

Marcação de insetos para estudos biológicos

Insect marking for biological studies

Márcio Martins de Araujo *

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Brasil

Fernando Javier Sanhueza Salas

Instituto Biológico de São Paulo. Laboratório de Estudo de vetores, Brasil

Valter Arthur

Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Laboratório de Radiobiologia e Ambiente, Brasil

Revista de la Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 1669-9513

Periodicidade: Semestral

Vol. 121, núm. 1, 2022

redaccion.revista@agro.unlp.edu.ar

Recepção: 11/11/21

Aprovação: 15/02/22

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/23/233043005/>

DOI: <https://doi.org/10.24215/16699513e093>

* **Autor correspondente:** marcio_araujo@usp.br



Resumo

A técnica de marcação permite estudar os comportamentos e interações ecológicas dos insetos, como por exemplo padrões de dispersão, movimento, territorialidade, manuseio, consumo de alimentos, associações vetor-parasita, e cadeias ou teias alimentares. Essa revisão descreve as vantagens e desvantagens dos marcadores, destacando três métodos cujo diferencial é a permanência no inseto independente do estágio de vida. Os radioisótopos minimizam a manipulação direta e o trauma nos insetos, podem ser aplicados em grandes populações e são facilmente rastreáveis, porém o seu descarte limita a aplicação em campo. Os isótopos estáveis ocorrem naturalmente no ambiente, não são radioativos e estão relacionados à estudos ecológicos de níveis tróficos e processos metabólicos, dentre os elementos mais são utilizados, os isótopos de carbono refletem principalmente a dieta dos animais; os isótopos de nitrogênio refletem as práticas agrícolas (extensiva x intensiva) e em parte a dieta. Os isótopos de oxigênio e hidrogênio são vinculados à composição isotópica da água que, por sua vez, é dependente de fatores geográficos tais como altitude, clima e latitude. Por sua vez, os oligoelementos também são utilizados como marcadores internos (não radioativos) e podem variar de acordo com a localização geográfica alterando as quantidades encontradas nas plantas e insetos. Portanto, a busca de uma melhor metodologia que permita detectar a correlação dos insetos com o homem e o meio ambiente depende do tipo de estudo a ser realizado.

Palavras-chave: radioisótopos, isótopos estáveis, oligoelementos, dispersão, comportamento

Abstract

The marking technique allows studying the behaviour and ecological interactions of insects, such as patterns of dispersion and movement, territoriality, handling and consumption of food, vector-parasite associations and food chains and webs. This review describes the advantages and disadvantages of markers, highlighting three methods whose differential is that they remain in the insect regardless of the stage of life. Radioisotopes minimize direct manipulation and trauma to insects, can be applied to large populations and are easily traceable, but their disposal limits field application. Stable isotopes that occur naturally in the environment are not radioactive and are related to ecological studies of trophic levels and metabolic processes, among the most used elements, carbon isotopes mainly reflect the diet of animals; nitrogen isotopes reflect agricultural practices (extensive x intensive) and in part diet and oxygen and hydrogen isotopes are linked to the isotopic composition of water, which, in turn, is dependent on geographic factors such as altitude, climate and latitude. Trace elements are also used as internal (non-radioactive) markers and can vary according to geographic location, changing the amounts found in plants and insects. Therefore, the search for a better methodology to detect the correlation of insects with man and the environment depends on the type of study to be carried out.

Keywords: radioisotopes, stable isotopes, trace elements, dispersion, behavior

INTRODUÇÃO

Quantificar a dispersão de insetos é a chave para entender a dinâmica da população e para responder a perguntas relacionadas às características comportamentais dos insetos e restrições fisiológicas ou genéticas. Mas, o objetivo de estudar a dispersão não é apenas aumentar o conhecimento fundamental das populações de insetos em si, mas também desenvolver sistemas de previsão para alertar os agricultores e silvicultores sobre invasões de pragas. O movimento em grande escala dos insetos causa problemas econômicos consideráveis na produção agrícola e nos sistemas florestais. As culturas fornecem uma concentração temporal e espacial de recursos que podem atrair ou prender muitos insetos de longas distâncias (Osborne et al., 2002).

Portanto, a liberação e captura é uma das principais estratégias para estudar o voo dos insetos em condições de campo, sendo possível determinar o raio de dispersão de um predador ou parasitóide em diversos agroecossistemas, além de viabilizar estudos sobre longevidade, crescimento, densidade e comportamento (Conrad et al., 2002).

A técnica pode ser utilizada tanto para insetos em laboratório quanto no campo, principalmente em trabalhos relacionados à ecologia e ao comportamento, sendo algumas premissas fundamentais para a utilização de qualquer técnica de marcação (Fernandes, 2002):

- **A marcação não pode afetar o comportamento do inseto:** o inseto marcado deve apresentar o mesmo comportamento que o inseto não marcado (selvagem), estando, dessa forma, perfeitamente integrado às condições de campo após a marcação e liberação.

- **Os insetos marcados e não marcados devem ter a mesma probabilidade de captura:** a marcação não pode afetar a coleta dos insetos. Há casos em que a marcação permite a visualização a distância (por exemplo, corantes fluorescentes). Isso pode, eventualmente, favorecer a observação de insetos marcados em detrimento daqueles não marcados e afetar o resultado. Por exemplo, se o objetivo é quantificar a população local, a maior probabilidade de observação de insetos marcados afeta diretamente a determinação do tamanho dessa população.

- **A marcação deve ser durável:** a marcação deve acompanhar o inseto por toda a sua vida ou pelo menos ser durável durante o período de estudo. O marcador não pode ser eliminado em função do comportamento do inseto ou por condições climáticas.

- **A manipulação e a liberação não podem afetar a longevidade ou o comportamento do inseto:** em alguns casos, os insetos precisam ser criados em laboratório e/ou capturados para serem marcados. Posteriormente, eles serão liberados, devendo comportar-se da mesma forma que os indivíduos selvagens, bem como ter a mesma expectativa de vida.

A marcação de insetos é descrita desde a década de 30, através do uso de etiquetagem (Fletcher, 1936), mutilação (Querci, 1936), tintas/manchas (Gillies, 1961; Mac Cord et al., 1983), pós fluorescentes (Chang, 1946), corantes internos (Bailey et al., 1962), corante alimentar (Williams, 1962), marcadores de proteína (Hagler et al., 1992), radioisótopos (Patterson et al., 1969; Zhou et al., 2004) e mais recentemente isótopos estáveis (Faiman et al., 2019).

Rastrear o movimento dos insetos em seu habitat natural é essencial para a compreensão de sua biologia básica, demografia e etologia. Uma ampla variedade de marcadores é usada para avaliar a dinâmica da população de insetos, dispersão, hábitos subterrâneos, territorialidade, comportamento alimentar, interações em nível trófico e outras interações ecológicas. O marcador ideal deve persistir sem inibir a biologia "normal" do inseto. Além disso, o marcador deve também ser ambientalmente seguro, econômico e fácil de usar (Hagler & Jackson, 2001).

A seleção da melhor técnica para marcação de insetos dependerá do sistema a ser estudado, ou seja, tamanho, estágio de vida e habitat, ou seja, não existe uma metodologia universal. Estudos preliminares devem ser feitos antes de conduzir qualquer investigação em que um marcador será usado para identificação. Dentre as várias opções de rastreamento, Lavadero et al. (2004) e El Sheikha (2019) listaram suas vantagens e limitações (Tabela 1). Apesar da maioria dos marcadores serem considerados eficazes para os seus respectivos propósitos, a flexibilidade dos isótopos quanto aos modos de aplicação, detecção e tipos de estudos a serem realizados aumentam seu potencial uso como ferramenta de pesquisa

em contraste com os procedimentos convencionais. Assim, esta revisão analisa de forma abrangente as técnicas de radiomarkação, isótopos estáveis e oligoelementos, principalmente pela retenção nos processos metamórficos.

Tabela 1

Vantagens e desvantagens de diferentes técnicas de marcação e rastreamento para uso em estudos ecológicos e comportamentais de insetos.

Técnicas de marcação	Vantagens	Desvantagens	Tipo de aplicação
Pó	Baixo custo; Facilmente disponível; Ambientalmente seguro; Fácil aplicação e detecção.	Pode causar efeitos adversos e inibir o comportamento de dispersão; Diminui a longevidade. As partículas podem ser transferidas para insetos selvagens; Não é indicado para voos de longas distâncias em Lepidoptera.	Externa
Corante	Baixo custo; Não exige trabalho intenso; Detecção visual, rápida e não destrutiva.	Maioria tem intervalo de retenção curto e são prejudiciais aos insetos em altas concentrações; Alguns não são visíveis diretamente.	Interna
Mutilação e tintas	Permanente; Facilmente identificado; Observações diretas de campo.	Impossível para insetos pequenos ou de corpo mole; Trabalho intenso; Tintas são restritas a um único estágio, podendo ser tóxica.	Externa
Pólen	Marcador biológico natural (automarkação).	Oneroso, demorado, tedioso; Requer experiência em palinologia.	Interna/ Externa
Genética	Visível	Eficiente; Pode ser detectado visualmente; Persiste por toda vida do inseto, por fazer parte de sua constituição física.	Interna
	Bioquímica	Eficiente; Não modifica a aparência do inseto.	A detecção de enzimas específicas através da eletroforese, requer preparação antes do estudo; Onerosa, demorada, tendenciosa; Inseto é sacrificado.

Continuação Tabela 1

Oligoelementos	Seguro para o ambiente; Sem alteração morfológica; Detectado em vários estágios; Persiste através da muda, gerações e níveis tróficos.	Onerosa e demorada (larga escala); Detecção exige mão de obra e equipamentos específicos; Baixa retenção em algumas espécies; Altas concentrações afetam o desenvolvimento.	Interna/ Externa
Radioisótopos	Simples; Detecção sensível, independentemente da localização do inseto.	Necessita de equipamento específico para detecção; Pode haver troca de material radioativo por trofalaxia.	Interna/ Externa
Isótopos estáveis	Preciso e Rápido.	Requer espectrômetro de massa de isótopos (caros); Depende da composição da planta.	Interna
Radar	Rastreamento de movimento sem necessidade de recaptura.	Demorado e oneroso; Não é adequado para todos os tamanhos de insetos.	Externa
Molecular (Proteínas e DNA)	Específico; Informações sobre o comportamento reprodutivo.	Alto custo; Necessário desenvolver técnicas para cada espécie estudada.	Interna

Adaptado de Lavandero et al. (2004) e El Sheikha (2019).

1. RADIOISÓTOPOS

No final da década de 1940, as liberações isotópicas de operações nucleares demonstraram a utilidade dos radioisótopos para estudar a dinâmica dos sistemas biológicos e no início da década de 1950, os ecologistas estavam usando radioisótopos para novas áreas de pesquisa experimental. Marcar os insetos com radioisótopos para estudar a dispersão, densidades populacionais, comportamento e ingestão de alimentos tornou-se um método de marcação de insetos muito popular entre os anos 1950 e 1970 (Mastrangelo & Walder, 2011).

Os insetos são mais radorresistentes do que os vertebrados superiores, mas menos resistentes do que bactérias, protozoários e vírus. Uma das razões para isso é a Regra de Dyar, ou seja, os artrópodes têm um crescimento descontínuo e a maioria das divisões celulares acontecem apenas durante o processo de muda (Behera et al., 1999).

A quantidade de um radioisótopo retido por um inseto após a administração de uma única dose, diminui exponencialmente ao longo do tempo devido à eliminação biológica e ao decaimento radioativo. O tempo necessário para que a quantidade de um determinado radiotraçador internalizado diminua pela metade em um determinado inseto é denominado meia-vida efetiva (Showler et al., 1988).

As vantagens de usar radioisótopos em vez de marcadores convencionais está relacionada a sua permanência relativa (corantes muitas vezes são removidos e a muda geralmente elimina as marcações externas), a rápida verificação e a possibilidade de rastrear os insetos marcados que estavam fora de vista (por exemplo, no subsolo). Vários traçadores foram estudados, como Cobalto 60, Estrôncio 89, Zinco 65, Iodo 131, Cálcio 45, Cério 144, mas o Fósforo 32 é o radioisótopo mais aplicado para marcação devido à sua meia-vida curta, segurança, atividade e fácil de detecção (Tabela 2) (O'brien & Wolfe, 1964).

Tabela 2*Principais radioisótopos utilizados em ecologia.*

Radioisótopo	Símbolo	Meia vida	Radiação e energia (Megaelétron-volt)	
			Beta	Gama
Cobalto 60	⁶⁰ Co	5,3 anos	0,31	1,2
Zinco 65	⁶⁵ Zn	245 dias	0,33	1,1
Ouro 195	¹⁹⁵ Au	185 dias	-	0,1
Cálcio 45	⁴⁵ Ca	165 dias	0,25	-
Estrôncio 89	⁸⁹ Sr	55 dias	1,50	-
Ferro 59	⁵⁹ Fe	45 dias	0,46	1,2
Fósforo 32	³² P	14,2 dias	1,71	-
Iodo 131	¹³¹ I	8 dias	0,61	0,36

Fonte: Neto et al. (1976).

Para análises mais prolongadas é necessário avaliar o ciclo de desenvolvimento do inseto a ser estudado. Quan et al. (1957) utilizaram Cério 144 como marcador persistente para populações de pulgas, mosquitos, baratas e carrapatos, sua meia vida é de 282 dias e o isótopo do seu decaimento denominado de Praseodímio 144 tem meia vida de 18 min, mas o seu beta energético de 2,97 MeV é alto e facilita sua detecção.

Uma das funções do radioisótopo é medir o consumo de alimentos, sem ser eliminado pelo sistema biológico do inseto. As larvas das abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, não defecam até pouco antes da pupação, assim o Trítio e ¹⁴C não são isótopos adequados pois podem ser perdidos como vapor de água tritiada (HTO) ou ¹⁴CO₂. (Dietz & Lambremont, 1970a). Já para o ³²P a retenção foi constatada durante o período larval, portanto foi possível mensurar o consumo alimentar entre as castas nas abelhas, onde as larvas que se transformaram em rainha tinham um consumo médio de 19% a mais do que as operárias (Dietz & Lambremont, 1970b).

Para marcação de duas espécies de lepidópteros *Panaxia dominula* Linnaeus e *Arctia caja* Linnaeus, Kettlewell (1952) tratou a fonte alimentar com enxofre (³⁵S) que possui meia vida de 87,1 dias e emite um raio beta de baixa energia (-0,168 MeV). As larvas alimentadas com as plantas tratadas apresentaram baixas contagens, diferentemente dos seus excrementos, porém, após a pupação os adultos possuíam contagens superiores. Isso, se deve ao fato de que o imago tem uma área de superfície maior do que uma larva, do qual a maioria dos raios beta foi absorvida. Também foi constatado a concentração de enxofre nas asas de alguns lepidópteros.

Arthur et al. (1987) utilizaram radioisótopo para avaliar a dispersão de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, imergidos em solução de ³²P, por 15 minutos e liberados em dois talhões de cana-de-açúcar. Observaram que os machos se dispersam mais rapidamente que as fêmeas com distâncias de até 24,7 e 9,12 m, respectivamente, e a detecção desses insetos marcados foi de aproximadamente três semanas.

Para Buscarlet (1983), a principal vantagem é que as informações são obtidas do próprio inseto e não dos alimentos consumidos ou dos produtos retirados. Existem também algumas limitações que impõem a escolha adequada do traçador. Por exemplo, o conteúdo alimentar no isótopo original não marcado deve ser constante e alto o suficiente para induzir uma taxa mensurável de eliminação do traçador.

Esse método, indicado para consumidores primários ou predadores, se baseia na conservação do radioisótopo por meio do sistema "alimentos-insetos-corpos-produtos removidos". Se os insetos recebem alimentos uniformemente marcados, a absorção pode ser calculada a partir da quantidade de traçador medido no corpo e nos produtos removidos por secreção, excreção, respiração de CO₂, (se ¹⁸O ou ¹⁴C foi

utilizado), transpiração de água (se ^{18}O ou ^3H foi usado), produção de ovos e outros (Kasting & Mcginnis, 1965).

Para marcação de adultos de *Aedes aegypti* Linnaeus, Hassett & Jenkins (1951) constataram que a absorção de ^{32}P ocorre para larvas de terceiro e quarto instares devido à alta taxa de alimentação, e o acúmulo desse isótopo no tecido foi em média de 30% no intestino médio e posterior, 20% nos túbulos de Malpighi. As fêmeas acumulavam cerca de 15% nos corpos gordurosos e 5% nos músculos das asas. Outros 5% foram encontrados no cordão nervoso ventral e 9% nas glândulas salivares. Radeleff et al. (1952) criando moscas da bicheira, *Callitroga americana* Cushing e Patten, em dietas artificiais e naturais marcadas com ^{32}P , também observaram acúmulo desse radioisótopo no abdômen e no tórax dos adultos.

Moore et al. (1974) estudou o potencial uso da técnica de marcação de radioisótopos para investigação da relação predador-presa, utilizando ovos e larvas da traça *Heliothis virescens* Fabricius alimentadas com ^{32}P em solução de sacarose a 10%, para predação da joaninha *Coleomegilla maculata* DeGeer. Dessa maneira, através de equações de predição da análise de regressão pode-se saber o número de ovos ou larvas consumidos, desde que determine a radioatividade da presa antes do consumo.

Em laboratório Sgrillo et al. (1977) ao ministrarem solução açucarada contendo ^{32}P para adultos de *Lixophaga diatraeae* Towns, observaram que as larvas no interior das fêmeas incorporaram o radioisótopo, dessa forma, foi possível detectar um parasitismo de 24% em lagartas de *Diatraea saccharalis* Fabricius frente aos adultos marcados em gaiola ecológica.

Williams & Reichle (1968) estimaram a taxa de consumo do besouro *Chrysochus auratus* Fabricius através da eliminação de rubídio-86 e fósforo-32 inoculado em plantas de *Apocynum cannabinum* Linnaeus, os indivíduos consumiram 56,8% (15,9 mg) de seu peso corporal seco em alimentos por dia, da folhagem ingerida 43% matéria seca foi digerida e 56% da energia assimilada. O valor calórico (cal/g) do alimento digerido foi 1,17 vezes maior do que o consumido e os besouros assimilaram 87% do ^{86}Rb e 74% do ^{32}P presentes nos alimentos, sendo que a meia-vida biológica de ^{86}Rb no inseto foi de um dia, enquanto a de ^{32}P foi de 7,5 dias nas fêmeas e 10,2 dias nos machos, essa diferença possivelmente é um reflexo do metabolismo do fósforo envolvida na formação do ovo.

A aplicação é feita sobre o inseto ou na dieta e a sua detecção depende do tipo de radiação a ser medida, do estado físico da amostra e local podendo ocorrer através de um contador Geiger-Muller, cintilação líquida, detectores de cintilação sólida, autoradiografia e medidores portáteis de taxa (Showler et al. 1988). Sua transferência pode ocorrer a nível trófico superior facilitando a marcação de predadores, porém nos casos em que há trofalaxia é possível haver troca de material radioativo entre insetos marcados e não marcados, reduzindo a confiabilidade da técnica. Assim, por questões de segurança, deve ser utilizada apenas em ambientes fechados (laboratórios ou casas de vegetação) e tem custo elevado, porém, os insetos podem ser mantidos vivos (Fernandes, 2002).

2. ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Um substituto para muitos métodos de radionuclídeos são os métodos de isótopos estáveis, uma vez que não apresentam riscos para a saúde ou para o meio ambiente e ainda podem ser empregados em condições de campo. Os isótopos estáveis não são radioativos, nem tóxicos e ocorrem naturalmente no meio ambiente. Esses elementos possuem átomos com o mesmo número de prótons, mas diferente número de nêutrons da forma mais comum do elemento encontrada na natureza, resultando em uma massa diferente, portanto, eles podem ser facilmente distinguidos. Por exemplo, um isótopo estável de nitrogênio (^{15}N) e carbono (^{13}C) são responsáveis por 0,732% e 1,08% de todo o nitrogênio e carbono, respectivamente (Michener & Lajtha, 2007).

Na biologia, os isótopos estáveis, incorporados aos tecidos dos insetos, são utilizados em estudos ecológicos de níveis tróficos e processos metabólicos, no campo da entomologia aplicada, os isótopos de carbono têm sido usados para a marcação e identificação permanente de insetos (Mainali et al., 2022). A variação natural dos isótopos estáveis é uma ferramenta que elucida a dinâmica espaço-temporal das vias ecológicas, aplicada com sucesso para rastrear uma ampla gama de organismos dispersantes e itens de interesse forense (Le Bot et al., 2011).

O princípio da técnica é que a composição isotópica estável de um animal seja determinada por sua dieta, que por sua vez irá refletir a “assinatura” do ambiente onde cresceu. Por exemplo, no caso do hidrogênio (H), a composição isotópica da chuva varia geograficamente de forma previsível, principalmente em função da temperatura, e qualquer organismo assumirá o perfil isotópico H da região em que se

desenvolveu (Bowen, 2010). Assim Holder et al. (2015) através da análise de isótopos de hidrogênio das asas dos besouros *Arhopalus ferus* Mulsant, parte metabolicamente inertes após a emergência do adulto, conseguiram demonstrar que a infestação de um navio cargueiro provavelmente se originou em Auckland, Nova Zelândia.

A composição isotópica assimilada nos tecidos dos organismos é promovida pela discriminação de isótopos mais pesados durante processos biológicos (Botteon, 2018) e sua detecção é realizada por meio de espectrometria de massa e exige mão-de-obra especializada para manipulação do equipamento, os custos de análise por amostra, dependendo do isótopo e da matriz, pode variar de US\$ 5 a 100,00. As assinaturas isotópicas naturais já são utilizadas em diversas áreas de pesquisa, dessa forma existe uma escala de padronização internacional às quais, grandes diferenças nas abundâncias dos isótopos de carbono ($^{12}\text{C}\approx 1,1\%$, $^{13}\text{C}\approx 98,9\%$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}\approx 0,3663\%$ e $^{14}\text{N}\approx 99,63\%$), as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ são geralmente expressas em notação delta (δ) partes por mil (por mil ‰) (IAEA, 2009).

Além do seu potencial para o uso em quarentena de plantas, essa técnica pode fornecer informações para detectar hospedeiros alternativos de espécies invasoras fora de seu ambiente original. Dessa forma, com intuito de determinar a origem geográfica da população de *Bactrocera dorsalis* Hendel no norte da China, Zhao et al. (2018) estabeleceram uma relação entre a água da chuva e os valores das razões dos isótopos estáveis de hidrogênio ($\delta^2\text{H}$) nesse inseto e constataram que os valores de $\delta^2\text{H}$ não eram consistentes com os da água da chuva em Pequim, mas sim para cidade de Fuzhou, no sudeste da China, esta disseminação provavelmente ocorreu devido o comércio interno de frutas e vegetais.

Para estudar a predação em condições de campo, Nienstedt & Poehling (2004) marcaram o pulgão *Sitobion avenae* Fabricius com isótopo estável ^{15}N e ofertaram para predadores de diferentes estratégias de alimentação como por exemplo o besouro *Platynus dorsalis* Pontopiddan e a aranha *Erigone atra* Blackwall. Em seus resultados observaram que o conteúdo desse isótopo nos predadores estava acima do nível natural, até 11 dias após a ingestão, sendo este valor correlacionado com o número de pulgões marcado ingeridos, permitindo a sua quantificação. Além disso, o conteúdo de ^{15}N aparentemente não foi influenciado pela ingestão de presas adicionais não marcadas.

Faiman et al. (2019) utilizaram oxido de deutério ($^2\text{H}_2\text{O}$), por não deixa traços duradouros no ambiente sazonal e ser facilmente armazenado na quitina dos insetos, marcaram as espécies de *Anopheles gambiae* Giles, observaram que a disponibilidade do isótopo ^2H para as larvas do mosquito foi aumentada por microrganismos coletados e cultivados localmente (ou seja, protozoários, algas e bactérias) fornecidos na dieta larval. Após o início de enriquecimento o isótopo pode ser detectado entre 5 a 7 dias, porem a faixa de segurança é de 10 a 15 dias. Por fim, os autores sugerem que essa marcação seja viável por mais de quatro meses proporcionando oportunidades para estudos de captura de marcas de longo prazo em grande escala.

Juarez et al. (2020) conduziram um estudo sobre dispersão de adultos de *Ae. aegypti* em duas comunidades residenciais no Texas, EUA, através do enriquecimento de recipientes com isótopos estáveis (^{13}C e ^{15}N) observaram a distância média e máxima percorrida por machos foi de 242 m e 429 m e para fêmeas foi de 195 m e 337 m respectivamente. De acordo com os autores os custos da análise isotópica por amostra deve ser aproximadamente US\$ 6, e essa tecnologia pode ser usada para tratar questões relacionadas à biologia e ao controle de mosquitos em ambientes locais de diversas partes do mundo.

A diferença inerente nas assinaturas isotópicas de dietas de criação em massa comparadas com dietas selvagens nos fornece marcadores naturais de baixo custo para insetos criados em larga escala uma vez que as plantas vasculares terrestres diferem em suas razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ por causa de suas vias fotossintéticas e enzimáticas, C_3 , C_4 ou metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) e sua discriminação relativa contra os átomos ^{13}C mais pesados. Quase todas as árvores frutíferas e outras espécies de plantas dicotiledôneas são plantas C_3 (maçã, banana, frutas cítricas etc.) e possuem uma faixa isotópica entre -25% e -35% sendo a média de $-27\pm 2\%$. Enquanto para as plantas C_4 pertencentes às Poaceae (cana-de-açúcar) e Cyperaceae, esses valores variam entre -7 e -18% com média de -11% (Hood-Nowotny et al., 2016).

As plantas C_3 incorporam preferencialmente o ^{12}C porque reduzem o CO_2 a fosfoglicerato através da enzima RuBP-carboxilase, que é sensível às diferenças de massa dos isótopos de carbono; já as plantas C_4 reduzem o CO_2 a ácido aspártico ou málico através da enzima PEP-carboxilase, que não possui o poder discriminatório da RuBP-carboxilase (Boutton, 1991). Esses valores isotópicos agrupados em intervalos distintos e sem sobreposição permitem identificar a dieta dos animais a partir da análise isotópica dos produtos em questão, uma vez que a assinatura isotópica dessa fonte alimentar é refletida nos tecidos específicos dos animais após certo tempo de metabolismo (Deniro & Epstein, 1978; 1981).

As assinaturas de isótopos de C, O, N e S em insetos criados em massa são geralmente independentes umas das outras, ou seja, fonte de açúcar, fonte de água usada para fazer a dieta, fertilização da fonte primária de N na dieta e as condições geográficas de origem da fonte S. Isso significa que eles podem ser tratados como marcadores independentes (Girón & Ríos, 1980).

As proteínas (medidas pelo nitrogênio) e os carboidratos (medidos pelo carbono) exercem influência no estado fisiológico e nutricional de um inseto (Le Gall & Behmer, 2014), em laboratório as respostas de forrageamento por fêmeas de *Bactrocera tryoni* Froggatt aos locais de proteína e oviposição estão correlacionadas com o nitrogênio e o carbono corporal total, dos quais baixos níveis elevam a busca por proteínas, enquanto que altos níveis correspondem a maior procura para oviposição (Balagawi et al., 2014). Além disso, a alimentação de proteína aumenta a longevidade e o sucesso de acasalamento dos machos, onde as fêmeas acasaladas por esses indivíduos alimentados com proteínas armazenam esperma por mais tempo comparados com aqueles desprovidos de proteínas (Prabhu et al., 2008). De acordo com Wigglesworth (1972), o metabolismo por grama de peso corporal do inseto diminui com o seu crescimento, de modo que a respiração é proporcional à massa do indivíduo com um expoente fracionário cerca de $2/3$ (0,67).

No estudo realizado por Zhou et al. (2004) através de proteínas marcadas com ^{14}C na dieta de fêmeas de *A. aegypti*, observaram que para atender à necessidade dos processos fisiológicos, incluindo atividades reprodutivas e sobrevivência após o primeiro ciclo gonotrófico, são necessárias reservas adicionais de proteínas. Além disso, carboidratos, incluindo açúcares e glicogênio derivados dos aminoácidos da proteína da refeição, atingiu rapidamente cerca de 5% (3% de açúcares mais 2% de glicogênio) em 1 h, enquanto o nível de reserva de lipídeos atingiu cerca de 2,5% neste momento, sugerindo que a gliconeogênese dos aminoácidos das proteínas da refeição é uma via metabólica de resposta rápida, em comparação com a lipogênese. Por outro lado, a conversão máxima de aminoácidos em açúcares mais glicogênio (7%) foi menor do que a conversão em lipídeo (16%). Isso sugere que a lipogênese deve atender às necessidades das reservas maternas de triacilglicerol (TAG) e dos lipídios do ovo.

Para *Drosophila nigrospiracula* Patterson e Wheeler, a mudança dos recursos alimentares do hospedeiro natural para uma dieta de laboratório de levedura por apenas 24 horas resultou em uma mudança nas assinaturas de isótopos estáveis em direção aos valores do novo recurso, isto valida sua aplicação em estudos de ecologia de recursos e habitats alimentares sendo sensível o suficiente para detectar mudanças dietéticas recentes, desde que os hospedeiros difiram em suas razões de isótopos estáveis (Markow et al., 2000).

Na Austrália, Mainali et al. (2022), comparou as razões isotópicas de carbono e nitrogênio entre *B. tryoni* criadas em diferentes dietas de larvas e moscas selvagens coletadas. Devido a variabilidade da fonte de alimento na fase larval e adulta valores de $\delta^{15}\text{N}$ foram inconclusivos, porém, na análise de $\delta^{13}\text{C}$ foi possível determinar a origem das moscas das frutas e rastrear mudanças na composição isotópica conforme as dietas dominadas por C_4 (laboratório) e C_3 (frutos de plantas). Isto demonstra que o uso de açúcar C_4 na dieta de larvas e adultos pode ser um marcador intrínseco adequado de moscas das frutas liberadas em um programa Técnica do Inseto Estéril. Resultado similar ao de Botteon (2018) que com *Anastrepha fraterculus* Wiedemann obteve valores diferentes de $\delta^{13}\text{C}$ comparado a moscas selvagens e criadas em frutos a base de fontes C_3 , mesmo após 15 dias de mudança de dieta.

Kjeldgaard et al. (2021) avaliaram as interações inter e intracoloniais em populações introduzidas de formigas *Solenopsis invicta* Buren no Texas e para quantificar o compartilhamento entre ninhos monogínicos (colônias com uma única rainha que põe ovos) e poligínicos (colônias com várias rainhas que põem ovos) no campo foi oferecido as operarias de cada ninho uma solução de sacarose contendo glicina marcada com ^{15}N . Cinco dos 52 ninhos não tratados mostraram evidências de compartilhamento com o ninho tratado (dois monogínicos e três poligínicos) a 5 metros de distância, possivelmente ninhos polidômicos, pois de modo geral as colônias se comportaram de forma idêntica, sugerindo que ambas as formas sociais mantêm limites estritos de colônia, independente da distância.

3. OLIGOELEMENTOS (ELEMENTOS RAROS)

As técnicas de marcação com elementos raros foram desenvolvidas na década de 1970 como uma alternativa à marcação de insetos com isótopos radioativos. Os oligoelementos são usados como ferramentas de marcação interna em aproximadamente 8 ordens e 30 famílias de insetos, incluindo carrapatos e aranhas. Alguns desses utilizados na marcação incluem os elementos rubídio (Rb), estrôncio

(Sr), céσιο (Cs), manganês (Mn), háfnio (Hf) e irídio (Ir) e os elementos lantanídeos: lantânio (La), samário (Sm), európio (Eu), disprósio (Dy) e cério (Ce). Esses elementos são utilizados na forma natural (não radioativa) e, em geral, adicionados à dieta na forma de cloreto, sendo que, o Rb em sua forma de cloreto (RbCl) é o marcador mais frequentemente usado para insetos (Hagler & Jackson, 2001).

A análise dos elementos de céσιο, estrôncio e rubídio, após digestão do material orgânico, pode ser feita por meio de espectrofotometria ou espectroscopia (plasma). Entretanto, para os lantanídeos como o disprósio, a detecção do seu teor deve ser realizada por meio da ativação de nêutrons. Durante esse processo, o ^{164}Dy , que é um isótopo de ocorrência natural, forma o isótopo ^{165}Dy , que emite radiação gama. Essa emissão pode ser detectada por meio de filme de raio X, que fica marcado pela radiação (Fernandes, 2002).

Para determinação do nível de marcação com elementos raros, Stimmann (1974) considera que os insetos marcados atinjam pelo menos a média acrescida 3 vezes o desvio padrão em comparação com os insetos controle, dessa forma mais de 99% dos insetos de campo devem possuir valores inferiores encontrados nos insetos marcados. Conhecendo as concentrações dos elementos no alimento, no inseto e nas fezes, podem-se determinar os a porcentagem de alimento ingerido, digerido e sua conversão em biomassa (Parra et al., 2013).

Hopper & Woolson (1991) conseguiram marcar o parasitóide de *Heliothis* sp., *Microplitis croceipes* Cresson, por até vinte dias após a emergência, usando isolada ou conjuntamente os elementos Dy, Cs, Rb e Sr, constatando que a utilização de mais de um elemento para marcação permite um maior número de combinações e, conseqüentemente, maiores possibilidades de marcação de insetos.

A praticidade de marcar insetos com oligoelementos depende de alguns fatores, listados na revisão de Hagler & Jackson (2001):

- Os níveis naturais dos elementos-traços, encontrados na crosta terrestre, podem variar de acordo com a localização geográfica e alterar as quantidades encontradas em plantas e insetos;
- A absorção desses elementos varia de acordo com a espécie, portanto é necessário determinar os níveis dos oligoelementos antes de iniciar os estudos com marcação;
- Existe uma correlação entre a quantidade do marcador com tamanho do inseto, aumentando ainda mais a variabilidade entre espécies;
- Para essa técnica é importante aplicar a concentração mais alta possível sem afetar a fisiologia e comportamento do inseto, fornecendo assim a marca acima da quantidade encontrada em insetos não marcados;
- O modo de aplicação determina sua intensidade e duração;
- Por fim, a quantidade de oligoelemento retido por um inseto pode diminuir ao longo do tempo devido a alimentação, excreção, acasalamento e oviposição.

Para *Ceratitis capitata* Wiedemann o Rb pode ser usado como marcador fisiológico interno para avaliar a dispersão em campo, sendo incorporado ao inseto por meio da alimentação de larvas ou adultos em plantas hospedeiras tratadas com aplicações foliares. A concentração mínima de Rb necessária na dieta larval para marcar as moscas adultas seria de aproximadamente 3000 μg Rb/g e para adultos cerca de 1000 μg Rb/g, e estas concentrações são alcançadas por meio de múltiplas aplicações de aproximadamente 10 g Rb/L na planta hospedeira (Van Steenwyk et al., 1992).

Wilkins et al. (2007) ao alimentar larvas de *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi* Liston em RbCl constataram que o aumento nas concentrações desse elemento afeta a longevidade, portanto passaram a recomendar uma concentração de 200 ppm para marcação de ambas as espécies, onde a detecção de Rb em machos adultos ocorre a partir de 6 dias de idade e fêmeas adultas 10 dias de idade.

Já Maciel de Freitas et al. (2004) avaliaram a marcação de ovos de *Aedes albopictus* Skuse após uma única refeição de sangue contendo RbCl, e encontraram uma concentração molar ideal de 0,025 M resultando em mais de 80% dos lotes de ovos marcado com Rb. Nas fêmeas adultas esse elemento foi detectado essencialmente no abdômen, cuja produção de ovos e sobrevivência não diferiram das não marcadas, pelo menos nas três semanas seguintes à refeição de sangue marcada.

Kumano et al. (2021) utilizando dieta artificial tratada com 0,5% de Rb para machos de *Euscepes postfasciatus* Fairmaire, constataram a transferência deste oligoelemento na ejaculação em fêmeas inseminadas sem afetar sua longevidade, portanto essa metodologia permite monitorar o nível espacial de esterilidade em um programa de erradicação através do desempenho de machos estéreis frente as fêmeas selvagens.

CONCLUSÕES

Entender a dispersão dos insetos é fundamental para compreensão de sua biologia, demografia e etologia. A marcação dos insetos não pode afetar seu comportamento, deve ter duração correspondente ao tempo de estudo, não ser tóxico, fácil aplicação e identificação, além disso é prudente considerar o custo-benefício e a segurança ambiental para determinar sua viabilidade. As três técnicas discutidas nessa revisão, apresentam um grau de permanência elevado, independem do tamanho do inseto e localização para rastreio. Para radioisótopos as informações são obtidas pelo próprio inseto, já para isótopos estáveis e oligoelementos é necessário determinar a quantidade de traçador na dieta. A composição isotópica assimilada nos tecidos dos organismos é promovida pela discriminação de isótopos mais pesados durante os processos biológicos, podem ser detectadas em consumidores primários, predadores e na própria prole, outra característica relevante na área radioentomológica é a identificação de espécies invasoras de acordo com sua região, demonstrado a versatilidade dessas ferramentas.

BIBLIOGRAFIA

- Arthur, V.; J.M.M Walder; F.M. Wiendl; A.C.A.M. Precetti; O.F. Teran & B.C. Henrique.** (1987). Dispersão de adultos de *Sphenophorus levis*, 1978 (Col., Curculionidae) em cana-de-açúcar marcados com ³²P. Energia Nuclear e Agricultura 8(1/2): 79-86.
- Bailey, S.F.; D.A. Eliason & W.G. Iltis.** (1962). Some marking and recovery techniques in *Culex tarsalis* Coq. flight studies. Mosquito News 22(1): 1-10.
- Balagawi, S.; K. Jackson; I.U. Haq; R. Hood-Nowotny; C. Rech & A. Clarke.** (2014). Nutritional status and the foraging behaviour of *Bactrocera tryoni* with particular reference to protein bait spray. Physiological Entomology 39(1): 33-43.
- Behera, M.K.; R. Behera & B. Patro.** (1999). Application of Dyar's rule to the development of *Macrosiphoniella sanborni* (Gill.) (Homoptera: Aphididae). Agricultural Science Digest (Karnal) 19: 179-182.
- Botteon, V.W.** (2018). The use of stable isotope as tracers of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). Tese de Doutorado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Brasil. 102 pp.
- Boutton, T.W.** (1991). Stable carbon isotope ratios of natural materials: II. Atmospheric, terrestrial, marine, and freshwater environments. In: Carbon Isotope Techniques. Coleman, D.C. & B. Fry (eds). New York: Academic Press. pp. 173-185.
- Bowen, G.J.** (2010). Isoscapes: spatial pattern in isotopic biogeochemistry. Annual Review of Earth and Planetary Sciences 38: 161-187.
- Buscarlet, L.A.** (1983). The use of radioactive tracers for insect feeding rate determination. The International Journal of Applied Radiation and Isotopes 34(5): 855-859.
- Chang, H.T.** (1946). Studies on the use of fluorescent dyes for marking *Anopheles quadrimaculatus* Say. Mosquito News 6: 122-125.
- Conrad, K.F.; K.H. Willson; K. Whitfield; I.F.J. Harvey; C.J. Thomas & T.N. Sherratt.** (2002). Characteristics of dispersing *Ischnura elegans* and *Coenagrion puella* (Odonata): age, sex, size, morph and ectoparasitism. Ecography 25(4): 439-445.
- Deniro, M.J. & S. Epstein.** (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochimica et Cosmochimica Acta 42(5): 495-506.
- Deniro, M.J. & E. Epstein.** (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. Geochimica et Cosmochimica Acta 45(3): 341-351.

- Dietz, A. & E.N. Lambremont.** (1970a). A method of studying food consumption of live honey bee larvae by liquid scintillation counting. *Annals of the Entomological Society of America* 63(5): 1340-1345.
- Dietz, A. & E.N. Lambremont.** (1970b). Caste determination in honey bees. II. Food consumption of individual honey bee larvae, determined with ³²P-labeled royal jelly. *Annals of the Entomological Society of America* 63(5): 1342-1345.
- El Sheikh, A.F.** (2019). Tracing insect pests: is there new potential in molecular techniques? *Insect Molecular Biology* 28(6): 759-772.
- Faiman, R.; A. Dao; A.S. Yaro; M. Diallo; S. Djibril; Z.L. Sanogo; Y. Ousmane; M. Sullivan; L. Veru; B.J. Krajacich; A. Krishna; J. Matthews; C.A.M. France; G. Hamer; K.A. Hobson & T. Lehmann.** (2019). 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* 10(8): 1274-1285.
- Fernandes, O.A.** (2002). O Uso de Marcadores no controle Biológico. In: Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Parra, J.R.P.; P.S.M. Botelho; B.S. Correia-Ferreira & J.M.S. Bento. Editora Manole Ltda, São Paulo. 595 pp.
- Fletcher, T.B.** (1936). Marked migrant butterflies. *Entomologist's Record* 48: 105-106.
- Gillies, M.T.** (1961). Studies on the dispersion and survival of *Anopheles gambiae* Giles in East Africa, by means of marking and release experiments. *Bulletin of Entomological Research* 52(1): 99-127.
- Girón, F.J. & S. Ríos.** (1980). Quasi-Bayesian Behaviour: A more realistic approach to decision making? *Trabajos de Estadística y de Investigación Operativa* 31(1): 17-38.
- Hagler, J.R. & C.G. Jackson.** (2001). Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annual Review of Entomology* 46(1): 511-543.
- Hagler, J.R.; A.C. Cohen; D. Bradley-Dunlop & F.J. Enriquez.** (1992). New approach to mark insects for feeding and dispersal studies. *Environmental Entomology* 21(1): 20-25.
- Hassett, C.C. & D.W. Jenkins.** (1951). The uptake and effect of radiophosphorus in mosquitoes. *Physiological Zoology* 24(3): 257-266.
- Holder, P.W.; R. Frew & R. Van Hale.** (2015). The geographic origin of an intercepted biosecurity pest beetle assigned using hydrogen stable isotopes. *Journal of Economic Entomology* 108(2): 834-837.
- Hood-Nowotny, R.; A. Harari; R.K. Seth; S.L. Wee; D.E. Conlong; D.M. Suckling; B. Woods; K. Lebdi-Grissa; G. Simmons & J.E. Carpenter.** (2016). Stable isotope markers differentiate between mass-reared and wild Lepidoptera in sterile insect technique programs. *Florida Entomologist* 99(1): 166-176.
- Hopper, K.R. & E.A. Woolson.** (1991). Labelling a Parasitic Wasp, *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), with Trace Elements for Mark—Recapture Studies. *Annals of the Entomological Society of America* 84(3): 255-262.
- International Atomic Energy Agency. IAEA.** (2009). Manual for the Use of Stable Isotopes in Entomology, Vienna, Austria. 78pp.
- Juarez, J.G.; S. Garcia-Luna; L.F. Chaves; E. Carbajal; E. Valdez; C. Avila; W. Tang; E. Martin; R. Barrera; R.R.M. Hemme; J.P. Mutebi; N. Vuong; E.B. Roark; C.R. Maupin; I.E. Badilho-Vargas & G.L. Hamer.** (2020). Dispersal of female and male *Aedes aegypti* from discarded container habitats using a stable isotope mark-capture study design in South Texas. *Scientific Reports* 10(1): 1-12.
- Kasting, R. & A.J. McGinnis.** (1965). Measuring consumption of food by an insect with carbon-14 labelled compounds. *Journal of Insect Physiology* 11(9): 1253-1260.
- Kettlewell, H.B.D.** (1952). Use of radioactive tracer in the study of insect populations (Lepidoptera). *Nature* 170(4327): 584-585.
- Kjeldgaard, M.K.; P.A. Eyer; C.C. McMichael; A.A. Bockoven; J.T. King; A. Hyodo; T.W. Boutton; E.L. Vargo & M.D. Eubanks.** (2021). Distinct colony boundaries and larval discrimination in polygyne red imported fire ants (*Solenopsis invicta*). *Molecular Ecology* 31(3): 1007-1020.
- Kumano, N.; K. Tsurui-Sato; K. Teruya & T. Toyosato.** (2021). Female Marking via Rubidium-Labeled Ejaculates in the West Indian Sweetpotato Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 114(3): 1411-1414.
- Lavandero, B.; S. Wratten; J. Hagler & M. Jervis.** (2004). The need for effective marking and tracking techniques for monitoring the movements of insect predators and parasitoids. *International Journal of Pest Management* 50(3): 147-151.
- Le Gall, M. & S.T. Behmer.** (2014). Effects of protein and carbohydrate on an insect herbivore: the vista from a fitness landscape. *Integrative and Comparative Biology* 54(5): 942-954.

- Le Bot, B.; Y. Oulhote; S. Deguen & P. Glorennec.** (2011). Using and interpreting isotope data for source identification. *Trends in Analytical Chemistry* 30(2): 302-312.
- Mac Cord, J.R.; P. Jurberg & M.M. Lima.** (1983). Marcação individual de triatomíneos para estudos comportamentais e ecológicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 78: 473-476.
- Maciel-de-Freitas, R.; J.M. Gonçalves & R. Lourenço-de-Oliveira.** (2004). Efficiency of rubidium marking in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): preliminary evaluation on persistence of egg labeling, survival, and fecundity of marked female. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(8): 823-827.
- Mainali, B.; A.S. Andrew; P.W. Taylor & P. Rempoulakis.** (2022). Stable isotopes for reliable identification of wild and mass-reared Queensland fruit flies in sterile insect technique programs. *Journal of Pest Science* 95:409-422.
- Markov, T.A.; S. Anwar & E. Pfeiler.** (2000). Stable isotope ratios of carbon and nitrogen in natural populations of *Drosophila* species and their hosts. *Functional Ecology* 14(2): 261-266.
- Mastrangelo, T. & J. Walder.** (2011). Use of radiation and isotopes in insects. In: *Radioisotopes—Applications in Bio-Medical Science*. Singh, J. Ed. InTech, Rijeka-Croatia. pp. 67-92.
- Michener, R. & K. Lajtha.** (2007). *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell Publishing Ltda., 2nd ed. 566 pp.
- Moore, S.T.; M.F. Schuster & F.A. Harris.** (1974). Radioisotope technique for estimating lady beetle consumption of tobacco budworm eggs and larvae. *Journal of Economic Entomology* 67(6): 703-705.
- Neto, S.S.; O. Nakano; D. Barbin & N.A.V. Nova.** (1976). *Manual de ecologia dos insetos*. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Editora Ceres. 419 pp.
- Nienstedt, K.M. & H.M. Poehling.** (2004). Prey to predator transfer of enriched ¹⁵N-contents: basic laboratory data for predation studies using ¹⁵N as marker. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 112(3): 183-190.
- O'brien, R.D. & L.S. Wolfe.** (1964). *Radiation, radioactivity and insects*. Academic Press, New York, USA. 211 pp.
- Osborne, J.L.; H.D. Loxdale & I.P. Woiwod.** (2002). Monitoring insect dispersal: methods and approaches. In: *Dispersal Ecology: The 42nd Symposium of the British Ecological Society held at the University of Reading*. Bullock, J.M.; R.E. Kenward & R.S. Hails. Blackwell Publishing, Oxford. pp. 24-49.
- Parra, J.R.P.; A.R. Panizzi & M.L. Haddad.** (2013). Índices nutricionais para medir consumo e utilização de alimentos por insetos. In: *Bioecologia e nutrição de insetos*. Panizzi, A.R. & J.R.P. Parra. Embrapa Soja, 2^a edição. 1601 pp.
- Patterson, R.S.; B.J. Smittle & R.T. Deneve.** (1969). Feeding habits of male southern house mosquitoes on ³²P-labeled and unlabeled plants. *Journal of Economic Entomology* 62(6): 1455-1458.
- Prabhu, V.; D. Perez-Staples & P.W. Taylor.** (2008). Protein: carbohydrate ratios promoting sexual activity and longevity of male Queensland fruit flies. *Journal of Applied Entomology* 132(7): 575-582.
- Quan, S.F.; W.V. Hartwell; K.G. Scott & C.T. Peng.** (1957). Cerium 144 as a Tag for Arthropods of medical Importance. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 51(1): 87-88.
- Querci, O.** (1936). Aestivation of Lepidoptera. *Entomologist's Record* 48: 122.
- Radeleff, R.D.; R.C. Bushland & D.E. Hopkins.** (1952). Phosphorus-32 329 Labeling of the Screw-worm Fly. *Journal of Economic Entomology* 45(3): 509-514.
- Sgrillo, R.B.; F.M. Wiendl; J.M.M. Walder & V. Arthur.** (1977). Técnica para estudos ecológicos da mosca cubana *Lixophaga diatraeae* Town., com o uso de traçador radioativo. *Boletim Científico, CENA, Piracicaba*. 17 pp.
- Showler, A.T.; R.M. Knaus & T.E. Reagan.** (1988). The versatility of radiotracer methods for studying insect ethology and ecology. *Florida Entomologist* 71(4): 554-580.
- Stimmann, M.W.** (1974). Marking insects with rubidium: imported cabbageworm marked in the field. *Environmental Entomology* 3: 327-328.
- Van Steenwyk, R.A.; K.Y. Kaneshiro; N.V. Hue & T.S. Whittier.** (1992). Rubidium as an internal physiological marker for Mediterranean fruit fly (Diptera: *Tephritidae*). *Journal of Economic Entomology* 85(6): 2357-2364.
- Wigglesworth, V.B.** (1972). *The Principles of Insect Physiology*. Chapman and Hall Ltd., 7nd ed. 833 pp.

- Wilkins, E.E.; S.C. Smith; J.M. Roberts & M. Bebedict** (2007). Rubidium marking of *Anopheles mosquitoes* detectable by field-capable X-ray spectrometry. *Medical and Veterinary Entomology* 21(2): 196-203.
- Williams, R.E.** (1962). Effect of coloring oviposition media with regard to the mosquito *Aedes triseriatus*(Say). *The Journal of Parasitology* 48: 919–925.
- Williams Jr, E.C. & D.E. Reichle.** (1968). Radioactive tracers in the study of energy turnover by a grazing insect (*Chrysochus auratus* Fab.; Coleoptera Chrysomelidae). *Oikos* 19: 10-18.
- Zhao, Z.; Z. Lu; G.V.P. Reddy; S. Zhao; G. Lin; J. Ding; J. Wu & Z. Li.** (2018). Using hydrogen stable isotope ratios to trace the geographic origin of the population of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) trapped in northern China. *Florida Entomologist* 101(2): 244-248.
- Zhou, G.; M. Flowers; K. Friedrich; J. Horton; J. Pennington & M.A. Wells.** (2004). Metabolic fate of [¹⁴C]-labeled meal protein amino acids in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* 50(4): 337-349.