidacloprido, não correspondeu à maior toxicidade desse acaricida. Possivelmente, o grupo de esterases que foi induzido não correspondeu ao grupo específico de esterases necessário para ativação de espiroclorfenol. O substrato utilizado na reação para quantificar esterases, o *p*-nitrofenil acetado, é um substrato de esterase geral, mas não necessariamente específico em termos de mimetização

da cadeia de acilação de espirodiclofeno (Van Leeuwen et al., 2005). Devido a isso, acredita-se que esse substrato não tenha sido o mais seletivo ou informativo para este experimento.

Os experimentos de pré-tratamento permitiram entender o perfil das enzimas nos ácaros ao longo do tempo. Esse resultado pode auxiliar na determinação do intervalo entre pulverizações de inseticidas e espirodiclofeno, a fim de reduzir os efeitos causados pelos inseticidas no controle proporcionado pelo acaricida. Com os ensaios de pré-tratamento, foi possível verificar que a ativação ou a inibição das enzimas de detoxificação foi dependente do inseticida e do tempo de exposição (Figuras 19, 20 e 21).

A atividade de mono-oxigenases foi induzida em ácaros expostos ao imidacloprido por seis, 12 e 48 horas. Apenas a exposição a imidacloprido por 24 horas não diferiu do controle. Fosmete induziu a atividade de mono-oxigenases apenas quando os ácaros ficaram expostos por 48 horas ao inseticida; nos demais tempos, a atividade foi semelhante ao controle. Cipermetrina, independentemente do tempo de exposição dos ácaros, não diferiu do controle. A atividade de esterases foi induzida independente do tempo de exposição a qualquer um dos inseticidas, exceto para fosmete, às 24 e 48 horas, e para imidacloprido às seis horas, os quais foram semelhantes ao controle. A atividade de GSTs foi induzida nos ácaros expostos à cipermetrina por 12 e 48 horas, enquanto às 24 horas a atividade foi reduzida.

Ácaros expostos ao fosmete por seis horas apresentaram menor atividade de GSTs; mas, quando expostos por 48 horas, a atividade quase dobrou, enquanto nos demais tempos não diferiu do controle. A atividade de GSTs em ácaros expostos ao imidacloprido foi semelhante ao controle apenas às 12 horas de exposição; e às seis e 24 horas a atividade foi reduzida, enquanto às 48 horas foi induzida. Ácaros expostos à mistura de espirodiclofeno e cipermetrina ou cipermetrina e, posteriormente, a espirodiclofeno apresentaram mortalidades semelhantes, no entanto, a exposição por 12 horas a esse inseticida e posterior ao acaricida apresentou a maior redução de toxicidade comparado aos ácaros expostos ao acaricida sem pré-tratamento com cipermetrina (Figura 19). Nesse mesmo tempo de exposição, foi observado que a atividade de GSTs foi superior a ácaros que não tiveram exposição a qualquer um dos inseticidas. Diante disso,

acredita-se que as GSTs tenham influenciado na resposta a espiroclorfenol devido ao pré-tratamento com cipermetrina. Van Pottelberge et al. (2009) observaram alta atividade de GST em uma população de *T. urticae* expostas ao espiroclorfenol; portanto, os autores acreditam que esse grupo de enzimas também possa estar envolvido no mecanismo de resistência desses ácaros a espiroclorfenol.

Glutathione-S-transferases são de uma família diversa de enzimas multifuncionais que aumentam a conjugação de sítios eletrofílicos de xenobióticos com o grupo tiol de glutathione reduzida (GSH), geralmente resultando em conjugados de GSH que são menos tóxicos, mais solúveis em água e mais excretáveis do que os substratos não conjugados com GSH. Aumento na produção de GST é associado à resistência a diversas classes de inseticidas (Prapanthadara et al., 1995; Vontas et al., 2001; Nordhus, 2005; Pavlidi et al., 2018). No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre esse grupo de enzimas em ácaros; portanto, mecanismos de resistência ligados a GSTs em ácaros são difíceis de elucidar (Stumpf e Nauen, 2002; Niu et al., 2011).

A exposição a fosmeto por seis horas e posterior a espiroclorfenol foi o único intervalo entre as pulverizações que diferiu da mistura entre espiroclorfenol e fosmeto, apresentando maior mortalidade do que a mistura e semelhante ao acaricida isolado. Na exposição por seis horas, foi observado redução na atividade de GST e não houve diferença na atividade de mono-oxigenases quando comparado ao controle, o que pode ter favorecido a ação de espiroclorfenol comparado à mistura. Às 48 horas de exposição, embora a atividade de GST e mono-oxigenases tenha sido superior ao controle, a mortalidade causada pelo acaricida ácaros não foi influenciada significativamente. Outra observação importante com relação ao ácaros expostos aos fosmeto é que a atividade de esterases foi semelhante ao controle. Esterases são um grande grupo de enzimas que são capazes de hidrolisar ligações éster na presença de água. Muitos inseticidas amplamente utilizados contêm ligações de éster, incluindo organofosforados, carbamatos, a maioria dos piretroides e outros compostos pertencentes a diferentes grupos químicos (por

exemplo, acequinocil, espiromesifeno, fluacripirim e bifenazato); portanto, eles são propensos à degradação por esterase (Montella et al., 2012).

A exposição de *B. yothersi* ao imidacloprido por seis e 12 horas influenciou negativamente o controle de espiroclorfenol. Esse efeito poderia ser explicado pelo aumento da atividade de mono-oxigenases em ambos os tratamentos. Embora estes tratamentos tenham sido diferentes da exposição a espiroclorfenol sem pré-tratamento com inseticidas, apenas a exposição por 12 horas a imidacloprido e posterior ao espiroclorfenol diferiu da mistura destes produtos, apresentando menor mortalidade do que a mistura. A diferença entre a mistura e os ácaros previamente tratados com o imidacloprido no tempo de exposição de 12 horas, é que a mistura favoreceu o aumento apenas de esterases, enquanto imidacloprido por 12 horas favoreceu o aumento de esterases e mono-oxigenases. Ainda, com relação ao pré-tratamento com o imidacloprido, embora a exposição por 48 horas a esse inseticida tenha resultado em aumento na atividade dos três grupos de enzimas, a mortalidade causada por espiroclorfenol não foi influenciada.

Como observado neste trabalho, a atividade das enzimas de detoxificação variou ao longo do tempo. Araújo (2018) verificou que a atividade de acetilcolinesterase em abelhas *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) expostas a fipronil e tiametoxam, isolados ou em mistura, foi decrescente ao longo do tempo (seis; 12; 24 e 48h); entretanto, inicialmente (uma hora) e ao final de 96 horas de exposição a esses produtos, houve um aumento na atividade dessa enzima. Nesse caso, a autora atribuiu tal resultado ao efeito tóxico provocado por esses inseticidas em abelhas. Van Pottelberge et al. (2008) também verificaram variação na atividade de mono-oxigenases ao longo do tempo, em uma população de *T. urticae* exposta a um indutor dessas enzimas, o barbitol. Esse resultado instigou uma pergunta sobre a atuação das enzimas nos períodos de exposição aos inseticidas estudados: como a exposição contínua a um inseticida aumenta e diminui a atividade dessas enzimas ao longo do tempo? A atividade de uma enzima que foi induzida por determinado produto, por exemplo, imidacloprido, pode permanecer alta durante um período e depois reduzir, mesmo quando o organismo está em contato direto com o indutor. Esse declínio pode ser explicado pela hipótese do retorno, no qual

a transcrição do gene que expressa aquela enzima é reprimida (Stevens et al., 2000). É possível que o indutor seja metabolizado pelas mesmas enzimas que ele induziu, suficientemente para reduzir sua concentração interna abaixo do ideal para indução completa (Van Pottelberge et al., 2008). A indução constitui uma adaptação temporária que permite ao organismo sobreviver à exposição de curto prazo ao estresse químico por meio da ativação da expressão do gene apenas quando necessário (Berenbaum e Zangerl, 1994).

Sumarizando os resultados obtidos nesta etapa do trabalho, a pulverização sequencial de espirodiclofeno e dos inseticidas cipermetrina, fosmete e imidacloprido pode favorecer o efeito tóxico de espirodiclofeno sobre *B. yothersi*; entretanto, o tempo de exposição a esses inseticidas pode influenciar positiva ou negativamente a posterior pulverização do acaricida. De acordo com os resultados de atividade de enzimas de detoxificação e a toxicidade de espirodiclofeno após diferentes tempos de exposição aos inseticidas, acredita-se que a pulverização isolada desses produtos seria uma forma de reduzir o efeito dos inseticidas sobre espirodiclofeno, e o intervalo de 24 horas entre a pulverização de inseticidas e de espirodiclofeno proporcionaria melhores resultados de controle do ácaro da leprose.

5.4. Atividade de enzimas de detoxificação e efeito de inibidores em ácaros *Brevipalpus californicus* expostos a espirodiclofeno, fosmete e imidacloprido, isolados e misturados

Visto que o efeito tóxico de agrotóxicos e o mecanismo fisiológico podem variar, dependendo das características da população de artrópodes (Ahmad, 2004), os objetivos dos experimentos realizados com *B. californicus* foram analisar o efeito da mistura de espirodiclofeno a fosmete ou imidacloprido sobre os ácaros e estudar o papel das enzimas, esterases, GSTs e mono-oxigenases, na detoxificação metabólica do acaricida e de inseticidas por meio da mensuração da atividade de enzimas de detoxificação e de inibidores dessas enzimas.

Nos ensaios toxicológicos, foi utilizada uma concentração de espirodiclofeno que causou baixa mortalidade (CL₂₅) de *B. californicus*.

Observou-se que, para essa espécie de ácaro, apenas a mistura de espirodiclofeno com imidacloprido reduziu o controle do acaricida (Figura 18). A toxicidade da mistura de espirodiclofeno com fosmete foi semelhante ao acaricida isolado. Os inseticidas isolados não foram tóxicos a *B. californicus*.

Nos estudos com os inibidores de enzimas de detoxificação, butóxido de piperonila (PBO), S, S, S-tributil-fosforotritioato (DEF) e maleato de dietila (DEM) foram usados para inibir as mono-oxigenases, esterases e glutathione-S-transferases, respectivamente. Os resultados mostraram que PBO e DEF não sinergizaram ou antagonizaram a toxicidade do espirodiclofeno contra *B. californicus*, e DEM sinergizou a toxicidade de espirodiclofeno (Figura 22). Van Pottelberge et al. (2009) também constataram que o pré-tratamento de *T. urticae* com PBO e DEF não resultou em alterações na toxicidade do espirodiclofeno; porém, o DEM causou um efeito antagônico, sendo observado pelo aumento da CL₅₀.

Os inibidores de enzima de detoxificação não influenciaram a mortalidade de *B. californicus* expostos ao espirodiclofeno em mistura com fosmete. Embora essa combinação não tenha apresentado efeito antagônico na mortalidade dos ácaros, observou-se que houve indução da atividade das mono-oxigenases e redução na atividade das esterases (Tabela 20), o que já era esperado, uma vez que fosmete é um inibidor da acetilcolinesterase (IRAC, 2021). Por esse motivo, acredita-se que o uso de PBO não foi suficiente para sinergizar espirodiclofeno em mistura com fosmete. A exposição à mistura de espirodiclofeno com fosmete não alterou a atividade de GST. Para esta mistura, o resultado do pré-tratamento com inibidores não foi complementar aos resultados obtidos nos ensaios enzimáticos. Provavelmente, devido à mortalidade dos ácaros expostos a espirodiclofeno em mistura com fosmete sem inibidores ter sido semelhante à mortalidade observada pelo acaricida isolado.

A toxicidade de espirodiclofeno em mistura com imidacloprido foi sinergizada por PBO. O aumento da mortalidade de ácaros, causado pela combinação de espirodiclofeno em mistura com imidacloprido, quando previamente exposto ao PBO, confirmou os resultados obtidos no ensaio enzimático, no qual um aumento na atividade da mono-oxigenase foi observado quando os ácaros foram expostos a esta combinação. Badieinia et al. (2020)

também observaram aumento na toxicidade de espirodiclofeno em uma população resistente de *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae), quando os ácaros foram previamente expostos a PBO. Em relação à DEF, esperava-se que a mortalidade dos ácaros expostos a esse sinergista fosse reduzida em posterior contato com espirodiclofeno em mistura com imidacloprido, uma vez que DEF inibe a atividade das esterases, e esse grupo de enzimas é importante na ativação do espirodiclofeno. Semelhantemente ao ocorrido para *B. yothersi*, acredita-se que o substrato *p*-nitrofenil acetato não tenha sido o substrato mais seletivo ou informativo para este ensaio, uma vez que o DEF não foi capaz de sinergizar espirodiclofeno em mistura com imidacloprido. Diferenças na sensibilidade das carboxilesterases (classe das esterases) já foram relatadas e provavelmente refletem a acessibilidade do inibidor ao centro ativo (Healy et al., 1991). Outra possível razão é que os bioensaios com inibidores da enzima de detoxificação nem sempre corroboram o mecanismo de metabolização dos agrotóxicos (Sanchez-Arroyo et al., 2001).

Glutathione-S-transferase também foi uma enzima importante na resposta da mortalidade dos ácaros expostos ao espirodiclofeno em mistura com imidacloprido, uma vez que o pré-tratamento com DEM e posterior contato com essa mistura apresentaram mortalidade maior do que a mistura sem o inibidor. Entretanto, a mistura de espirodiclofeno com imidacloprido continuou apresentando efeito antagônico em comparação com o acaricida isolado. A detoxificação de inseticidas neonicotinoides tem uma correlação positiva com um aumento na atividade de GST e mono-oxigenases (Zhao et al., 2000; Tiwari et al., 2011; Yang et al., 2016; Badieinia et al., 2020), o que é congruente com resultados obtidos para *B. californicus*. Em ácaros tetraniquídeos, foi demonstrado que as enzimas de detoxificação, como as mono-oxigenases, estão envolvidas na resistência ao espirodiclofeno, enquanto as esterases estão, provavelmente, envolvidas no sequestro de espirodiclofeno (Kramer e Nauen, 2011; Demaeght et al., 2013; Bajda et al., 2015; Wei et al., 2019).

Os resultados observados neste trabalho indicaram que a exposição de *B. californicus* a fosmete e imidacloprido, isolado ou em mistura com espirodiclofeno, altera a atividade das enzimas de detoxificação. Os três grupos de enzimas, mono-oxigenases, esterases e GSTs demonstraram forte influência

na resposta de mortalidade dos ácaros quando expostos à combinação espiroclorfenol em mistura com imidacloprido, corroborando estudos anteriores que verificaram a influência desses grupos de enzimas na eficácia de controle do espiroclorfenol contra ácaros (Rauch e Nauen, 2003; Van Pottelberge et al., 2009; Badieinia et al., 2020). A adição de fosmete à calda de espiroclorfenol não interferiu no controle proporcionado pelo acaricida no controle de *B. californicus*. A estimativa da atividade de enzimas detoxificadoras, relacionadas à defesa, fornece informações sobre o grau de tolerância que as populações de ácaros-praga podem exibir aos agrotóxicos e podem ser ferramentas úteis para monitorar a suscetibilidade das pragas a esses produtos e, assim, melhorar o manejo desses ácaros-praga.

Os métodos utilizados neste trabalho, bem como a caracterização de enzimas de detoxificação em ácaros *Brevipalpus* são inéditos. Esses resultados auxiliarão em trabalhos futuros para estudo do efeito de agrotóxicos sobre esses ácaros e auxiliarão no entendimento de como esse efeito pode influenciar no manejo do ácaro da leprose. Além disso, as informações fornecidas neste trabalho, sobre o mecanismo fisiológico de ácaros *Brevipalpus*, podem ajudar a avaliar o risco de seleção de populações resistentes a acaricidas.

6. CONCLUSÕES

- Os inseticidas cipermetrina, fosmete e imidacloprido antagonizam espiroclorfenol sobre ovos e adultos de *B. yothersi*.
- A fertilidade de ovos de *B. yothersi* é reduzida apenas quando os ácaros são expostos a 3,5 mg.L⁻¹ de espiroclorfenol.
- Em laboratório, cipermetrina e imidacloprido isolado ou em mistura com espiroclorfenol não interferem na fecundidade e na fertilidade de *B. yothersi*.
- Algumas concentrações de fosmete reduzem a fecundidade de *B. yothersi*; porém, a mistura desse inseticida com espiroclorfenol não altera a fecundidade.
- Em casa de vegetação, determinadas concentrações de fosmete (250; 125 e 31,2 mg.L⁻¹), espiroclorfenol (0,9 e 0,4 mg.L⁻¹) e de imidacloprido (40,0 mg.L⁻¹) reduzem a população de *B. yothersi*. No entanto, a mistura de espiroclorfenol com fosmete, na dose de 0,2 + 31,2 mg.L⁻¹, favorece o aumento da população.
- A exposição de *B. yothersi* a qualquer um dos produtos, isolados ou em mistura, reduz a duração de cada estágio de desenvolvimento dos ácaros.
- Os parâmetros de tabela de vida, TPOP, longevidade total, dias de oviposição e fecundidade, também foram afetados quando os ácaros foram expostos aos produtos isolados e em mistura.
- A alteração nos parâmetros demográficos é dependente do produto a que os ácaros são expostos.
- Em campo, a adição dos inseticidas à calda de espiroclorfenol aumenta o tempo para reduzir a população de *B. yothersi* e reduz o período de reinfestação do ácaro.
- Não há redução no teor de espiroclorfenol quando inseticidas são adicionados à calda do acaricida.
- A atividade de enzimas de detoxificação foi dependente do inseticida ou de mistura e do tempo de exposição.
- A pulverização isolada desses produtos é uma forma de reduzir o efeito dos inseticidas sobre espiroclorfenol, e o intervalo de 24 horas entre a

pulverização de inseticidas e de espirodiclofeno proporciona melhores resultados de controle do ácaro da leprose.

- Imidacloprido antagoniza espirodiclofeno e promove redução no controle de *B. californicus*, enquanto fosmete não altera a toxicidade.
- A exposição de *B. californicus* a fosmete e imidacloprido, isolado ou em mistura com espirodiclofeno, altera a atividade das enzimas de detoxificação.
- O uso de inibidores de enzima de detoxificação auxilia no entendimento da função das enzimas na resposta toxicológica de *B. californicus* a espirodiclofeno, em mistura com fosmete e imidacloprido.

7. REFERÊNCIAS

- Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of insecticide. **Journal of Economic Entomology** 18:265-267.
- Abou-Donia MB (2014) Metabolism and toxicokinetics of xenobiotics, In: Derelanko MJ, Auletta CS (Eds.) **Handbook of toxicology**. CRC Press, 17, p. 618-658.
- Adesanya AW, Beauchamp MJ, Lavine MD, Lavine LC, Zhu A, Walsh DB (2019) Physiological resistance alters behavioral response of *Tetranychus urticae* to acaricides. **Scientific Reports** 9:19308.
- Agrofit - **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- Ahmad M (2004) Potentiation/antagonism of deltamethrin and cypermethrins with organophosphate insecticides in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 80: 31-42.
- Ahmad M (2008) Potentiation between pyrethroid and organophosphate insecticides in resistant field populations of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 91:24–31.
- Ahmad M (2009) Observed potentiation between pyrethroid and organophosphorus insecticides for the management of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection** 28:264–268.
- Ako M, Borgemeister C, Poehling HM, Elbert A, Nauen A (2004) Effects of neonicotinoid insecticides on the bionomics of twospotted spider mite (Acari:Tetranychidae). **Ecotoxicology** 97:1587-1594.
- Ako M, Poehling HM, Borgemeister C, Nauen R (2006) Effect of imidacloprid on the reproduction of acaricide-resistant susceptible strains of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Pest Management Science** 62:419-424.
- Albuquerque FA, Oliveira CAL, Barreto M (1997) Estudos da relação entre as incidências de verrugose da laranja-doce e leprose dos citros em frutos de laranja Pera. **Científica** 25:393-402.
- Alves EB, Casarin NFB, Omoto C (2018) Lethal and sublethal effects of pesticides used in Brazilian citrus groves on *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). **Arquivo do Instituto Biológico** 85:1-8.

- Amaral I, Melville CC, Rocha CM, Della Vechia JF, Prado TJ, Andrade DJ (2019) Sublethal effects of spiroadiclofen on biological and demographic parameters of the citrus leprosis mite *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae). **Pest Management Science** 76:1874–1880.
- Amenya DA, Naguran R, Lo TCM, Ranson H, Spillings BL, Wood OR, Brooke BD, Coetzee M, Koekemoer LL (2008) Over expression of a cytochrome p450 (CYP6P9) in a major African malaria vector, *Anopheles funestus*, resistant to pyrethroids. **Insect Molecular Biology** 17:19-25.
- Andrade DJ, Ferreira MC, Fenólio LG (2013) Compatibilidade entre acaricidas e fertilizantes foliares em função de diferentes águas no controle do ácaro da leprose dos citros *Brevipalpus phoenicis*. **Revista Brasileira de Fruticultura** 35:39-50.
- Andrade DJ, Ferreira MC, Santos NC (2010) Efeito da adição de óleos ao acaricida cyhexatin sobre o ácaro *Brevipalpus phoenicis* e na retenção de calda por folhas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura** 32:1055-1063.
- Andrade DJ, Lorençon JR, Siqueira DS, Novelli VM, Bassanezi RB (2018) Space-time variability of citrus leprosis as strategic planning for crop management. **Pest Management Science** 74: 1798-1803.
- Andrade DJ, Oliveira CAL, Pattaro FC, Siqueira DS (2010) Acaricidas utilizados na citricultura convencional e orgânica: manejo da leprose e populações de ácaros fitoseídeos. **Revista Brasileira de Fruticultura** 32:1028-1037.
- Andrade TLC (1997) **Ação acaricida do hexythiazox, dicofol e óxido de fenbutatin, em três níveis de pH da calda**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Unesp, Jaboticabal.
- Anspaugh DD, Kennedy GG, Roe RM (1995) Purification and characterization of a resistance-associated esterase from the Colorado potato beetle, *Leptino tarsi decemlineata* (Say). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 53:84-96.
- Araújo JF (2018) **Efeitos isolados e combinados dos inseticidas fipronil e tiametoxam para a abelha brasileira *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae)**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – UFScar, Araras.
- Arena GD, Ramos-González PL, Nunes MA (2016) *Citrus leprosis virus C* infection results in hypersensitive-like response, suppression of the JA/ET plant defense pathway and promotion of the colonization of its mite vector. **Frontiers Plant Science** 7:1757.
- Argentine JA, Lee SH, Sos MA, Barry SR, Clark JM (1995) Permethrin resistance in a near isogenic strain of Colorado potato beetle. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 53:97-115.

- Arrese EL, Soulages JL (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology** 55:207–225.
- Associação brasileira de normas técnicas. NBR 14029: **Agrotóxicos e afins – validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro, 2016.
- Attique MNR, Khaliq A, Sayyed AH (2006) Could resistance to insecticides in *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae) be overcome by insecticide mixtures? **Journal of Applied Entomology** 130:122-127.
- Ay R, Kara FE (2011) Toxicity, inheritance of fenpyroximate resistance, and detoxification-enzyme levels in a laboratory-selected fenpyroximate-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), **Crop Protection** 30:605-10.
- Badieinia F, Khajehali J, Nauen R, Dermauw W, Van Leeuwen T. (2020) Metabolic mechanisms of resistance to spiroticlofen and spiromesifen in Iranian populations of *Panonychus ulmi*. **Crop Protection** 134:1-6.
- Bajda S, Dermauw W, Greenhalgh R, Nauen R, Tirry L, Clark RM, Van Leeuwen T (2015) Transcriptome profiling of a spiroticlofen susceptible and resistant strain of the European red mite *Panonychus ulmi* using strand-specific RNA-seq. **BMC Genomics** 16:974.
- Baker EA, Hayes AL, Butler RC (1992) Physicochemical properties of agrochemicals: their effects on foliar penetration. **Pesticide Science** 34:167–182.
- Bassanezi RB, Lopes SA, Miranda MP, Wulff NA, Volpe HXL, Ayres AJ (2020) Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Tropical Plant Pathology** 45:251–264.
- Bastianel M, Novelli VM, Kitajima EW, Kubo KS, Bassanezi RB, Machado MA, Freitas-Astua J (2010) Citrus leprosis: centennial of an unusual mite virus pathosystem. **Plant Disease** 94:284-292.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. **Journal of Statistical Software** 67:1-48.
- Beard JJ, Ochoa R, Braswell WE, Bauchan GR (2015) *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex (Acari: Tenuipalpidae) - a closer look. **Zootaxa** 3944:1-67.
- Belasque-Jr J, Yamamoto PT, Miranda MP, Bassanezi RB, Ayres AJ, Bové JM (2010) Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology** 31:53–64.
- Bendis RJ, Relyea RA (2014) Living on the edge: Populations of two zooplankton species living closer to agricultural fields are more resistant to a common insecticide: Spatial variation in pesticide resistance. **Environmental Toxicology and Chemistry** 33:2835–2841.

- Berenbaum MR, Zangerl AR (1994) Costs of inducible defense: protein limitation, growth and detoxification in parsnip webworms. **Ecology** 75:2311–2317.
- Bernard CB, Philogène BJ (1993) Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. **Journal of Toxicology Environmental Health** 38:199–223.
- Boyland E, Chasseaud LF (1970) The effect of some carbonyl compounds on rat liver glutathione levels. **Biochemical Pharmacology** 19:1526–1528.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254.
- Brasil 2017: Portaria nº 148, de 26 de dezembro de 2017. Estabelecer critérios e procedimentos a serem adotados para recomendação de mistura em tanque de agrotóxicos e afins e sua prescrição em receituário agrônomo. Diário Oficial da União. 28 de dezembro de 2017. Visited on 23 nov. 2018. Seção 1.
- Brasil. 2006: Ministério da Saúde. Metodologia para quantificação de atividades de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Brasília: Ministério da Saúde, 128 p.: il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- Brogdon WG, Mcallister JC, Vulule J (1997) Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. **Journal of American Mosquito Control Association** 13:233-237.
- Buters JTM, Schiller CD, Chou RC (1993) A highly sensitive tool for the assay of cytochrome P450 enzyme activity in rat, dog and man. **Biochemistry Pharmacology** 46:1577–1584.
- Campos F, Omoto C (2002) Resistance to hexythiazox in *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) from Brazilian citrus. **Experimental and Applied Acarology** 26:243-251.
- Carvalho GFG, Ferreira MC, Lorençon JR, Sakomura J (2014) Mite control in orange fruit after spraying acaricides in mixture with leaf fertilizers. **Aspects of Applied Biology** 122:437–440.
- Casarin NFB (2010) **Calda sulfocálcica em pomares de citros: evolução da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) e impacto sobre *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae)**. 95f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Esalq, Piracicaba.
- Casida JE (1970) Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 18:753–772.

- Castagnoli M, Liguori M, Simoni S, Duso C (2005) Toxicity of some insecticides to *Tetranychus urticae*, *Neoseiulus californicus* and *Tydeus californicus*. **Biocontrol** 50:611–622.
- Che-Mendoza A, Penilla R, Rodríguez D (2009) Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. **African Journal of Biotechnology** 8:1386–1397.
- Chen GM, Chi H, Wang RC, Wang YP, Xu YY, Li XD, Yin P, Zheng F-Q (2018) Demography and uncertainty of population growth of *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae) reared on five host plants with discussion on some life history statistics. **Journal of Economic Entomology** 111:2143-2152.
- Cheon GS, Paik CH, Lee GH, Kim SS (2007) Toxicity of spiroticlofen to the predatory mite, *Amblyseius womersleyi* (Acari: Phytoseiidae), and its prey, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Entomology Science** 42:44–51.
- Chi H (1988) Life-table analysis incorporating both sexes and variable development rates among individuals. **Environmental Entomology** 17:26-34.
- Chi H (2020) TWSEX-MSCHART: A computer program for the age-stage two-sex life table analysis. Disponível em: <<http://140.120.197.173/ecology/Download/TWSEXMSChart.rar>>. Acesso em: 3 dez. 2020.
- Chi H, Liu H (1985) Two new methods for the study of insect population ecology. **Bulletin of the Institute Zoology Academia Sinica** 24:225-240.
- Chi H, Su HY (2006) Age-stage, two-sex life tables of *Aphidius gifuensis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and its host *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) with mathematical proof of the relationship between female fecundity and the net reproductive rate. **Environmental Entomology** 35:10-21.
- Chiavegato LG (1986) Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 15:17-22.
- Chiavegato LG; Kharfan PR (1993) Comportamento do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (G.) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 22:355-359.
- Childers CC, Derrick KS (2003) *Brevipalpus* mites of unassigned rhabdovirus in various crops. **Experimental and Applied Acarology** 30:1-3.
- Childers CC, Rodrigues JCV, Welbourn WC (2003) Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. **Experimental and Applied Acarology** 30:29-105.

- Cloyd RA (2011) Pesticide mixtures. In M. Stoytcheva (Eds.) **Pesticides Formulations, Effects, Fate**. InTech: Croatia, p. 69-80.
- Cohen E (2006) Pesticide-mediated homeostatic modulation in arthropods. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 85:21–27.
- Cook G, Kirkman W, Clase R, Steyn C, Basson E, Fourie PH, Moore SD, Grout TG, Carstens E, Hattingh V (2019) *Orchid fleck virus* associated with the first case of citrus leprosis-N in South Africa. **European Journal of Plant Pathology** 155:1373–1379.
- Corbett JR (1974) **The biochemical mode of action of pesticides**. Academic Press, New York, NY.
- Cordeiro EMG, de Moura ILT, Fadini MAM and Guedes RNC (2013) Beyond selectivity: are behavioral avoidance and hormesis likely causes of pyrethroid-induced outbreaks of the southern red mite *Olygonychus ilicis*? **Chemosphere** 93:1111–1116.
- Correia MA, O de Montellano PR (2005). **Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry** p. 247–322.
- Costa APM (2019) **Mecanismos intraespecíficos associados ao aumento populacional de *Brevipalpus yothersi* Baker (Prostigmata: Tenuipalpidae) e *Panonychus citri* (McGregor) (Trombidiformes: Tetranychidae) após aplicação de inseticidas em citros**. 38 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Fundecitrus, Araraquara.
- Costa CJ, Garcia MF, Ferragut F, Laborda R, Roca D, Marzal C (1988) Residual influence of the insecticides butocarboxim, cypermethrin and azinphos-methyl on the biotic potential of *Panonychus citri* (McGr.) (Acari: Tetranychidae), **Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas** 14:127–140.
- Cruz-Jaramillo JL, Ruiz-Medrano R, Rojas-Morales L, López-Buenfil JA, Morales-Galván O, Chavarín-Palacio C, Ramírez-Pool JA, Cázares-Xoconostle B (2014) Characterization of a proposed dichorhavirus associated with the citrus leprosis disease and analysis of the host response. **Viruses** 6:2602–2622.
- Cutler GC (2013) Insects, insecticides and hormesis: evidence and considerations for study. **Dose–Response** 11:154–177.
- De Carli LF, Miranda MP, Volpe HXL, Zanardi OZ, Vizoni MC, Martini FM, Lopes JAP (2018) Leaf age affects the efficacy of insecticides to control Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Applied Entomology** 142:689–695.
- Della Vechia JF, Bassanezi RB, Andrade DJ (2019) Physicochemical and biological compatibility of insecticide mixtures with acaricide in the management of *Brevipalpus yothersi*. **Systematic and Applied Acarology** 24:455-1464.

- Della Vechia JF, Ferreira MC, Andrade DJ (2018) Interaction of spirodiclofen with insecticides for the control of *Brevipalpus yotheri* in citrus. **Pest Management Science** 74:2.438-2.443.
- DeLuca JG, Dysart GR, Rasnick D, Bradley MO (1988) A direct, highly sensitive assay for cytochrome P-450 catalyzed O-deethylation using a novel coumarin analog. **Biochemistry Pharmacology** 37:1731–1739.
- Demaeght P, Dermauw W, Tsakireli D, Khajehali J, Nauen R, Tirry L, Vontas J, Lummen P, Van Leeuwen T (2013) Molecular analysis of resistance to acaricidal spirocyclic tetrone acids in *Tetranychus urticae*: CYP392E10 metabolizes spirodiclofen, but not its corresponding enol. **Insect Biochemistry Molecular Biology** 43:544–54.
- Demétrio CGB, Hinde J, Moral RA (2014) Models for over dispersed data in entomology. In: Ferreira, C.P., Godoy, W.A.C. (Eds.). **Ecological modelling applied to entomology**. Switzerland: Springer. p. 219–259.
- Dermauw W, Van Leeuwen T (2014) The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 45:89-110.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52:81–106.
- Dittrich V, Streibert P, Bathe PA (1974) An old case reopened: mite stimulation by insecticide residues. **Environmental Entomology** 3:534-540.
- Dominguez F.S, Bernal A, Childers CC, Kitajima EW (2001) First report of *Citrus leprosis virus* in Panama. **Plant Disease** 85:228–228.
- Ebeling W (1963) The factors that influence the rate of disappearance of residues. In: Ebeling W (Ed.) **Analysis of the basic process involved in the deposition, degradation, persistence, and effectiveness of pesticides**, p. 126-135.
- Efron B, Tibshirani RJA (1993) **An introduction to the bootstrap**. London: Springer.
- Feyereisen R (2015) Insect P450 inhibitors and insecticides: Challenges and opportunities. **Pest Management Science** 71:793–800.
- Feyereisen R, Langry KC, Ortiz de Montellano PR (1984) Self-catalyzed destruction of insect cytochrome P450. **Insect Biochemistry** 14:19–26
- Finney DJ (1971) **Probit analysis**. Cambridge University Press, 333 p.
- Franco CR (2002) **Deteção e caracterização da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) a acaricida propargite**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Esalq, Piracicaba.

- Freitas-Astúa J, Ramos-González PL, Arena GD, Tassi, AD, Kitajima EW (2018) *Brevipalpus*-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? **Current Opinion on Virology** 33: 66–73.
- Fujioka K, Casida JE (2007) Glutathione-S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. **Chemical Research in Toxicology** 20:1211–1217.
- Gabre RA, Adham FK, Chi H (2005) Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **Acta Oecologica** 27:179-183.
- García-Escamilla P, Duran-Trujillo Y, Otero-Colina G, Valdovinos-Ponce G, Santillán-Galicia MT, OrtizGarcía CF, Velázquez-Monreal JJ, Sánchez-Soto S (2018) Transmission of viruses associated with cytoplasmic and nuclear leprosis symptoms by *Brevipalpus yothersi* and *B. californicus*. **Tropical Plant Pathology** 43:69–77.
- Gazziero DLP (2015) Mistura de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta Daninha** 33:83-92.
- Godman D (1982) Optimal life histories, optimal notation, and the value of reproductive value. **The American Naturalist** 119:803-823.
- Guedes RN, Cutler GC (2013) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. **Pest Management Science** 70:690-697.
- Gul H, Ullah F, Biondi A, Desneux N, Qian D, Gao X, Song D (2019) Resistance against clothianidin and associated fitness costs in the chive maggot, *Bradysia odoriphaga*. **Entomologia Generalis** 39:81–92.
- Habig WH, Jakoby WB (1981) Glutathione-S-transferases (rat and human), assays for differentiation of glutathione-S-transferases. In: Jakoby, W.B. (Ed.) Methods in enzymology, detoxification and drug metabolism: conjugation and related systems. Academic Press, New York, pp 398–405.
- Haynes KF (1988) Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Annual Review of Entomology** 33:149-168.
- Healy JM, Dumancic MM, Oakeshott JG (1991) Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics** 29:365–388.
- Henderson CF, Tilton EW (1955) Tests with acaricides against the brow wheat mite. **Journal of Economic Entomology** 48:157–161.
- Hodgson E (2012) Biotransformation (metabolism) of Pesticides, In: Hodgson E (Ed.) **Pesticide biotransformation and Disposition**. Elsevier Inc., pp. 73–116.

- Holland JM, Chapman RB, (1993) A comparison of the toxic and sub-lethal effects of fluvalinate and esfenvalerate on the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). **Experimental & Applied Acarology** 18:3–22.
- Huang YB, Chi H (2011) The age-stage, two-sex life table with an offspring sex ratio dependent on female age. **Journal of Agriculture and Forestry** 60:337–345.
- Huang YB, Chi H (2012) Age-stage, two-sex life tables of *Bactrocera curcubitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) with a discussion on the problem of applying female age-specific life tables to insect populations. **Insect Science** 19:263–273.
- IBGE – **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- Ikeda FS (2013) Resistência de plantas daninhas em soja resistente ao glifosato. **Informe Agropecuário** 34:58–65.
- IRAC International Insecticide Mixture. Insecticide Resistance Action Committee. Disponível em: <http://www.iraonline.org/content/uploads/IRAC_MixtureStatement_v1.0_10Sep12.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- James DG, Price TS (2002) Fecundity of twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) is increased by direct and systemic exposure to imidacloprid. **Journal of Economic Entomology** 27:151–156.
- Jeger M et al. (2017) Pest categorisation of citrus leprosis viruses. **EFSA Journal** 15: 5110.
- Johnson RM (2015) Honeybee toxicology. **Annual of Review Entomology** 60:22.1–22.20.
- Khajehali J et al. (2010) Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. **Pest Management Science** 66 220–228.
- Kitajima EW, Chagas CM, Rodrigues JCV. (2003) *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology** 30:135–60.
- Kitajima EW, Mülle RGW, Costa AS, Yuki W (1972) Short, rod-like particles associated with Citrus leprosis. **Virology** 50:254–8.
- Kitajima EW, Novelli VM, Alberti G (2014) Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae) - economically important plant-virus vectors-part 1: an update on the biology and economical importance of *Brevipalpus* mites. **Zoologica** 160:1–10.

- Kliot A, Ghanim M (2012) Fitness costs associated with insecticide resistance. **Pest Management Science** 68:1431–1437.
- Kramer T, Nauen R (2011) Monitoring of spirotetramat susceptibility in field populations of European red mites, *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae), and the cross-resistance pattern of a laboratory-selected strain. **Pest Management Science** 67:1.285-1.293.
- Kulkarni AP, Hodgson E (1980) Metabolism of insecticides by mixed function oxidase systems. **Pharmacology and Therapeutics** 8:379-475.
- Leigh TF, Wynholds PF (1980) Organophosphorus insecticides stimulated egg laying of mites reared on the treated cotton plants. **California Agriculture** 34 14–15.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR (2007) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology** 52:231-253.
- Li YY, Fan X, Zhang GH, Liu YQ, Chen HQ, Liu H, Wang JJ (2017) Sublethal effects of bifenazate on life history and population parameters of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Systematic and Applied Acarology** 22:148–158.
- Lichiheb N, Personne E, Carole B, Van den Berg F, Barriuso E (2016) Implementation of the effects of physicochemical properties on the foliar penetration of pesticides and its potential for estimating pesticide volatilization from plants. **Science of the Total Environment** 550:1022–1031.
- Lindquist R (2002) Tank-mixed pesticides offer benefits, disadvantages. **Greenhouse Business** 8: 25-29.
- Liu XC, Li QS, Liu QX (1998) The effects of insecticides on disposal behavior and fecundity of carmine spider mite. **Acta Phytophylacica Sinica** 25:156–160.
- Lümmen P, Khajehali J, Luther K, Van Leeuwen T (2014) The cyclic keto-enol insecticide spirotetramat inhibits insect and spider mite acetyl-CoA carboxylases by interfering with the carboxyltransferase partial reaction. **Insect Biochemistry Molecular Biology** 55:1-8.
- Marcic D (2003) The effects of clofentezine on life-table parameters in two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology** 30:249–263.
- Marcic D, Ogurlic I, Mutavdzic S, Peric P (2010) The effects of spiromesifen on life history traits and population growth of two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology** 50:255–267.
- Marer PJ, Flint ML, Stimmann MW (1988) **The Safe and Effective Use of Pesticides**. University of California Publication 3324, 387 p.

- Martin T, Ochou OG, Vaissayre M, Fournier D (2003) Organophosphorus insecticides synergize pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. **Journal of Economic Entomology** 96: 468-474.
- Matsumura F (1985) **Toxicology of Insecticides**, p. 203–298, Springer US.
- Mineiro JLC, Sato ME, Novelli VM, Andrade DJ (2015) Distribuição de *Brevipalpus yothersi* Baker, 1949 (Acari: Tenuipalpidae) em diferentes hospedeiras e localidades no Estado de São Paulo. In.: **Reunião Anual Do Instituto Biológico**. Resumos... São Paulo: O Biológico 77:84.
- Miranda MP, Volpe HXL, Veiga ACP, Zanardi OZ, Bassanezi RB, Andrade DJ, Carmo-Sousa M (2017) Manejo de insetos e ácaros vetores fitopatógenos nos citros. **Informe Agropecuário** 38:1-25.
- Montella IR, Schama R, Valle D (2012) The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A Review. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 107, 437-449.
- Moraes GJ, Flechtmann CHW (2008) **Manual de acarologia: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil**. Holos: Ribeirão Preto.
- Morales-Rodriguez A, Peck DC (2009) Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*. **Biological Control** 51:169–180.
- Morales-Rodriguez A, Warnner KW (2015) Efficacy of thiamethoxam and fipronil, applied alone and in combination, to control *Limonius californicus* and *Hypnoidus bicolor* (Coleoptera: Elateridae). **Pest Management Science** 7:584–591.
- Mozes-Koch R, Slabezki Y, Efrat H, Kamer Y, Yakobson BA, Dag A (2000) First detection of fluvinate resistance in the *Varroa* mite using bioassay and biochemical methods. **Experimental and Applied Acarology** 24:35–43.
- Mullins JW (1993) Imidacloprid: a new nitroguanidine insecticide. **Journal of the American Chemical Society** 524:183–198.
- Nauen R (2005) Spirodiclofen: mode of action and resistance risk assessment in tetranychid pest mites. **Pesticide Science** 30:272–274.
- Nauen R, Stumpf N, Elbert A, Zebitz CPW, Kraus W (2001) Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). **Pest Management Science** 57: 253-261.
- Navia D, Mendonça RS, Ferragut F, Miranda LC, Trincado RC, Michaux J, Navajas M (2013) Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). **Zoologica Script** 42:406–426.

- Nelder JA, Wedderburn RWM (1972) Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society** 135:370–384.
- Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F, Kalaki R (2011) **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia. 71 p.
- Niu JZ, Liu GY, Dou W, Wang JJ (2011) Susceptibility and activity of glutathione S-transferases in nine field populations of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) to pyridaben and azocyclotin. *Florida Entomology* 94:321–329.
- Nordhus EGM (2005) **Molecular methots in apecies identification of *Liriomyza* spp. and the study of insecticide resistance in *Liriomyza* spp., *Bemisia tabacia* and *Myzus persicae***. PhD. Scientiarum Thesis. Norwegian University of Life Sciences, University of miljø – biovitenskap.
- Oliveira, C.A.L., Pattaro FC (2008) Citros: manejo de ácaros fitófagos na cultura. In: Yamamoto, P.T. (Org.). **Manejo integrado de pragas dos citros**. Piracicaba: ESALQ/USP. p. 81–125.
- Omoto C, Alves EB, Ribeiro PC (2000) Detecção e monitoramento da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) ao dicofol. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 29:757-764.
- Pavlidis N, Vontas J, Van Leeuwen T (2018) The role of glutathione-S-transferase (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. **Current Opinion in Insect Science** 27:97-102.
- Petter FA, Segate D, Almeida FA, Alcântara Neto F, Pacheco LP (2013) Incompatibilidade física de misturas entre inseticidas e fungicidas. **Comunicata Scientiae** 4:129-138.
- Petter FA, Segate D, Pacheco LP, Almeida FA, Alcântara Neto F (2012) Incompatibilidade física de misturas entre herbicidas e inseticidas. **Planta Daninha** 30:449-457.
- Phillips PA, Machlitt D, Mead M (1987) Non-target effects of dimethoate and acephate against *Euseius tularensis* Cogdon and *Aphytis melinus* De Bach on lemons in California. **Crop Protection** 6:388–392.
- Plapp FW, Bigley WS, Chapmen GA, Eddy GW (1963) Synergism of malathion against resistant house flies and mosquitoes. **Journal of Economic Entomology** 56:643–649.
- Prado EP, Araújo D, Raetano CG, Dal Pogetto MHFA, Aguiar-Júnior HO, Christovam RS (2011) Influência da dureza e potencial hidrogeniônico da calda de pulverização sobre o controle do ácaro-da-leprose em frutos de laranja doce. **Bragantia** 70:389–396.

- Prapanthadara L, Hemingway J, Ketterman AJ (1995) DDT- resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera, Culicidae) from Zanzibar, based on insecticide DDT dehydrochlorinase activity of glutathione S-transferases. **Bulletin of Entomological Research** 85: 267- 74.
- R Development Core Team. 2018. R: **A language and environment for statistical computing**. Foundation for statistical computing, Vienna, Austria.
- Raff K, Priester T (1985) Synergists as research tools and control agents in agriculture. *Journal of Agricultural Entomology* 2, 27–45.
- Rahman MM, Farha W, Abd El-Aty AM, Kabir MH, Im SJ, Jung DI, Choi JH, Kim SW, Son YW, Kwon CH, Shin HC (2015) Dynamic behavior and residual pattern of thiamethoxam and its metabolite clothianidin in Swiss chard using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry** 174:248–255.
- Ramos-González PL, Chabi-Jesus C, Guerra-Peraza O, Breton MC, Arena GD, Nunes MA, Kitajima EW, Machado MA, Freitas-Astúa J (2016) Phylogenetic and molecular variability studies reveal a new genetic clade of *Citrus leprosis virus C*. **Viruses** 8:153.
- Ramos-González PL, et al. (2017) *Citrus leprosis virus N*: A new Dichorhavirus causing Citrus Leprosis disease. **Phytopathology** 107:963–976.
- Rauch N, Nauen R (2003) Spirodiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 74:91-101.
- Reffstrup TK, Larsen JC, Meyer O (2010) Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 56:174–192.
- Reis PR, Neto MP, Franco RA (2005) Controle de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) e *Oligonychus ilicis* (McGregor, 1917) (Acari: Tenuipalpidae, Tetranychidae) em cafeeiro e o impacto sobre ácaros benéficos. II – Spirodiclofen e Azocyclotin. **Ciência e Agrotecnologia** 29:528–537.
- Rocha CM, Della Vechia JF, Savi PJ, Omoto C, Andrade DJ (2021) Resistance to spirodiclofen in *Brevipalpus yotheri* from brazilian citrus groves detection, monitoring, and population performance. **Pest Management Science**, 1-8.
- Rodrigues JCV, Machado MA (1999) Notes on a probable respiratory apparatus in eggs of *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). **International Journal of Acarology** 25:231-234.
- Rossetti V, Colariccio A, Chagas CM, Sato ME, Raga A (1997) Leprose dos citros. **Boletim Técnico do Instituto Biológico** 6:5–27.

- Roy A, León MG, Stone AL, Schneider WL, Hartung JS, Brlansky RH (2014) First report of *Citrus leprosis virus* nuclear type in sweet Orange in Colombia. **Plant Disease** 98:1162–1162.
- Roy A, Stone A, Otero-Colina G, Gang WNC, Diann ALL, Nakhla KM, Hartung SJ, Schneider LW, Brlansky HR (2015) Identification and molecular characterization of nuclear *Citrus leprosis virus*, a member of the proposed Dichorhavirus genus infecting multiple Citrus species in Mexico. **Phytopathology** 105:564–575.
- Saber M, Ahmadi Z, Mahdavinia G (2018) Sublethal effects of spiroadiclofen, abamectin and pyridaben on life-history traits and life-table parameters of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology** 75:55–67.
- Saénz-de-Cabezón Irigaray FJ, Zalom FG (2006) Side effects of five new acaricides on the predator *Galendromus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology** 38:299–305.
- Saini RS, Cutkomp LK (1966) The effects of DDT and sublethal doses of dicofol on reproduction of the two-spotted spider mite. **Journal of Economic Entomology** 59:249–253.
- Sanchez-Arroyo H, Koehler PG, Valles SM (2001) Effects of the synergists piperonyl butoxide and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate on propoxure pharmacokinetics in *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology** 94: 1209–1216.
- Sánchez-Velázquez EJ, Santillán-Galicia MT, Novelli VM, Nunes MA, Mora-Aguilera G, Valdez-Carrasco JM, Otero-Colina G, Freitas-Astúa J (2015) Diversity and genetic variation among *Brevipalpus* populations from Brazil and Mexico. **PLoS ONE** 10:e0133861.
- Sancho E, Villarroel MJ, Andreu E, Ferrando MD (2009) Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. **Chemosphere** 74:1171–1178.
- SAS Institute (2015) SAS/IML® 14.1 **User`s Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Savi PJ, Moraes GJ, Melville CC and Andrade DJ (2019) Population performance of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) on African tomato varieties and wild tomato genotypes. **Experimental and Applied Acarology** 77:555-570.
- Shi L, Xu Z, Shen G, Song C, Wang Y, Peng J, Zhang J, He L (2015) Expression characteristics of two novel cytochrome P450 genes involved in fenpropathrin resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 119:33–41.
- Silva JF, Ferreira LR, Ferreira FA (2007) Herbicidas: absorção, translocação, metabolismo, formulação e misturas. In: Silva AA, Silva JF (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas** p. 118-154.

- Silva Júnior G, Behlau F, Miranda MP, Bassanezi RB, Andrade DJ (2021) **Guia de controle de pragas**. Fundecitrus: Brasil.
- Silva MZ, Sato ME, Oliveira CAL, Rais DS (2011) Toxicidade diferencial de agrotóxicos utilizados em citros para *Neoseiulus californicus*, *Euseius concordis* e *Brevipalpus phoenicis*. **Bragantia** 70:87-95.
- Snoeck S, Greenhalgh R, Tirry L, Clark RM, Van Leeuwen T, Dermauw W (2017) The effect of insecticide synergist treatment on genome-wide gene expression in a polyphagous pest. **Scientific Reports** 7:13440.
- Stark JD, Banks JE (2003) Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. **Annual Review of Entomology** 48:505-519.
- Steinbach D, Moritz G, Nauen R (2017) Fitness costs and life table parameters of highly insecticide resistant strains of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) at different temperatures. **Pest Management Science** 73:1789-1797.
- Stevens JL, Snyder MJ, Koener JF, Feyereisen R (2000) Inducible P450s of the CYP9 family from larval *Manduca sexta* midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 30:559–568.
- Stumpf N, Nauen R (2002) Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 72:111–121.
- Szczepaniec A, Creary SF, Laskowski KL, Nyrop JP and Raupp MJ (2011) Neonicotinoid insecticide imidacloprid causes outbreaks of spider mites on elm trees in urban landscapes. **PLoS ONE** 6:e20018.
- Tariq K, Noor M, Hori M, Ali A, Hussain A, Peng W, Chang C, Zhang H (2017) Blue light-induced immunosuppression in *Bactrocera dorsalis* adults, as a carryover effect of larval exposure. **Bulletin of Entomological Research** 107:734-741.
- Tariq K, Noor M, Saeed S, Zhang H (2015) The effect of ultraviolet-A radiation exposure on the reproductive ability, longevity, and development of the *Dialeurodes citri* (Homoptera: Aleyrodidae) F1 generation. **Environmental Entomology** 44:1614–1618.
- Tarwater OR (1984) Compatibility and tank-mix testing of pesticides, in Advances. In Scher HB (Ed.) **Pesticide Formulation Technology**, American Chemical Society, pp 231-241.
- Tassi AD, Garita-Salazar LC, Amorim L, Novelli VM, Freitas-Astua J, Childers CC, Kitajima EW (2017) Virus-vector relationship in the *Citrus leprosis* pathosystem. **Experimental and Applied Acarology** 71:227–241.
- Terrieri LC (1984) Induction of detoxification enzymes in insects. *Annual of Review Entomology* 29:71-88.

- Thompson HM (1996) Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. **Ecotoxicology** 5:59-81.
- Tiwari S, Mann RS, Rogers ME, Stelinski LL (2011) Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science** 67:1258–1268.
- Tornisiello VL, Botelho RG, De Toledo Alves, PA, Bonfleur EJ, Monteiro SH (2013) Pesticide tank mixes: an environmental point of view. In **Herbicides-Current Research and Case Studies in Use**. InTech. June.
- Tuan SJ, Lee CC, Chi H (2014) Population and damage projection of *Spodoptera litura* (F) on peanuts (*Arachis hypogaea* L) under different conditions using the age-stage, two-sex life table. **Pest Management Science** 70:805-813.
- Ullah F, Gul H, Desneux N, Said F, Gao X, Song D (2020) Fitness costs in chlorfenapyr-resistant populations of the chive maggot, *Bradysia odoriphaga*. **Ecotoxicology** 29, 407–416.
- Ullah F, Gul H, Tariq K, Desneux N, Gao X, Song D (2021) Acetamiprid resistance and fitness costs of melon aphid, *Aphis gossypii*: An age-stage, two-sex life table study. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 171:104729.
- USDA – **United States Department of Agriculture**. Disponível em: <<https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/w66343603?locale=en>>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- Valles SM (1998) Toxicological and biochemical studies with field populations of German cockroach, *Blattella germanica*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 62:190-200.
- Van Leeuwen T, Dermauw W (2016) Xenobiotic metabolism and resistance in chelicerate mites. **Annual of Review Entomology** 61:475-498.
- Van Leeuwen T, Van Pottelberge S, Nauen R, Tirry L (2007) Organophosphate insecticides and acaricides antagonise bifenazate toxicity through esterase inhibition in *Tetranychus urticae*. **Pest Management Science** 63:1172-1177.
- Van Leeuwen T, Van Pottelberge S, Tirry L (2005) Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. **Pest Management Science** 61:499-507.
- Van Pottelberge S, Van Leeuwen T, Khajehali J and Tirry L (2009) Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spiroticlofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Pest Management Science** 65: 358-66.

- Van Pottelberge S, Van Leeuwen T, Van Amermaet K, Tirry L (2008) Induction of cytochrome P450 monooxygenase activity in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and its influence on acaricide toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 91:128-133.
- Vieira JC (2019) **Influência de adjuvantes e fertilizantes foliares na eficácia de acaricidas para o controle do ácaro da leprose dos citros**. 41 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Fundecitrus, Araraquara.
- Vontas J, Small GJ, Hemingway J (2001) Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. **Biochemical Journal** 357: 65-72.
- Wachendorff U, Brück R, Elbert A, Fischer R, Nauen R, Stumpf N, Tiemann R (2000) BAJ 2740: A novel broad spectrum acaricide. **Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases** 2:53-58.
- Waterman KCEA (2008) **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development** - Regulations, Methodologies and Best Practices. Editora Springer 115-135.
- Wei P, Demaeght P, De Schutter K, Grigoraki L, Labropoulou V, Riga M, Vontas J, Nauen R, Dermauw W, Van Leeuwen T (2019). Overexpression of an alternative allele of carboxyl/choline esterase 4 (CCE04) of *Tetranychus urticae* is associated with high levels of resistance to the keto-enol acaricide spiroticlofen. **Pest Management Science** 76:1142-1153.
- Xu X, Strange JP, Welker DL, James RR. Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). **BMC Genomics** 14:874, 2013.
- Yang N, Xie W, Jones CM, Bass C, Jiao X, Yang X, Liu B, Li R, Zhang Y (2013) Transcriptome profiling of the whitefly *Bemisia tabaci* reveals stage-specific gene expression signatures for thiamethoxam resistance. **Insect Molecular Biology** 22:485e496.
- Yang X, He C, Xie W, Liu Y, Xia J, Yang Z, Guo L, Wen Y, Wang S, Wu Q (2016) Glutathione S-transferases are involved in thiamethoxam resistance in the field whitefly *Bemisia tabaci* Q (Hemiptera: Aleyrodidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 34:73-78.
- Yao J, Zhu YC, Adamczyk J, Luttrell R (2018) Influences of acephate and mixtures with other commonly used pesticides on honeybee (*Apis mellifera*) survival and detoxification enzyme activities. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology** 209:9–17.
- Yeoh CL, Kuwano E, Eto M (1982) Effects of the fungicide IBP as a synergist on the metabolism of malathion in insects. **Journal of Pesticide Science** 7:31–40.

- Zalom FG, Toscano NC, Byrne FJ (2005) Managing resistance is critical to future use of pyrethroids and neonicotinoids. **California Agriculture** 59:11-15.
- Zanardi OZ, Bordini GP, Franco AA, Morais MR, Yamamoto PT (2018) Spraying pyrethroid and neonicotinoid insecticides can induce outbreaks of *Panonychus citri* (Trombidiformes: Tetranychidae) in citrus groves. **Experimental and Applied Acarology** 76:339-354.
- Zera AJ, Denno RF (1997) Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. **Annual of Review Entomology** 42:207–230.
- Zhao JZ, Bishop BA, Grafius EJ (2000) Inheritance and synergism of resistance to imidacloprid in the *Colorado potato beetle* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology** 93:1508–1514.