



NATÁLIA APARECIDA FERREIRA OLIVEIRA

**ANESTESIA DE ADULTOS DE *Chrysoperla externa*
(NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) A BAIXAS
TEMPERATURAS**

LAVRAS – MG

2023

NATÁLIA APARECIDA FERREIRA OLIVEIRA

**ANESTESIA DE ADULTOS DE *Chrysoperla externa* (NEUROPTERA:
CHRYSOPIDAE) A BAIXAS TEMPERATURAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Agronomia, para a obtenção do
título de Bacharel.

Profa. Dra. Brígida de Souza

Orientadora

M.a Nívia Borges Palhari

Coorientadora

LAVRAS-MG

2023

NATÁLIA APARECIDA FERREIRA OLIVEIRA

**ANESTESIA DE ADULTOS DE *Chrysoperla externa* (NEUROPTERA:
CHRYSOPIDAE) A BAIXAS TEMPERATURAS**

**ANESTHESIA OF ADULT *Chrysoperla externa* (NEUROPTERA:
CHRYSOPIDAE) AT LOW TEMPERATURES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Agronomia, para a obtenção do
título de Bacharel.

Aprovado em 17/03/2023

DRA. BRÍGIDA DE SOUZA - UFLA

ENG. AGRÔNOMO PATRICK LOPES GUALBERTO - UFLA

M.A. GABRIELA COSTA PINHEIRO - UFLA

M.A. NÍVIA BORGES PALHARI - UFLA

M.A. DELANE PATEZ PORTO - UFLA

Profa. Dra. Brígida de Souza

Orientadora

M.a Nívia Borges Palhari

Coorientadora

LAVRAS-MG

2023

A Deus, por ser sempre meu guia e
minha luz e a Nossa Senhora Aparecida
por ser minha intercessora fiel em todos
os momentos. OFEREÇO

Aos meus pais Márcio e Rosangela, por
terem zelado por mim e cuidado tão bem
durante toda essa trajetória. DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser sempre minha melhor companhia e força para seguir em frente nos desafios e a Nossa Senhor Aparecida por ser sempre minha intercessora.

Aos meus pais, Marcio e Rosangela por serem minha base e meu exemplo de fé e perseverança, minha eterna gratidão por tanto amor e cuidado nos momentos difíceis e em momentos felizes.

A minha prima, Ariane por ser luz em minha vida e me incentivar em todos os desafios e oportunidades e por se fazer presente em todos os momentos de minha vida.

Ao departamento de Entomologia pela oportunidade de estagiar e ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

A minha orientadora, professora Dra. Brígida de Souza, pela orientação e oportunidade de trabalhar com diversos trabalhos de pesquisa.

Aos alunos de pós-graduação pelo auxílio durante a iniciação científica, em especial a minha coorientadora, M.a Nívia Borges Palhari pela coorientação, atenção e cuidado e a M.a Delane Porto pela ajuda e amizade.

Aos funcionários e professores do departamento de Entomologia que de alguma forma contribuíram positivamente para o meu crescimento, em especial a técnica Elaine, pela amizade, ajuda e colaboração dos projetos de pesquisa e na vida.

Aos colegas de turma que sempre estiveram presentes em todos os momentos trocando forças, em especial Ana Flávia que sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando.

A UFLA, pela oportunidade de escrever minha história junto dessa incrível instituição e amadurecer crescendo pessoalmente e profissionalmente.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota. ”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A capacidade de dispersão dos insetos pode ser estudada através da marcação, liberação e recaptura. O método de marcar-liberar-recapturar é uma forma de auxiliar na compreensão dos padrões de dispersão, entretanto, para marcar insetos de tamanho relativamente pequeno com maior mobilidade, é necessário o uso de anestesia. *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) é um ótimo agente de controle biológico já comercializado, porém pouco se conhece a respeito dos efeitos da anestesia através do frio sobre a espécie. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da anestesia via exposição ao frio em adultos de *C. externa*. Os tratamentos foram baseados no tempo e temperatura de exposição, sendo eles: T1–2 minutos a -19°C; T2–2 minutos a 0°C; T3–2 minutos a 12,5°C; T4–4 minutos a -19°C; T5–4 minutos a 0°C; T6–4 minutos a 12,5°C, T7–6 minutos a -19°C; T8–6 minutos a 0°C; T9–6 minutos a 12,5°C e, por último, a testemunha, em que os adultos foram mantidos à 25°C, condição térmica utilizada na criação. Avaliou-se a mortalidade e a taxa de recuperação pós-exposição aos tratamentos aplicados. O delineamento utilizado foi blocos inteiramente casualizados com seis repetições, sendo que cada repetição continha cinco indivíduos. Para o parâmetro taxa de mortalidade não houve diferença significativa. Já para o parâmetro taxa de anestesia, houve diferença significativa, sendo que os tratamentos T1 (2 minutos a -19°C), T4 (4 minutos a -19°C) e T7 (6 minutos a -19°C) proporcionaram um período de anestesia entre 31 e 279 segundos, que favoreceu a manipulação dos crisopídeos.

Palavras-chave: Liberação. Recaptura. Imobilização.

ABSTRACT

The dispersal ability of insects can be studied through marking, release and recapture. The mark-release-recapture method is a way to aid in understanding dispersal patterns, however, to mark insects of relatively small size with greater mobility, it is necessary to use anesthesia. *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) is an excellent biological control agent already commercialized, but little is known about the effects of anesthesia through cold on the species. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of anesthesia via exposure to cold in adults of *C. externa*. Treatments were based on exposure time and temperature, namely: T1–2 minutes at -19°C; T2–2 minutes at 0°C; T3–2 minutes at 12.5°C; T4–4 minutes at -19°C; T5–4 minutes at 0°C; T6–4 minutes at 12.5°C, T7–6 minutes at -19°C; T8–6 minutes at 0°C; T9–6 minutes at 12.5°C and, finally, the control, in which the adults were kept at 25°C, the thermal condition used in rearing. Mortality and post-exposure recovery rate to the applied treatments were evaluated. The design used was completely randomized blocks with six repetitions, each repetition containing five individuals. There was no significant difference for the mortality rate parameter. As for the anesthesia rate parameter, there was a significant difference, with treatments T1 (2 minutes at -19°C), T4 (4 minutes at -19°C) and T7 (6 minutes at -19°C) providing a period of anesthesia between 31 and 279 seconds, which favored the handling of lacewings.

Keywords: Release. Recapture. Immobilization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Duração de anestesia (segundos) obtido para adultos de *Chrysoperla externa*, após exposição a diferentes tempos e temperaturas, conforme os tratamentos T1 a T9, e seus respectivos agrupamentos de médias pelo teste de Tukey. T1: 2', -19°C; T2: 2', 0°C; T3: 2', 12,5 °C; T4: 4', -19°C; T5: 4', 0 °C ; T6: 4', 12,5 °C ; T7: 6', -19°C ; T8: 6', 0 °C ; T9: 6', 12,5 °C. 24
- Figura 2.** *C. externa* anestesiada após exposição a -19°C por 4 minutos.....26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Menor e maior tempo (segundos) em que adultos de <i>Chrysoperla externa</i> permaneceram anestesiados após serem expostos a diferentes tempos e temperaturas, conforme os tratamentos T1, T4 e T7.	23
--	----

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. Referencial teórico.....	15
3.1. Os crisopídeos	15
3.2. Dispersão dos insetos	17
3.3. Anestesia através do frio para estudos de dispersão	18
3.4. Coma frio.....	20
4. Material e Métodos.....	22
5. Resultados e Discussão.....	23
6. Conclusão	27

1. Introdução

Os crisopídeos são insetos pertencentes à família Chrysopidae, que é composta por aproximadamente 1200 espécies e subespécies distribuídas em 86 gêneros, sendo a segunda maior dentro da ordem Neuroptera (HARUYAMA et al., 2008). A família se caracteriza por insetos com alta eficiência predatória que contribuem para o controle biológico natural de pragas, sendo encontrados em diversos cultivos agrícolas (FREITAS, 2002; COSTA, 2010). Dentre os diversos gêneros descritos na família Chrysopidae, segundo OSWALD (2018), *Chrysoperla* é um dos mais frequentes, encontrado por todo o mundo, abrigando cerca de 36 espécies, entre elas *C. externa* (Hagen, 1861). Na fase larval esses insetos têm hábito alimentar generalista, sendo capazes de controlar populações de diversos insetos, como pulgões, moscas-branca e tripses, além de outros artrópodes, com estudos que já vem sendo realizados a mais de 250 anos (SENIOR e MCEWEN, 2001; CARVALHO e SOUZA, 2009).

Recentemente, Botti et al. (2021) relataram a capacidade de *C. externa* em predação a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae), quando observaram a presença de larvas do crisopídeo dentro de frutos brocados, constatando-se que a larva retirava os imaturos da praga e os consumia. Alguns trabalhos também relatam a capacidade desses entomófagos em predação o bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) (DAMI et al., 2018).

Os crisopídeos possuem uma grande adaptabilidade a diferentes ambientes, o que lhes garante uma boa dispersão geográfica, que pode impactar nas formas de colonização e sobrevivência no ecossistema (BROOKS e BERNARD, 1990; LOXDALE e LUSHAI, 1999). Estudos sobre a dispersão dos insetos são relacionados à chegada e à permanência em determinado habitat, e envolve a interação de uma espécie com outras espécies ali presentes, como, por exemplo, a permanência de um parasitoide pela presença de seu hospedeiro (ELZINGA et al., 2007).

O entendimento dos padrões de dispersão também se faz necessário para insetos predadores, como *C. externa*, com a finalidade de garantir que insetos liberados no local, como parte de um programa de controle biológico aplicado contra pragas, estejam se mantendo na área alvo. Dentre as formas de se conhecer a dispersão dos insetos, está a radiotelemetria, técnica utilizada no monitoramento de abelhas, por exemplo, mas que pode ser inviável para espécies de tamanho diminuto, que tenham baixa relação

superfície/volume corporal ou peso/superfície corporal. Sendo assim, a técnica de marcação-liberação-recaptura se faz viável quando os estudos se relacionam aos crisopídeos (HAGLER et al., 2002; RINK e SINSCH, 2007; ROBINET et al., 2019).

Diversos são os trabalhos de pesquisa envolvendo a técnica de marcação-liberação-recaptura realizados com diferentes espécies, como *Apis mellifera* (L., 1758) (Hymenoptera: Apidae), utilizando pó fluorescente; *Monochamus galloprovincialis* (Oliver, 1795) (Coleoptera: Cerambycidae) e *Cimex lectularius* (L., 1758,) (Hemiptera: Cimicidae), utilizando tintas de diferentes cores; e *Cydia pomonella* L., 1758 (Lepidoptera: Tortricidae) marcadas internamente com corante vermelho e externamente com pós fluorescentes Day-Glo Daylight[®] de diferentes cores (HAGLER et al., 2011; JUDD et al., 2011; COOPER et al., 2015; ROBINET et al., 2019). Cada trabalho aponta um meio para a marcação, o que demonstra que as técnicas não são padronizadas para todas as espécies, sendo necessário o desenvolvimento de diferentes metodologias que se adequem ao inseto a ser trabalhado (LORU et al., 2013).

Muitas vezes, para se proceder a manipulação do inseto para a marcação, é necessário o uso de uma técnica de anestesia como forma de facilitar o procedimento, especialmente com insetos diminutos ou muito ativos. Segundo Colinet e Renault (2012), o dióxido de carbono (CO₂) é comumente utilizado em diversos estudos para anestesia de insetos alados. Entretanto, quando utilizado de forma incorreta, ocasiona desequilíbrio do pH da hemolinfa, diminuindo a acidez e levando o inseto à morte (BADRE et al., 2005).

O uso do clorofórmio também pode ser eficiente, Cevik et al. (2019) avaliaram diferentes doses e tempos de exposição em larvas de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae) e concluíram que maiores concentrações e maior tempo retardam a recuperação e, também, causam a depressão do sistema nervoso central (SNC). Outra opção seria a utilização da exposição do inseto ao frio. A anestesia pela exposição ao frio é abordada em diversos trabalhos como, por exemplo, em *A. mellifera* (HORI et al., 2006). Essa imobilização é reversível e pode ser entendida como uma resposta fisiológica do inseto. Nesse caso, a temperatura interfere nas suas atividades tornando-os incapacitados de realizar qualquer movimento quando expostos a determinadas condições térmicas (HAZELL e BALE, 2011).

Ao se tratar da família Chrysopidae, Loru et al. (2010) constataram a eficiência do acetato de etila para a imobilização de adultos de *Chrysoperla pallida* Henry et al, 2002, mas pouco se conhece a respeito das formas de se proceder e sobre os efeitos da

anestesia sobre *C. externa*, se fazendo necessários maiores estudos sobre a questão. Ademais, o acesso ao acetato de etila não é tão fácil quando comparado à opção de se expor os espécimes ao frio, em geladeiras. A anestesia através da exposição ao frio é uma técnica considerada simples, que pode ser conduzida e replicada em qualquer lugar que se disponha de materiais que forneçam baixas temperaturas, como geladeiras e freezers. Esse procedimento requer apenas que a condução seja efetuada de forma meticulosa, seguindo-se a metodologia estabelecida.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer uma metodologia para anestesia de adultos de *C. externa* como forma de garantir facilidade na manipulação desses insetos para fins de marcação para uso em ensaios de marcação-liberação-recaptura, baseada na exposição a baixas temperaturas. Espera-se que temperaturas abaixo de 0°C proporcionem a anestesia desses adultos.

2.2. Objetivos Específicos

- Testar três temperaturas de exposição disponíveis no equipamento utilizado para a anestesia;
- Obter a resposta fisiológica de *C. externa* a diferentes exposições a baixas temperaturas;
- Obter tempo de duração da anestesia.

3. Referencial teórico

3.1. Os crisopídeos

A ordem Neuroptera é representada por diferentes famílias de insetos predadores de diversas pragas das culturas agrícolas, sendo a família Chrysopidae a segunda maior. O seu destaque é devido a indivíduos dessa família possuírem elevada capacidade predatória e por ser composta por insetos holometabólicos, os quais possuem uma grande diferença da fase larval para fase adulta se tratando de morfologia e hábitos alimentares, e isso permite que eles tenham maior vantagem em atingir diferentes ecossistemas garantindo assim maior sucesso e vantagem em sua evolução (FREITAS, 2002; BORTOLI et al., 2006).

Os adultos dos crisopídeos não são predadores, se alimentam especificamente de pólen e néctar no campo, por outro lado, as larvas são predadoras generalistas de diversos artrópodes pragas como pulgões, cochonilhas, tripses, lagartas, etc., contribuindo assim para o controle biológico promovendo a regulação das populações de pragas nos cultivos agrícolas (CARVALHO et al., 2002; VALENCIA et al., 2006; WANG et al., 2012).

A família Chrysopidae é composta por 1200 espécies e subespécies distribuídas em mais de 80 gêneros e subgêneros (OSWALD e MACHADO, 2018). Dentre os gêneros descritos nessa família, segundo Albuquerque et al. (2002), *Chrysoperla* é considerado um dos grupos mais importantes de inimigos naturais no controle biológico. Freitas e Morales (2009) relatam que o gênero *Chrysoperla* é composto por 36 espécies, dentre elas, quatro são encontradas no Brasil, sendo: *C. externa* (Hagen, 1861), *C. defreitasi* (Brooks, 1994), *C. raimundoi* (Freitas e Penny, 2001) e *C. genanigra* (Freitas, 2003). A espécie Neotropical *C. externa* se destaca nos estudos de controle biológico, se mostrando um bom agente de manejo de pragas devido à alta voracidade de suas larvas e também pela sua ocorrência natural em diversos tipos de sistemas, como cultivos protegidos, silvicultura, monocultivo e pomares (FREITAS E PENNY, 2001; BONANI et al., 2009).

Diversos são os trabalhos que comprovam essa capacidade de *C. externa* em contribuir para o controle biológico de pragas. Ao estudar o controle biológico da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), Borges (2020) avaliou a eficiência de predação de lagartas por larvas de *C. externa* comparando os ovos de *Anagasta kuehniella*, e observou que as larvas de *C.*

externa se alimentaram 1,5 vezes mais de ovos de *S. frugiperda* em relação a ovos de *A. kuehniella* e 1,4 vezes mais de lagartas neonatas do que alimento alternativo (Figura 2)

Larvas de *C. externa* também foram estudadas na cultura do eucalipto, visando o controle do psilídeo-de-concha, *Glycaspis brimblecombei*, (Moore, 1964) (Hemiptera: Aphalaridae). Ao avaliarem a predação de ninfas de *G. Brimblecombei*, Cuello et al. (2019) observaram que larvas de terceiro ínstar predam com maior facilidade, em comparação com os instares anteriores, e que a predação ocorre quando as larvas penetram seu aparelho bucal por de baixo da concha construída pelo hemíptero, e assim realizam a sucção das ninfas que ficam ali abrigadas.

Estudos visando análise da biologia de vida e desenvolvimento de *C. externa* mostram que larvas, quando alimentadas com pulgão-da-roseira *Rhodobium porosum* (Sanderson, 1901) (Hemiptera: Aphididae), se desenvolvem sem efeitos negativos até a fase adulta, sendo considerada uma presa que satisfaz as exigências nutricionais das larvas e garante bons resultados para o controle biológico (PEREIRA et al., 2020).

De acordo com Luna-Espino et al. (2020), ao estudarem a eficiência de larvas de primeiro, segundo e terceiro instar de *C. externa* na predação do tripes *Frankliniella occidentalis* (Pergande, 1895), praga do tomateiro, observaram que a presença do predador, mais especificamente segundo e terceiro instar reduziram os danos aos frutos, consumindo até 36,6% das presas disponíveis na fase de floração da cultura.

Mais recentemente, foi relatado por Botti et al. (2022) a predação da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867), por larvas de *C. externa*, que observaram que a larva acessava a galeria no fruto e retirava a fase imatura da broca para se alimentar. Existem também relatos que essa espécie de crisopídeo é capaz de predar o bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842). As larvas possuem a capacidade de encontrar as lagartas mesmo quando elas estão dentro das minas (DAMI et al., 2018).

Devido a sua facilidade de criação em laboratório, contornando pequenos problemas como o canibalismo da fase imatura na ausência de alimentos, os crisopídeos apresentam elevada capacidade reprodutiva, com isso espécies do gênero *Chrysoperla* têm sido criados em massa e já comercializadas para liberação na América do Norte e na Europa, entre elas, *C. externa* é comercializada na América Latina e Ásia (TAUBER et al., 2000; AMARAL, 2011).

No Brasil, a comercialização de crisopídeos para controle biológico é recente, atualmente a espécie é comercializada por três empresas no país: TOPBIO – Insumos

Biológicos Industriais e Comercio Ltda., Associação Mineira dos Produtores de Algodão – AMIPA e pela JB Biotecnologia Ltda. Com registro para o pulgão-do-algodoeiro *Aphis gossypii* (Glover, 1877) (Hemiptera: Aphididae), mosca branca *Bemisia tabaci* Biótipo B (Genn 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae), pulgão-da-batata *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878) (Hemiptera: Aphididae), pulgão-verde-dos-cereais *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae), pulgão-verde *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae), pulgão-da-roseira *Rhodobium porosum* (Sanderson, 1901) (Hemiptera: Aphididae), pulgão-roxo-da-roseira *Macrosiphum rosae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) (AGROFIT, 2023).

3.2. Dispersão dos insetos

Conhecer a dispersão dos insetos nos diferentes ecossistemas existentes é a melhor forma de entender a dinâmica populacional dos mesmos, e assim, garantir melhor desenvolvimento de trabalhos que visam o melhor manejo de insetos pragas nos cultivos agrícolas (TOMASETO, 2012). Segundo Pires, (2010) a dispersão é o movimento de um determinado grupo de indivíduos para colonização de um novo lugar, e essa dispersão é ocasionada por diferentes elementos, dentre eles a presença ou ausência de insetos pragas, alimento, temperatura, umidade, precipitação pluviométrica, entre outros.

A capacidade de voo dos insetos permite melhor adaptação a possíveis necessidades de dispersão, e assim permite que essa se torne um mecanismo de proteção para determinada espécie, evitando possíveis chances de extinção, como exemplo, pulgões, *Aphis gossypii* quando excedem o número de indivíduos em determinada área, desenvolvem o mecanismo de voo como forma de facilitar a colonização em outras áreas (ANDRADE, 2018).

Se tratando de inimigos naturais, o conhecimento sobre a dispersão é de grande importância para garantir o sucesso do controle biológico de pragas, bem como a distribuição de liberação no local alvo (BECCHI, 2021). Dentre as formas de se entender sobre a dispersão, estudos envolvendo marcação-liberação-recaptura são utilizados visando a avaliação de determinado grupo de insetos em um determinado espaço (REZENDE, 2022). A técnica de marcar-liberar-recapturar inclui a criação dos insetos em laboratório, os quais são marcados com corantes de fácil identificação, para que a localização e recaptura sejam facilitadas, a fim de se calcular sua dispersão no ambiente desejado (VACAS et al., 2019).

Estudos envolvendo essa técnica são utilizados para diversas finalidades, Vilarinho, (2007) realizou um estudo no qual, utilizou corantes lipossolúveis nas cores vermelho Sudan Red 7B (C.I.26050) e azul Solvent Blue 35 (C.I.61554) adicionados a dieta artificial de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae) com objetivo de avaliar a procedência da marcação e o desenvolvimento dos insetos o que resultou em coloração em todas as fases de vida até a fase adulta, sendo possível notar a mudança de coloração a partir do terceiro dia de alimentação.

Da mesma forma, Fernandes, (2002) realizou testes para coloração de adultos do parasitoide *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) devidamente desenvolvidos em lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com dieta composta por Calco Oil Red WP N-1700, os quais eram coloridos artificialmente o que facilitava o monitoramento da dispersão dos mesmos em campo por apresentarem coloração de alta nitidez e dificuldade de retirar do inseto.

O uso de isótopos estáveis é uma técnica relativamente recente, utilizada para a marcação de insetos, Faiman et al. (2019) testaram óxido de deutério na marcação de larvas de *Anopheles gambiae* (Giles, 1902) (Diptera: Culicidae) o qual possui maior vantagem sobre outros isótopos devido a seu mínimo acúmulo de resíduo.

Outra forma de proceder a marcação de insetos é utilizando corantes externos, Pannuti et al. (2019) utilizaram pós-fluorescentes vermelho em pó luminoso (BioQuip Products, Rancho Dominguez, Califórnia, EUA) e Sudan Red 7B (SigmaAldrich Corporation, St. Louis, Missouri, EUA) em testes com lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809) (Lepidoptera: Noctuidae) as mesmas apresentaram marcação por até 60 horas, o que indica baixa eficiência da técnica para estudos que exigem resultados a longo prazo.

3.3. Anestesia através do frio para estudos de dispersão

O destaque que os crisopídeos ganharam no controle biológico, e também a flexibilidade adaptativa da espécie possibilitou inúmeros estudos sobre esses insetos e suas características, com isso, se faz necessário conhecer a dispersão dos insetos no ambiente de forma a entender sua eficiência para controle biológico (HAGLER et al., 2002). Como forma de entender a dispersão dos insetos, a técnica de marcar, liberar e recapturar tem sido muito utilizada, como por exemplo, em *Aedes albopictus* (Skuse,

1894), visando conhecer a distância percorrida pelo inseto transmissor de doenças como a dengue, zika vírus, entre outras (VAVASSORI, SADDLER & MÜLLER, 2019).

Contudo, a manipulação dos insetos em laboratório exige técnicas que facilitem o desenvolvimento dos trabalhos, entre elas, a anestesia é uma tática para manuseio de insetos diminutos e de corpo delicado. Entre as diversas formas de anestésiar, as mais utilizadas são o dióxido de carbono, clorofórmio, acetato de etila e a refrigeração (RAYL e WRATTEN, 2016; LOEBLEIN et al. 2019).

Em razão de sua facilidade e eficiência de uso, além de não causar riscos à saúde humana, o dióxido de carbono tem sido comumente utilizado na anestesia de insetos alados (COLINET & RENAULT, 2012; RAYL & WRATTEN, 2016). Arenas et al. (2014), utilizaram anestesia por CO₂ em adultos e ninfas de *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908) (Hemiptera: Liviidae), mantendo-os por dois minutos afim de facilitar a manipulação dos insetos. Porém, segundo Shen et al. (2020), a exposição de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae) por mais de 90 minutos causa morte dos insetos.

O clorofórmio é um líquido volátil que já foi muito utilizado na medicina como anestésico. Na entomologia por não ser inflamável, e é considerado um anestésico de rápida ação nos insetos. Seu uso em testes realizados com larvas de *D. melanogaster* expostas a diferentes concentrações de clorofórmio e diferentes tempos de exposição mostrou que a combinação 24s×2 (duas doses de clorofórmio por 24 segundos) se obteve um bom tempo de anestesia das larvas e não desencadeou nenhum problema a elas, porém, altas concentrações como 30s×2 provocou um retardo na recuperação e depressão de sistema nervoso central (SNC) (FREDDI, 1973; CEVIK et al. 2019).

Segundo Loru et al. (2010), na entomologia o acetato de etila é utilizado em câmaras mortíferas, por ser considerado um produto não higroscópico que mantém o inseto macio a fim de facilitar a montagem para coleções. No entanto, testes foram realizados para se observar a resposta do acetato de etila como anestésico alternativo na imobilização de *Chrysoperla pallida* Henry et al., 2002 (Neuroptera: Chrysopidae), quando o inseto se mostrou totalmente imóvel, era retirado do frasco, obtiveram então que o acetato de etila possui propriedades para ser usado como anestésico, tendo como efeito negativo somente a longevidade de vida das fêmeas expostas ao teste.

Assim como o CO₂, a utilização de baixas temperaturas tem sido frequentemente utilizada para anestésiar insetos, pois se trata de uma técnica simples e de baixo custo, sendo necessária apenas a disponibilidade de materiais que podem fornecer a

refrigeração. A uma dada temperatura os insetos cessam seus movimentos e a permanência em temperaturas amenas o inseto entra em estado de coma frio, o qual pode resultar em danos, como por exemplo, a morte do inseto, ou pode se reverter, possibilitando que o mesmo retorne as condições normais em resposta ao aumento da temperatura (MACMILLAN e SINCLAIR, 2011; RAYL e WRATTEN, 2016).

O conhecimento sobre formas de anestésias insetos é de suma importância para facilitar a manipulação dos mesmos em laboratório para diversos estudos. Estudos apontam formas de anestésias *C. pallida*, mas não se tem uma metodologia estabelecida para *C. externa*, sendo assim, são necessários maiores estudos para obter conhecimento de melhores formas de manipulação dos mesmos.

3.4. Coma frio

A imobilização através da refrigeração de insetos segundo Everatt et al. (2013), é uma técnica estudada desde 1872. Em estudos realizados com três espécies de protistas a temperatura influenciava diretamente sobre o movimento realizado pelos mesmos, mas não se tinha uma definição correta sobre o que acontecia com os organismos expostos a baixas temperaturas e as possíveis mortes que ocorriam.

Segundo Andersen e Johannes (2019), a uma determinada temperatura os insetos atingem seu mínimo térmico crítico (CT_{min}) e perdem sua capacidade de realizar qualquer movimento, ao diminuir um pouco mais a temperatura o inseto entra em estado de coma frio, conhecido também por ser a anestesia. A permanência por maiores tempos a essa determinada temperatura pode ocasionar a morte do inseto, mas por outro lado, se a temperatura for aumentada o inseto inicia sua recuperação e volta a sua temperatura ideal.

A técnica de refrigeração para anestésias insetos apesar de ocasionar algumas mortes, não deve ser considerada um processo que causa um valor considerável de danos, pois quando realizado em temperaturas ideais de forma criteriosa, o efeito é apenas do coma e esse estado pode ser entendido como uma resposta fisiológica do inseto ao estresse ocasionado pelo frio, sendo essa anestesia reversível (SAMPER, 1881; HAZELL e BALE, 2011).

Segundo Andersen et al. (2018), a explicação mais provável para o início do coma frio, é que o frio causa desligamento do sistema nervoso central, e dessa forma os

insetos perdem sua mobilidade. Esse desligamento é resultado de uma despolarização que ocorre em baixas temperaturas e é causada pelo acúmulo e remoção de potássio no SNC, ocorrendo assim uma hipercalemia. Por outro lado, a recuperação do coma frio está ligada ao equilíbrio da homeostase iônica, ou seja, quando a concentração de potássio se regulariza os insetos retornam sua mobilidade (FINDSEN, et al., 2014; ANDERSEN e OVERGAARD, 2019).

Duman (1992) explica que insetos são susceptíveis a baixas temperaturas e são totalmente incapazes de sobreviver quando expostos as mesmas, e a formação de cristais de gelo que ocorre em sua hemolinfa. Como forma de sobreviver e não sofrer danos pelo frio os insetos desenvolveram mecanismos para impedir o congelamento. São conhecidas duas formas de resistência pelos insetos quando expostos ao frio: os que toleram o congelamento e os que evitam o congelamento. Os insetos que evitam o congelamento desenvolveram a capacidade de aumentar a temperatura da hemolinfa, impedindo assim seu congelamento, já os insetos que toleram o congelamento, sua habilidade é de sobrevivência mesmo que ocorra o congelamento do fluido extracelular (CUBILLOS et al., 2018).

Evitar ou tolerar o congelamento está relacionado à presença de crioprotetores na fisiologia da hemolinfa do inseto. Esses crioprotetores possibilitam a diminuição da temperatura de congelamento da hemolinfa, que são os açúcares, polióis e aminoácidos ou podem se ligar ao cristal de gelo impedindo seu crescimento, que são as chamadas proteínas de ligação de gelo (DAVIES, 2014; DUMAM, 2015; CUBILLOS et al., 2018).

Essas proteínas de ligação de gelo nos insetos incluem as anticongelantes (AFPs) e os nucleadores de gelo (INPs). Dessa maneira, o que confere a tolerância dos insetos ao frio é a presença de nucleadores de gelo que possibilitam um aumento da temperatura da hemolinfa de forma que os cristais de gelo se formem no fluido extracelular quando o inseto é exposto a temperaturas inferiores a 0°C. Já os insetos que evitam o frio produzem anticongelantes (AFPs), esses atuam na hemolinfa abaixando seu ponto de congelamento e aderindo a superfície do cristal de gelo impedindo sua propagação. (MICHAUD e DENLINGER, 2004; DUMAN, 2015).

4. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico com Entomófagos (LCBE), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde é mantida uma criação para fins de pesquisa. Com até 24 horas após a oviposição das fêmeas adultas da criação foram coletados todos os ovos disponíveis como garantia de se obter ovos viáveis para realização dos testes, e as larvas eclodidas foram alimentadas com ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae). Ao atingirem a fase adulta, os indivíduos foram utilizados no teste, o que garantiu a padronização da idade entre eles.

Os testes foram conduzidos na parte da manhã em geladeira do tipo Frost Free (Electrolux), nos quais os adultos foram submetidos ao resfriamento em tubos de vidro com fundo chato. Os tratamentos foram baseados no tempo e temperatura de exposição ao frio, sendo eles: T1: 2 minutos a -19°C; T2: 2 minutos a 0°C; T3: 2 minutos a 12,5°C; T4: 4 minutos a -19°C; T5: 4 minutos a 0°C; T6: 4 minutos a 12,5°C; T7: 6 minutos a -19°C; T8: 6 minutos a 0°C; T9: 6 minutos a 12,5°C e, por último, a testemunha, composta por adultos mantidos à 25°C, condição térmica utilizada na criação. Cada tratamento foi composto por um total de 30 indivíduos de *C. externa*.

Foram avaliados visualmente de forma direta o tempo de recuperação pós-exposição e o número de insetos que, por ventura, morreram durante a exposição ao frio. A recuperação foi avaliada contabilizando o tempo através do uso de um cronômetro de forma visual após a retirada dos insetos da exposição ao frio. O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados com seis repetições, sendo que cada repetição continha 5 adultos de *C. externa*. Para todos os parâmetros avaliados procedeu-se a aplicação de Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM), entretanto, para cada modelo utilizou-se a melhor distribuição. Para o número de mortes ocasionadas pela exposição ao frio, utilizou-se a distribuição binominal. Para a duração da anestesia, procedeu-se a distribuição tweedie. Os dados foram submetidos ao teste de Qui-Quadrado (X^2) e a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de médias de Tukey com intervalo de confiança (IC) de 95%, através do software R versão 4.1.1 (R CORE TEAM, 2021).

5. Resultados e Discussão

Na avaliação da recuperação dos adultos em função das condições a que foram submetidos, notou-se que os tratamentos que permaneceram com os dados agrupados no valor de zero para duração da anestesia não demonstraram resposta às condições aplicadas, portanto não causaram a anestesia dos indivíduos, sendo eles T2 (2 minutos a 0°C), T3 (2 minutos a 12,5°C), T5 (4 minutos a 0°C), T6 (4 minutos a 12,5°C) e T9 (6 minutos a 12,5°C). O T8 (6 minutos a 0°C) anestesiou apenas dois indivíduos, pelo período de entre 75 e 90 segundos. Tais condições não possibilitaram atingir o objetivo principal deste trabalho, devendo ser descartados. Os tratamentos T1 (2 minutos, -19°C), T4 (4 minutos, -19°C) e T7 (6 minutos, -19°C) se destacaram por causarem a anestesia entre 31 e 279 segundos (Tabela 1).

A submissão dos adultos de *C. externa* a diferentes temperaturas e tempos de exposição, em sua maioria, não ocasionou letalidade, com exceção ao tratamento que incluiu 6 minutos de exposição a -19°C (T7), que ocasionou a morte de 16 indivíduos. Entretanto, ao aplicar o teste ANOVA, verificou-se que não houve diferença na taxa de mortalidade entre os diferentes tratamentos ($p=1$; $GL=10$; $X^2<0$).

Entretanto, é preciso salientar que, para a escolha do tempo de anestesia, deve-se considerar o tempo gasto no manuseio de aproximadamente três minutos dos insetos, além da possível mortalidade.

Tabela 1. Menor e maior tempo (segundos) em que adultos de *Chrysoperla externa* permaneceram anestesiados após serem expostos a diferentes tempos e temperaturas, conforme os tratamentos T1, T4 e T7.

Tratamentos	Menor tempo anestesiados	Maior tempo anestesiados
T1 (2 minutos, -19°C)	31	160
T4 (4 minutos, -19°C)	103	208
T7 (6 minutos, -19°C)	164	279

Fonte: Autor

A exposição ao frio durante 6 minutos a -19°C (T7), apesar de proporcionar o maior tempo para recuperação da anestesia, causou uma mortalidade que, mesmo não sendo significativa, deve ser considerada devido à perda de exemplares. Já para o tratamento de 4 minutos de exposição a -19°C (T4), que manteve os insetos anestesiados

por cerca de 3,46 minutos, observou-se que, além da suficiência de tempo para o manuseio, a não ocorrência de insetos mortos.

Quando realizada a ANOVA referente ao tempo de anestesia, verificou-se que há diferença entre os tratamentos quanto à taxa de recuperação pós-exposição ao frio ($p < 0,00001$; $GL = 10$; $X^2 = 41,02016$) (Figura 1).

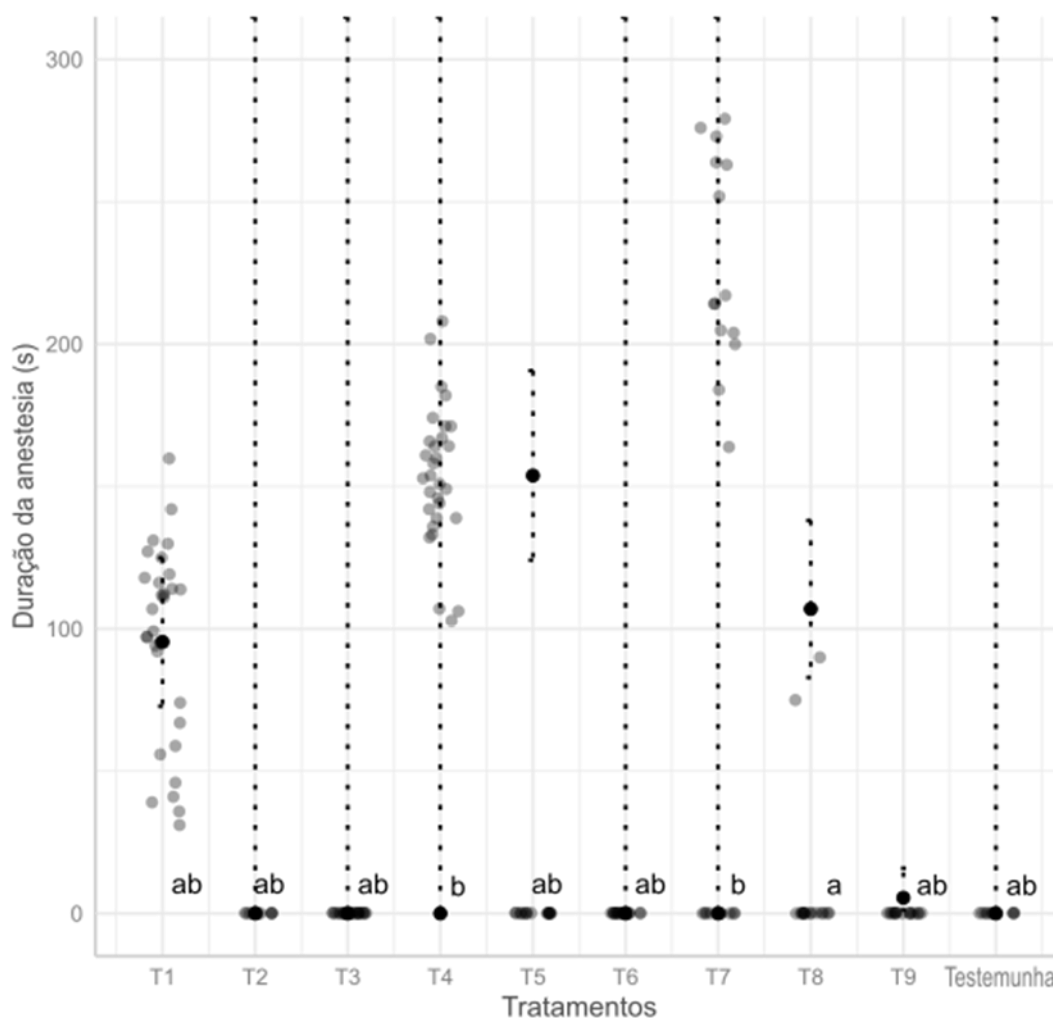


Figura 1 Duração de anestesia (segundos) obtido para adultos de *Chrysoperla externa*, após exposição a diferentes tempos e temperaturas, conforme os tratamentos T1 a T9, e seus respectivos agrupamentos de médias pelo teste de Tukey. T1: 2', -19°C; T2: 2', 0°C; T3: 2', 12,5 °C; T4: 4', -19°C; T5: 4', 0 °C ; T6: 4', 12,5 °C ; T7: 6', -19°C ; T8: 6', 0 °C ; T9: 6', 12,5 °C.

A partir do agrupamento de médias, verifica-se que não houve diferenças entre os tratamentos quatro e sete, os quais garantiram maior tempo de anestesia e, desse modo, maior tempo para manipulação dos indivíduos, ademais, o tratamento um também permitiu anestesia dos exemplares, apesar de ter diferido dos citados

anteriormente pelo agrupamento de médias, devendo assim ser considerado também para anestesia de *C. externa*. Esses tratamentos diferiram de forma significativa dos demais, que não diferiram entre si, com exceção do tratamento oito que, apesar de ter proporcionado a imobilização dos adultos, o tempo de imobilização não foi suficiente para a manipulação dos insetos, uma vez que o menor tempo foi zero e o maior noventa segundos.

Sendo assim, para fins de anestesia visando a marcação dos adultos de *C. externa*, os tratamentos T1 (2 minutos, -19°C), T4 (4 minutos, -19°C) e T7 (6 minutos, -19°C) são recomendados para se atingir o objetivo proposto. Entretanto é preciso avaliar o tempo necessário para a manipulação e ponderar qual se adequa melhor à necessidade e objetivos da pesquisa. Ao analisar esses três tratamentos, é notável que o T7 acarretou maior tempo de imobilização, porém, a exposição por maior tempo a -19°C resultou em 16 adultos mortos, o que deve ser considerado, uma vez que se objetiva a anestesia sem letalidade dos exemplares. Já o T1 (2 minutos, -19°C) não ocasionou letalidade, mas proporcionou um menor tempo de anestesia (entre 31 e 160 segundos). Sendo assim, sugere-se a utilização das condições referentes ao T4, já que o mesmo permite um tempo considerável de anestesia (103 a 208), sem perda de espécimes.

Em baixas temperaturas os insetos entram em estado de paralisia, chamado de coma frio, que é reversível, porém, a forma com que as diversas espécies reagem sob baixas temperaturas é diferente (LEE, 1991), uma vez que, conforme Overgaard e MacMillan (2017), a tolerância a baixas temperaturas envolve processos fisiológicos e bioquímicos.

Ao estudar a anestesia a frio para adultos de *C. externa*, verificou-se que o tempo de exposição interferiu na taxa de sobrevivência. Insetos expostos a -19°C por quatro minutos foram anestesiados e não morreram, por outro lado, para os insetos expostos à mesma temperatura por seis minutos observou-se a ocorrência de mortalidade. Em estudos com abelhas (*A. mellifera*) expostas a -18°C por quatro minutos, não houve mortalidade e nem danos aos insetos (FROST et al., 2011). Já no trabalho de Gazoni et al. (2012), adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) quando expostos a temperatura de 6°C causa letalidade progressiva, onde os insetos entram em estado de coma frio, e quando expostos a -10°C ocorre morte de adultos e larvas.

O uso de baixas temperaturas é empregado para diversas finalidades quando se trata de insetos, Ferrari et al. (2011) avaliou a exposição do gorgulho-do-milho

Sitophilus zeamays Mots. 1855 (Coleoptera: Curculionidae) a baixas temperaturas como forma de controle dessa praga de grãos-armazenados, temperaturas abaixo de 3°C ocorre morte dos indivíduos em período menor que 30 dias. Utilizando a imobilização pelo frio como forma de auxiliar a aplicação da técnica do inseto estéril em *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae), Zhang et al. (2020) observaram que a sobrevivência dos machos diminui quando expostos a 1°C, independente da duração do tempo de exposição, mas, a permanência por três horas a 10°C permite anestesia, não causa morte e, tampouco, danos ao inseto.

Como a reação de diferentes espécies quando expostas ao frio é variável, a realização de estudos preliminares antes de utilizá-las de forma aplicada é imprescindível. Os resultados obtidos neste trabalho são fundamentais para a elaboração de um protocolo de anestesia para adultos de *C. externa*, com o objetivo de elaborar trabalhos de marcação-liberação-recaptura, para que seja possível compreender a dinâmica desses insetos nos agroecossistemas. Estudos como esse visam adequar uma metodologia para anestesiá-los, sendo necessários estudos que abordem o desenvolvimento de uma metodologia para conhecimento da dispersão para assim proceder a continuidade dessa pesquisa.



Figura 2. *C. externa* anestesiada após exposição a -19°C por 4 minutos.

6. Conclusão

Para a anestesia de adultos de *C. externa* visando conhecer o tempo hábil para o manuseio durante o procedimento de marcação, sem perda de exemplares, é recomendado que se faça a exposição por até 3,5 minutos (entre 103 a 208 segundos), a -19°C .

7. Referências

- AGROFIT. **Consulta de ingrediente ativo**. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 04 fev. 2023.
- ALBUQUERQUE, G. S.; TAUBER, C. A.; TAUBER, M. J. *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): história de vida e potencial de controle biológico na América Central e do Sul. **Controle biológico**, v. 4, n. 1, pág. 8-13, 1994.
- AMARAL, B. B.; **Otimização da criação de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) visando sua produção em escala comercial. 2011.** Dissertação (Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2011.
- ANDERSEN, M. K.; OVERGAARD, J. The central nervous system and muscular system play different roles for chill coma onset and recovery in insects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 233, p. 246–251, 2019.
- ANDERSEN, M. K; et al. Central nervous system shutdown underlies acute cold tolerance in tropical and temperate *Drosophila* species. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n.12, p.1-8, 2018.
- ANDRADE, S. C. **Aspectos bioecológicos de *Quesada gigas* (Olivier, 1790) (Hemiptera: Cicadidae) associados à cultura do café.** 2018. Tese (Doutorado em Agronomia - Entomologia Agrícola) – Universidade Estadual Paulista, UNESP Campus Jaboticabal. 2018.
- ARENAS, L. D. O.; et al. Toxicidad de extractos de “venadillo” (*Swietenia humilis* ZUCC.) en adultos y ninfas de *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE). **Entomología Mexicana**, v. 1, n.1, 746-749, 2014.
- BADRE, N. H.; MARTIN, M. E.; COOPER, R. L. The physiological and behavioral effects of carbon dioxide on *Drosophila melanogaster* larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 140, n. 3, p. 363-376, 2005.
- BECCHI, L. K. ***Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae): controle de qualidade, detecção de endossimbiontes e dispersão em plantio de eucalipto.** 2021. Tese (Doutorado em Agronomia – Proteção de Plantas) Universidade Estadual Paulista, UNESP Campus Botucatu. 2021.
- BONANI, J. P.; et al. Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com *Planococcus citri* (Risso, 1813)(Hemiptera: Pseudococcidae) e *Toxoptera citricida* (Kirkaldy, 1907)(Hemiptera: Aphididae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p.31-38, 2009.

BORGES, L. F. **Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) pelo tratamento de sementes, híbridos de milho e predação por *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae).** 2020. 42 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba. 2020.

BOTTI, J. M. C.; et al. Predation of Coffee Berry Borer by a Green Lacewing. **Neotropical Entomology**, v. 51, n.1, p. 160-163, 2021.

BROOKS, S. J; BARNARD, P. C. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). **Bulletin of the Natural History Museum** (Entomology Series), v. 59, p. 117-286, 1990.

CARVALHO, C. F.; SOUZA, B. Métodos de criação e produção de crisopídeos. In: BUENO, V. H. P. (ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade.** 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. p. 77-115.

CARVALHO, G. A.; et al. Seletividade de inseticidas a *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotropical Entomology**, v.31, p.615-621, 2002.

CEVIK, D.; et al. Chloroform and desflurane immobilization with recovery of viable *Drosophila* larvae for confocal imaging. **Journal of Insect Physiology**, v. 117, p. 103900, 2019.

COLINET, H; RENAULT, D. Metabolic effects of CO₂ anaesthesia in *Drosophila melanogaster*. **Biology Letters**, v. 8, n. 6, p. 1050-1054, 2012.

COOPER, R.; WANG, C.; SINGH, N. Marca-liberação-recaptura revela extensa movimentação de percevejos (*Cimex lectularius* L.) dentro e entre apartamentos. **PloS One**, v. 10, n. 9, p. 1-20, 2015.

COSTA, R. I. F.; SOUZA, B.; FREITAS, S. Dinâmica espaço-temporal de taxocenoses de crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) em ecossistemas naturais. **Neotropical Entomology**, v. 39, p.470-475, 2010.

CUBILLOS, C.; et al. Cold tolerance mechanisms of two arthropods from the Andean Range of Central Chile: *Agathemera crassa* (Insecta: Agathemeridae) and *Euathlus condorito* (Arachnida: Theraphosidae). **Journal of thermal biology**, v. 74, p. 133-139, 2018.

CUELLO, E. M., et al. Prey consumption and development of the indigenous lacewing *Chrysoperla externa* feeding on two exotic Eucalyptus pests. **Biocontrol Science and Technology**, v.29, n.12, p. 1159-1171, 2019.

DAMI, B. G.; et al. Comportamento dos predadores *Chrysoperla externa* e *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) consumindo bicho-mineiro *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras (44., 2018, Franca). **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2018. (1 CD-ROM), 1 p.

DAVIES, P. L. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. **Trends in biochemical sciences**, v. 39, n. 11, p. 548-555, 2014.

DE BORTOLI, S.A.; et al. Desenvolvimento e capacidade predatória de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) em diferentes presas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 6, n. 1, p. 145-152, 2006.

DUMAN, J. G. Animal ice-binding (antifreeze) proteins and glycolipids: an overview with emphasis on physiological function. **The Journal of experimental biology**, v. 218, n. 12, p. 1846-1855, 2015.

ELZINGA, J. A.; et al. Distribution and colonization ability of three parasitoids and their herbivorous host in a fragmented landscape. **Basic and Applied Ecology**, v. 8, n.1, p. 75-88, 2007.

EVERATT, M. J.; et al. The effect of acclimation temperature on thermal activity thresholds in polar terrestrial invertebrates. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n. 10, p. 1057-1064, 2013.

FAIMAN, R., et al. Marking mosquitoes in their natural larval sites using 2H-enriched water: a promising approach for tracking over extended temporal and spatial scales. **Methods in ecology and evolution**, v.10, n.8, p. 1274-1285, 2019.

FERNANDES, O. A. O uso de marcadores no controle biológico, p. 115-123. In: PARRA, J. R. P.; P. S. M. BOTELHO; B. S. CORRÊA-FERREIRA; J. M. S. BENTO (Eds.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo, Manole, 613p. 2002.

FERRARI, E. F., et al. Controle de gorgulho-do-milho submetido ao tratamento térmico. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, n.3, p.196-204, 2011.

FIGUEIRA, L. K.; LARA, F. M. Relação predador: presa de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) para o controle do pulgão-verde em genótipos de sorgo. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 447-450, 2004.

FINDSEN, A.; et al. Why do insects enter and recover from chill coma? Low temperature and high extracellular potassium compromise muscle function in *Locusta migratoria*. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n.8, p. 1297-1306, 2014.

FREDDI, W.E. da S. Preparo da gestante para o parto. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 26, p. 108-120, 1973.

FREITAS, S. D.; MORALES, A. C. Indicadores morfométricos em cabeças de espécies brasileiras de *Chrysoperla* (Neuroptera, Chrysopidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, p. 499-503, 2009.

FREITAS, S. O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas. In: PARRA, J. R. P. et al. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 209-224.

FREITAS, S.; PENNY, N. D. The green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of Brazilian agro-ecosystems. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 52, n. 29, p. 245-395, 2001.

FROST, E.H.; SHUTLER, D.; HILLIER, N.K. Effects of cold immobilization and recovery period on honeybee learning, memory, and responsiveness to sucrose. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 10, p. 1385-1390, 2011.

GAZONI, F. L., et al. Avaliação da resistência do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) a diferentes temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p.69-74, 2012.

HAGLER, J.; et al. Parasitoid Mark-Release-Capture Techniques II. Development and Application of a Protein Marking Technique for *Eretmocerus* spp., Parasitoids of *Bemisia argentifolii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 12, n.6, p. 661-675, 2002.

HAGLER, J.; et al. A method for distinctly marking honeybees, *Apis mellifera*, originating from multiple apiary locations. **Journal of Insect Science**, v. 11, n. 143, 2011.

HARUYAMA, N., et al. Green lacewing phylogeny, based on three nuclear genes (Chrysopidae, Neuroptera). **Systematic Entomology**, v. 33, n. 2, p. 275-288, 2008.

HAZELL, S. P.; BALE, J. S. Low temperature thresholds: Are chill coma and CTmin synonymous? **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 8, p. 1085-1089, 2011.

HORI, S.; et al. Associative visual learning, color discrimination, and chromatic adaptation in the harnessed honeybee *Apis mellifera* L. **Journal of Comparative Physiology**, v. 92, p. 691–700, 2006.

JUDD, G. J. R.; et al. Operational mark–release–recapture field tests comparing competitiveness of wild and differentially mass-reared codling moths from the Okanagan–Kootenay sterile insect program. **Canadian Entomologist**, v. 143, n. 3, p. 300-316, 2011.

LEE, R.E. Insect cold-hardiness: to freeze or not to freeze. **Bioscience**, v. 39, n. 5, p. 308-313, 1989.

LEE, R.E. Principles of insect low temperature tolerance. In: LEE, R.E.; DENLINGER, D.L. (eds) **Insects at low temperature**. Springer, Boston, 1991. p. 17-46.

LOEBLEIN, J. S.; et al. Bioassay technique and maintenance of *Gyropsylla spagazziniana* (Lizer, 1719)(Hemiptera: Psylloidea: Aphalaridae) in vitro conditions. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 3, p. 2019.

LORU, L.; et al. An individual marking technique for green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). **The Florida Entomologist**, v. 96, p. 628-630, 2013.

LORU, L.; et al. Ethyl acetate: a possible alternative for anaesthetizing insects. **Annales de la Société Entomologique de France**, v.46, p.422-424, 2010.

LOXDALE, H.D.; LUSHAI, G. Slaves of the environment: the movement of herbivorous insects in relation to their ecology and genotype. **Philosophical**

Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, v.354, p.1479-1495, 1999.

LUNA, L. A. V.; et al. Taxonomía y registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. **Acta zoológica mexicana**, v.22, n.1, p. 17-61, 2006.

LUNA-ESPINO, H. M.; JIMÉNEZ-PÉREZ, A.; CASTREJÓN-GÓMEZ, V. R. Assessment of *Chrysoperla comanche* (Banks) and *Chrysoperla externa* (Hagen) as biological control agents of *Frankliniella occidentalis* (Pergande)(Thysanoptera: Thripidae) on tomato (*Solanum lycopersicum*) under glasshouse conditions. **Insects**, v. 11, n. 2, p. 87, 2020.

MACMILLAN, H. A.; SINCLAIR, B. J. Mechanisms underlying insect chill-coma. **Journal of insect physiology**, v. 57, n. 1, p. 12-20, 2011.

MAIA, W. J. M.; et al. Capacidade predatória e aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861)(Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856)(Hemiptera: Aphididae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 1259-1268, 2004.

MICHAUD, M. R.; DENLINGER, D. L. Molecular modalities of insect cold survival: current understanding and future trends. In: **International Congress Series**. Elsevier, v.1275, p. 32-46, 2004.

MORAES, J. C.; et al. Resposta da aplicação de atrativos alimentares na população de crisopídeos em cafeeiro em transição para sistema de cultivo orgânico. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil (2., 2001, Vitória, ES). **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2001. (CD-ROM), p. 2062-2068

OVERGAARD, J., & MACMILLAN, H. A. The integrative physiology of insect chill tolerance. **Annual review of physiology**, v.79, p.187-208, 2017.

OSWALD, J. D.; MACHADO, R. J. Biodiversity of the Neuropterida (Insecta: Neuroptera, Megaloptera, and Raphidioptera). **Insect Biodiversity: science and society**, v. 2, p. 627-672, 2018.

PANNUTI L. E., et al. (External marking and behavior of early instar *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean. **Florida Entomologist**, v. 102, n.1, p.90-95, 2019.

PEREIRA, L. L. **Controle biológico em roseiras: avaliação do predador *Chrysoperla externa* na redução populacional do afídeo *Rhodobium porosum***. 2020. 76 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

PIRES, E. M. **Dispersão e predação de *Asopinae* associados à eucaliptocultura**. 2010. Tese (Doutorado em Entomologia - Ciência) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2010.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available in: <https://www.R-project.org>.

RAYL, R. J.; WRATTEN, S. D. A comparison of anesthesia techniques for entomological experimentation: longevity of the leaf-mining fly pest *Scaptomyza flava* Fallén (Drosophilidae). **PeerJ Preprints**, v. 4, n.1, 2016.

REZENDE, G. F. Aspectos da ecologia da movimentação e da reprodução como bases para o manejo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). 2022. Tese (Doutorado em Agronomia – Entomologia agrícola) Universidade Estadual Paulista, UNESP Campus Jaboticabal. 2022.

RINK, M.; SINSCH, U. Radio-telemetric monitoring of dispersing stag beetles: Implications for conservation. **Journal of Zoology**, v. 272, n. 3, p. 235-243, 2007.

ROBINET, C.; DAVID, G.; JACTEL, H. Modeling the distances traveled by flying insects based on the combination of flight mill and mark-release-recapture experiments. **Ecological Modelling**, v. 402, p. 85-92, 2019.

SEMPER, C. Animal life as affected by the natural conditions of existence. **D. Appleton**, v. 30, p. 108, 1881.

SENIOR, L. J.; MCEWEN, P. K. The use of lacewings in biological control. In: MCEWEN, P. K.; NEW, T. R. WHITTINGTON, A.E. (ed.). **Lacewings in the Crop Environment**. Ed. London: Cambridge University Press. 2001. p. 296-302.

SHEN, J.; et al. CO₂ anesthesia on *Drosophila* survival in aging research. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 103, n.1, p. e21639, 2020.

TAUBER, M. J., et al. Commercialization of predators: recent lessons from green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae: *Chrysoperla*). **American Entomologist**, v. 46, n. 1, p. 26-38, 2000.

TOMASETO, A. F. **Capacidade de dispersão de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**. 2012. 78p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

VACAS, S.; et al. Survey on *Drosophila suzukii* natural short-term dispersal capacities using the mark– release– recapture technique. **Insects**, v.10, n.9, p.268, 2019.

VAVASSORI, L.; SADDLER, A.; MÜLLER, P. Active dispersal of *Aedes albopictus*: a mark-release-recapture study using self-marking units. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2019.

VILARINHO, E. C. **Marcação de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) e dispersão de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae)**. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia – Entologia Agrícola) Universidade Estadual Paulista- Câmpus Jaboticabal. 2007.

WANG, Y.; et al. Consumption of Bt rice pollen expressing Cry2Aa does not cause adverse effects on adult *Chrysoperla sinica* Tjeder (Neuroptera: Chrysopidae). **Biological Control**, v. 61, n.3, p. 246-251, 2012.

ZHANG, D.; et al. Toward implementation of combined incompatible and sterile insect techniques for mosquito control: Optimized chilling conditions for handling *Aedes albopictus* male adults prior to release. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.14, p.1-23, 2020.