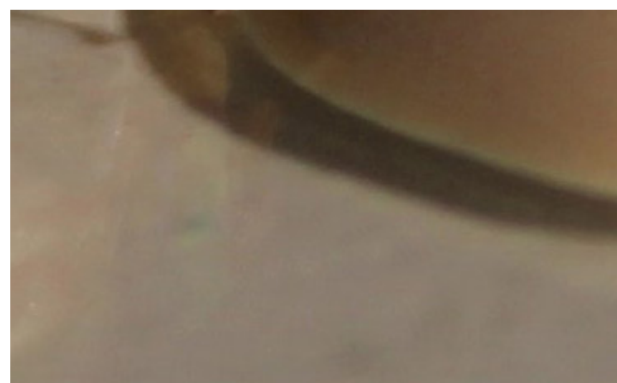
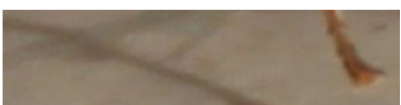
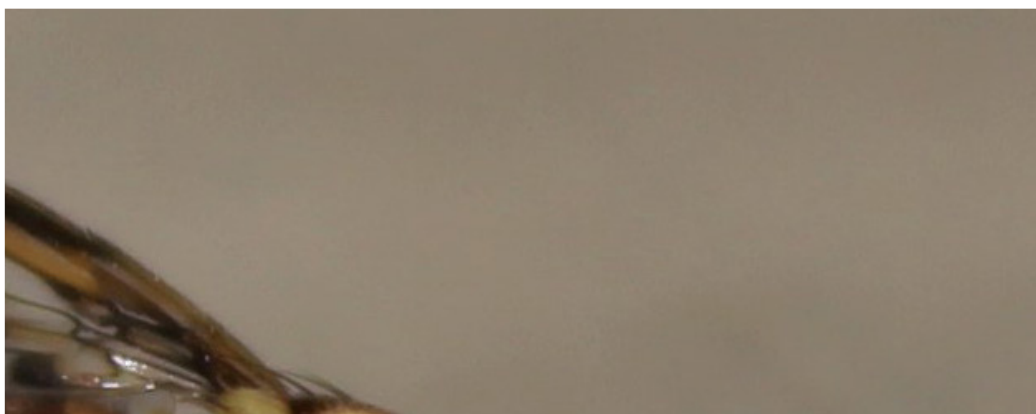


Recomendações para avaliação de iscas tóxicas sobre as moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em laboratório



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Uva e Vinho
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 109

Recomendações para avaliação de iscas tóxicas sobre as moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em laboratório

*Marcelo Zanelato Nunes, Cléber Antonio Baronio, Ruben Machota Jr., Lígia Caroline Bortoli,
Joel Pasinato, Morgana Baldin, Inana Xavier Schütze, Marcos Botton*

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95701-008 Bento Gonçalves, RS

Fone: (0xx) 54 3455-8000
Fax: (0xx) 54 3451-2792
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Uva e Vinho

Presidente
Adeliano Cargnin

Secretário-Executivo
Edgardo Aquiles Prado Perez

Membros
João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto, Klecius Ellera Gomes, Luciana Mendonça Prado, Nubia Poliana Vargas Gerhardt, Rochelle Martins Alvorcem, Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Supervisão editorial
Klecius Ellera Gomes

Revisão de texto
Edgardo Aquiles Prado Perez

Normalização bibliográfica
Rochelle Martins Alvorcem CRB10/1810

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Edgardo Aquiles Prado Perez

Foto da capa
Ruben Machota Junior

1ª edição
Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Uva e Vinho

Recomendações para avaliação de iscas tóxicas sobre as moscas-das-frutas
Anastrepha fraterculus e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em laboratório
/ Marcelo Zanelato Nunes ... [et. al.] – Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e
Vinho, 2019.
20 p. : il. color. -- (Documentos, 109).

ISSN 1808-4648

1. Moscas das frutas. 2. Praga de planta. 3. *Anastrepha fraterculus*. 4. Mosca-Sul-Americana. 5. *Ceratitis capitata*. 6. Mosca do Mediterrâneo. 7. Iscas tóxicas. I. Nunes, Marcelo Zanelato. II. Embrapa Uva e Vinho. III. Série.

CDD 632.77

© Embrapa, 2019

Autores

Marcelo Zanelato Nunes

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitossanidade/Entomologia, Bolsista de Pós-Graduação, UFPel, Pelotas-RS.

Cléber Antonio Baronio

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitossanidade/Entomologia, Bolsista de Pós-Graduação, UFPel, Pelotas-RS.

Ruben Machota Jr.

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitossanidade/Entomologia, Bolsista de Pós-Doutorado, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves-RS.

Lígia Caroline Bortoli

Bióloga, Mestre em Fitossanidade/Entomologia, Bolsista do CNPq, UFPel, Pelotas-RS.

Joel Pasinato

Biólogo, Mestre em Agronomia, Bolsista de Pós-Graduação, UFRGS, Porto Alegre-RS.

Morgana Baldin

Engenheira Agrônoma, Mestre em Fitossanidade/Entomologia, Bolsista de Pós-Graduação, UFPel, Pelotas-RS.

Inana Xavier Schutze

Engenheira Agrônoma, Mestre em Fitossanidade/Entomologia, Bolsista de Pós-Graduação, UFPel, Pelotas-RS.

Marcos Botton

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Entomologia, Pesquisador Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS.

Apresentação

As iscas tóxicas têm sido uma ferramenta importante para o manejo das moscas-das-frutas no Brasil. De maneira geral, a tecnologia consiste na associação entre um atrativo alimentar e um agente letal que controla os adultos do inseto ao entrarem em contato ou se alimentarem da mistura. Como vantagens do uso da tecnologia, destaca-se o emprego de doses reduzidas de inseticidas e a possibilidade de diminuir a presença de resíduos tóxicos nos frutos, devido a aplicação ser realizada nas bordas dos pomares, nos troncos e/ou folhas, evitando atingir os frutos.

Nos últimos anos, tem havido uma retomada nas pesquisas com iscas tóxicas visando o desenvolvimento de novas formulações. Esta publicação é parte dos resultados de pesquisas conduzidas há mais de uma década pela equipe do laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho, que tem buscado uma melhor compreensão das questões relativas à eficácia no emprego das iscas tóxicas.

A publicação descreve uma proposta de metodologia para a avaliação de iscas tóxicas em laboratório, utilizando como modelo as espécies *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*, importantes pragas da fruticultura gaúcha e brasileira, como modelo. Portanto, a metodologia proposta poderá auxiliar na condução de experimentos de avaliação de iscas tóxicas em laboratório, bem como contribuir com o conhecimento da relação isca tóxica-inseto, levando ao desenvolvimento e adoção de formulações mais eficientes pelos fruticultores.

Jose Fernando da Silva Protas
Chefe Geral da Embrapa Uva e Vinho

Sumário

Introdução	6
Fatores a serem considerados na condução de experimentos	7
Legislação	7
Ambiente experimental	8
Protocolo experimental e lista de verificação	9
Obtenção dos insetos adultos	10
Fornecimento das iscas tóxicas	10
Anestesiamento dos insetos	10
Unidades experimentais	11
Quantidade de insetos por unidade experimental	12
Quantidade de isca tóxica a ser fornecida	12
Fatores inerentes aos insetos utilizados	13
Idade dos insetos	13
Privação alimentar	14
Fornecimento de alimento e água	14
Intervalo de avaliação	15
Procedimento padrão na instalação de experimentos para avaliação de iscas tóxicas	16
Passo-a-passo	16
Análise estatística	17
Referências	17

Introdução

As moscas-das-frutas estão entre as principais pragas da fruticultura brasileira (ARIOLI et al., 2015). Dentre as espécies com maior ocorrência na Região Sul do Brasil, destacam-se a mosca-das-frutas sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e a mosca-do-mediterrâneo *Ceratitidis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) (ARIOLI et al., 2015; BOTTON et al., 2016). Os maiores prejuízos são atribuídos às fêmeas (dano direto) que perfuram os frutos para realizar a oviposição. Após a eclosão das larvas, estas iniciam a alimentação resultando em injúrias nos frutos com destruição da polpa (SORIA, 1985; AGUIAR-MENEZES et al., 2004; ZART et al., 2011). Estas injúrias ocasionam alterações fisiológicas que aceleram os processos de maturação e conduzem à queda prematura dos frutos (SALLES, 1999; BOTTON et al., 2003), tornando-os impróprios para o comércio, além de facilitar a penetração de patógenos, reduzindo a qualidade do produto final (SANTOS et al., 2008; MACHOTA JUNIOR et al., 2016). Dependendo da espécie frutífera cultivada, podem ocorrer variações no aparecimento e intensidade de sintomas característicos de infestações por moscas-das-frutas (ARIOLI et al., 2015), e em alguns casos, as perdas nas áreas de produção podem chegar a 100% (HERNANDES et al., 2013).

O manejo destes insetos-praga tem sido realizado principalmente através do monitoramento com atrativos alimentares e/ou sexuais (feromônios) e do controle através de pulverizações com inseticidas organofosforados em cobertura (KOVALESKI; RIBEIRO, 2003; SCOZ et al., 2004; RAGA; SATO, 2006; URBANEJA et al., 2009; HÄRTER et al., 2010; BOTTON et al., 2016). De modo geral, os inseticidas utilizados para o controle possuem elevada toxicidade aos mamíferos e peixes, baixa seletividade aos inimigos naturais e grande período de carência, levando a preocupações sobre os efeitos desses resíduos nos alimentos e no ambiente (NAKANO; ROMANO, 2002; SCOZ et al., 2004).

Como alternativa às aplicações em cobertura, uma técnica de menor impacto ambiental para a supressão populacional das espécies de moscas-das-frutas é o emprego de iscas tóxicas (STARK et al., 2004; YEE; ALSTON, 2006; ZART et al., 2009) que, quando aplicadas em faixas na borda dos pomares ou em linhas alternadas no interior do cultivo provocam a morte dos adultos quando ingeridas. Dentre os benefícios da aplicação de iscas tóxicas destacam-se reduções nas quantidades de ingrediente ativo aplicados por área (YEE; ALSTON, 2006), de resíduos em frutos (ZART et al., 2009) e de efeitos deletérios aos insetos benéficos como abelhas e parasitoides (STARK et al., 2004, ROSA, 2016). Além disso, algumas formulações apresentam alta resistência à lavagem pela água da chuva, reduzindo a necessidade de reaplicações ao longo da safra.

No Brasil, diferentes atrativos alimentares e formulações de iscas tóxicas de pronto uso são empregados pelos fruticultores no manejo de moscas-das-frutas (Tabela 1).

Os atrativos alimentares para a elaboração de iscas tóxicas na propriedade são utilizados em mistura com inseticidas registrados para a cultura, apresentando efeito de contato e/ou ingestão sobre os adultos da espécie-alvo. Nesse sentido, merecem destaque os inseticidas organofosforados, piretroides e espinosinas (SCOZ et al., 2004; RAGA; SATO, 2006; SCHÜTZE et al., 2018; BALDIN et al., 2018). Ressalta-se a demanda permanente pela avaliação de novas moléculas para emprego como agentes letais no manejo de moscas-das-frutas devido às restrições quanto a toxicidade dos organofosforados e ao potencial de seleção de populações resistentes quando se emprega o mesmo grupo químico. Por esse motivo, a busca constante por novos inseticidas para o controle de mosca-das-frutas é uma necessidade que requer confiáveis e precisas avaliações destes produtos em condições controladas. Entretanto, algumas questões básicas comuns aos

Tabela 1. Atrativos alimentares e formulações de iscas tóxicas de pronto uso disponíveis no Brasil.

Nome ou Marca	Categoria		Diluição recomendada em água ¹	Fabricante ²
	Atrativo alimentar	Isca tóxica de pronto uso		
Melaço-de-cana de açúcar	X			
Biofruit	X		3 a 5%	BioControle
Flyral	X		1,25%	Bioiberica / Wiser
Isca Samaritá	X		3 a 5%	Samaritá
Anamed	X		sem diluição	Isca Tecnologias
Success 0,02CB		X	1:1,5 v/v	Corteva Agriscience

¹ referem-se às proporções de 'parte do produto comercial: parte de água', conforme recomendação dos fabricantes.

² a menção a estas marcas é apenas para fins ilustrativos, não havendo, por parte da Embrapa, qualquer tipo de conotação comercial.

experimentos laboratoriais de ingestão passam pela padronização e compreensão dos diferentes fatores envolvidos. Além disso, observa-se que alguns fatores decisivos na avaliação de inseticidas não são padronizados, resultando em variações das metodologias empregadas nos experimentos químicos de ingestão em laboratório.

Os experimentos para avaliação de novos inseticidas, formulações de iscas tóxicas com atrativos alimentares + agentes letais ou iscas tóxicas de pronto uso são primeiramente realizados em laboratório devido à facilidade de condução e o isolamento de fatores biológicos e ambientais. Apesar disso, tratando-se de formulações de iscas tóxicas, os protocolos disponíveis não são padronizados e podem resultar em falhas na interpretação dos resultados.

Este comunicado técnico tem como objetivo descrever fatores relevantes na condução de experimentos de avaliação de iscas tóxicas em laboratório para as espécies de moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitidis capitata*.

Fatores a serem considerados na condução dos experimentos

Legislação

Importante salientar que no Brasil, existem normas legais aplicáveis às atividades relacionadas à criação e manutenção de insetos em cativeiro, incluindo a coleta de material biológico conforme IN nº 3, de 2014, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, 2014) e a manutenção de animais silvestres – vertebrados e invertebrados – em cativeiro por prazo superior a 24 meses, conforme a Lei Complementar nº 140, de 2011 (BRASIL, 2011) e a IN nº 7, de 2015 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2015).

Sendo assim, o pesquisador interessado deverá solicitar a autorização ou licença por meio do cadastro on line no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBio (disponível em <<http://www.icmbio.gov.br/sisbio/>>). No caso de manutenção temporária de espécimes da fauna silvestre em cativeiro, por exemplo, o pesquisador deverá requerer autorização para execução de atividades com finalidade científica ou didática.

Também cabe ao pesquisador fazer o cadastro de acesso ao patrimônio genético, assim como de envio e remessa de material, acessando o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, sistema eletrônico criado pelo Decreto nº 8.772, de 2016 (BRASIL, 2016), que regulamenta a Lei nº 13.123, de 2015 (BRASIL, 2015) como um

instrumento para auxiliar o Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGen – na gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado.

Ambiente experimental

Os experimentos devem ser conduzidos em ambiente que permita a regulagem e manutenção da temperatura, umidade e fotoperíodo compatível com as exigências ambientais de cada espécie de mosca-das-frutas a ser utilizada. A sala a ser utilizada para a condução desses experimentos deve apresentar temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $70 \pm 10\%$. Recomendam-se variações na fotofase de acordo com a necessidade de cada espécie, como por exemplo, 12 h para *A. fraterculus* e 14 h para *C. capitata*.

A superfície para a instalação dos experimentos deve oferecer igualdade de condições ambientais entre as unidades experimentais (gaiolas) e ao mesmo tempo facilitar as avaliações. Para isso, sugere-se a instalação dos experimentos em superfícies planas, tais como mesas, bancadas (Figura 1), estantes ou prateleiras (Figura 2) que deem suporte às gaiolas. Mesas possuem a limitação de requerer demasiado espaço físico por acomodarem todas as unidades experimentais em um mesmo nível. Além de não removíveis, as bancadas limitam-se por, muitas vezes, não serem destinadas exclusivamente à instalação dos experimentos. As estantes e prateleiras, por sua vez, são eficientes na economia de espaço físico, podendo ser facilmente removíveis e destinadas exclusivamente aos experimentos. No entanto, considerando o fator ambiental luminosidade, mesas e bancadas são mais indicadas, uma vez que, estantes ou prateleiras poderão fornecer uma distribuição irregular de luminosidade entre as unidades experimentais em seus diferentes níveis. Para evitar esta condição, poderão ser realizadas adaptações com lâmpadas posicionadas atrás das prateleiras.

A sala deve ser destinada preferencialmente para a instalação de experimentos, sendo higienizada com frequência evitando a infestação e/ou proliferação de agentes contaminantes. Após cada turno de trabalho, superfícies e equipamentos utilizados devem ser descontaminados com um desinfetante eficaz (álcool 70%, por exemplo). Água limpa e detergente neutro – sem cheiro – podem ser utilizados para a limpeza geral, assegurando que, qualquer resíduo de detergente tenha sido removido ao final do processo. Materiais endurecidos, como porções de dieta, por exemplo, podem ser facilmente removidos com uso de água quente, sendo desaconselhado o uso de produtos abrasivos que podem danificar estruturas plásticas. Superfícies contaminadas por fungos e/ou infestada por

Fotos: Ruben Machota Jr.



Figura 1. Superfícies para instalação e condução dos experimentos de toxicidade de iscas tóxicas sobre moscas-das-frutas em laboratório: mesas (a) e bancadas (b) para disposição das gaiolas.



Fotos: Cléber Antonio Baroni

Figura 2. Superfícies para instalação e condução dos experimentos de toxicidade de iscas tóxicas sobre moscas-das-frutas em laboratório: estantes com prateleiras (a) e detalhe do regulador de fotoperíodo (b). No piso ao fundo, umidificador para manutenção da umidade relativa da sala experimental.

ácaros (Arachnidae: Acari) podem ser limpas com solução de vinagre de álcool e água, na proporção 1:1 v/v. Teias de aranhas (Arachnidae: Araneae) podem ser removidas utilizando aspiradores de pó, vassouras ou escovas.

Protocolo experimental e lista de verificação

A elaboração de um protocolo experimental é uma etapa importante na realização da pesquisa científica, tendo como base a hipótese formulada pelo pesquisador. É durante a sua elaboração que o pesquisador pode aprofundar as ideias básicas do projeto, considerando os aspectos teóricos e práticos de sua operacionalidade. Além da revisão bibliográfica, o protocolo deverá contemplar, em linhas gerais, os demais pontos de importância do experimento, tais como: o objetivo do estudo; a seleção das amostras (populações de insetos a serem estudadas e suas características); o desenho do experimento (formulação de hipóteses, definição do delineamento experimental e do número de tratamentos e repetições); as estratégias de condução do experimento (horário do dia, número e intervalo entre as avaliações) e posterior análise dos dados.

De posse do protocolo experimental é importante que seja realizada a verificação prévia de todo o material necessário para condução do experimento, incluindo balança de precisão, cilindro de CO₂, congeladores e/ou refrigeradores (quando for o caso), além do número total de insetos, a quantidade de gaiolas, fontes de alimento e água, e as condições de uso dos atrativos (alimentares e/ou sexuais) e produtos fitossanitários. Esta verificação é crucial para a condução dos trabalhos com máxima eficiência.

Obtenção dos insetos adultos

Os insetos a serem submetidos aos ensaios devem ser criados de forma padronizada durante todas as fases de desenvolvimento. O Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, segue a metodologia adaptada de Machota Junior et al. (2010) para criação de *A. fraterculus* utilizando dieta sólida para adultos à base de extrato de soja, gérmen de trigo *in natura* e açúcar mascavo na proporção 3:1:1. Para a oviposição e desenvolvimento larval são utilizados frutos de mangueira *Mangifera indica* L. das cultivares Tommy Atkins ou Palmer, como alternativa aos frutos de mamoeiro *Carica papaya* L.. Adultos de *C. capitata* são mantidos seguindo a mesma metodologia, utilizando para a fase larval a dieta artificial proposta por Salles (1992) e adaptada por Nunes et al. (2013).

Fornecimento de iscas tóxicas

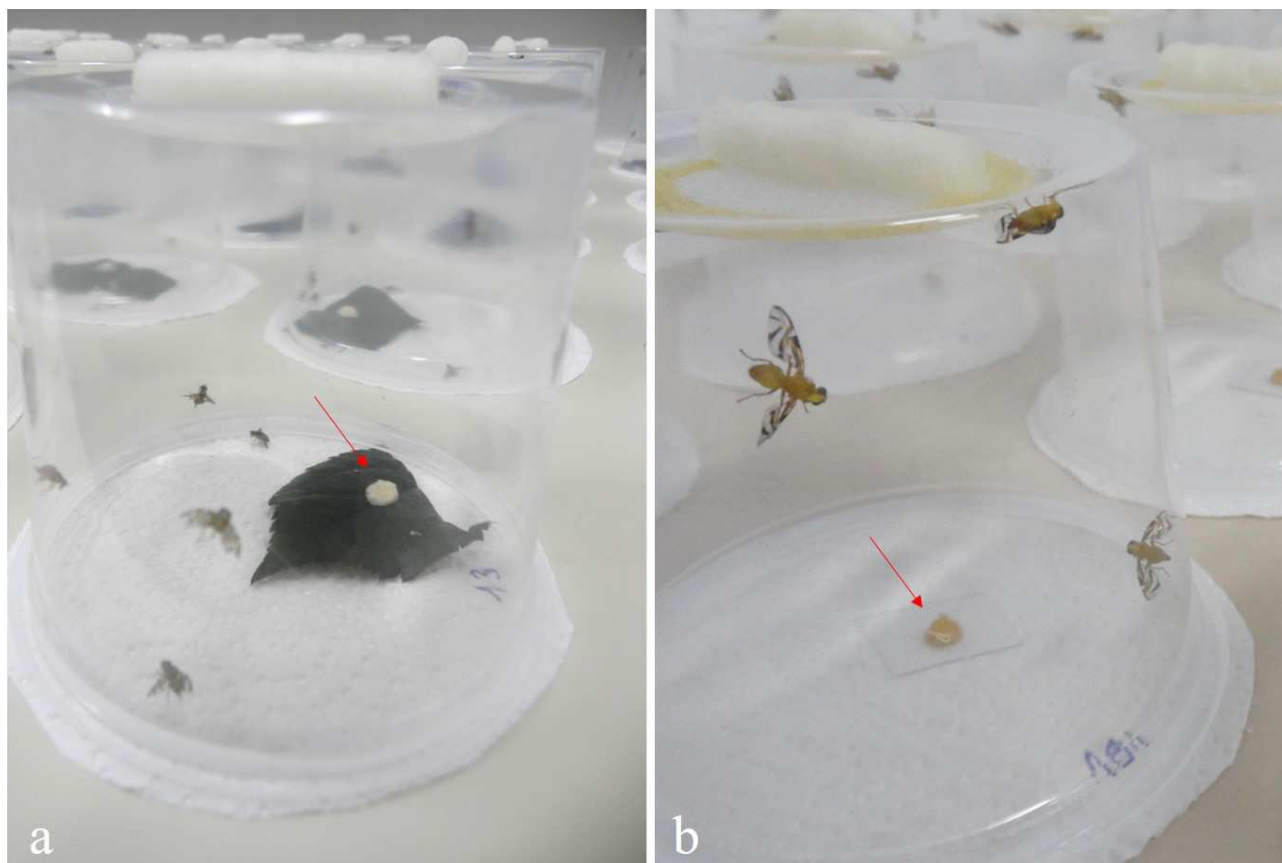
As iscas tóxicas a serem avaliadas são geralmente aplicadas sobre folhas de plantas (MEDINA et al., 2004; RAGA; SATO, 2006; CHUECA et al., 2007; URBANEJA et al., 2009; BORGES et al., 2015), em especial no caso de experimentos com chuva simulada. Porções plásticas de polietileno tereftalato – PET (Figura 3) recortadas de garrafas, lamínulas de microscópio (GAZIT et al., 2012) ou ainda tampas plásticas podem ser utilizadas para o fornecimento das formulações (RAGA; SATO, 2006; MACHOTA JUNIOR et al., 2013).

A utilização de porções plásticas do tipo PET ou lamínulas de microscópio como superfícies inorgânicas para a aplicação dos tratamentos, reduz a possibilidade de contaminação decorrente da pré-existência de resíduos de agentes letais, comumente encontrados quando folhas de plantas são utilizadas. Além disso, diferenças no teor de umidade entre o ambiente e a porção de folha utilizada podem resultar no enrolamento da mesma, dificultando o acesso do inseto à isca tóxica e as avaliações posteriores.

Anestesiamento dos insetos

Antes da utilização dos insetos em diversos estudos tem sido realizada a dessensibilização ou anestesiamento destes, geralmente com exposição ao dióxido de carbono ou ao frio (NONDILLO et al., 2007; EFROM et al., 2011; RAGA et al., 2018). O tempo de exposição varia conforme a espécie de mosca-das-frutas, podendo variar também conforme as condições ambientais no dia do experimento, caso estas não sejam controladas. Neste sentido, dias quentes propiciam a maior atividade dos insetos, resultando em um menor efeito da anestesia e um rápido retorno destes à atividade normal de deslocamento e voo. De maneira geral, adultos de *A. fraterculus* e *C. capitata* requerem tempos entre 3,5 e 4 minutos de dessensibilização ao frio (1 °C). Com os insetos anestesiados e as gaiolas disponíveis, pode-se dar início ao preparo das unidades experimentais.

Em experimentos de laboratório foram avaliados diferentes métodos de anestesiamento de insetos e o efeito destes sobre a mortalidade de adultos de *A. fraterculus* após ingestão de isca tóxica. Os insetos adultos (machos e fêmeas com 15 dias de idade) foram anestesiados (Figura 4) utilizando três métodos distintos (dióxido de carbono – CO₂, frio e éter de petróleo) originando os seguintes tratamentos: (1) anestesia com CO₂ por 30 segundos; (2) anestesia com frio, à temperatura de -12 °C por 2 minutos; (3) anestesiados com frio, à temperatura de 1 °C por 4 minutos; (4) anestesia com éter por 60 segundos, e (5) insetos manipulados pelas asas, com auxílio de uma pinça metálica de ponta fina, sem o uso de anestesia. A formulação inseticida utilizada foi o espinosade Success 0,02



Fotos: Ruben Machota Junior e Cléber Antonio Baroni

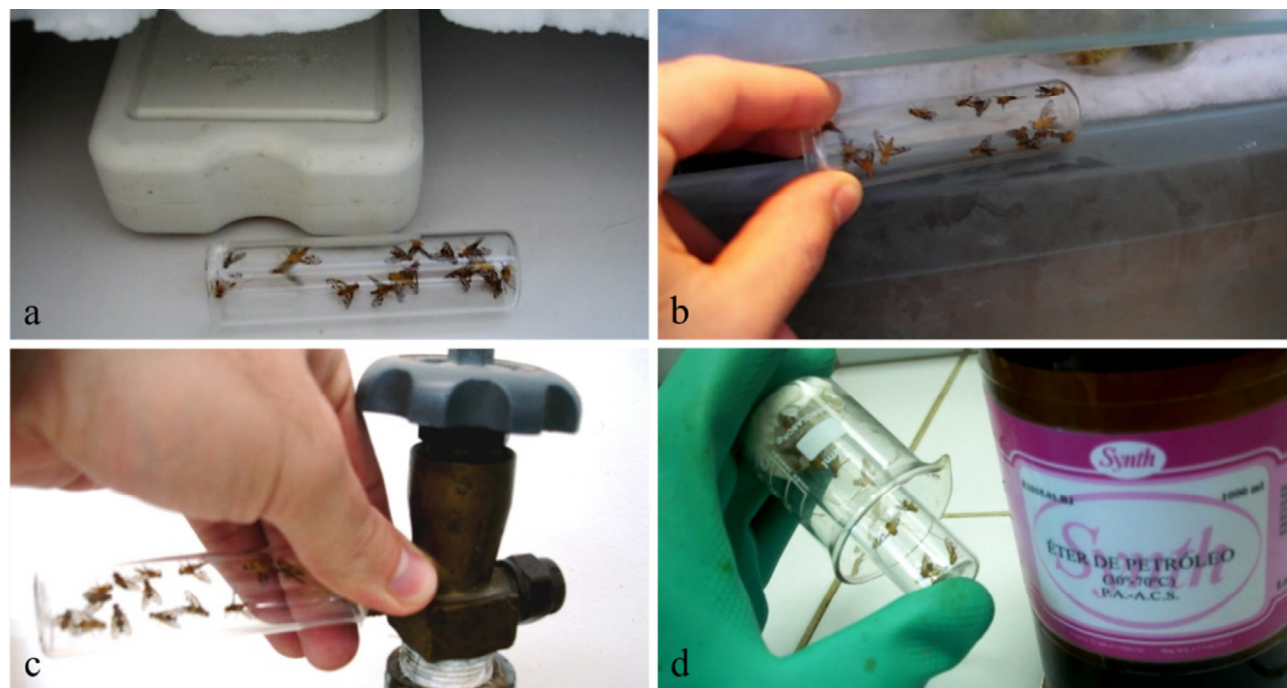
Figura 3. Fornecimento de isca tóxica para moscas-das-frutas em laboratório: a) isca tóxica aplicada sobre folhas de macieira *Malus domestica* Borkh.; b) isca tóxica aplicada sobre porções plásticas de polietileno tereftalato PET. As setas indicam a gota de isca tóxica.

CB (dosagem de 1:1,5 – produto comercial: água) (Corteva Agriscience), tendo como testemunha água destilada.

Como resultados, a mortalidade promovida pelos diferentes métodos de anestesia não diferiu entre machos e fêmeas ($p > 0,05$), assim como não houve diferença na mortalidade promovida pelos tratamentos 24 e 48 horas após a aplicação (HAA), embora 72 HAA, insetos anestesiados com 'Éter' apresentaram mortalidade significativamente superior aos demais tratamentos. Desta forma, a utilização de diferentes métodos de anestesia, à exceção do 'Éter', não influenciaram a mortalidade de adultos de *A. fraterculus* em experimentos de ingestão com isca tóxica à base de espinosade em laboratório.

Unidades experimentais

Comumente utilizam-se unidades experimentais confeccionadas a partir de potes plásticos de 300 a 350 mL de capacidade, com fundo recortado e cobertos com tela plástica (malha de 1 mm). Facilmente lavável, a malha plástica permite a circulação de ar pelo interior da gaiola, reduzindo a possibilidade de proliferação de microorganismos contaminantes, além de permitir a utilização de roletes dentais umedecidos para fornecer alimentação aos insetos através do topo da gaiola. Este tamanho de gaiola permite a utilização de quatro a cinco casais por unidade experimental. Recipientes maiores, de 500 a 1000 mL, podem facilitar a fuga dos insetos durante as avaliações. Além disso, requerem demasiado espaço físico para a instalação das unidades amostrais e também



Fotos: Ruben Machota Junior

Figura 4. Métodos de anestesiamento de mosca-das-frutas para ensaios em laboratório: a) ao frio (1 °C por 4 minutos); b) ao frio (-12 °C por 2 minutos); c) por dióxido de carbono (CO₂ por 30 segundos) e d) por éter de petróleo (exposição aos vapores por 60 segundos).

para o depósito em almosarifados quando não estão em uso. Recipientes menores que 300 mL não são recomendados, pois, reduzem o espaço para livre circulação dos insetos.

Quantidade de insetos por unidade experimental

O número de insetos a ser utilizado deve estar de acordo com o tamanho das gaiolas e a praticidade de avaliação. Gaiolas com uma grande quantidade de insetos (superior a cinco casais) implicam em dificuldades para avaliação do número de insetos mortos, facilitando a fuga dos demais no momento do registro. Por isso, indica-se a utilização de quatro a cinco casais de insetos por gaiola para as espécies *A. fraterculus* e *C. capitata*.

Segundo Stark¹ (2015), especialista em ensaios toxicológicos com tefritídeos da Washington State University, Pullman, WA, EUA, nas avaliações de formulações de iscas tóxicas a individualização de insetos por unidade experimental (um macho ou fêmea por gaiola, por exemplo) é desnecessária, pois além de laboriosa, requer materiais e espaço físico em demasia, devendo o pesquisador atentar para o número total de insetos por unidade experimental (gaiola).

Quantidade de isca tóxica a ser fornecida

A quantidade de isca tóxica a ser disponibilizada depende do número de insetos utilizados. No entanto, uma gota de 40 microlitros (µL) atende a demanda para o número de insetos proposto, considerando um tempo de fornecimento de até 4 horas (BARONIO et al., 2019). Após a aplicação da isca tóxica sobre a superfície escolhida, as gotas deverão ser submetidas à um intervalo de secagem à sombra antes do fornecimento aos insetos. De maneira geral, um intervalo de 4 horas mostrou-se suficiente para secagem das formulações de iscas tóxicas disponíveis no mercado brasileiro.

¹ Comunicação pessoal de John D. Stark, em fevereiro de 2015.

Apesar de algumas formulações líquidas de iscas tóxicas reduzirem sensivelmente sua eficiência após poucas horas de secagem (REVIS et al., 2004), o oferecimento das gotas secas assemelha-se às condições de campo onde, de maneira geral, as formulações sofrem rápida desidratação após a aplicação, especialmente em dias quentes. Além disso, comparada ao produto fresco, o ressecamento da gota de isca tóxica diminui a probabilidade de contaminação de outras porções da gaiola quando do eventual contato dos insetos com o produto.

Fatores inerentes aos insetos utilizados

Frutos infestados de plantas hospedeiras e dietas artificiais são as duas fontes principais de manutenção de populações de moscas-das-frutas em laboratório para o fornecimento de insetos para experimentos toxicológicos. Neste sentido, a forma de obtenção dos insetos, bem como a proporção sexual, a idade e o tempo de privação alimentar destes antes do oferecimento das iscas são fatores que poderão influenciar os resultados obtidos nos experimentos. Além desses, o tempo de oferecimento da isca tóxica e a presença de outra fonte alimentar junto ao tratamento a ser avaliado poderão influenciar a taxa de mortalidade e consequente eficiência dos tratamentos (NUNES, 2017; BARONIO et al., 2019).

Estudos realizados no Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, apontam que adultos de *A. fraterculus* que tiveram seu desenvolvimento larval em dieta artificial apresentaram uma mortalidade 10% mais rápida em comparação aos insetos com desenvolvimento larval em frutos de mangueira ou araçazeiro (*Psidium cattleianum*) após exposição à isca tóxica Success 0,02CB (NUNES, 2017). De modo a obter informações mais próximas do que ocorreria em condições naturais, recomenda-se a utilização de insetos oriundos de frutos reconhecidos como hospedeiros da espécie como substrato larval. No caso de utilização de dietas artificiais, recomenda-se a realização de testes preliminares buscando estabelecer as diferenças, se houver, destas populações para determinada isca tóxica.

Idade dos insetos

A idade é um fator de grande importância para testes toxicológicos com iscas tóxicas. Segundo Piñero et al. (2002) e Thomas et al. (2008), a capacidade atrativa dos compostos utilizados nas iscas tóxicas pode variar de acordo com idade dos insetos. Isso ocorre porque as fêmeas de tefritídeos passam por uma fase jovem (de duração variável conforme a espécie) em que precisam adquirir proteínas e carboidratos para o desenvolvimento e maturação de seu aparelho reprodutor, estando assim, prontas para a cópula e realização de posturas viáveis. Segundo Reyes et al. (2012), adultos de *A. fraterculus* apresentam maior porcentagem de ovários imaturos aos cinco dias de idade, enquanto que, de 15 a 30 dias há quase uma totalidade de ovários em desenvolvimento e maduros. Para a espécie *C. capitata*, com ciclo biológico mais curto, maior porcentagem de ovários imaturos é observada até quatro dias após a emergência, com número maior de ovários em desenvolvimento e maduros entre seis e oito dias (ARITA, 1982).

Em ensaios prévios, verificou-se que adultos de *A. fraterculus* com idades entre 15 e 30 dias e de *C. capitata* com idades entre seis e oito dias não diferiram significativamente quanto à mortalidade. Para fins de padronização, para ambas as espécies sugere-se que os experimentos com iscas tóxicas utilizem insetos com cinco a oito dias de idade, pois, estes ainda se encontrariam em fase de aquisição de recursos alimentares, apresentando maior probabilidade de ingestão das formulações.

De maneira geral, recomenda-se que extremos de idade, ou seja, insetos com idade adulta inferior a três dias e superior a 20 dias, sejam evitados.

Privação alimentar

O período de privação alimentar também é importante nos experimentos com iscas tóxicas, de modo que, variações nesse período podem causar diferenças significativas na mortalidade. Experimentos realizados no Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho demonstraram que períodos de privação alimentar para *A. fraterculus* entre 12 e 24 h podem causar redução no tempo letal médio (TL_{50}) da população de insetos entre 12 e 18%, respectivamente, em comparação à população sem privação alimentar (NUNES, 2017).

O uso de privação alimentar tem por objetivo garantir que os insetos acessem a fonte (isca tóxica em avaliação) o mais rápido possível, garantindo a acurácia dos resultados. Estudos demonstram que, quando não privadas de alimentação, moscas-das-frutas podem não mostrar interesse à isca tóxica (VARGAS et al., 2002; YEE; CHAPMAN, 2005; MANGAN, 2009). Importante ressaltar que a mortalidade de insetos privados de alimentação por 24 horas pode inviabilizar o experimento devido à alta mortalidade da população pela falta de alimento. Recomenda-se, portanto, que os insetos sejam submetidos a períodos de privação alimentar de, no máximo, 12 horas, o que garantiria ao mesmo tempo rápido acesso à isca tóxica, sem efeito significativo na mortalidade pela restrição alimentar.

Optar pela privação alimentar ou não dos insetos irá depender do objetivo do experimento. Se o objetivo for avaliar a atratividade da composição da isca tóxica, por exemplo, o ideal seria que os insetos não estivessem com privação alimentar prévia, pois a isca deverá, em hipótese, atrair os insetos mesmo previamente alimentados, assim como aconteceria em condições de campo e/ou ambiente natural. Por outro lado, se o objetivo for avaliar diferentes atrativos associados à agentes letais, a privação alimentar prévia se faz necessária, condicionando uma ingestão maior e mais rápida, facilitando a comparação dos resultados.

Fornecimento de alimento e água

Assim como no caso da privação alimentar, a presença ou não de outra fonte alimentar no interior das unidades experimentais junto ao fornecimento das iscas tóxicas irá depender do objetivo do experimento.

A presença de uma fonte alimentar junto à isca tóxica em teste pode interferir na estimativa do tempo letal médio (TL_{50}) de iscas tóxicas devido à possibilidade do inseto buscar a fonte alimentar em detrimento da isca tóxica. Dessa forma, aconselha-se, para a determinação de tempos letais médios, apenas o fornecimento de água junto com a porção de isca tóxica a ser avaliada. A água pode ser fornecida de várias formas, sendo as mais usuais, um algodão hidrófilo embebido e posicionado no interior da gaiola sobre uma tampa plástica ou através de um rolete dental de algodão hidrófilo posicionado sobre o *voile* ou tela plástica da gaiola (Figura 5).

Cada um dos métodos de fornecimento de água aos insetos possui vantagens e desvantagens. Quando a água é fornecida em algodões no interior de pequenas tampas plásticas, sua duração no reservatório é de pelo menos 72 horas, não havendo necessidade de reabastecimento em períodos inferiores. Dentre os pontos negativos estão a possibilidade de morte de insetos por afogamento ou pelo molhamento e aderência das asas sobre o algodão, dificultando a saída do inseto do reservató-

rio, prejudicando o acesso dos demais à água bem como as avaliações, pois, a remoção dos insetos mortos facilitaria a fuga dos demais. Por outro lado, a utilização do rolete dental exige que os algodões sejam reidratados diariamente, já que são mais suscetíveis ao ressecamento. Entretanto, tais roletes podem ser utilizados também no fornecimento de dieta líquida, geralmente composta por uma solução de hidromel em porcentagens variáveis (água + mel a 10%, por exemplo), resultando em significativa redução de mão-de-obra na condução dos experimentos.

O fornecimento do alimento poderá ser realizado junto ou algumas horas após a oferta da isca tóxica aos insetos. Experimentos para avaliação do tempo de fornecimento de iscas tóxicas à adultos de *A. fraterculus* de 15 dias e *C. capitata* de seis dias e privados de alimentação por 12 horas não revelaram diferenças no tempo letal de insetos permitidos a alimentar-se por uma, duas, quatro e oito horas, sugerindo que os insetos buscam a fonte alimentar rapidamente em condições de privação alimentar.

Intervalo de avaliação

O intervalo entre as avaliações deve ser considerado de acordo com o objetivo do experimento. Avaliações em intervalos curtos são geralmente realizadas com o intuito de estimar o tempo letal médio (TL_{50}) de determinada formulação de isca tóxica em minutos ou horas. Quanto menor for o intervalo, maior será a acurácia do teste (LEORA, 1987). Formulações contendo agentes letais que possuem rápida ação inseticida, como no caso de organofosforados e piretroides, ou para os quais não se sabe ao certo o efeito sobre a espécie de mosca-das-frutas estudada, exigem intervalos de avaliação curtos (em minutos, por exemplo) para a correta estimativa do TL_{50} . Intervalos prolongados (em horas) são utilizados quando o objetivo é verificar a eficiência das formulações testadas em



Fotos: Cléber Antonio Baroniô

Figura 5. Unidades experimentais com diferentes métodos de fornecimento de água e dieta: a) água em algodão hidrófilo e dieta fornecidas em potes plásticos de 2 e 1 cm de diâmetro, respectivamente; b) dieta à base de hidromel a 10% ofertada em rolete dental posicionado sobre tela plástica na parte superior da gaiola.

períodos previamente definidos. De maneira geral, testes toxicológicos tem duração máxima entre 72 e 96 horas após a aplicação.

Procedimento padrão na instalação de experimentos para avaliação de iscas tóxicas

Os materiais necessários para a instalação de experimentos são descritos abaixo:

1. Copos plásticos transparentes de 300 a 350 mL, com abertura superior coberta com tecido *voile* ou tela plástica (malha de 1 mm). Salienta-se que, quanto maior a transparência da gaiola melhor será a visualização dos insetos e avaliação do experimento;
2. Discos de papel absorvente com diâmetro variável, ligeiramente maior que o diâmetro da base da gaiola, evitando que insetos se coloquem entre o disco de papel e a superfície de apoio da gaiola;
3. Roletes dentais ou pequenas porções de algodão hidrófilo separadas manualmente;
4. Superfícies para aplicação da isca tóxica, como porções plásticas de PET (2x2 cm, por exemplo), contendo um ponto central da isca tóxica a ser testada;
5. Insetos saudáveis, com idade e características definidas previamente;
6. Anestesiamento de insetos com CO₂ ou frio.

Passo-a-passo

1. No dia da instalação do experimento realize as diluições dos atrativos, dos inseticidas e formule as iscas tóxicas a serem testadas. Aplique as formulações em volume definido sobre as porções plásticas de PET com auxílio de pipeta automática (preferencialmente) ou seringas graduadas descartáveis. Em seguida mantenha as placas contendo cada tratamento em ambiente protegido da luz solar. A secagem das formulações pode ser acelerada com a utilização de um leve fluxo de ar forçado.
2. Corte o número de discos de papel que serão necessários, servindo de base no interior das unidades experimentais. Opcionalmente, a identificação do tratamento e repetição ao qual a gaiola pertence, poderá ser realizada diretamente no disco de papel, evitando assim marcações indevidas nas gaiolas.
3. Colete os insetos do interior das gaiolas de criação utilizando tubos plásticos com tampa (modelo Falcon, por exemplo) ou tubos de ensaio fechados com plástico filme e submeta-os ao CO₂ ou frio pelo período previamente definido.
4. Com os insetos anestesiados, distribua-os sobre os discos de papel e posicione a gaiola sobre o disco evitando a fuga dos insetos. Nota: ao manusear os insetos, estes deverão ser pinçados exclusivamente pelas asas. Injúrias aos demais apêndices corporais (como pernas e antenas) poderão comprometer a resposta natural dos insetos às substâncias a serem avaliadas.
5. Quando todas as gaiolas estiverem completas forneça a água em um algodão hidrófilo embebido e posicionado no interior da gaiola sobre uma tampa plástica e/ou nos roletes dentais que deverão ser posicionados na parte superior da gaiola em contato com o tecido *voile* ou tela plástica.

6. Insira a placa contendo a isca tóxica em cada gaiola pelo tempo determinado.
7. Após este período, retire a placa contendo a isca tóxica, fornecendo alimento suplementar, se necessário.
8. Realize as avaliações do número de insetos vivos ou mortos em cada gaiola a cada intervalo pré-estabelecido. Aconselha-se a retirada dos insetos mortos ao final de cada avaliação

Análise estatística

Os dados obtidos são comumente transformados, submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriores testes de comparações de média para cada intervalo de tempo avaliado caso sejam assumidas a homocedasticidade dos erros e a normalidade dos resíduos. Para a determinação da concentração letal (CL) e do tempo letal (TL) para cada um dos tratamentos, os dados obtidos são submetidos às análises de modelos binomiais Probit e Logit (FLORES et al., 2011; NUNES, 2017; BALDIN et al., 2018; SCHÜTZE et al., 2018; BARONIO et al., 2019).

Referências

- AGUIAR-MENEZES, E. de L.; FERRARA, F. A. A.; MENEZES, E. B. Moscas-das-frutas. In: CASSINO, P. C. R.; RODRIGUES, W. C. (Coord.). **Citricultura fluminense: principais pragas e seus inimigos naturais**. Seropédica: EDUR, 2004. p. 67-84.
- ARIOLI, C. J.; ROSA, J. M. da; BOTTON, M.; SANTOS, J. P. dos; MENEZES NETTO, A. C.; NAVA, D. E. Como combater mosca-das-frutas em pomares domésticos? In: Simpósio Internacional Ciência, Saúde e Território, 3., 2015, Lages, SC. **Anais...** Lages: Uniplac, 2015. p. 320-325.
- ARITA, L. H. Reproductive and sexual maturity of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). **Hawaiian Entomological Society**, v. 24, n. 1, p. 25-29, 1982. Doi: 10.1590/1983-40632018v4852480.
- BALDIN, M. M.; SCHÜTZE, I. X.; BARONIO, C. A.; GARCIA, F. R. M.; BOTTON, M. Concentration and lethal time of toxic baits based on spinosyns on *Ceratitis capitata* and *Diachasmimorpha longicaudata*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, n. 3, p. 323-330, Jul./Sep. 2018.
- BARONIO, C. A.; BERNARDI, D.; NUNES, M. Z.; PASINATO, J.; GARCIA, F. R. M.; BOTTON, M. Bioassay Method for Toxicity Studies of Toxic Bait Formulations to *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 356-363, 2019.
- BORGES, R.; MACHOTA JUNIOR, R.; BOFF, M. I. C.; BOTTON, M. Efeito de iscas tóxicas sobre *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Bioassay**, v. 10, n. 3, 2015. Doi: 10.14295/BA.v10.134.
- BOTTON, M.; HICKEL, E. R.; SORIA, S. de J. Pragas. In: FAJARDO, T.V.M. (Ed) **Uva para processamento: Fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. (Frutas do Brasil, 35). p. 82-105.
- BOTTON, M.; ARIOLI, C. J.; MACHOTA JUNIOR, R.; NUNES, M. Z.; ROSA, J. M. da. Moscas-das-frutas na fruticultura de clima temperado: situação atual e perspectivas de controle através do emprego de novas formulações de iscas tóxicas e da captura massal. **Agropecuaria Catarinense**, v. 29, n. 2, p. 103-108, maio/ago. 2016.
- BRASIL. Lei complementar nº 140, de 8 de dezembro de 2011. Fixa normas, nos termos dos incisos III, VI e VII do aput e do parágrafo único do art. 23 da Constituição Federal, para a cooperação entre a União, os Estados, o Distrito Federal e os Municípios nas ações administrativas decorrentes do exercício da competência comum relativas à proteção das paisagens naturais notáveis, à proteção do meio ambiente, ao combate à poluição em qualquer de suas formas e à preservação das florestas, da fauna e da flora; e altera a Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 dez. 2011. Seção 1. p. 198.
- BRASIL. Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1, a alínea j do Artigo 8, a alínea c do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3º e 4º do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto no 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de

benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mai. 2015. Seção 1.

BRASIL. Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016. Regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 mai. 2016. Seção 1. p. 3.

CHUECA, P.; MONTÓN, H.; RIPOLLÉS, J. L.; CASTAÑERA, P.; MOLTÓ, E.; URBANEJA, A. Spinosad bait treatments as alternative to Malathion to control the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) in the Mediterranean Basin. **Journal of Pesticide Science**, v. 34, n. 1, p. 407-411, 2007. Doi: 10.1584/jpestics.C08-01.

EFROM, C. F. S.; REDAELI, L. R.; MEIRELLES, R. N.; OURIQUE, C. B. Laboratory evaluation of phytosanitary products used for control of the South American Fruit Fly, *Anastrepha fraterculus* in organic farming. **Crop Protection**, v. 30, n. 9, p. 1162-1167, Sep. 2011. Doi: 10.1016/j.cropro.2011.05.007.

FLORES, S.; GOMEZ, L. E.; MONTOYA, P. Residual control and lethal concentrations of GF-120 (Spinosad) for *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 6, p. 1885-1891, 2011. Doi: 10.1603/EC10365.

GAZIT, Y.; GAVRIEL, S.; AKIVA, R.; TIMAR, D. Toxicity of baited spinosad formulations to *Ceratitidis capitata*: from the laboratory to the application. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 147, n. 2, p. 120-125, Dec. 2012. Doi: 10.1111/eeee.12051.

HÄRTER, W. da R.; GRÜTZMACHER, A. D.; NAVA, D. E.; GONÇALVES, R. da S.; BOTTON, M. Isca tóxica e disrupção sexual no controle da mosca-das-frutas sulamericana e da mariposa-oriental em pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 3, p. 229-235, mar. 2010.

HERNANDES, J. L.; BLAIN, G. C.; PEDRO-JÚNIOR, M. J. Controle de moscas-das-frutas (diptera: tephritidae) em cultivo orgânico de ameixa pelo ensacamento dos frutos com diferentes materiais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1209-1213, 2013. Doi: 10.1590/S0100-29452013000400032.

IBAMA. Instrução normativa nº 7, de 30 de abril de 2015. Institui e normatiza as categorias de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro, e define, no âmbito do Ibama, os procedimentos autorizativos para as categorias estabelecidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 maio 2015. Seção 1, p. 55-59.

ICMBIO. Instrução normativa nº 3, de 1º de setembro de 2014. Fixar normas para a utilização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBio, na forma das diretrizes e condições previstas nesta Instrução Normativa, e regulamentar a disponibilização, o acesso e o uso de dados e informações recebidos pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade por meio do SISBio. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 de set. 2014. Seção 1, p. 60.

KOVALESKI, A.; RIBEIRO, L. G. **Manejo de pragas na produção integrada de maçã**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 34).

LEORA Software. **Polo PC: A users guide to Probit Logit Analysis**. Berkeley, CA, 1987.

MACHOTA JUNIOR, R.; BORTOLI, L. C.; TOLOTTI, A.; BOTTON, M. **Técnica de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) em laboratório utilizando hospedeiro natural**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15).

MACHOTA JUNIOR, R.; FORMOLO, R.; BERNARDI, D.; BOTTON, M.; RUFATO, L. Effect of insecticides on *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in 'Italy' table grape under plastic cover. **Investigación Agraria**, v. 15, n. 2, p. 113-120, Dec. 2013.

MACHOTA JUNIOR, R.; BORTOLI, L. C.; CAVALCANTI, F. R.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A. D. Assessment of injuries caused by *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) on the incidence of bunch rot diseases in table grape. **Neotropical Entomology**, n. 45, v. 4, p. 361-368, 2016. Doi: 10.1007/s13744-016-0377-y.

MANGAN, R. L. Effects of bait age and prior protein feeding on cumulative time-dependent mortality of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) exposed to GF-120 spinosad baits. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 3, p. 1157-1163, Jun. 2009.

MEDINA, P.; PÉREZ, I.; BUDIA, F.; ADÁN, A.; VIÑUELA, E. Development of an extended-laboratory method to test bait insecticides. **IOBC/WPRS Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 59-66, 2004.

NAKANO, O.; ROMANO, F. C. B. Uso de reguladores de crescimento na esterilização da mosca-do-mediterrâneo. **Laranja**, v. 23, n. 1, p. 115-125, 2002.

- NONDILLO, A.; ZANARDI, O.; AFONSO, A. P. S.; BENEDETTI, A. J.; BOTTON, M. Efeito de inseticidas neonicotinóides sobre a mosca-das-frutas sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) na cultura da videira. **BioAssay**, v. 2, n. 9, p. 1-9, 2007.
- NUNES, A. M.; COSTA, K. Z.; FAGGIONI, K. M.; COSTA, M. de L. Z.; GONÇALVES, R. da S.; WALDER, J. M. M.; GARCIA, M. S.; NAVA, D. E. Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 10, p. 1309-1314, out. 2013.
- NUNES, M. Z. **Eficácia de formulações de iscas tóxicas sobre adultos de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae)**. 128 f. 2017. Tese (Doutorado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Pelotas, RS, 2017.
- PIÑERO, J. C.; ALUJA, M.; EQUIHUA, M.; OJEDA, M. M. Feeding history, age and sex influence the response of four economically important *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) to human urine and hydrolyzed protein. **Folia Entomologica Mexicana**, v. 41, n. 3, p. 283-298, 2002.
- RAGA, A.; SATO, M. E. Time-mortality for fruit flies (Diptera: Tephritidae) exposed to insecticides in laboratory. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 73-77, jan./mar. 2006.
- RAGA, A.; GALDINO, L.; SILVA, S.; BALDO, F.; SATO, M. E. Comparison of insecticide toxicity in adults of the fruit flies *Anastrepha fraterculus* (Wied.) and *Anastrepha grandis* (Macquart) (Tephritidae). **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 25, n. 2, p. 1-8, 2018. Doi: 10.9734/JEAI/2018/43066.
- REVIS, H.C.; MILLER, N. W.; VARGAS, R. I. Effects of aging and dilution on attraction and toxicity of GF-120 fruit fly bait spray for melon fly control in Hawaii. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 5, p. 1659-1665, October 2004. Doi: 10.1603/0022-0493-97.5.1659.
- REYES, C. P.; JAHNKE, S. M.; REDAELLI, L. R. Caracterização ovariana e definição do número de gerações de moscas-das-frutas sul-americana durante o ciclo das culturas em dois pomares na região de Porto Alegre, RS, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 2, p. 185-192, abr./jun. 2012.
- ROSA, J. M. da. **Diagnóstico dos serviços de polinização em pomares de macieira e efeito de formulações de iscas tóxicas sobre *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) em laboratório e campo**. 109 f. 2016. Tese (Doutorado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Pelotas, RS, 2016.
- SALLES, L. A. B. Metodologia de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) em dieta artificial em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 21, p. 479-486, 1992.
- SALLES, L. A. B. Colonização e dispersão de adultos de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) em pomares de pessegueiro e macieira. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1999.
- SANTOS, J. P. dos; CORRENT, A. R.; BERTON, O.; SCHWARZ, L. L.; DENARDI, F. Incidência de podridão-branca em frutos de macieira com e sem fermentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 118-121, 2008.
- SCHÜTZE, I. X.; BARONIO, C. A.; BALDIN, M. M.; LOECK, A. E.; BOTTON, M. Toxicity and residual effects of toxic baits with spinosyns on the South American fruit fly. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 2, p. 144-151, Feb. 2018. Doi: 10.1590/s0100-204x2018000200002
- SCOZ, P. L.; BOTTON, M.; GARCIA, M. S. Controle químico de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) em laboratório. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1689-1694, 2004. Doi: 10.1590/S0103-84782004000600004.
- SORIA, S. de J. **A mosca-da-fruta e seu controle**. Bento Gonçalves: Embrapa – CNPUV, 1985. (Embrapa-CNPUV. Comunicado Técnico, 3).
- STARK, J. D.; VARGAS, R.; MILLER, N. Toxicity of spinosad in protein bait to three economically important tephritid fruit fly species (Diptera: Tephritidae) and their parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 3, p. 911-915, June 2004. Doi: 10.1093/jee/97.3.911
- THOMAS, D. B.; EPSKY, N. D.; SERRA, C. A.; HALL, D. G.; KENDRA, P. E.; HEATH, R. R. Ammonia formulations and capture of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Journal of Entomology Science**, v. 43, n. 1, p.75-85, 2008. Doi: 10.18474/0749-8004-43.1.76.
- URBANEJA, A.; CHUECA, P.; MONTÓN, H.; PASCUAL-RUIZ, S.; DEMBILIO, O.; VANACLOCHA, P.; ABAD-MOYANO, R.; PINA, T.; CASTAÑERA, P. Chemical alternatives to Malathion for controlling *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and their side effects on natural enemies in Spanish citrus orchards. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 1, p. 144-151, 2009. Doi: 10.1603/029.102.0121.

VARGAS, R. I.; MILLER, N. W.; PROKOPY, R. J. Attraction and feeding responses of Mediterranean fruit fly and a natural enemy to protein baits laced with two novel toxins, phloxine B and spinosad. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 102, n. 3, p. 273-282, March 2002.

YEE, W. L.; CHAPMAN, P. S. Effects of GF-120 fruit fly bait concentrations on attraction, feeding, mortality, and control of *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 5, p. 1654-1663, 2005. Doi: 10.1603/0022-0493-98.5.1654.

YEE, W. L.; ALSTON, D. G. Effects of spinosad, spinosad bait, and chloronicotinyl insecticides on mortality and control of adult and larval Western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 5, p. 1722-1732, Oct. 2006.

ZART, M.; FERNANDES, O. A.; BOTTON, M. **Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) na cultura da videira**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2009. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 81).

ZART, M.; BOTTON, M.; FERNANDES, O. A. Injúrias causadas por mosca-das-frutas sul-americana em cultivares de videira. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 64-71, 2011.

Embrapa

Uva e Vinho