

FABIANE PETRY

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DE FERTILIDADE E CICLO EVOLUTIVO DE  
ESPÉCIES DE *SIMULIUM* (DIPTERA, SIMULIIDAE) E SUSCEPTIBILIDADE DE  
SUAS LARVAS EM BIOENSAIOS LABORATORIAIS COM FORMULADOS DE  
*BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENIS* EM APARATO ELABORADO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de concentração Parasitologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra Ana Leuch Lozovei

CURITIBA

2005

## TERMO DE APROVAÇÃO

FABIANE PETRY

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DE FERTILIDADE E CICLO EVOLUTIVO DE ESPÉCIES DE *SIMULIUM* (DIPTERA, SIMULIIDAE) E SUSCEPTIBILIDADE DE SUAS LARVAS EM BIOENSAIOS LABORATORIAIS COM FORMULADOS DE *BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENIS* EM APARATO ELABORADO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de “Mestre em Parasitologia”, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de concentração Parasitologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos doutores:

Prof. Dr. José Lopes

Universidade Estadual de Londrina, Paraná – UEL

Dra. Samira Chahad Ehlers

Pesquisadora colaboradora do Departamento de Genética,  
Universidade de Leicester, UK

Prof. Dra. Ana Leuch Lozovei

Universidade Federal do Paraná - UFPR

Curitiba, 5 de abril de 2005

## AGRADECIMENTOS

Em primeiríssimo lugar, agradeço a Deus nosso Pai por ter-me encaminhado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, em que adquiri valiosos conhecimentos científicos que de agora em diante os colocarei a serviço da comunidade que necessitar.

À professora Dra. Ana Leuch Lozovei da Universidade Federal do Paraná, pela orientação, amizade, ensinamentos e dedicação no decorrer de todo o trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná e ao seu corpo docente pelos ensinamentos transmitidos.

À professora Dra. Vanete Thomaz Soccol da Universidade Federal do Paraná, coordenadora do Curso e ao Colegiado do Curso que não mediram esforços para o bom desempenho no funcionamento do Curso.

À professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, mais uma vez, sinceros agradecimentos pelo auxílio financeiro liberado pelo programa de pós-graduação destinado ao transporte automotivo ao campo.

Ao professor Dr. José Lopes da Universidade Estadual de Londrina pelo fornecimento dos três formulados de Bti empregados neste trabalho.

Aos proprietários da Chácara Evíssima Sr. Jovete dos Reis Santos por permitirem freqüentar a área a qualquer momento e pela receptividade amigável ao longo da pesquisa.

Aos colegas e amigos do curso, em especial, às meninas da Parasitologia Ângela Maron de Mello, Elisângela Aparecida Pereira e Regiane Szargiki.

Às funcionárias da Universidade Federal do Paraná Luciane Henning e Juliana Trackz pela amizade.

Ao Dr. Edílson Batista de Oliveira, da EMBRAPA/FLORESTA do município de Colombo, Paraná, pela orientação em análises estatísticas.

Ao prof. Dr. Aguinaldo Nascimento da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio na interpretação dos resultados estatísticos.

À professora Nívea da Silva Matuda, da Universidade Federal do Paraná, pelos serviços de Ajuste do Modelo Estrutural Linear.

Aos meus tios Olímpio e Pierina Petry pela acolhida e amizade.

Ao colega Jonny Edward Duque Luna pelo auxílio em testes estatísticos.

Em fim, sincero agradecimento a todas as pessoas que direta ou indiretamente cooperaram na execução deste trabalho e, inclusive, à Natureza pela matéria prima, grupo de insetos, que constitui o objeto deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	3
<b>SUMÁRIO</b>	4
Lista de figuras	6
Lista de tabelas	6
Lista de apêndices Capítulo 1	7
Lista de apêndices Capítulo 2.	7
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	8
<b>REFERÊNCIAS</b>	9
<b>CAPÍTULO 1: Fertilidade de ovos de <i>Simulium</i> (Diptera, Simuliidae) oriundos de criadouro natural e antrópico e aspectos relacionados com ciclo biológico, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil</b>	11
<b>RESUMO</b>	12
<b>ABSTRACT</b>	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	14
2.1. Importância econômica e médico-veterinária de simulídeos	14
2.2. Veiculação de patogênicos	17
2.3. Alguns aspectos biológicos de simulídeos	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	22
3.1. Localidade de pesquisa	22
3.2. Criadouro investigado e procedimentos em coleta de posturas	23
3.3. Procedimentos laboratoriais em posturas	24
3.4. Obtenção de ciclo biológico	25
3.5. Reforço de controle	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	26
4.1. Espécies constatadas	26
4.2. Tipos de substratos e de posturas	27
4.3. Morfologia e tamanho de ovos	32
4.4. Fertilidade e número de ovos por postura	32
4.5. Incubação de ovos, eclosão e comportamento larvar	35
4.6. Obtenção do ciclo biológico básico	38
4.7. Ponderações sobre ciclos biológicos e programas de controle	41
<b>5. CONCLUSÕES</b>	41
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	42
<b>7. APÊNDICES</b>	48

<b>CAPÍTULO 2: Susceptibilidade em larvas de <i>Simulium</i> a três diferentes formulações de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> testada em laboratório com um aparato simples econômico e rápido</b>	54
<b>RESUMO</b>	55
<b>ABSTRACT</b>	55
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	56
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	58
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	58
2.2. Histórico do <i>Bacillus thuringiensis</i>	60
2.3. Modo de ação do <i>Bacillus thuringiensis</i>	62
2.4. Resistência ao <i>Bacillus thuringiensis</i>	63
2.5. Avanços tecnológicos	65
2.6. Controle de Simuliidae	67
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	68
3.1. Localidade da coleta de larvas	68
3.2. Substratos e coletas de larvas	68
3.3. Larvas utilizadas e manutenção no laboratório	68
3.4. Aparato simples e econômico para bioensaios	69
3.5. Biolarvicidas e concentrações empregadas	69
3.6. Colonização por larvas no aparato e procedimentos em bioensaios	70
3.7. Identificação das espécies de <i>Simulium</i>	71
3.8. Verificação de temperatura e pH	71
3.9. Análise estatística dos resultados	72
<b>4. RESULTADOS</b>	72
4.1. Espécies de <i>Simulium</i> em bioensaios com diferentes formulados do Bti	72
4.2. Variações da temperatura durante os testes	72
4.3. Proporções de espécies em bioensaios com diferentes concentrações de Bti	73
4.4. Concentrações letais CL <sub>50</sub>	73
4.5. Bioensaios em concentrações de 0,2, e 0,32mg/l	75
<b>5. DISCUSSÃO</b>	76
5.1. Considerações sobre fatores ambientais	76
5.2. Considerações sobre o aparato utilizado em bioensaios	77
5.3. Considerações sobre o método de avaliação	78
5.4. Mortalidade de larvas	79
<b>6. CONCLUSÕES</b>	80
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	81
<b>8. APÊNDICES</b>	88

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1: Freqüência percentual média bianual de sete espécies de *Simulium* coletadas no Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil 27
- Figura 2: Diferentes aspectos morfológicos de posturas de *Simulium* encontradas no Riacho dos Padres, Chácara Evíssima, Almirante Tamandaré, Paraná (escala em cm). 28
- Figura 3: Percentual de fertilidade de ovos em espécies de *Simulium*, no criadouro Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil 34

### CAPÍTULO 2

- Figura 1: Aparato simples e econômico utilizado em bioensaios com formulações de Bti e larvas de espécies de *Simulium* 71
- Figura 2: Concentrações letais (CL<sub>50</sub>) para os três tratamentos testados contra larvas de *Simulium*. 75

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1. Percentual geral de fertilidade de ovos em espécies de *Simulium* verificado em posturas trazidas do Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil, período jan. a dez. 2004 33
- Tabela 2. Duração média, menor e maior, do ciclo biológico de ovo a adulto em seis espécies de *Simulium* de ovos oriundos do criadouro natural Riacho dos Padres, Chácara Evíssima, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. jan.a dez, 2004 40

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1. Número total de larvas de espécies de *Simulium* testadas em bioensaios com diferentes concentrações dos três biolarvicidas 73
- Tabela 2. Concentração letal 50% (CL<sub>50</sub> mg/l) de Bti e intervalo de confiança para os três formulados nas concentrações de 0,04 a 2,4mg/l com larvas de *Simulium* 74
- Tabela 3. Análise de variância e as médias das CL<sub>50</sub> para os três formulados de *Bacillus thuringiensis israelensis* em bioensaios com larvas de *Simulium* 75
- Tabela 4. Número total de larvas de *Simulium* testadas e seus percentuais de mortalidade nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l dos três biolarvicidas de Bti 77

## LISTA DE APÊNDICES

### CAPÍTULO 1

Tabela 3. Percentual de fertilidade de fêmeas de <i>Simulium</i> pelo número de larvas eclodidas por postura (Diptera, Simuliidae), Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, PR no período de dezembro de 2003 a abril de 2004	49
---	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 5. Oscilação da temperatura da água e ambiental durante os bioensaios com diferentes formulações de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	88
Tabela 6. Frequência de larvas das diferentes espécies no conjunto capturado no mês de fevereiro e submetidas aos bioensaios com diferentes concentrações do bioinseticida <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	88
Tabela 7. Frequência de larvas das diferentes espécies no conjunto capturado no mês de março e submetidas aos bioensaios com diferentes concentrações do bioinseticida <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	88
Tabela 8. Frequência de larvas das diferentes espécies no conjunto capturado no mês de abril e submetidas aos bioensaios com diferentes concentrações do bioinseticida <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	88
Tabela 9. Frequência de larvas das diferentes espécies no conjunto capturado no mês de maio e submetidas aos bioensaios com diferentes concentrações do bioinseticida <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	89
Tabela 10A. Médias e desvios padrão da temperatura da água e do ambiente durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l do biolarvicida Teknar	89
Tabela 11A. Médias e desvios padrão do pH e percentagem de mortalidade durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l do biolarvicida Teknar	89
Tabela 12B. Médias e desvios padrão da temperatura da água e do ambiente durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l do biolarvicida Vectobac	90
Tabela 13B. Médias e desvios padrão do pH, e da percentagem de mortalidade durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l do biolarvicida Vectobac	90
Tabela 14C. Médias e desvios padrão da temperatura da água e do ambiente durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l do biolarvicida Aquabac	91
Tabela 15C. Médias e desvios padrão do pH, e da percentagem de mortalidade durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32 mg/l do biolarvicida Aquabac	91

## INTRODUÇÃO GERAL

Os simulídeos têm distribuição cosmopolita, vivem em climas desde tropicais a frios (COSCARÓN, 1971). Seus criadouros são em águas correntes com diversos tipos de vazões, variando desde pequenos córregos a caudalosos rios e cachoeiras (CROSSKEY, 1993; VULCANO, 1981). São os únicos artrópodes de importância médica cujos imaturos ocupam o ecossistema fluvial lótico afixando-se em diferentes tipos de substratos sólidos.

A importância médico-veterinária está centrada em adultos fêmeas que, ao contrário de machos, espoliam o sangue em hospedeiros vertebrados para suprir suas necessidades fisiológico-reprodutivas. Ao exercerem a hematofagia à luz do dia no ambiente externo, perturbam o bem-estar de hospedeiros, molestando os animais domésticos ocasionando perdas econômicas em plantéis. Muitas espécies são vetoras de diversos organismos patogênicos ao homem, animais domésticos e silvestres. As fêmeas de simulídeos, sendo telmofágicas, sugam sangue de espécies variadas de animais. Um dos problemas de saúde pública que ocorre em diversos países do continente africano, da América Central e do Sul é a oncocercose, doença causada por *Onchocerca volvulus*. Este parasita causa intenso prurido, envelhecimento precoce em derme afetada e cegueira irreversível quando em estágio mais avançado. Em áreas infestadas por borrachudos, as espécies do gênero *Simulium* hematófagas devem estar sob controle para amenizar as insistentes e molestantes investidas e impedir a transmissão pelas vetoras deste patógeno.

O controle de simulídeos foi iniciado com os inseticidas químicos organoclorados, DDT e BHC. Hoje, devido à pressão seletiva de espécies, os efeitos nocivos sobre o homem e outros animais e o acúmulo na cadeia alimentar, o uso destes inseticidas foi restringido. Atualmente em escala mundial é utilizado o larvicida biológico *Bacillus thuringiensis israelensis*. Segundo RABINOVITCH (1997), em função do crescente aumento no número de insetos resistentes aos inseticidas químicos, tudo indica que os inseticidas biológicos ainda terão longa vida com um mercado promissor.



Para obter sucesso em controle de borrachudos, torna-se essencial a participação da comunidade-alvo nos programas. Repassar as informações sobre a biologia de insetos-alvo e a educação ambiental são quesitos importantes. HABIB (1989) assegura que nenhuma forma isolada de controle de pragas terá pleno êxito sem adotar políticas baseadas em um conjunto de medidas estratégicas. PETRY *et al.* (2004) e MELO *et al.* (1984) recomendam o trabalho informativo e educativo junto à comunidade bem como a sua participação efetiva nos programas de combate, principalmente em procedimentos de controle mecânico. O trabalho de educação deve ser persistente e constante, pois o envolvimento das pessoas nem sempre encontra imediata adesão.

A execução do controle mecânico, retirando imaturos do leito fluvial, é mais factível em riachos pequenos. MELO *et al.* (1984) e LOZOVEI *et al.* (1992) puseram à prova a validade deste procedimento físico. Os primeiros autores obtiveram numa extensão de aproximadamente de 15 km resultados satisfatórios. Os segundos autores conseguiram pleno êxito em vertedouros e no leito do riacho, nas dependências de um sítio. Em alguns casos, porém, torna-se necessário proceder ao controle integrado para assegurar o sucesso do programa.

A expectativa para o futuro próximo é poder controlar as fêmeas grávidas com uso de armadilhas iscadas com feromônio sintético, similar ao isolado em ovários grávidos e em posturas recém-depositadas no complexo de espécies de *Simulium damnosum* (McCALL *et al.*, 1997).

## REFERÊNCIAS

COSCARÓN, S. Estado actual de las enfermedades transmitidas por simúlidos. **Boletín de la Sociedad Entomológica del Perú**, v.6, n. 2, p. 80-84, 1971.

CROSSKEY, R.W. Blackflies (Simuliidae). *In*: LANE, R.P.; CROSSKEY, R.W. **Medical Insects and Arachnids**. ed. Chapman & Hall, London, 1993, 723 p.

HABIB, M.E.M. Uma política para o controle de borrachudos no Brasil. *In*: 3 Seminário sobre insetos e ácaros (1989: Campinas, São Paulo). **Anais 3 do XI Congresso da Sociedade Entomológica do Brasil**, Campinas, São Paulo, Fundação Cargill. p. 99-102, 1989.

LOZOVEI, A.L.; CUNHA, M.C.I. da & OLIVEIRA, V.L.R. de. Controle físico de simulídeos (Diptera, Simuliidae) em vertedouros de açudes de piscicultura e no leito do Rio Dom Rodrigo, Campo Largo, Paraná, Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, p. 679-684, 1992.

MELO, J.L.B.; SOUZA, M.A.T. & OLIVEIRA, S.J.B. Considerações gerais sobre o método de controle mecânico dos simulídeos. **Boletim de Saúde**, v. 11, n. 2, p. 12-16, 1984.

McCALL, P.J.; WILSON, M.D.; DEEBEN, B.D.; CRARE BRONSVOORT, B.M. & HEATH, R.R. Similarity in oviposition aggregation pheromone composition within the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) species complex. **Bulletin of Entomological Research**, v. 87, p. 609-616, 1997.

PETRY, F.; LOZOVEI, A.L.; FERRAZ, M.E. & SANTOS NETO, L.G.; Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 1, p. 127-132, 2004.

RABINOVITCH, L. Situação atual e necessidade de controle biológico de vetores de importância para a saúde pública. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 1, p. 42-45, 1997.

VULCANO, M.A. Simuliidae. *In*: HURLBERT, S.H.; RODRIGUEZ, G.; SANTOS, N.D. **Aquatic Biota of Tropical South America**, 1981, 323 p.

## **CAPITULO 1**

**FERTILIDADE DE OVOS DE *SIMULIUM* (DIPTERA, SIMULIIDAE) ORIUNDOS DE CRIADOURO NATURAL E ANTRÓPICO E ASPECTOS RELACIONADOS COM CICLO BIOLÓGICO, ALMIRANTE TAMANDARÉ, PARANÁ, BRASIL**

## RESUMO

Posturas individualizadas foram coletadas com substratos para conferir o índice percentual de fertilidade de ovos pela contagem de larvas recém-eclodidas, exocórios vazios e ovos inviáveis. No criadouro pesquisado, a fertilidade de ovos das espécies pesquisadas foi alta. Das 213 posturas coletadas, contendo 74.906 ovos, o índice percentual geral de fertilidade foi de 99,13%. Os índices de fertilidade que ocorreram entre as diferentes posturas foram de 94% em duas posturas; 95% em uma; 96% em seis; 97% em dez; 98% em 32; 99% em 67 e 100% em 95 posturas. Os aspectos biológicos que seguem foram verificados em temperatura da água de 16,5°C a 28°C e a do ambiente de 22°C a 28,5°C. A incubação de ovos variou de 4 a 6 dias; o crescimento larvar teve a duração de 22 a 39 dias e a formação de pupas, de 4 a 5 dias. A evolução biológica a partir da incubação do ovo até a emergência do adulto em *Simulium orbitale* foi de 30 a 32 dias; *Simulium perflavum* de 32 a 35 dias; *Simulium subnigrum* de 33 a 39 dias, *Simulium inaequale* de 41 a 47 dias; *Simulium pertinax* de 42 a 48 dias e *Simulium distinctum* de 48 a 49 dias. O conhecimento da duração dos instares larvares é importante em controle com *Bacillus thuringiensis israelensis*. Em controle mecânico, porém todas as fases aquáticas são objetos de remoção.

Palavras-chave: *Simulium*, fertilidade ovos, ciclo biológico, oviposição, Simuliidae.

## ABSTRACT

Eggs fertility rate and some biological aspects of the immature forms were studied on six *Simulium* species from ovipositions collected in natural breeding places located in rural area. The fertility was considerably high. For a total of 213 ovipositions containing 74.906 eggs, the average fertility rate was 99.1% with variation from 94 to 100%. The developmental cycle of the immature forms was observed from egg eclosion to adult emergence under temperature from 16.5 to 28°C. In *Simulium orbitale* the life cycle duration was 30 to 32 days, in *Simulium perflavum* 32 to 35 days, in *Simulium subnigrum* 33 to 39 days, in *Simulium inaequale* 41 to 47 days, in *Simulium pertinax* 42 to 48 days, and finally, the longest duration was observed in *Simulium distinctum* to range 48 to 49 days.

Key words: *Simulium*, egg fertility, life cycle, oviposition, Simuliidae.

## INTRODUÇÃO

Os simulídeos desempenham papel contraproducente em áreas econômicas, turísticas e de recreação, cujas conseqüências repercutem especialmente em medicina humana e veterinária. As fêmeas destes dípteros causam grande aflição e incômodo aos hospedeiros. Nas fazendas agropecuárias, constata-se perdas na produção de proteínas (leite e carne), comprometendo a economia, além de alto custo despendido ao seu controle. O incômodo causado pelas picadas das fêmeas estressa os hospedeiros-alvo e muitas espécies desempenham o papel de vetores biológicos de agentes de doenças (LANE & CROSSKEY, 1993; KIM & MERRITT, 1997).

Pelo interesse epidemiológico em medicina humana e veterinária, os cientistas têm dado grande ênfase ao estudo de simulídeos. Entretanto sobre o ciclo biológico existem poucas pesquisas (COLBO & MOORHOUSE, 1974; COLBO & WOTTON, 1979; LOZOVEI *et al.*, 1989; PEGORARO, 1993 e KIM & MERRITT, 1997). Sendo assim, os ciclos evolutivos completos da maioria das espécies de simulídeos permanecem pouco explorados. Os conhecimentos de ciclos de vida, aliados aos aspectos ecológicos detalhados, são importantes no planejamento adequado do controle desta simuliofauna.

A criação experimental em laboratório exige equipamento para aeração da água, padronização adequada do número de larvas por volume de água e a quantidade de alimento a ser ofertado para os diferentes instares larvares. Além disso, há necessidade de outras adaptações, como por exemplo, os sistemas de circulação de água utilizados em cativeiro devem assemelhar-se ao máximo possível ao habitat natural. Depara-se com a necessidade de se desenvolverem estudos, tanto em laboratório como no campo ou em paralelo, para determinar a duração do ciclo biológico, em especial, o número de instares larvares para as espécies de importância epidemiológica.

Inúmeras espécies hematófagas veiculam diversos organismos patogênicos ao homem, aos animais domésticos e silvestres. E mesmo em localidades imunes à transmissão de organismos parasitários, pelas insistentes picadas infligidas a animais de sangue quente (homens, vertebrados, mamíferos e aves), estes insetos funcionam como pragas molestantes.

Até o ano de 2002, foram descritas e reconhecidas 1.787 espécies de simulídeos (CROSSKEY, 2002). Cada região zoogeográfica tem suas espécies-praga hematófagas e seus vetores biológicos de patógenos. As hematófagas de *Austrosimulium* Tonnoir, 1925 distribuem-se na Austrália e Nova Zelândia; de *Cnephia* Enderlein, 1921 ocupam a região Holoártica; de *Prosimulium* Roubaud, 1906 distribuem-se nas regiões Holoártica, no leste e no sudeste da África, enquanto *Simulium* Latreille, 1802 tem distribuição cosmopolita, excetuando só a Nova Zelândia (LANE & CROSSKEY, 1993).

O presente trabalho teve como objetivos:

a) Obter posturas em substratos artificiais formados por fragmentos de fitilhos a fim de facilitar o estudo da fertilidade de ovos.

b) Investigar e obter adultos em espécies de *Simulium* a partir de posturas oriundas do campo, o tempo de duração das fases aquáticas, ou seja, da incubação de ovos, da fertilidade de ovos, dos estágios larvares e pupais.

c) Estabelecer em condições laboratoriais a duração do ciclo biológico de ovo à emergência do adulto em seis espécies de *Simulium* mais frequentes no Riacho dos Padres.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Importância econômica e médico-veterinária de simulídeos

Os simulídeos-fêmeas picam, incomodam e perturbam a vida de hospedeiros de sangue quente. Nas Regiões Afrotropical e Neotropical, as mais temidas são as espécies do gênero *Simulium* são as principais transmissoras de *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893). Embora esta filaria parasite especificamente o homem, houve casos de macacos-aranha (*Ageles geoffroyi*) naturalmente infectados na Guatemala e de gorila, no Congo. A *O. volvulus* transmite-se de um homem infectado ao outro, via picada de fêmeas infectadas do gênero *Simulium*. (EEZZUDUEMHOI & WILSON, 2002).

Além de tratar-se de inseto incômodo, transmissor de patógenos as picadas podem provocar reações alérgicas. No entanto, estas implicações diferem de pessoa a pessoa (SERVICE, 1997). Segundo LANE & CROSSKEY (1993), na área rural do Canadá e no sul de Nova Zelândia, ocorrem algumas espécies hematófagas agressivas, apesar

de não veicularem agentes patogênicos. Em algumas áreas do Canadá, nos meses de junho e julho, as populações de *Simulium venustum* Say, 1823 *s.l.* durante o dia são tão abundantes que, sem proteção, as atividades ao ar livre tornam-se cruciantes. Como estes insetos têm o hábito de revoar em enxames e de pousar, os espécimes podem infiltrar nos cabelos ou debaixo de roupa e provocar cócegas, causando constrangimento. Os borrachudos são atraídos por cores saturadas (azul, violeta, marrom e preta). HAHN (2004) recomenda o uso de roupas claras por serem menos atrativas para as fêmeas, evitar áreas sombreadas, bem como a exposição em horários de maior atividade de fêmeas, geralmente nas primeiras horas da manhã e ao entardecer. O uso de repelentes também ajuda a amenizar o mal-estar e a aflição (DIPTÈRES PIQUEURS, 2004).

As espécies hematófagas que molestam os hospedeiros não são as mesmas em diferentes países. *Simulium erythrocephalum* (De Geer, 1776), por exemplo, predomina na Europa Central, *Simulium posticatum* Meigen, 1838, na Inglaterra e *Simulium vittatum* Zetterstedt, 1838, no Canadá e na América do Norte.

No oeste do Canadá, *Simulium arcticum* Malloch, 1914 e *Simulium luggeri* Nicholson & Mickel, 1950 prejudicam severamente o gado nas pastagens. Antes da construção da barragem Gardiner sobre o rio Saskatchewan, a população de *Simulium arcticum* era tão abundante junto aos rebanhos que um grande número de animais morria por reações alérgicas e por choque anafilático. A partir da construção da barragem Gardiner, eliminando suas cascatas-habitat de reprodução desta espécie, decaiu a intensidade das picadas. Nesta mesma área, porém, surgiu *Simulium luggeri*, que dominou os cursos de águas mais lentas e persistiu como praga molestante do gado (DIPTÈRES PIQUEURS, 2004).

Nos Estados Unidos, os maiores problemas ocorrem no Vale de Mohave, onde o caudaloso Rio Colorado, banhando três estados (Arizona, Califórnia e Nevada) com suas águas rápidas, proporciona-lhes a maior fonte de economia na geração de energia elétrica, na irrigação, na recreação e no uso doméstico. Nestas profusas águas também se procria *Simulium vittatum*, que afeta a economia, a saúde dos residentes, os turistas e os esportistas aquáticos. A espécie, além de picar e revoar em enxames ao redor de

peessoas, embrenha-se nos cabelos, entra na boca, nas narinas e nos ouvidos, causando pânico (MULLA & LACEY, 1976). As constantes e repetidas picadas provocam febre, inchaço, cefaléia e dores nas articulações (SERVICE, 1997).

Nos Estados Unidos, a *Cnephia pecuarum* (Riley, 1887) é considerada severa praga de búfalos e *Prosimulium mixtum* Syme & Davies, 1958 é nociva por picar insistentemente durante a primavera e verão no noroeste do país e no leste do Canadá. Na Austrália, *Austrosimulium pestilens* Mackerras & Mackerras, 1955 é temida e nociva entre as pragas hematófagas de animais domésticos (CARABIN *et al.*, 2003).

Um clássico exemplo de aborrecimento por causa da massiva presença de borrachudos consta registrado na literatura que ocorreu no século XX (1930) no Vale do Danúbio (Europa Central, antiga Iugoslávia e Romênia). Miríades de *Simulium colombaschense* Fabricius, 1787 dispersos em toda esta área, empreendiam ferozes picadas. Quando o número de picadas não causava morte de animais, o incômodo provocado atrapalhava a alimentação do gado com conseqüente perda de peso. Com a diminuição da produtividade, reduzia-se o alimento e a economia da população local. O controle desta espécie, finalmente, foi resolvido com a interferência no ambiente fluvial (LANE & CROSSKEY, 1993; KETTLE, 1995; SERVICE, 1997).

Na região sudeste do Brasil, em Itatiba, São Paulo, *Simulium rubrithorax* Lutz, 1910 também tem causado problemas em rebanhos (ANDRADE, 1989). No Parque Nacional da Amazônia brasileira, várias espécies antropofílicas de *Simulium* provocam reações alérgicas em pessoas não ambientadas. Entre as espécies desta região, destacam-se *Simulium sanguineum* Knab, 1915 e *Simulium guianense* Wise, 1911 *s.l.*, ambas ativas durante o ano todo (LACEY, 1981). No sul, existem várias espécies hematófagas. A antropofílica *Simulium pertinax* Kollar, 1832, amplamente dispersa no litoral norte de São Paulo e nos três estados sulinos, é considerada a mais incômoda (RUAS NETO *et al.*, 1984; RUAS NETO *et al.*, 1985; RUAS NETO & MATIAS, 1985; ARAÚJO-COUTINHO *et al.*, 1988; CASTELLO BRANCO JR., 1994). De acordo com SOUZA (1984), no Rio Grande do Sul, a alta infestação de simulídeos antropofílicos vem prejudicando o turismo e a produtividade agrícola. Durante a colheita de uvas, os agricultores ficam penalizados sem poder calçar botas nem sapatos devido ao edema



provocado pelas picadas. Na região das Hortênsias, nordeste e encosta superior da Serra, os borrachudos castigam adultos e crianças não só em áreas rurais, mas invadem também os perímetros urbanos (PROGRAMA DE COMBATE AOS BORRACHUDOS E MOSQUITOS DA UFRS, 2004).

Para finalizar, em diversos países existem numerosas referências de perdas econômicas provocadas por simulídeos em agropecuária. Grande número de gado bovino, eqüino, muar, suíno, ovino, de cães, gatos e de aves, como perus, patos e frangos, assim como animais silvestres morrem em consequência do ataque destes insetos. As mortes usualmente ocorrem em consequência de uma aguda toxemia por excessivo número de picadas, por choque anafilático ou por inalação de insetos (ROBINSON, 1997).

## 2.2. Veiculação de patógenos

Os patógenos veiculados por simulídeos para as aves são do gênero *Leucocytozoon* Ziemann, 1898 (Apicomplexa, Plasmodiidae), que causam malária à semelhança de *Plasmodium*. Entre as que mais prejudicam economicamente a criação de aves, incluem-se *Leucocytozoon smithi* (Laveran & Lucet, 1905), parasita de sangue de galináceos perus na América do Norte e na Europa e *Leucocytozoon simondi* (Mathis & Leger, 1910) que afeta patos e gansos domésticos na América do Norte, na Europa e no sudeste da Ásia, com mortalidade aproximada de 100%. No Canadá, *Leucocytozoon simondi* é o maior fator limitante na criação de gansos. No sudeste da Ásia, o parasita *Leucocytozoon caulleryi* (*Akiba caulleryi* Bennett, Garham & Fellis, 1965) causou sérias perdas no plantel com alta mortalidade de frangos. *Leucocytozoon sabrazesi* e *Leucocytozoon schoutedeni* em galináceos jovens também provocam mortalidade mais severa que em adultos. As espécies dos gêneros *Simulium*, *Prosimulium*, *Eusimulium* Roubaud, 1906 e *Cnephia* constituem vetores biológicos de *Leucocytozoon* (TARSHIS, 1972; KETTLE, 1995; LEUCOCYTOZOONOSIS, 2004(a), 2004(b)). As filarias patogênicas do gênero *Onchocerca* veiculadas aos ungulados, listadas até o momento, formam 21 espécies parasitas de diferentes animais. Na veiculação destas filarias, participam várias espécies de *Simulium* (KETTLE, 1995; LEUCOCYTOZOONOSIS, 2004(a); 2004(b)).

Aos simúlídeos também se atribui a veiculação de arbovírus da encefalite eqüina na Venezuela e em algumas localidades da Colômbia. Simúlídeos igualmente são considerados vetores mecânicos de vírus da mixomatose de coelhos (LANE & CROSSKEY, 1993; KETTLE, 1995).

As espécies veiculadoras de *Onchocerca volvulus* estão incluídas no gênero *Simulium*. Originariamente, a oncocercose humana aconteceu em países tropicais da África sub-saariana e só depois apareceu na América Central e na do Sul (LANE & CROSSKEY, 1993).

O principal vetor da *Onchocerca* na África é o complexo de espécies *Simulium damnosum* Theobald, 1903 *s.l.* que conta com mais de 40 membros entre as espécies afins, citoespécies e *sibling species* (são morfologicamente idênticas, mas diferentes sob aspectos ecológicos). De acordo com McCALL *et al.*, (1997), doze membros deste complexo são considerados principais vetores de *O. volvulus*. Na Etiópia, Uganda, Tanzânia e República Democrática do Congo, *Simulium neavei* Roubaud, 1915 é o vetor comum (OKULICZ *et al.*, 2002). Na zona florestal de Gana, porém, onde a oncocercose é hiperendêmica, predomina como vetor *Simulium sanctipauli* Vajime & Dunbar, 1975 (KUTIN *et al.*, 2004).

Em alguns países do Continente Americano, entre os principais veiculadores de *Onchocerca* citam-se *Simulium metallicum* Bellardi, 1859, *Simulium ochraceum* Walker, 1861 e *Simulium exiguum* Roubaud, 1906 *s.l.* No Brasil, destacam-se *Simulium exiguum*, *Simulium guianense*, *Simulium oyapockense* Floch & Abonnenc, 1946 *s.l.*, *Simulium roraimense* Nunes & Mello, 1974 e *Simulium incrustatum* Lutz, 1910 (SHELLEY, 2002).

A oncocercose é considerada um problema de saúde pública. Existem extensas áreas de milhões de hectares de terras férteis e agriculturáveis freqüentemente desabitadas pelo temor de infecções dérmicas e oculares. A oncodermatite, além do intenso prurido, causa lesões e, na fase crônica, determina severa desfiguração dérmica e envelhecimento precoce. Tais sintomas prejudicam severamente a concentração, o rendimento no trabalho e a interação social. As lesões oncodérmicas provocam o estigma e depreciam a auto-estima dos doentes afetados. Em áreas endêmicas

africanas, a oncodermatite com severo prurido acomete acima de 80% da população. Em mulheres grávidas, o parasita pode danificar a glândula pituitária de fetos resultando no nascimento de indivíduos anões por deficiência da produção do hormônio de crescimento conforme considerações de WHO Onchocerciasis (NORWOOD, 2004).

A oncocercose ocular, em números, lidera como segunda doença infecciosa da cegueira humana. Está presente em 36 países da África e em um país da Península Arábica (Iêmen). No Continente Americano, Colômbia, Equador, Guatemala, Venezuela e México, incluindo o Brasil, são seis países que ainda não se livraram dessa enfermidade. No território brasileiro, a oncocercose ocorre nos estados do Amazonas e Roraima entre os índios Yanomami que habitam ao longo da fronteira com a Venezuela (FACT SHEET, 2000; THYLEFORS, 2001; OKULICZ *et al.*, 2002; CARABIN *et al.*, 2003).

A oncocercose no Brasil, ocorre sob forma endêmica, cujas manifestações são lesões dermatológicas, nódulos subcutâneos e eventualmente cegueira (MORAES, 1991). Exames oftalmológicos realizados nos índios Yanomami (pólo Toototobi) mostraram que eles apresentavam predominantemente ceratite punctata (PASSOS & COELHO, 1998). Entre as hipóteses sobre a origem da oncocercose nas Américas, a mais respeitada diz que é originária da África e teria sido introduzida através do tráfico de escravos (SÁ & MAIA-HERZOG, 2003). A existência da oncocercose entre os Yanomami é curiosa, uma vez que estes nunca tiveram contato com os escravos africanos e nem com seus descendentes. Provavelmente, a doença tenha seguido um caminho indireto através de focos existentes na Venezuela (MORAES, 1991).

A implantação do programa de controle de vetores em focos brasileiros de oncocercose torna-se impraticável devido ao isolamento dos grupos atingidos, à dificuldade de acesso às áreas, à mobilidade dos Yanomami, à vasta extensão territorial e aos tipos de criadouros de simuliídeos (PASSOS & COELHO, 1998). Outro fator que dificulta o controle de simuliídeos vetores é a existência de diversos rios, alguns deles muito extensos (COELHO *et al.*, 1998; SHELLEY 2002). Por causa destes problemas, optou-se por implantar o programa de tratamento medicamentoso dos

parasitados com ivermectina (PASSOS & COELHO, 1998; ARAÚJO-COUTINHO, 2000). Em Guiné, ao associar o tratamento de parasitados com ivermectina com o controle de vetores conseguiram reduzir a infectividade mais rapidamente (GUILLET *et al.*, 1995).

Aproximadamente 85,5 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (EEZZUDUEMHOI & WILSON, 2002). Estima-se em 125 milhões de indivíduos expostos ao risco de infecções oncocercóticas e destes 12 milhões são crianças (PRESS RELEASE WHO/53, 1999). Entre as pessoas mais sujeitas, enumeram-se pescadores, fazendeiros, cavadores de areia, todos por permanecerem durante longas horas ou por residirem perto de rios-criadouro de simulídeos, motivo pelo qual a doença recebe o nome popular de “cegueira-dos-rios”. Estão expostos também ao risco da infecção os missionários, os cientistas e os que prestam serviços voluntários. Em áreas hiperendêmicas, a carga de microfilárias em parasitados é alta, ao redor de 150 milhões de exemplares por parasitado. Há regiões com muitas pessoas infectadas e cegas. Os cegos oncocercóticos têm expectativa de vida reduzida em um terço e a maioria morre dentro de 10 anos. Os mais longevos, além disso, sentem-se afetados por graves problemas sócio-econômicos (ETYA’ALE, 2001; NORWOOD, 2004). De acordo com os especialistas em oncocercose da OMS, a doença acomete mais severamente ao longo de rios que percorrem o Continente Africano. A Nigéria, a Etiópia, República dos Camarões, a Uganda e a República do Congo concentram o maior número de infectados (ETYA’ALE, 2001; OKULICZ *et al.*, 2002).

Recentes estudos efetuados na Etiópia, Nigéria e Sudão revelaram a triste situação de crianças, em que as infecções oncocercóticas são responsáveis pelo baixo rendimento e pela alta evasão escolar devido ao intenso prurido dérmico. Entre adultos, como conseqüências também ocorrem à baixa produtividade em atividades profissionais, salários reduzidos e elevados gastos com o tratamento (ETYA’ALE, 2001).

### **2.3. Alguns aspectos biológicos de simulídeos**

No Brasil, os simulídeos são conhecidos popularmente por borrachudos, moscas-negras, piuns e casaquinhos-de-couro. Em países de idioma inglês, são denominados *black flies*, *buffalo gnats*, em hispânico, *jejenes*, em francês, *mouches noires*. Os

adultos têm atividades hematofágicas diurna e exófila. Este comportamento sobressai pela importância na veiculação de patógenos aos humanos em atividades no ambiente externo.

Os simulídeos têm adaptações morfológicas especiais para viverem em habitats riacófilos, afixados em substratos sólidos, como folhas de vegetais, galhos e raízes pendentes sobre a água, ramos secos, além de outros garranchos encaixados na correnteza. O desenvolvimento dos estágios imaturos (ovos, larvas e pupas), portanto, restringe-se exclusivamente ao ecossistema fluvial. Larvas e pupas predominam em águas lólicas desde as mais tênues correntezas até as muito fortes e velozes. Em algumas espécies africanas, as larvas são foréticas, utilizam como substrato o corpo de efemérides, camarões e caranguejos com quem convivem no ecossistema límico. Os forontes servem-lhes também de meio de dispersão (CROSSKEY, 1993).

Apesar de as larvas evoluírem afixadas a objetos sólidos, locomovem-se graças a algumas adaptações morfológicas. Na extremidade posterior do abdome, possuem uma protuberância com uma espécie de ventosa que as fixa aos substratos e é esta mesma ventosa que as auxilia na movimentação. Outro recurso de que dispõem para se movimentar é a propata ou falsa perna localizada no tórax. Sendo retrátil e munida de uma ventosa de ganchos em sua extremidade, facultam-lhes fixarem-se e locomoverem-se como lagartas de lepidópteros geometrídeos (mede-palms). Além dos dois recursos citados, as larvas constam dotadas de glândulas salivares, mais longas que o próprio corpo. São elas que sintetizam uma substância sedosa com a qual os insetos tecem fios de seda utilizados para ancorarem nos substratos sólidos dentro de água. Graças a este artifício, as larvas flutuam pela correnteza água abaixo até encontrarem um lugar apropriado para nova fixação pelas ventosas e para dar continuidade ao seu desenvolvimento. A troca constante de microhabitats tem por finalidade de ofertar-lhes maior e renovado fluxo de partículas alimentares. Finalmente, implantadas em casulos geralmente em forma de cones, elaborados com os mesmos fios de seda e afixados em substratos. As larvas encerram o ciclo de crescimento, passando à fase de pupas. As larvas maduras assim como as pupas não mais se alimentam (=larvas maduras são aquelas que concluíram o crescimento em tamanho e em órgãos de pré-pupas incluindo os

histoblastos já formado e fortemente pigmentado). Os adultos emergem dentro de uma bolha de ar. Uma vez fora da água, ambos os sexos estão aptos a copular. A espermatogênese nos machos e a maturação dos órgãos sexuais nas fêmeas ocorrem em larvas e pupas, fases anteriores, portanto, às aladas terrestres. WALL & SHEARER (1997) referem que em simulídeos em climas frios o ciclo biológico completo ocorre em 42 a 15 semanas. Esta variação é dependente da espécie, da disponibilidade de nutrientes para as larvas e das condições climáticas. Em algumas espécies brasileiras de *Simulium* durante o crescimento larvar foram determinados de 6 a 8 instares larvares obtidos com base em medidas morfométricas de alguns escleritos cefálicos (CUNHA *et al.*, 1998; GORAYEB, 1981). Para evidenciar a complexidade deste assunto, COLBO (1987), no Canadá, servindo-se dos mesmos procedimentos de morfometria, obteve onze ecdises larvares para o complexo de espécies de *Simulium vittatum* e até mais de onze em alguns exemplares. A determinação do número de instares larvares em complexos de espécies torna-se mais problemática. O número de gerações por ano também varia de uma, em espécies univoltinas, a seis, em polivoltinas. Segundo CROSSKEY (1993), *Simulium damnosum* pode completar o ciclo biológico em aproximadamente duas semanas e ter de 15 a 20 gerações por ano.

Excluindo as espécies autógenas, o regime hematofágico de fêmeas assegura seus ciclos gonotróficos. Os simulídeos, sendo telmofágicos, sugam o sangue de espécies variadas de animais. Além do repasto sangüíneo, as fêmeas necessitam de alimento de origem florícola. Os machos alimentam-se exclusivamente de néctares. Embora seja grande a gama de hospedeiros, observa-se o predomínio de espécies mamofílicas, em particular, as antropofílicas e as ornitofílicas. (INSECTS DIPTÈRES SIMULIIDÉS, 2004).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Localidade de pesquisa**

O Município de Almirante Tamandaré (25°18'0"S, 49°18'0"W) ocupa uma área a sudeste e ao norte da Região Metropolitana de Curitiba, distando cerca de 20 km do centro da Capital. Numa extensão total de 188 km<sup>2</sup>, reside uma população de 80.058 indivíduos na área urbana e 9.352 habitantes, na rural. O município é cercado por

montanhas cobertas de vegetação nativa. A área de preservação conta com mananciais subterrâneos do Karst, nascentes APA (Área de Proteção Ambiental) do Rio Passaúna (COMEC, 1991) e quatro fontes de águas minerais exploradas por empresas do ramo. O município faz parte do circuito de turismo, de passeios ecológicos e áreas de lazer. Nestas áreas, localizam-se clínicas naturistas, chácaras de produtos hortigranjeiros, cafés coloniais, pescarias (pesque-pague), restaurantes, confeitarias e outros empreendimentos de esportes, festas, eventos e lazer (COMEC, 1991; ALMIRANTE TAMANDARÉ, 2003; GUIA DE TURISMO RURAL, 2003). O município topograficamente acidentado favorece diversos riachos formarem criadouros preferenciais de simulídeos.

O clima da região é subtropical úmido mesotérmico com verões frescos, invernos com ocorrência de geadas severas e freqüentes. A temperatura média nos meses mais quentes mantém-se em 22°C e nos mais frios, em 18°C (FERREIRA, 1996), embora em 2004 tenham ocorrido muitas e freqüentes geadas com temperatura ambiente beirando 0°C.

A presente investigação foi realizada à Rua Irmã Jacobina, nº 4, em Lamenha Grande, bairro de Almirante Tamandaré, na Chácara Evíssima de uma microempresa. O Riacho dos Padres atravessa a chácara em leito de livre escoamento, interrompido, porém, em seu percurso por quatro tanques de piscicultura. A plataforma de cimento dos vertedouros de tanques forma o principal criadouro de simulídeos. Este criadouro já tinha sido submetido ao controle integrado de janeiro a dezembro de 2002. Na época, foi recomendado que o proprietário desse a continuidade ao cronograma de controle mecânico lhe fornecido. Isto ocorreu durante cerca de seis meses. No entanto, durante o verão de 2003, a população de simulídeos reinfestou o biótopo, devido ao abandono do cronograma recomendado. Tornou-se necessário estabelecer monitoramento contínuo para reduzir a população de insetos a nível tolerável, visto que na área há fluxo constante de visitantes.

### **3.2. Criadouro e procedimentos em coleta de posturas**

Foi realizado estudo preliminar *in loco* para detalhar os procedimentos de coleta de ovos no campo e da verificação dos tipos de substratos mais ocorrentes. Isto

permitiu verificar que as posturas de borrachudos ocorriam em todas as estações do ano. Isto motivou a elaboração de uma pesquisa sobre a fertilidade de ovos.

A fim de obter um grande número de posturas de ovos no campo, foram introduzidos substratos artificiais em águas reófilas do riacho e no vertedouro de um tanque da piscicultura. Os substratos artificiais consistiram de dois metros de fitilhos de polietileno-polipropileno, nas cores amarelo-claro, branco e azul-escuro, presos a um suporte transversal de margem a margem. Estas cores destinavam-se a facilitar a visualização de posturas, a contagem dos exocórions vazios e dos ovos inférteis. Nas coletas, procedia-se a retirada dos substratos colonizados por posturas e sua substituição por outros iguais. As posturas depositadas em vegetais pendidos na margem do riacho e nos parcialmente submersos também foram colhidas. O material coletado, acondicionado em sacos plásticos umedecidos com água do próprio criadouro foi transportado ao laboratório da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, em caixa de isopor com cubos de gelo.

### **3.3. Procedimentos laboratoriais em posturas**

As oviposições trazidas do campo apresentavam diferentes etapas de desenvolvimento embrionário. Somente as posturas recentes com coloração clara e conteúdo interno transparente e com início de da embriogênese foram utilizadas. Na seqüência, expurgadas de fauna associada e de outros elementos, as posturas foram colocadas em placas de Petri com 30ml de água destilada e cobertas com o correspondente par a fim de mantê-las constantemente úmidas e protegidas de insetos predadores. Duas ou três vezes por dia as posturas foram observadas até a eclosão de larvas, quando então procedeu-se ao cômputo dos imaturos. Nas posturas mais recentes de cor esbranquiçada opaca, as verificações eram procedidas uma vez ao dia. O índice da fertilidade de ovos foi calculado a partir do cômputo de larvas recém-eclodidas, exocórions vazios e de ovos inviáveis verificado ao microscópio estereoscópico. Para a contagem das larvas recém-eclodidas transferia-se com contagotas a água com larvas as placa de Petri. No fundo, da parte externa, destas placas foram traçadas linhas paralelas a fim de computar, em zig-zag, as larvas aderidas.



Conferiu-se também o tamanho dos ovos de algumas espécies de *Simulium* ao microscópio óptico com auxílio de ocular com escala micrométrica.

### **3.4. Obtenção de ciclo biológico**

O ciclo biológico das fases aquáticas de seis espécies de *Simulium* em laboratório obteve-se também a partir de posturas trazidas do Riacho dos Padres. Na obtenção do ciclo, utilizaram-se posturas recém-depositadas e em início de incubação. As posturas recentes apresentam os ovos claro-amarelados com a matriz gelatinosa claro-transparente. Algumas horas após as posturas apresentam-se mais escurecidas. Os ovos em início de incubação apresentam cor marrom-clara escurecendo gradativamente e à medida que as larvas vão se formando surgem manchas escurecidas na região da cápsula cefálica.

Para estudar o ciclo biológico, a seleção de posturas seguiu os mesmos procedimentos utilizados na obtenção do índice de fertilidade de ovos (item 3.2). Em seqüência, as posturas escolhidas foram separadas junto com um fragmento de substrato, fitilho e/ou vegetal, prendendo-o a um fragmento de isopor vazado que permanecia boiando na superfície da água em frascos de vidro (500 ml) com boca larga contendo água do próprio criadouro e fortemente aerada. De duas a três vezes por dia, os ovos nestas posturas eram observados a fim de registrar o início e o fim da incubação. Nas etapas seguintes, as observações continuaram diárias para obter a duração do crescimento larvar e a formação de pupas. Durante o processo de crescimento larvar, a troca da água nos frascos de criação acontecia a cada dois ou três dias. Este procedimento destinava-se a impedir a mortandade de larvas provocada pela presença de excrementos nitrogenados, que lhes são elementos tóxicos. O suprimento nutricional às larvas consistiu de alimento de peixes TetraMin<sup>®</sup>.

Foram determinados o tempo de incubação de ovos, do ciclo de crescimento larvar, do pupal e ainda o ciclo biológico de ovo a adulto. Tendo como origem, as posturas trazidas do criadouro natural Riacho dos Padres. Neste trabalho, a pesquisa para a obtenção de todas as etapas biológicas foi realizada de janeiro a dezembro de 2004. A ocorrência das espécies neste criadouro já era conhecida desde o levantamento realizado por LOZOVEI *et al.* (2004).

Para identificar as espécies com base em larvas, pupas e adultos, utilizou-se chaves dicotômicas de COSCARÓN & WYGODZINSKY (1984), COSCARÓN (1991) e STRIEDER *et al.* (1992).

### **3.5. Reforço do controle no criadouro**

Para evitar que se repetisse a falha ocorrida após o controle integrado do ano de 2002 (PETRY *et al.* 2004) em que a população de simulídeos havia declinado a níveis toleráveis, em 2004 sentiu-se a necessidade de reforçar o controle de simulídeos no Riacho dos Padres. O bem-estar instalado na Chácara fez com que o abandono do controle mecânico provocasse novamente a reinfestação do criadouro pela população de simulídeos, problema referido no item 3.1. Elaborou-se um novo esquema e programou-se um controle em longo prazo, dando ênfase novamente às técnicas de controle mecânico. Foi instruído um dos funcionários da chácara para executar as técnicas de controle físico a cada 20 dias. Este controle consistiu na remoção de formas imaturas (ovos, larvas e pupas) do leito do riacho junto com os substratos naturais e artificiais e no despreendimento de imaturos por escovação das plataformas de vertedouros seguida de suas retiradas. A eficiência deste controle foi avaliada pela queda de picadas de simulídeos.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Espécies constatadas no criadouro**

Durante levantamento bianual de pupas as seguintes espécies foram relatadas, em ordem decrescente da frequência populacional, *Simulium (Inaequalium) inaequale* Peterson & Shannon, 1927 (34,91%), *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (19,74%), *Simulium (Thyrsopelma) orbitale* Lutz, 1910 (18,75%), *Simulium (Ectemnaspis) perflavum* Roubaud, 1906 (14,85%), *Simulium (Inaequalium) subnigrum* Lutz, 1910 (9,84%), *Simulium (Chirostilbia) distinctum* Lutz, 1910 (1,68%) e *Simulium (Psaroniocompsa) incrustatum* Lutz, 1910 (0,23%) (figura 1).

Neste estudo, foram investigadas as seis primeiras espécies. *Simulium incrustatum* ficou fora pela expressividade irregular e frequência esporádica no criadouro. Entre as populações, no criadouro estudado, os ovos *S. distinctum*

sobressaíram-se com morfologia de aspecto ovóide fugindo do padrão subtriangular e com dimensões maiores. Estas características foram utilizadas para a separação das outras espécies.

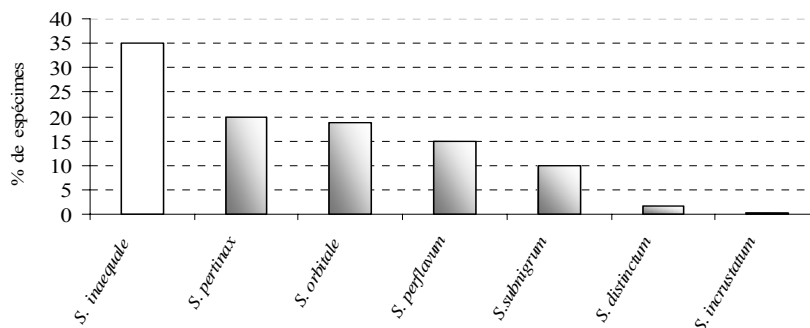


Figura 1. Frequência percentual média bianual de pupas de sete espécies de *Simulium* coletadas no Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil.

#### 4.2. Tipos de substratos e de posturas

Foram variados os tipos de substratos que serviram para postura de simulídeos. Entre os mais freqüentes, estão os vegetais suspensos sobre o espelho d'água ou parcialmente emergentes, gravetos variados, paredes laterais de plataformas de cimento dos vertedouros de tanques de piscicultura, paredes laterais em tubos de cimento de escoamento de tanques e outros garranchos encalhados no riacho. As posturas foram numerosas em substratos antrópicos, fitilhos propositalmente introduzidos, que constituíram um excelente meio para obter numerosas posturas em ótimas condições de integridade, com boa visualização tanto de ovos como de larvas recém-eclodidas. Nos fitilhos de cores claras, amarelo-clara e branca, obteve-se sempre maior número de posturas que em azul-escuro. Foram constatados diversos formatos de posturas (figura 2). As posturas bem delimitadas, isoladas e íntegras, depositadas em vegetais, também foram utilizadas.

As posturas de espécies que colonizam o Riacho dos Padres foram coletadas predominantemente em substratos na linha da água sempre umedecidos. Portanto, a incubação de ovos pode ocorrer fora do habitat reobionte. No laboratório, confirmou-se esta proposição, pois as larvas eclodiram com êxito de posturas colocadas em água parada sem nenhuma aeração e, nestas condições, sobreviveram por muitas horas. A

umidade, porém, é imprescindível para a embriogênese e formação de larvas. Os ovos são muito sensíveis ao dessecamento. A massa gelatinosa, em parte, protege-os contra o dessecamento. No momento da oviposição, os ovos são cobertos com uma matriz gelatinosa transparente, ora abundante ora mais tênue. Percebeu-se nitidamente que a matriz unia os ovos uns aos outros e mantinha-os aderidos firmemente aos substratos apoiados na linha d'água ou umedecidos por respingos de água. Em *Simulium distinctum* e *Simulium pertinax*, as posturas não são totalmente recobertas pela matriz gelatinosa. Ela existiu, porém, somente na parte inferior servindo-lhes para afixá-los aos substratos.

Em geral, as fêmeas premidas de exigências ambientais reobiontes depositam suas posturas em substratos submersos ou localizados na superfície da água, mas sempre em locais úmidos. MOREIRA & SATO (1996) no Brasil, encontraram oviposições de *Simulium nogueirai* D'Andretta & González, 1962 fora da coluna de água em substratos vegetais das margens de cachoeira sujeitos à incidência de respingos.

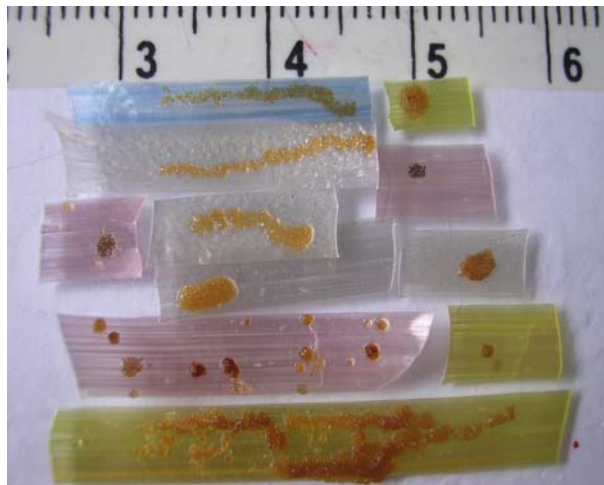


Figura 2. Diferentes aspectos morfológicos de posturas de *Simulium* encontradas no Riacho dos Padres, Chácara Evíssima, Almirante Tamandaré, Paraná (escala em cm).

Três tipos principais de postura foram constatados no criadouro estudado: **a)** posturas com ovos dispersos, formando um conjunto de montículos nos substratos com pouca matriz gelatinosa; **b)** posturas individualizadas, de contornos delimitados com ovos agrupados em uma camada única, e posturas superpostas em várias camadas,

geralmente embebidas totalmente em abundante massa gelatinosa e aderidas firmemente aos substratos e **c**) posturas com milhares de ovos depositados em extensas massas contíguas e embebidos em abundantes matrizes gelatinosas em superposição. Foram posturas de contornos morfológicos indefinidos e desorganizados, coletivas, ou seja, depositadas por várias fêmeas numa mesma área física do substrato. Para o estudo da fertilidade de ovos, foram selecionadas as posturas caracterizadas nos itens **a** e **b**, que ocorreram tanto em substratos fitilhos como em vegetais. Nestes tipos, cada postura delimitada foi considerada individual.

Observou-se que *Simulium distinctum* ovipõe em grupos de 2 a 12 ovos com predomínio em aglomerações menores. Posturas desta espécie em mais de um caso estavam associadas às de *Simulium pertinax*. PY-DANIEL *et al.* (1988) no Brasil, também referem-se à associação de imaturos de diferentes espécies em criadouros naturais. Outras vezes, as fêmeas depositam ovos isolados ou em grupos, podendo resultar em massas de milhares de ovos que só se consegue individualizá-los pelo desenvolvimento embrionário diferenciado (MOREIRA & SATO, 1996).

McCALL *et al.* (1997), na África, estudaram seis espécies do complexo *Simulium damnosum* e constataram que várias espécies depositavam ovos agregados em superposição numa mesma área física. WILSON *et al.* (2000), também na África, em experimentos laboratoriais com *Simulium damnosum*, verificaram que diversas fêmeas depositavam ovos num mesmo local físico em extensas massas aglomeradas em superposição.

De acordo com PEGORARO (1993), no Brasil em laboratório, *Simulium pertinax* ovipõe em pequenos grupos em superposição e sem matriz gelatinosa. O mesmo fato foi constatado por RODRIGUEZ-PÉREZ *et al.* (2003) na Venezuela durante a postura de *Simulium ochraceum*, um importante vetor de *Onchocerca volvulus* na região Neotropical. Em BLACKFLY BIOLOGY (2004) no Canadá, consta que as fêmeas formavam enxames e depositavam os ovos na vegetação aquática rastejante. Este comportamento de oviposição repetia-se a cada tarde nos mesmos locais, resultando num aglomerado de 2000 a 3000 ovos por cm<sup>2</sup>.

Na presente investigação foram encontradas oviposições coletivas agregadas em extensas e contíguas massas gelatinosas sobrepostas depositadas em delimitada área física de um substrato. Este tipo de comportamento nas oviposições foi observado inúmeras vezes em diferentes datas de dias ensolarados, porém, só num determinado local. Serviram para este tipo de postura as paredes internas de um tubo de cimento de cerca de 30 cm de diâmetro por onde escoava o excedente de água de um dos tanques de piscicultura. Na saída deste tubo, as fêmeas ora revoavam sem formar enxames ora pousavam na parede interna recoberta de musgo úmido em que depositavam ovos sobre camadas de oviposições anteriores. Convém ressaltar que este tipo de posturas também foi encontrado em outros tipos de substratos, mas sem ter presenciado o ato da oviposição.

De acordo com McCALL *et al.* (1997), os estímulos às fêmeas grávidas para oviposições agregadas em extensas massas superpostas são devidos à presença de substâncias químicas voláteis, ou seja, feromônios que emanam de ovos recém-depositados. Os feromônios são odores sintetizados nos ovários durante o processo de amadurecimento de ovos e eliminados juntamente com a postura. Estas substâncias funcionam como isca para atrair as fêmeas grávidas a se aglomerarem em torno de posturas precedentes recém-depositadas. Os mesmos autores isolaram os feromônios em ovários grávidos e em oviposições recém-depositadas, coletivas, agregadas em superposição de *Simulium damnosum*.

Seria ótimo se, em laboratório, os cientistas conseguissem sintetizar substâncias similares aos feromônios que atraíssem as fêmeas grávidas em algum tipo de armadilha. Desta forma, em áreas intensamente infestadas, os vetores talvez pudessem ser controlados com gastos menores em inseticidas.

No Brasil, segundo HAMADA (1998), *Simulium perflavum* ovipõe tocando levemente o abdome no substrato submergido, alternando com pairadas no ar. A oviposição ocorre em dois picos, um menor pela manhã (7-9 h) e outro maior à tarde (13-18 h), mas a atividade máxima foi observada entre 17-17h30. GORAYEB (1981), em um igarapé próximo a Manaus no Estado de Amazonas, estudou as oviposições de *Simulium fulvinotum* Cerqueira & Melo, 1968. As fêmeas aglomeravam-se em revoada

perto de substratos vegetais submersos e em mergulhos rápidos e frequentes depositavam os ovos quando a luz do dia começasse a diminuir após o pico máximo de temperatura do dia. O primeiro pico de fêmeas em atividade ocorreu às 15 horas e o segundo, às 16 horas. MOREIRA & SATO (1996) referem que *Simulium inaequale* coloca os ovos continuamente formando um trilho sobre substrato vegetal na saída de lagos ou rios abertos. Os mesmos autores observaram em *Simulium nogueirai* que a atividade de oviposição iniciava no meio da tarde e aumentava progressivamente, culminando perto do pôr-do-sol. Conforme MOREIRA & SATO (1996) e HAMADA (1998), a intensidade da atividade de oviposição ocorre quando a umidade do ar é maior e menores, a temperatura e a luminosidade, diminuindo a probabilidade de os ovos dessecarem. SAUNDERS (2002) sugere que, associada aos fatores ambientais, a ocorrência destes picos de oviposição em fases específicas do dia caracteriza a presença de relógios biológicos.

Na Austrália, fêmeas de *Austrosimulium pestilens* formam enxames e espalham seus ovos sobre a superfície da água e incorporam à areia do fundo dos rios (ROBINSON, 1997). No Canadá, por exemplo, *Cnephia pecuarum* e *Cnephia decotensis* (Dyar & Shannon, 1927) sobrevoam a superfície da água e deixam seus ovos caírem diretamente na água. Em condições climáticas adversas, porém, mantendo a umidade, estes ovos entram em hipobiose (dormência). Com o retorno da viabilidade ambiental, completam as etapas da embriogênese e das fases posteriores (DAVIES & PETERSON, 1956; KETTLE, 1995). *Simulium arcticum* e *Simulium decorum* Walker, 1861 ovipositam durante o vôo (FREDEEN, 1959). Entre espécies estudadas no Canadá, *Simulium venustum* é a mais especializada em postura, depositando-a em substratos vegetais usualmente verdes ou, na ausência destes, em vôo os ovos são colocados diretamente na água (DAVIES & PETERSON, 1956). As espécies *Prosimulium hirtipes* (Fries, 1824), *Prosimulium tomosvaryi* (Enderlein, 1921) e *Prosimulium subrufipes* Knoz, 1980 ovipõem em musgos úmidos a 20 cm acima da água (ZWICK & ZWICK 1990). No Japão, *Simulium japonicum* Matsumura, 1931 e *Simulium rufubasis* Brunetti, 1911 colocam as posturas isoladas a uns 5 cm acima do nível da água (BABA & TAKAOKA, 1989).

Enfim, os hábitos de postura variam grandemente entre várias espécies de simúlídeos que se servem dos mais variados substratos encontrados nas entranhas de rios ou adjacências, muitas vezes inimagináveis entre pesquisadores. Entretanto, o comportamento nas oviposições de muitas outras espécies de simúlídeos ainda continua desconhecido.

### **4.3. Morfologia e tamanho de ovos**

As espécies de simúlídeos ocorrentes no criadouro pesquisado têm ovos morfológicamente semelhantes. São ovóides subtriangulares, embebidos de uma substância gelatinosa transparente, ora abundante com ovos superpostos em duas a três camadas ora mais tênue com ovos dispostos em uma camada única ou em pequenos montículos. Em parte, isto ajuda a mantê-los úmidos e garantir-lhes o sucesso da embriogênese e a formação de larvas. O fator importante do sucesso na sobrevivência de ovos e na eclosão de larvas é a umidade provinda da água fluvial. Sua ausência, ao contrário, seria letal. As fêmeas movidas pelas exigências endógenas e exógenas sempre escolhem locais apropriados para garantir a perpetuidade de sua prole.

Os ovos de simúlídeos são diminutos. As dimensões obtidas em diferentes posturas de populações do Riacho dos Padres variaram muito. Os de maiores dimensões foram os de *Simulium distinctum*, medindo de 0,30 a 0,35mm de comprimento e de 0,15 a 0,20mm de largura. Nas outras cinco espécies estudadas, as dimensões enquadraram-se dentro de 0,20 a 0,22mm de comprimento e de 0,13 a 0,15mm de largura.

DAVIES & PETERSON (1956) no Canadá, tratando do mesmo assunto em relação a diferentes gêneros, verificaram que os tamanhos de ovos em espécies de *Simulium* oscilaram entre 0,04 e 0,02mm de largura por 0,08 e 0,04 mm de comprimento. Entre as espécies de *Cnephia*, a dimensão de ovos oscilou de 0,13 a 0,07 mm de largura e de 0,28 a 0,12 mm de comprimento. No gênero *Gymnopais* Stone, 1949, a variação foi de 0,35 a 0,22 de comprimento a 0,40 a 0,23 mm de largura.

### **4.4. Fertilidade e número de ovos por postura**

Os ovos constituem elemento biológico importante para verificar a fertilidade das populações. O crescimento e o tamanho de uma população de insetos normalmente são



estimados pela fertilidade e pela sobrevivência. No presente trabalho estabeleceu-se obter o tamanho inicial das populações de simúlideos a partir de posturas. Assim, pela eclosão de larvas obteve-se o índice da fertilidade que por sua vez estabeleceu o tamanho inicial da população.

No presente trabalho o total de posturas analisadas (n = 213) foram computados 74.906 ovos. Destes, 99,1% foram férteis (n = 74.251) e 0,9% inférteis (n = 655) (tabela 1). Na maioria das posturas, a fertilidade oscilou de 99 a 100% (n = 162 posturas); em outras, em menor número, a fertilidade manteve-se de 94 a 98% (n = 51 posturas) (figura 3). O número de ovos por postura foi desigual. Quando três posturas atingiram acima de mil ovos, em contrapartida, só quatro contaram menos de cem (23, 27, 50 e 98). A maioria de posturas (n = 199), o número de ovos oscilou de 104 a 850 (tabela 3, apêndice). COLBO (1987) nos Estados Unidos, nesta década tinha se surpreendido com a escassez de informações em pesquisas envolvendo os ovos de simúlideos. Atualmente, depois de tantos anos a situação continua a mesma.

Tabela 1. Percentual geral de fertilidade de ovos em espécies de *Simulium* verificado em posturas trazidas do Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil, período jan. a dez. 2004.

Nº total de posturas	Nº total de ovos	Nº de ovos férteis	% de ovos férteis	Nº de ovos inviáveis	% de ovos inviáveis
<b>213</b>	<b>74.906</b>	<b>74.251</b>	<b>99,1</b>	<b>655</b>	<b>0,9</b>

Na área estudada, o porcentual de ovos fecundos apresenta-se elevado, isso explica, em parte, a proliferação intensa e continuada desta entomofauna no criadouro pesquisado, mesmo quando monitorado por controle integrado.

SIMMONS & EDMAN (1981), no Canadá, estudaram as oviposições de *Simulium decorum* no laboratório, dentro de um sistema de circulação de água fechado. Induziram machos e fêmeas a copular e as fêmeas a ovipor sobre rolhas de cortiça colocada na água. Em várias posturas em 18 meses de trabalho obtiveram um total de 2.500 ovos cuja fertilidade oscilou de 50 a 60%. HADI & TAKAOKA (1995), no Japão, também em experimento laboratorial, obtiveram de *Simulium bidentatum* (Shiraki, 1935) 61,40% de fertilidade de ovos. BABA *et al.* (1988), na Guatemala, igualmente em condições laboratoriais, obtiveram a fertilidade de 72,3% de *Simulium ochraceum*.

Na África, WILSON *et al.* (2000), igualmente em experimentos laboratoriais com oviposições induzidas de *Simulium damnosum* verificaram que a fertilidade de ovos entre diferentes posturas variou, em média, de 51 a 86%. PEGORARO (1993), no Brasil, em condições aclimatizadas (BOD) de laboratório, constatou que a fertilidade de ovos de *Simulium pertinax* não passou de 30%. Em todas as referências supra citadas, a fertilidade de ovos atingida ficou muito aquém dos resultados obtidos no presente trabalho com *Simulium* spp, oscilando de 94,00 a 100% em diferentes posturas (figura 4). A fertilidade de ovos em posturas depositadas naturalmente em substratos ofertados na natureza, ao contrário das de laboratório, reflete índices bem superiores aos conseguidos pelos pesquisadores acima mencionados.

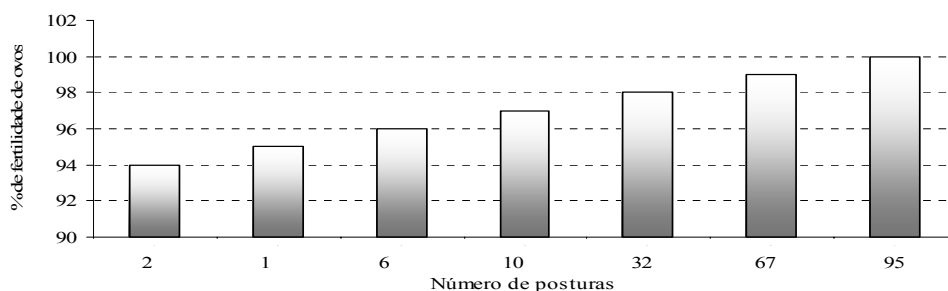


Figura 3. Percentual de fertilidade de ovos em espécies de *Simulium* no Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil.

Na presente pesquisa, as posturas trazidas do campo apresentaram melhor desempenho de fertilidade, provavelmente pelo fato de os insetos não terem tido interferência externa forçada em nenhuma de suas etapas da reprodução, mas sim foram impelidos unicamente pelas condições fisiológicas. Em cativeiro, inúmeros fatores interferem nas atividades normais de insetos. No laboratório, é possível que a constante movimentação de pessoas, a luz artificial, a alteração do fotoperíodo e, ainda, a cópula induzida, influenciem na atividade sexual destes insetos. De acordo com VIVIANI & ARAÚJO-COUTINHO (1999), a baixa sobrevivência de fêmeas mantidas em laboratório para a oviposição é atribuída ao processo estressante. Na natureza, todas as etapas relacionadas ocorreram com naturalidade desde a cópula até as posturas. Os ovos foram postos sobre substratos existentes no momento exato do

estímulo natural. Além disso, em diferentes espécies de *Simulium*, o comportamento em postura de ovos está atrelado aos diferentes fatores ambientais e climáticos difícil de serem reproduzidas em laboratório. As exigências para a escolha de substratos apropriados e úmidos, a hora do dia, a temperatura e a luminosidade tornam-se fatores decisivos favoráveis às fêmeas no aspecto reprodutivo.

Com referência ao número de ovos por postura, a variação constitui um detalhe biológico entre diferentes e mesmo dentro de uma mesma espécie. No presente trabalho, o número de ovos variou de 23 a 1.030 por postura (tabela 3, apêndice). É do conhecimento geral que a quantidade de ovos por postura depende da idade fisiológica de fêmeas, ou seja, do número de ciclos gonotróficos já realizados. As fêmeas políparas são menos produtivas que as jovens e primíparas. Este fator faz com que o número de ovos por fêmea varie grandemente. Em geral, as fêmeas podem viver de três a quatro semanas, potencialmente a tempo para o desenvolvimento de até três ciclos gonotróficos sucessivos (CROSSKEY 1993; DAVIES & PETERSON 1956). A diferença quanto ao número de ovos por fêmea deve estar relacionada a diferentes critérios de estudo, a diferentes espécies analisadas e, provavelmente, a diferentes idades fisiológicas de fêmeas. Entretanto, dentro de cada espécie deve existir um número aproximado de ovos por fêmea e para a mesma idade fisiológica.

Segundo DAVIES & PETERSON (1956), na maioria das espécies canadenses, a média varia de 200 a 500 ovos por fêmea, entre as diferentes espécies, porém, a variação impressiona. Em *Gymnops sp*, por exemplo, são 40 a 50 ovos por fêmea, enquanto em *Simulium aureum* Fries, 1824 o número chega a 823 ovos. WALL & SHEARER (1997) e LANE & CROSSKEY (1993) também concordam que isso reflete uma característica muitíssimo desigual e consideram razoável o número de ovos por fêmea oscilar de 150 a 800, como regra geral. No Brasil, PEGORARO (1993) em *S. pertinax* encontrou uma média de 236,9 ovos por fêmea e GORAYEB (1981) em *Simulium fulvotum* Cerqueira & Melo, 1968 obteve em média 32 ovos por fêmea.

#### **4.5. Incubação de ovos, eclosão e comportamento larvar**

Em laboratório a incubação de ovos das espécies de *Simulium spp* levou de três a seis dias em temperaturas de 20 a 28,5°C. O tempo de incubação em posturas recém-

depositas, esbranquiçado-opacas, levou até 144 horas. Segundo GORAYEB (1981), ovos recém-depositados apresentam coloração branco opaca, escurecendo gradativamente, e 35 horas após foi possível identificar a região anterior da posterior nas larvas em processo de desenvolvimento. Nas pesquisas de BEGEMANN (1980), a incubação de *Simulium nigritarse* Coquillett, 1902 e *Simulium adersi* Pomeroy, 1922 processou-se no intervalo de 3 a 13 dias a 25°C.

Neste trabalho, as eclosões de larvas em posturas de ovos depositados em camadas sobrepostas e cobertos com espessa matriz gelatinosa foram assincrônicas. Primeiramente eclodiam as larvas em ovos localizados na parte periférica de posturas, cobertos com camada mais fina de matriz gelatinosa, mais expostos ao ambiente, atingidos por maior quantidade de oxigênio necessário ao seu desenvolvimento. Houve retardo de até dois dias em eclosões de ovos localizados em camadas mais profundas, agregados em superposição e cobertos com espessa matriz gelatinosa. Neste caso, as larvas iam surgindo à medida que a massa gelatinosa ia se dissolvendo. Os retardos segundo LAIR (1981), devem ser atribuídos à depleção de oxigênio em ovos situados em camadas mais profundas da matriz. BEGEMANN (1980) também constatou a falta de sincronismo em eclosões larvares de *Simulium*. Já em posturas de ovos em montículos com camada gelatinosa reduzida, praticamente não houve diferença de eclosão entre a primeira e a última larva, eclodiram em menos de 24 horas. GORAYEB (1981) obteve entre o início e o final de eclosões de larvas diferença aproximada de 17 horas.

Na natureza, as águas reófilas com elevado teor de oxigênio dissolvido são imprescindíveis aos estágios larvares. No Riacho dos Padres, sempre foram encontradas larvas em abundância em águas de maior correnteza. Nos experimentos de laboratório em 38 posturas observadas, as larvas recém-eclodidas sobreviveram até 48 horas, em água sem aeração em placas de Petri permanecendo nos primeiros instares. Depois disso, a sobrevivência reduziu-se paulatinamente. A mortalidade total sobreveio somente após 60 horas de vida aquática. As larvas recém-eclodidas movimentavam-se constantemente em pequenos deslocamentos sobre a massa gelatinosa. Ao atingirem a água, continuavam seus movimentos os quais tornavam-se mais lentos e por fim definhavam por completo envolvidos numa teia de fios de seda.

Esta sobrevivência de larvas, em água parada, era desconhecida visto que os instares larvares são exclusivamente reobiontes.

MOREIRA & SATO (1993), referem que encontraram *Simulium nogueirai* ter oviposto em substratos vegetais umedecidos por respingos a 2,1 m da superfície da água e até 4,6 m de altura da cachoeira. Afirmam também que não dispunham de informações de como as larvas recém-eclodidas nestas condições alcançariam a correnteza. No entanto, sugerem a possibilidade de que isto aconteça pela ação da gravidade das gotas de água usadas como veículo.

No Riacho dos Padres, também deve acontecer um comportamento igual em larvas recém-eclodidas de posturas depositadas em substratos úmidos próximos à água corrente. Igualmente, deve repetir-se o mesmo fenômeno observado em laboratório. Durante as coletas de postura no campo, em inúmeras ocasiões, detectou-se em fitilhos claros úmidos (amarelos e brancos) a presença incalculável de larvas recém-eclodidas. Os resultados aqui obtidos com larvas recém-eclodidas fora da água corrente são detalhes muito importantes em controles com larvicida. Nestas circunstâncias, elas não teriam sido eliminadas por falta da ingestão do inseticida, isto só aconteceria com controle mecânico.

SIMMONS & EDMAN (1981), no Canadá, estudaram o comportamento de *Simulium decorum* em experimento laboratorial num fechado sistema de aeração de água. Observaram que, sem aeração da água por freqüente falha do equipamento elétrico, as larvas sobreviviam por quatro horas sem prejuízo em seu desenvolvimento. Durante uma falha do sistema, faliu por oito dias ininterruptos, ainda assim algumas larvas sobreviveram. Não mencionaram, porém, o estágio das mesmas.

Nos experimentos laboratoriais, desta pesquisa, para verificar a fertilidade de ovos, houve um fato inesperado durante o período de 11 de março a 22 de abril de 2004. As larvas de 51 posturas ficaram entaladas dentro do conteúdo interno de ovos, exteriorizando somente as cápsulas cefálicas. Desta forma, todas pereceram e as posturas foram descartadas. Em algumas outras posturas, parece ter havido uma paralisação no desenvolvimento embrionário. Mesmo assim, foram deixadas nas placas até que o meio as contaminasse. Não se conseguiu identificar o fator negativo

que interrompeu o processo biológico. Não parece ter sido a temperatura no laboratório neste período, pois se manteve de 19 a 28,5°C, ou seja, nos níveis iguais a todos os experimentos. Por outro lado, mesmo se o fosse, os simulídeos suportam grande variação de temperatura, inclusive as próximas a zero, como constatado várias vezes no campo durante o inverno. Em literatura, também, nenhuma referência bibliográfica foi encontrada que explicasse o insucesso ocorrido com as eclosões.

Os altos índices de fertilidade verificados em ovos de *Simulium* spp e os aspectos biológicos correlatos, como a duração da incubação, a sobrevivência de larvas recém-eclodidas, o tempo da duração dos estágios larvares e pupais e, ainda, os ciclos evolutivos de ovo a adulto, são detalhes que trazem uma contribuição importante e até a pouco desconhecidos com relação à maioria das espécies brasileiras, com exceção de *S. pertinax*.

LANE & CROSSKEY (1993) apontam dificuldades na obtenção do ciclo biológico em simulídeos nas etapas de larvas, pupas e adultos. Segundo os autores, a complexidade é muito maior que em outros dípteros, pelo elevado e variável número de instares larvares e pela existência de duas fases de faratos (escondidos) que ocorrem em duas etapas - entre as metamorfoses de larvas para pupas e outra, de pupas para adultos. Nestas fases, os intervalos fisiológicos normalmente são longos entre a separação de velhas cutículas das novas e suas eliminações na passagem para estágio seguinte.

#### **4.6. Obtenção do ciclo biológico básico**

Do Riacho dos Padres, foram trazidas 78 posturas das seis espécies para obter o tempo de duração do crescimento no ciclo biológico aquático, ou seja, da incubação de ovos, da fase larvar e o de formação de pupas. O tempo de duração obtido para os estágios aquáticos para as seis espécies estudadas: **a)** duração da incubação de ovos, de quatro a seis dias; **b)** crescimento larvar, de 22 e 39 dias; **c)** formação de pupas, de quatro a cinco dias. Estes desenvolvimentos aquáticos ocorreram em temperaturas da água de 16,5°C a 28°C e do meio de 22°C a 28,5°C. A duração do ciclo evolutivo de ovo a adulto variou conforme a espécie. Comparativamente com outras pesquisas os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com os de outros pesquisadores dentro

de condições ambientais e de nutrição normais, exceto no crescimento larvar que aqui foi mais longo em que o tempo mínimo excedeu em 8 dias e o máximo em 25 dias.

Tendo em vista a variação do tempo de desenvolvimento larvar das espécies investigadas, a cronologia da evolução biológica de ovo a adulto não foi a mesma em todas as posturas. Em ordem crescente, sob temperatura de 16,5°C a 28,5°C, a menor e a maior duração média em evolução do ciclo de ovo a adulto foi de 30 a 32 dias em *Simulium orbitale*, de 32 a 35 dias em *Simulium perflavum*, de 33 a 39 dias em *Simulium subnigrum*, de 41 a 47 dias em *Simulium inaequale*, de 42 a 48 dias em *Simulium pertinax* e de 48 a 49 dias em *Simulium distinctum* (tabela 2).

PEGORARO (1993) em condições seminaturais, obteve a duração do ciclo biológico de 35 dias a 20°C e de 30 dias a 25°C em *Simulium pertinax*, ou seja, um pouco menores comparando aos resultados da presente investigação.

Em geral, a variação no tempo de duração do ciclo biológico em simulídeos depende de condições de cada espécie. O número de gerações por ano também varia de uma em espécies univoltinas ou mais, em polivoltinas.

Em programas de controle de simulídeos com biolarvicida os tempos de duração das fases larvares são muito importantes. Os períodos de crescimento mais curtos e os mais longos são levados em consideração em reaplicações do biolarvicida. As larvas em controle com biolarvicida são os únicos e principais alvos. Ao contrário do controle com ações mecânicas, em que todas as fases aquáticas (ovos, larvas e pupas) são atingidas pela ação.

Em algumas espécies brasileiras de *Simulium* durante o crescimento larvar foram determinados de 6 a 8 instares larvares obtidos com base em medidas morfométricas de alguns escleritos cefálicos (CUNHA *et al.*, 1998; GORAYEB, 1981). Para evidenciar a complexidade deste assunto, COLBO (1987), no Canadá, servindo-se dos mesmos procedimentos de morfometria, obteve onze ecdises larvares para o complexo de espécies de *Simulium vittatum*. A determinação do número de instares larvares em complexos de espécies torna-se mais complexa.

Englobando as espécies do mundo todo, até o momento, o número de instares larvares foi estabelecido em seis instares, no mínimo e em onze, no máximo. A

Tabela 2. Duração média, menor e maior, do ciclo biológico de ovo a adulto em seis espécies de *Simulium* de ovos oriundos do Riacho dos Padres, Chácara Evíssima, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil, janeiro a dezembro de 2004.

Espécies	Incubação ovos em dias	Crescimento larval em dias	Formação pupas em dias	Duração do ciclo ovo-adulto em dias
<i>S. orbitale</i>	4	22	4	30
	5	22	5	32
médias das médias	<b>4,5</b>	<b>22</b>	<b>4,5</b>	<b>31</b>
<i>S. perflavum</i>	5	22	5	32
	6	24	5	35
médias das médias	<b>5,5</b>	<b>23</b>	<b>5</b>	<b>33,5</b>
<i>S. subnigrum</i>	5	24	4	33
	5	29	5	39
médias das médias	<b>5</b>	<b>26,5</b>	<b>4,6</b>	<b>36</b>
<i>S. inaequale</i>	6	30	5	41
	6	36	5	47
médias das médias	<b>6</b>	<b>33</b>	<b>5</b>	<b>44</b>
<i>S. pertinax</i>	6	32	4	42
	5	39	4	48
médias das médias	<b>5,5</b>	<b>35,5</b>	<b>4</b>	<b>45</b>
<i>S. distinctum</i>	6	37	5	48
	6	38	5	49
médias das médias	<b>6</b>	<b>37,5</b>	<b>5</b>	<b>48,5</b>

diferença ampla no número de instares e as exigências biológicas dos simuliídeos desestimulam a investigação tanto no campo como em laboratório. O conhecimento da duração do ciclo larvar é de suma importância em programas para estabelecer os cronogramas de aplicação de medidas de controle. No biótopo estudado, o intervalo das reaplicações do biolarvicida (Bti) admite um intervalo de 20 dias, baseando-se no tempo médio da duração das fases larvares. É nesta base que o cronograma de controle mecânico foi executado durante o ano de 2004 dando ótimos resultados. As picadas *in loco* praticadas por fêmeas de *Simulium* em humanos ocorriam esporadicamente.

Esquemáticamente, a contar da incubação de ovos até formação de pupas, a cronologia da duração do ciclo completo em simuliídeos consta apresentada em INSECTES DIPTÈRES SIMULIIDÉS (2004):

- Incubação de ovos, 2 a 7 dias (mais se houver hipobiose);
- Desenvolvimento larvar com 6 a 8 instares, de 1 a 2 semanas (mais se houver hipobiose);
- Desenvolvimento pupal, 2 a 10 dias (mais se houver hipobiose);
- Ciclo biológico de ovo a adulto de 11 a 31 dias (mais se houver hipobiose).



No presente trabalho os resultados obtidos em desenvolvimento do ciclo biológico das espécies envolvidas encaixam-se dentro da cronologia acima mencionada, exceto o crescimento larvar que levou mais tempo que o acima referido, não incluindo a hipobiose.

#### **4.7. Ponderações sobre ciclos biológicos e programas de controle**

É necessário conhecer o tempo de duração do ciclo biológico básico de cada espécie de *Simulium* para poder programar adequadamente a frequência da execução de controle mecânico e a da reaplicação do biolarvicida. Entretanto, o que dificulta o pesquisador em estudar o ciclo evolutivo aquático são os criadouros muito diversificados em ecossistemas fluviais lóticos e as exigências vitais de cada espécie levando longo tempo para completar o ciclo.

Para obter o ciclo biológico em laboratório, no presente trabalho, sem citar as peculiaridades endógenas das espécies e da influência de fatores ambientais, fizeram se sentir uma série de dificuldades, como o tempo despendido em observações laboratoriais, o estresse de larvas pela constante troca de água em recipientes de criação, o acerto adequado em alimentação diária, as interrupções de aeração de água por falha elétrica e o demorado crescimento de fases larvares constituíram fatores que dificultaram o melhor desempenho do empreendimento.

### **5. CONCLUSÕES**

Em ambiente laboratorial a duração das formas aquáticas de *Simulium distinctum*, *S. inaequale*, *S. orbitale*, *S. perflavum*, *S. pertinax*, *S. subnigrum* e *S. incrustatum* variou entre as espécies. O tempo de incubação de ovos ocorreu entre **4 e 6** dias; o crescimento larvar de **22 a 39** dias e o de formação de pupas de **4 a 5** dias verificados em temperaturas da água de 16,5°C a 28°C e do ambiente de 22°C a 28,5°C.

O número de ovos por posturas provindas do criadouro natural oscilou de 23 a 1.030. Das de 213 posturas com um total de 74.906 ovos estudados em condições

laboratoriais o índice percentual de fertilidade foi de 99,1% e de inviáveis somente de 0,9%.

A duração média do ciclo biológico de ovo a adulto foi de 30 a 32 dias em *Simulium orbitale*, de 32 a 35 dias em *Simulium perflavum*, de 33 a 39 dias em *Simulium subnigrum*, de 41 a 47 dias em *Simulium inaequale*, de 42 a 48 dias em *Simulium pertinax* e de 48 a 49 dias em *Simulium distinctum*.

**Recomendações:** **a)** Antes de se estabelecer qualquer programa de controle num criadouro de simulídeos, para obter sucesso, recomenda-se conhecer a duração do ciclo de desenvolvimento das fases aquáticas de todas as populações que proliferam no criadouro. Baseando-se neste conhecimento, a estrutura do controle deve ser adequadamente programada. A alta fertilidade de ovos em populações de simulídeos que colonizam o Riacho dos Padres, associados às informações obtidas sobre a duração do período de ciclo de desenvolvimento larvar vai auxiliar no plano da efetivação do controle. **b)** Em áreas livres da veiculação de patógenos ou de escassez ou dificuldade em conseguir Bti, sugere-se utilizar o que dispõe, incluindo preferir o controle por ação exclusivamente mecânica, se o criadouro for adequado, na certeza de resultados rápidos, radicais e mais econômicos; **c)** O controle mecânico deve ser assumido pelo proprietário do empreendimento. Após ser devidamente instruído, manter esta praga sob o controle será de sua inteira responsabilidade.

## 6. REFERÊNCIAS

ALMIRANTE TAMANDARÉ. Cidade dos Minérios e das Águas Minerais. Guia Turístico de Almirante Tamandaré. Ano I, n. 1, 30 p., 2003.

ANDRADE, C.F.S. Manejo integrado de borrachudos. *In*: Seminários sobre Insetos e Ácaros, Anais 3 da Sociedade Entomológica do Brasil do **XI Congresso Brasileiro de Entomologia de 1987**, Campinas, Fundação Cargill, 1989, p. 141-157.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C.; MAIA-HERZOG, M. & SOUZA, B.C. Levantamento das espécies do gênero *Simulium* Latreille (Diptera, Simuliidae) no litoral norte do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 32, n. 1, p. 11-17, 1988.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Simulídeos: importância médica e métodos de controle. **Vetores e Pragas**, v. 7, p. 4-7, 2000.

BABA, M.; TAKAOKA, H.; OCHOA, A.J.O.; JUAREZ, E.L.; TADA, I. & SHIMADA, M. Laboratory observations on oviposition and egg development of Guatemala *Simulium ochraceum* (Diptera: Simuliidae) at different temperatures. **Japanese Journal of Sanitary Zoology**, v. 39, n. 4, p. 363-367, 1988.

BEGEMANN, G.J. Laboratory studies on the biology of *Simulium nigrirarse* Coquillett and *Simulium adersi* Pomeroy (Diptera: Simuliidae). **Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 203-211, 1980.

BLACKFLY BIOLOGY SIMULIIDAE (2003).

Disponível em: <<http://www.entomologist.free-online.co.uk/simbiol2.htm>>

Acesso em: 11 jan.2004.

CARABIN, H.; ESCALONA, M.; MARSHALL, C.; MARTÍNEZ, S.V.; BOTTO, C.; JOSEPH, L. & BASAÑEZ, M.G. Prediction of the community prevalence of human onchocerciasis in the Amazonian onchocerciasis focus: Bayesian Approach. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 7, p. 482-490, 2003.

CASTELO BRANCO JR, A. Influência do regime de ventos na dispersão de adultos de *Simulium pertinax* Kollar (Diptera: Simuliidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, n. 3, p. 571-573, 1994.

COELHO, G.E.; VIEIRA, J.B.F.; GARCIA-ZAPATA, M.T.A. & SCHUERTZ, J.C.M. Identificação de áreas de estratificação epidemiológica no foco de oncocercose na região Yanomami, Roraima, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, n. 3, p. 607-611, 1998.

COLBO, M.H. & MOORHOUSE, D.E. The survival eggs of *Austrosimulium pestilens* Mack & Mack (Diptera: Simuliidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 64, p. 629-632, 1974.

COLBO, M.H. & WOTTON, R.S. Preimaginal blackfly bionomics. *In: Blackflies*, Marshall Lair (ed.) Academic Press, London, 1979, p. 209-226.

COLBO, M.H. Problems in estimating black fly population in their aquatic stages. *In: Black Flies Ecology, Population Management and Annotated World List*. The Pennsylvania State University, Pennsylvania, 1987, p. 77-89.

COMEC 1991. **APA Estadual do Passaúna. Proteção Ambiental Bacia do Passaúna. 2. Zoneamento ecológico-econômico da Bacia do Passaúna**, 192 p. Convênio "Programas Impactos Ambientais de Barragens PIAB". Coordenação de Região Metropolitana de Curitiba.

COSCARÓN, S. & WYGODZINSKY, P. Notas sobre Simulidos neotropicales. VII. Sobre los subgeneros *Psaroniocompsa* Enderlein y *Inaequalium* subgen. nov. **Archivos de Zoología**, v. 31, n. 2, p. 37-103, 1984.

COSCARÓN, S. **Fauna de agua dulce de la República Argentina**. Simuliidae (Insecta, Diptera) vol. 38 n. 2. Buenos Aires, Ed. Fundación par la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC), 1991, 304 p.

CROSSKEY, R.W. Blackflies (Simuliidae). *In*: LANE, R.P.; CROSSKEY, R.W. **Medical Insects and Arachnids**. ed. Chapman & Hall, London, p. 723, 1993.

CROSSKEY, R.W. 2002. Second Update to the Taxonomic and Geographical Inventory of World Blackflies (Diptera: Simuliidae). **The Natural History Museum**, London, 2002, 14 p.

CUNHA, M.C.I.; COSCARÓN, S. & BASSI, R.M.Z. Determinación de los estadios larvales de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) de Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense**, v. 27, n. 1,2,3,4, p. 57-66, 1998.

DAVIES, D.M. & PETERSON, B.V. Observations on the mating, feeding, ovarian development and oviposition of adult black flies (Simuliidae, Diptera). **Canadian Journal of Zoology**, v. 34, p. 615-655, 1956.

DELLOME, J. Simuliofauna do Rio Marumbi (Morretes, Paraná, Brasil). I. Coleta e Criação; dados meteorológicos e físico-químicos do criadouro; adultos (Diptera, Simuliidae). **Acta Biológica Paranaense**, v. 20, n. 1,2,3,4, p. 145-156, 1991.

DIPTÈRES PIQUEURS, 2004. Disponível em:  
<[http://rec.agr.qc.ca/ecorc/diptera/bf11\\_dp11\\_e.htm](http://rec.agr.qc.ca/ecorc/diptera/bf11_dp11_e.htm)> Acesso em: 26 ago. 2004.

EEZZUDUEMHOI, D. & WILSON, D. **Onchocerciasis**. Last Updated: August 14, 2002. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/oph/topic709.htm>> Acesso em: 17 jan. 2004.

ETYA'ALE, D. Vision 2020: Update on Onchocerciasis. **Journal Community Eye Health**, International Center for Eye Health, v. 14, n. 38, p. 19-21, 2001.

FACT SHEET, 2000. **Onchocerciasis (River Blindness)** WHO n° 95: 4 p.  
Disponível em: <[http://sleekfreak.ath.cx:81/3wdev/CD3WD/HEALTH/S0387E/B554\\_2.HTM](http://sleekfreak.ath.cx:81/3wdev/CD3WD/HEALTH/S0387E/B554_2.HTM)> Acesso em: 17 nov. 2004.

FERREIRA, J.C.V. **O Paraná e seus Municípios**. Maringá, ed. Memória Brasileira, 1996, 728 p.

FREDEEN, F.J.H. Collection, Extraction, Sterilization and Low-Temperature Storage of

Black-Fly Eggs (Diptera: Simuliidae). **The Canadian Entomologist**, v. 91, p. 450-453, 1959.

GORAYEB, I.S. Comportamento de ovoposição e ciclo evolutivo de *Simulium fulvinoxum* Cerq. e Melo, 1968 (Diptera, Simuliidae). **Acta Amazônica**, v. 11, n. 3, p. 595-604, 1981.

GUIA DE TURISMO RURAL NA AGRICULTURA FAMILIAR. Almirante Tamandaré, Colombo e São José dos Pinhais. Fundação Terra, Secretaria da Agricultura e de Abastecimento do Paraná, 2003, 37 p.

GUILLET, P.; SÉKÉTÉLI, A.; ALLEY, E.S.; AGOUA, H.; BOATIN, B.A.; BISSAN, Y.; AKPOBOUA, L.K.B.; QUILLÉ-VÉRÉ, D. & SAMBA, E.M. Impacto of combined large-scale ivermectin distribution and vector control on transmission of *Onchocerca volvulus* in the Niger basin, Guinea. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 73, n. 2, p. 199-205, 1995.

HADI, U.K. & TAKAOKA, H. Effects of constant temperatures on oviposition and immature development of *Simulium bidentatum* (Diptera: Simuliidae), a vector of bovine *Onchocerca* (Nematoda: Onchocercidae) in Central Kyushu, Japan. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 6, p. 801-806, 1995.

HAMADA, N. Bionomics of *Simulium perflavum* Roubaud (Diptera, Simuliidae) in Central Amazonia, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 41, n. 2-4, p. 523-526, 1998.

HAHN, J. Black flies. **Yard & Garden Briefs**, Minnesota, p.1-3.  
Disponível em: < file:///black%20flies.htm > Acesso em: 09 jan.2004.

INSECTES DIPTÈRES SIMULIIDÉS, 2004. Disponível em:  
<<http://www.vetnantes.fr/ENVN/arthropode/pages/Principauxgroupes/Simuliides.htm>>  
Acesso em: 25 fev. 2004.

KETTLE. D.S **Medical and Veterinary Entomology**, 2<sup>nd</sup> edition, CAB International, Wallingford, UK, 1995, 725 p.

KIM, K.C. & MERRITT, R.W. **Black Flies, Ecology, Population Management and Annotated World List**. Pennsylvania State University, Pennsylvania, 1997, 527 p.

KUTIN, K.; KRUPPA, T.F.; BRENYA, R. & GARMS, R. Efficiency of *Simulium sanctipauli* as a vector of *Onchocerca volvulus* in the forest zone of Ghana. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 2, p. 167-173, 2004.

LACEY, L.A. Simulídeos Antropofílicos no Parque Nacional da Amazônia (Tapajós), Brasil, com referência aos efeitos no homem. **Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 90, n. 4, p. 326-338, 1981.

LAIR, M. **Blackflies. The future for biological methods in integrated control.** Academic Press. INC. London, LTD, 1981, 399 p.

LANE, R.P. & CROSSKEY, R.W. **Medical Insects and Arachnids.** Mosquitoes (Culicidae) and Blackflies (Simuliidae). Chapman & Hall. London., 1993, 706 p.

LEUCOCYTOZOONOSIS, 2004(a). Meck Veterinary Edition.

Disponível em: <<http://www.merck.vetmanual.com.mvm/htm/bc/200106.htm>> Acesso em: 25 set. 2004.

LEUCOCYTOZOONOSIS, 2004(b). Department of Natural Resources, Michigan.

Disponível em: <[http://www.michigan.gov/dnr/1,1607,7-153-10370\\_12150\\_12220-26944--,00.html](http://www.michigan.gov/dnr/1,1607,7-153-10370_12150_12220-26944--,00.html)> Acesso em: 25 set. 2004.

LOZOVEI. A.L.; CUNHA. M.C.I. & BASSI, R.A. Estudo das espécies de simulídeos (Diptera, Simuliidae) que se procriam em vertedouros de açudes de piscicultura, Região Metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. *In: Seminários sobre Insetos e Ácaros, Anais 3 da Sociedade Entomológica do Brasil do XI Congresso Brasileiro de Entomologia de 1987*, Campinas, Fundação Cargill, v. 3, p. 103-111, 1989.

McCALL, P.J.; WILSON, M.D.; DUEBEN, B.D.; CLARE-BRONSWOORT, B.M. de & HEATH, R.R. Similarity in oviposition aggregation pheromone composition within the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) species complex. **Bulletin of Entomological Research**, v. 87, n. 6, p. 609-616, 1997.

MORAES, M.A.P. Oncocercose entre os índios Yanomami. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 7, n. 4, p. 503-514, 1991.

MOREIRA, G.R.P. & SATO, G. Blackfly Oviposition on Riparian Vegetation of Waterfalls in an Atlantic Rain Forest Stream. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, n. 3, p. 557-562, 1996.

MULLA, M.S. & LACEY, L.A. 1976. Biting Flies the Lower Colorado River Basin: Economic and Public Health Implications of *Simulium* (Diptera: Simuliidae). *In: National Center for Infections Disease Traveler's Health*, 2003-2004.

NORWOOD, B. 2004. **Onchocerciasis.**

Disponível em:<<http://www2.austincc.edu/microbio/2993c/oncho.html>> Acesso em: 29 nov. 2004.

OKULICZ, J.F.; ELTON, D.M. & SCHWARTZ, R.A. **Onchocerciasis (River Blindness)**, 2002, 24 p. Disponível em:<<http://www.emedicine.com/derm/topic637.htm>> Acesso em: 20 jul. 2004.

PASSOS, A.D.C. & COELHO, G.E. Oncocercose: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, supl. II, p. 107-111, 1998.

PEGORARO, R.A. Ciclo Biológico de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (Diptera: Simuliidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, n. 1, p. 29-37, 1993.

PRESS RELEASE WHO/53. **River Blindness: Its impending elimination signals a landmark in public/private sector collaboration**, 1999. Disponível em: <<http://www.who.int/inf-pr-1999/en/pr99-53.html>> Acesso em: 17 nov. 2004.

PROGRAMA DE COMBATE AOS BORRACHUDOS E MOSQUITOS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

Disponível em: <<http://geocities.yahoo.com.br/derlib/simulideo/simulideo.htm>> Acesso em: 28 set. 2004.

PY-DANIEL, V.; SOUZA, M.A.T. & CALDAS, E.P. Simuliidae (Diptera, Culicomorpha) no Brasil. III Sobre o *Simulium (Chirostilbia) riograndense* sp.n e revisão do *Simulium (Chirostilbia) distinctum* Lutz, 1910. **Iheringia. Ser. Zoológica**, v. 67, p. 37-57, 1988.

ROBINSON, J.R. **Black flies or Buffalo Gnats (Family Simuliidae)**. Texas Agricultural Extension Service, 1997.

Disponível em: <<http://entowww.tomu.edu/extension/bulletins/uc/uc-019.html>> Acesso em: 11 abr. 2004.

RODRIGUEZ-PÉREZ, M.A.; VALDIVIESO-LOPES, N.L. & McCALL, P.J. Aggregated oviposition in *Simulium ochraceum s.l.* (Diptera: Simuliidae) an important Neotropical vector of *Onchocerca volvulus*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 203-207, 2003.

RUAS NETO, A.L.; CALDAS, E.P. & SOUZA, M.A.T. Programa Estadual de Controle de Borrachudos: controle dos simulídeos no Rio Grande do Sul, aspectos gerais. **Boletim de Saúde**, v. 11, n. 2, p. 4-7, 1984.

RUAS NETO, A.L.; SOUZA, M.A.T.; SEVERINO, S.; MELO, J.L.B; SILVEIRA, S.M. & de FORTES N.D.F. Controle integrado de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832. 1. Utilização de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em três municípios do Rio Grande do Sul. **Boletim de Saúde**, v. 12, n. 2, p.17-20, 1985.

RUAS NETO, A.L. & MATIAS, R.S. Controle integrado de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832. 2. A competição interespecífica como possível método de controle natural. **Boletim de Saúde**, v. 12, n. 2, p. 21-24, 1985.

SÁ, M.R. & MAIA-HERZOG, M. Doença de além-mar: estudos comparativos da oncocercose na América Latina e África. **História, Ciências, Saúde- Manguinhos**, v. 10, n. 1, p. 251-58, 2003.

SAUNDERS, D.S. **Insects clocks**, 3<sup>rd</sup> ed. Amsterdam, Elsevier Science B. V. 2002, 576 p.

SERVICE, M.R. **Medical Entomology for Students**. Chapman & Hall. London, 1997, 267 p.

SHELLEY, A.J. Oncocercose humana no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1167-1177, 2002.

SIMMONS, K.R. & EDMAN, J.D. Sustained colonization of the black fly *Simulium decorum* Walker (Diptera: Simuliidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 59, n. 1, p. 1-7, 1981.

SOUZA. M.A.T. Atendimento médico por picadas de simulídeos. **Boletim de Saúde**, v. 11, n. 2, p. 8-11, 1984.

STRIEDER, M.N.; CORSEUIL, E. & PY-DANIEL V. Espécies do gênero *Simulium* (Diptera, Simuliidae) ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil, com chaves para sua identificação. **Acta Biológica Leopoldense**, v. 14, n. 2, p. 53-74, 1992.

TARSHIS I.B. The Feeding of Some Ornithophilic Black Flies (Diptera: Simuliidae) in the Laboratory and Their Role in the Transmission of *Leucocytozoon simondi*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 65, n. 4, p. 842-848, 1972.

THYLEFORS, B. Onchocerciasis: impact of Interventions **2001. Journal Community Eye Health**, International Center for Eye Health, v. 14, n. 38, p. 17-19, 2001.

VIVIANI, A.B.P.; ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Period of ovarian development of *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Diptera: Simuliidae) under laboratory conditions. **Entomologia y Vectores**, v. 6, n.2, p. 180-189, 1999.

WALL, R. & SHEARER, D. **Veterinary Entomology**. Chapman & Hall, 1997, 439 p.

WILSON, M.D.; OSEI-ATWENEBOANA, M.Y; BOAKYE, D.A. & McCALL, P.J. Improved survival and oviposition of *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) in the laboratory. **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, n. 3, p. 285-289, 2000.

ZWICK, H. & ZWICK, P. Terrestrial mass-oviposition of *Prosimulium* species (Diptera: Simuliidae). **Aquatics Insects**, v. 12 n. 1, p. 33-46, 1990.

## 7. APÊNDICES



Tabela 3. Percentual de fertilidade de ovos de *Simulium* sp por postura calculado pelo número de larvas recém-eclodidas (Diptera, Simuliidae), Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, no período de dezembro de 2003 a abril de 2004.

Ordem numérica de posturas	Data coleta de ovos	Aspecto das posturas	Nº de ovos por postura	Nº de larvas eclodidas	Ovos inférteis	Total de ovos férteis	% de ovos férteis
1	03.12.03	arredondada	289	287	2	287	99,31
2	03.12.03	longa/estreita	333	333	0	333	100,00
3	03.12.03	arredondada	212	212	0	212	100,00
4	03.12.03	alongada	359	359	0	359	100,00
5	03.12.03	longa/espessa	328	328	0	328	100,00
6	03.12.03	longa/espessa	409	409	0	409	100,00
7	03.12.03	irregular	353	353	0	353	100,00
8	03.12.03	alongada	313	313	0	313	100,00
9	07.01.04	alongada	233	233	0	233	100,00
10	07.01.04	alongada	230	225	5	225	97,83
11	07.01.04	longa/estreita	781	776	5	776	99,36
12	07.01.04	alongada	1.022	1.009	13	1009	98,73
13	07.01.04	alongada	647	647	0	647	100,00
14	07.01.04	pequena	104	102	2	102	98,08
15	07.01.04	longa/espessa	277	277	0	277	100,00
16	07.01.04	longa/estreita	310	309	1	309	99,68
17	07.01.04	irregular em S	252	243	9	243	96,43
18	07.01.04	irregular	181	180	1	180	99,45
19	07.01.04	retangular	244	243	1	243	99,59
20	13.01.04	irregular em S	209	206	3	206	98,56
21	13.01.04	montículos	105	103	2	103	98,10
22	13.01.04	longa/estreita	839	832	7	832	99,17
23	13.01.04	retangular	333	333	0	333	100,00
24	13.01.04	arredondada	180	175	5	175	97,22
25	13.01.04	irregular	262	259	3	259	98,85
26	13.01.04	retangular	508	507	1	507	99,80
27	13.01.04	irregular	311	301	10	301	96,78
28	13.01.04	retangular	321	314	7	314	97,82
29	13.01.04	arredondada	50	50	0	50	100,00
30	13.01.04	retangular	286	285	1	285	99,65
31	20.01.04	longa/estreita	404	404	0	404	100,00
32	20.01.04	irregular	394	394	0	394	100,00
33	20.01.04	longa/estreita	455	445	10	445	97,80
34	20.01.04	irregular em C	289	287	2	287	99,31
35	20.01.04	longa/estreita	272	261	11	261	95,96
36	20.01.04	alongada	768	762	6	762	99,22
37	20.01.04	irregular	466	465	1	465	99,79
38	20.01.04	retangular	423	399	24	399	94,33
39	20.01.04	longa/estreita	508	507	1	507	99,80
40	20.01.04	arredondada	122	122	0	122	100,00
41	20.01.04	longa/estreita	595	578	17	578	97,14
42	26.01.04	arredondada	160	160	0	160	100,00
43	26.01.04	alongada	347	347	0	347	100,00
44	26.01.04	alongada	393	393	0	393	100,00
45	26.01.04	alongada	281	275	6	275	97,86
46	26.01.04	alongada	314	314	0	314	100,00
47	26.01.04	irregular em C	298	294	4	294	98,66
<b>Σ subtotal</b>			<b>16.770</b>	<b>16.610</b>	<b>160</b>	<b>16.610</b>	

Tabela 3. Percentual de fertilidade de ovos de *Simulium* sp por postura calculado pelo número de larvas recém-eclodidas (Diptera, Simuliidae), Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, no período de dezembro de 2003 a abril de 2004.

Ordem numérica de posturas	Data coleta ovos	Aspecto das posturas	Nº de ovos por postura	Nº de larvas eclodidas	Ovos inférteis	Total de ovos férteis	% de ovos férteis
48	26.01.04	irregular	440	432	8	432	98,18
49	26.01.04	arredondada	202	202	0	202	100,00
50	26.01.04	irregular	402	402	0	402	100,00
51	26.01.04	alongada	316	315	1	315	99,68
52	26.01.04	alongada	430	428	2	428	99,53
53	26.01.04	alongada	325	323	2	323	99,38
54	26.01.04	retangular	524	524	0	524	100,00
55	26.01.04	irregular em C	336	336	0	336	100,00
56	29.01.04	irregular	330	330	0	330	100,00
57	29.01.04	irregular	322	322	0	322	100,00
58	29.01.04	irregular	423	423	0	423	100,00
59	29.01.04	alongada	401	401	0	401	100,00
60	29.01.04	longa/estreita	465	465	0	465	100,00
61	29.01.04	longa/estreita	349	349	0	349	100,00
62	29.01.04	alongada	454	454	0	454	100,00
63	29.01.04	alongada	357	357	0	357	100,00
64	29.01.04	alongada	275	275	0	275	100,00
65	29.01.04	monticulos	1.030	1.030	0	1030	100,00
66	29.01.04	irregular	340	340	0	340	100,00
67	29.01.04	arredondada	280	280	0	280	100,00
68	29.01.04	irregular	383	383	0	383	100,00
69	02.02.04	irregular	323	323	0	323	100,00
70	02.02.04	irregular	373	373	0	373	100,00
71	02.02.04	irregular	285	285	0	285	100,00
72	02.02.04	arredondada	270	270	0	270	100,00
73	02.02.04	irregular	361	361	0	361	100,00
74	02.02.04	longa/estreita	489	489	0	489	100,00
75	02.02.04	alongada	599	599	0	599	100,00
76	02.02.04	monticulos	165	165	0	165	100,00
77	02.02.04	alongada	601	590	11	590	98,17
78	02.02.04	arredondada	160	160	0	160	100,00
79	05.02.04	oval	260	258	2	258	99,23
80	05.02.04	alongada	292	291	1	291	99,66
81	05.02.04	monticulos	27	27	0	27	100,00
82	05.02.04	longa/estreita	391	388	3	388	99,23
83	05.02.04	arredondada	164	164	0	164	100,00
84	05.02.04	retangular	258	258	0	258	100,00
85	05.02.04	retangular	163	163	0	163	100,00
86	05.02.04	longa/estreita	287	285	2	285	99,30
87	05.02.04	retangular	382	376	6	376	98,43
88	05.02.04	irregular em S	98	92	6	92	93,88
89	05.02.04	monticulos	264	259	5	259	98,11
90	09.02.04	arredondada	245	240	5	240	97,96
91	09.02.04	retangular	314	314	0	314	100,00
92	09.02.04	alongada	285	279	6	279	97,89
93	09.02.04	alongada	338	332	6	332	98,22
94	09.02.04	longa/larga	633	632	1	632	99,84
<b>Σ subtotal</b>			<b>16.411</b>	<b>16.344</b>	<b>67</b>	<b>16.344</b>	

Tabela 3. Percentual de fertilidade de ovos de *Simulium* sp por postura calculado pelo número de larvas recém-eclodidas (Diptera, Simuliidae), Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, no período de dezembro de 2003 a abril de 2004.

Ordem numérica de posturas	Data coleta de ovos	Aspecto das posturas	Nº de ovos por postura	Nº de larvas eclodidas	Ovos inférteis	Total de ovos férteis	% de ovos férteis
95	09.02.04	arredondada	321	315	6	315	98,13
96	09.02.04	alongada	344	342	2	342	99,42
97	12.02.04	montículos	339	338	1	338	99,71
98	12.02.04	arredondada	268	268	0	268	100,00
99	12.02.04	longa/larga	658	649	9	649	98,63
100	12.02.04	alongada	266	264	2	264	99,25
101	12.02.04	alongada	384	384	0	384	100,00
102	12.02.04	montículos	318	315	3	315	99,06
103	12.02.04	longa/estreita	229	229	0	229	100,00
104	12.02.04	montículos	564	559	5	559	99,11
105	12.02.04	longa/estreita	697	695	2	695	99,71
106	12.02.04	irregular em S	433	431	2	431	99,54
107	12.02.04	montículos	608	601	7	601	98,85
108	12.02.04	alongada	850	848	2	848	99,76
109	23.02.04	alongada/encurv.	369	366	3	366	99,19
110	23.02.04	arredondada	133	132	1	132	99,25
111	23.02.04	alongada/encurv.	406	405	1	405	99,75
112	23.02.04	montículos	23	23	0	23	100,00
113	23.02.04	longa/estreita	459	454	5	454	98,91
114	23.02.04	arredondada	255	253	2	253	99,22
115	23.02.04	retangular	393	388	5	388	98,73
116	23.02.04	larga/irregular	527	524	3	524	99,43
117	23.02.04	arredondada	121	116	5	116	95,87
118	23.02.04	montículos	149	146	3	146	97,99
119	08.03.04	alongada/encurv.	388	387	1	387	99,74
120	08.03.04	arredondada	114	113	1	113	99,12
121	08.03.04	arredondada	192	189	3	189	98,44
122	08.03.04	arredondada	157	155	2	155	98,73
123	08.03.04	alongada/irregular	415	415	0	415	100,00
124	08.03.04	irregular	266	263	3	263	98,87
125	08.03.04	alongada/encurv.	327	325	2	325	99,39
126	08.03.04	montículos	304	299	5	299	98,36
127	08.03.04	longa/estreita	456	454	2	454	99,56
128	08.03.04	alongada	313	312	1	312	99,68
129	08.03.04	alongada/retangul.	276	276	0	276	100,00
130	08.03.04	alongada/irregular	346	346	0	346	100,00
131	08.03.04	alongada/encurv.	234	228	6	228	97,44
132	08.03.04	montículos	228	228	0	228	100,00
133	08.03.04	encurvada em C	227	226	1	226	99,56
134	08.03.04	arredondada	192	185	7	185	96,35
135	11.03.04	longa/estreita	727	723	4	723	99,45
136	11.03.04	longa/estreita	144	143	1	143	99,31
137	11.03.04	alongada	360	359	1	359	99,72
138	11.03.04	arredondada	331	329	2	329	99,40
139	11.03.04	montículos	555	549	6	549	98,92
140	11.03.04	encurvada em C	193	193	0	193	100,00
141	11.03.04	irregular	514	498	16	498	96,89
<b>Σ subtotal</b>			<b>16.373</b>	<b>16.240</b>	<b>133</b>	<b>16.240</b>	

Tabela 3. Percentual de fertilidade de ovos de *Simulium* sp por postura calculado pelo número de larvas recém-eclodidas (Diptera, Simuliidae), Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, no período de dezembro de 2003 a abril de 2004.

Ordem numérica de posturas	Data coleta de ovos	Aspecto das posturas	Nº de ovos por postura	Nº de larvas eclodidas	Ovos inférteis	Total de ovos férteis	% de ovos férteis
142	15.03.04	longa/estreita	289	289	0	289	100,00
143	15.03.04	irregular	593	588	5	588	99,16
144	15.03.04	retangular	236	235	1	235	99,58
145	15.03.04	alongada/encurv.	278	274	4	274	98,56
146	15.03.04	alongada/encurv.	411	410	1	410	99,76
147	15.03.04	irregular	213	209	4	209	98,12
148	15.03.04	irregular	209	201	8	201	96,17
149	15.03.04	alongada/irregular	330	327	3	327	99,09
150	22.03.04	alongada	292	290	2	290	99,32
151	22.03.04	alongada	216	209	7	209	96,76
152	22.03.04	longa/estreita	328	318	10	318	96,95
153	22.03.04	alongada	284	279	5	279	98,24
154	22.03.04	alongada/irregular	365	364	1	364	99,73
155	22.03.04	alongada/irregular	435	431	4	431	99,08
156	22.03.04	retangular	351	342	9	342	97,44
157	22.03.04	longa/estreita	214	210	4	210	98,13
158	22.03.04	larga/irregular	345	339	6	339	98,26
159	25.03.04	encurvada em C	328	324	4	324	98,78
160	25.03.04	alongada	266	259	7	259	97,37
161	25.03.04	alongada/irregular	372	372	0	372	100,00
162	29.03.04	montículos	265	263	2	263	99,25
163	29.03.04	montículos	220	219	1	219	99,55
164	29.03.04	montículos	271	271	0	271	100,00
165	29.03.04	encurvada	289	279	10	279	96,54
166	29.03.04	irregular	264	262	2	262	99,24
167	29.03.04	montículos	287	285	2	285	99,30
168	29.03.04	alongada	365	364	1	364	99,73
169	01.04.04	alongada/irregular	443	442	1	442	99,77
170	01.04.04	alongada	359	357	2	357	99,44
171	01.04.04	montículos	329	329	0	329	100,00
172	01.04.04	alongada	240	240	0	240	100,00
173	01.04.04	montículos	211	211	0	211	100,00
174	01.04.04	alongada	286	285	1	285	99,65
175	01.04.04	alongada/irregular	1.030	975	55	975	94,66
176	01.04.04	encurvada/irregul.	307	304	3	304	99,02
177	05.04.04	montículos	146	142	4	142	97,26
178	05.04.04	irregular	214	214	0	214	100,00
179	05.04.04	arredondada	140	138	2	138	98,57
180	05.04.04	longa/estreita	333	329	4	329	98,80
181	05.04.04	irregular	300	299	1	299	99,67
182	05.04.04	larga/irregular	797	782	15	782	98,12
183	05.04.04	irregular	348	341	7	341	97,99
184	05.04.04	alongada/irregular	395	390	5	390	98,73
185	13.04.04	larga/estreita	249	248	1	248	99,60
186	13.04.04	arredondada	358	350	8	350	97,77
187	13.04.04	alongada	174	171	3	171	98,28
188	13.04.04	alongada	384	381	3	381	99,22
<b>Σ subtotal</b>			<b>15.359</b>	<b>15.141</b>	<b>218</b>	<b>15.141</b>	

Tabela 3. Percentual de fertilidade de ovos de *Simulium* sp por postura calculado pelo número de larvas recém-eclodidas (Diptera, Simuliidae), Riacho dos Padres, Almirante Tamandaré, Paraná, no período de dezembro de 2003 a abril de 2004.

Ordem numérica de posturas	Data coleta de ovos	Aspecto das posturas	Nº de ovos por postura	Nº de larvas eclodidas	Ovos inférteis	Total de ovos férteis	% de ovos férteis
189	13.04.04	arredondada	282	279	3	279	98,94
190	13.04.04	arredondada	317	316	1	316	99,68
191	13.04.04	montículos	398	395	3	395	99,25
192	13.04.04	alongada/irregular	684	673	11	673	98,39
193	13.04.04	alongada/irregular	810	802	8	802	99,01
194	19.04.04	irregular	482	481	1	481	99,79
195	19.04.04	irregular	301	298	3	298	99,00
196	19.04.04	alongada	416	414	2	414	99,52
197	19.04.04	alongada	388	388	0	388	100,00
198	19.04.04	alongada/encurv.	407	405	2	405	99,51
199	19.04.04	alongada	458	449	9	449	98,03
200	22.04.04	montículos	268	266	2	266	99,25
201	22.04.04	montículos	355	349	6	349	98,31
202	22.04.04	irregular	326	325	1	325	99,69
203	22.04.04	longa/larga	442	440	2	440	99,55
204	22.04.04	longa/larga	474	471	3	471	99,37
205	22.04.04	irregular	313	306	7	306	97,76
206	22.04.04	alongada/encurv.	382	378	4	378	98,95
207	03.05.04	encurvada	382	380	2	380	99,48
208	03.05.05	montículos	277	275	2	275	99,28
209	06.05.04	montículos	329	329	0	329	100,00
210	06.05.05	montículos	433	431	2	431	99,54
211	06.05.06	montículos	481	478	3	478	99,38
212	06.05.07	montículos	379	379	0	379	100,00
213	13.05.04	espalhada-irregul.	209	209	0	209	100,00
<b>Σ subtotal</b>			<b>9.993</b>	<b>9.916</b>	<b>77</b>	<b>9.916</b>	
<b>Σ total geral</b>			<b>74.906</b>	<b>74.251</b>	<b>655</b>	<b>74.251</b>	
<b>% geral</b>				<b>99,13</b>	<b>0,87</b>	<b>99,13</b>	

## **CAPITULO 2**

**SUSCEPTIBILIDADE EM LARVAS DE *SIMULIUM* A TRÊS DIFERENTES  
FORMULAÇÕES DE *BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENIS* TESTADA  
EM LABORATÓRIO COM UM APARATO SIMPLES ECONÔMICO E RÁPIDO**

## RESUMO

Foi verificada a susceptibilidade das larvas de espécies de *Simulium* ao efeito do bioinseticida *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Os formulados comerciais empregados foram Teknar<sup>®</sup>, Vectobac<sup>®</sup> e Aquabac<sup>®</sup>. O acondicionamento das larvas foi elaborado utilizando-se de compressores de ar conectados a elementos arejadores porosos de sílica que permitiram agitar a água. Cada unidade de bioensaios compunha-se de um frasco com 2 litros de água do criadouro natural, arejadores, saco de nylon e cerca de 50 larvas evoluídas. A exposição de larvas ao Bti durou 10 minutos, depois do que as larvas foram transferidas para outro frasco sem o ingrediente ativo. A verificação da mortalidade deu-se cinco horas após a aplicação do larvicida. As concentrações testadas variaram de 0,04 a 2,4mg/l e as CL<sub>50</sub> medianas de produtos Teknar<sup>®</sup>, Vectobac<sup>®</sup> e Aquabac<sup>®</sup> foram 0,035, 0,281 e 0,213mg/l, respectivamente. As cinco espécies de *Simulium* provenientes do Riacho dos Padres foram igualmente susceptíveis aos efeitos tóxicos do Bti. Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para Teknar<sup>®</sup> em relação a Vectobac<sup>®</sup> e a Aquabac<sup>®</sup>, mas entre os dois últimos não houve diferença significativa. Em repetições com os referidos larvicidas nas dosagens 0,2 e 0,3mg/l, a análise das categóricas indicou que os três diferem entre si ao nível de 5%.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Simulium*, susceptibilidade.

## ABSTRACT

In the present work the effects of the bacterial larvicide's *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) on five *Simulium* species were verified. Three commercially available Bti products were tested: Teknar<sup>®</sup>, Vectobac<sup>®</sup> and Aquabac<sup>®</sup>. For the bioassays, electric air pumps were used to ensure aeration and motion of water. Each bioassay unit was comprised by a two-liter glass tank filled with water from natural breeding places of *Simulium* and a nylon<sup>®</sup> bag forming an internal compartment inside each tank was used to keep a number of 50 developed larvae. The exposed time to Bti was 10 minutes and afterwards the larvae were transferred to another tank without larvicide's. The mortality was verified 5 hours after larvicide application. The range of Bti concentrations tested was from 0.04 to 2.4mg/l and the LC<sub>50</sub> medians of Teknar<sup>®</sup>, Vectobac<sup>®</sup> and Aquabac<sup>®</sup> products were 0.035, 0.281 and 0.213mg/l, respectively. All five *Simulium* species from "Riacho dos Padres" river were susceptible to toxic effects of Bti. Statistical difference on larvae mortality ( $p < 0.05$ ) was detected to Teknar<sup>®</sup> compared to Vectobac<sup>®</sup> and Aquabac<sup>®</sup> and no significative differences were observed between these two products. However, for the replicate tests using 0.2 and 0.3mg/l dosages, the categorical analysis showed significative differences among three products at the 5% level.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Simulium*, susceptibility.

## INTRODUÇÃO

Na década de 1970, havia uma preocupação com populações de simuliídeos resistentes a inseticidas químicos, especificamente nos países do continente africano onde a oncocercose é problema de saúde pública. Voltou-se, então, a atenção para o controle biológico, culminando com o isolamento do *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) em 1977. Este bacilo produz uma característica inclusão protéica que é o ingrediente ativo (i.a.) de bioinseticidas, hoje largamente utilizados no controle de Culicidae e Simuliidae. O agente larvicida de Bti é altamente específico e esta especificidade, em parte, deve-se às condições necessárias à solubilização do cristal protéico.

No Brasil, o controle de borrachudos teve início em meados do século XX no estado de São Paulo. Inicialmente, sobre a população larvária foram aplicados inseticidas químicos organoclorados como DDT e BHC. A partir de 1971, estes inseticidas foram substituídos pelo organofosforado Temephos (Abate<sup>®</sup>) (ARAÚJO-COUTINHO, 1995). No Estado do Rio Grande do Sul, em 1976, com este organofosforado foi iniciado o controle de populações de *Simulium* spp (MARDINI *et al.*, 2000). RUAS-NETO (1984), neste mesmo Estado, reporta-se a populações de *S. pertinax* Kollar, 1832 resistentes ao Temephos. Este fato serviu de alerta e de suporte para que programas de controle fossem revistos. No Rio Grande do Sul, estado pioneiro no controle biológico com Bti, para checar o fluxo em pequenos e médios riachos, desenvolveu-se uma metodologia que usa medidores fixos de vazão tipo “Parshal modificado”. Em 17 anos (1993-2000) muitos medidores de vazão foram construídos em mais de uma centena de municípios (MARDINI *et al.*, 2000). O programa de controle paulista foi reformulado e, em 1986, um projeto piloto estabelecido. Devido aos resultados positivos, o organofosforado gradualmente foi sendo substituído pelo bioinseticida Bti para então a partir de 1990 ser implantado em larga escala (CAVADOS *et al.*, 2000; ARAÚJO-COUTINHO, 1995). Atualmente os dois grandes programas de controle de simuliídeos estão nesses dois estados.

Quanto aos inimigos naturais, são citados peixes, náíades de Odonata, de Ephemeroptera e de Plecoptera, larvas de Trichoptera e Megaloptera, pássaros



insetívoros, libélulas e rãs como sendo alguns dos predadores de imaturos e alados (CUNHA, 2001, RUAS NETO *et al.*, 1984). SOUZA & MAGNI (1988) observaram sobre uma rampa os pássaros quero-quero, bem-te-vi, suiriri pequeno e joão-de-barro alimentando-se de larvas e pupas de simulídeos. SATO *et al.* (1986), na região de Joinville, Santa Catarina, encontraram dezoito espécies de peixes com pupas e larvas no conteúdo entérico. Alguns desses peixes são popularmente conhecidos como lambari, cascudo, barrigudinho e bagre. Microsporídia (protozoário), Mermitidae (nematoda) e fungos também são exemplos de agentes bióticos de controle (ANDRADE, 1989).

Outra maneira de conter a proliferação de simulídeos é através do controle mecânico que consiste na remoção das formas imaturas dos criadouros com remoção de substratos naturais e antrópicos. Também os imaturos podem ser removidos pela escovação de plataformas de vertedouros e pela alternância da saída de água de tanques que para isso deveriam dispor de dois sistemas de escoamento. Os imaturos desprendidos após a escovação devem ser retidos em um tecido ou tela de malha fina na extremidade final e retirados para área seca. A realização desse tipo de controle é mais factível em pequenos criadouros. Torna-se essencial a participação da comunidade alvo nos programas, sendo a informação e a educação ambiental quesitos importantes a serem abordados. PETRY *et al.* (2003) e MELO *et al.* (1984) recomendam o trabalho informativo e educativo junto à comunidade bem como a participação efetiva da mesma nos programas de combate, principalmente nos procedimentos de controle mecânico. As pessoas que freqüentam ou moram em áreas infestadas normalmente adotam a proteção individual na tentativa de evitar ou reduzir as picadas.

O método químico de controle consiste na aplicação de inseticidas sintéticos. Devido aos problemas com populações de insetos resistentes e aos efeitos adversos sobre a população não alvo, atualmente estes inseticidas são pouco utilizados.

A expectativa futura para o controle consiste no uso de armadilhas impregnadas com feromônios de agregação que serviriam para atrair as fêmeas grávidas (McCALL *et al.*, 1997).

Para ampliar os conhecimentos sobre a susceptibilidade ao Bti em espécies de *Simulium*, propôs-se nesta investigação utilizar três diferentes biolarvicidas em espécies que proliferam na área rural da região Metropolitana de Curitiba, aferindo-os em bioensaios laboratoriais em um aparato simples e rápido. Os seguintes objetivos foram propostos:

a) Verificar, em bioensaios de laboratório, com três formulações de *Bacillus thuringiensis israelensis* Teknar<sup>®</sup>, Aquabac<sup>®</sup> e Vectobac<sup>®</sup> a susceptibilidade de larvas de *Simulium inaequale*, *Simulium pertinax*, *Simulium orbitale*, *Simulium perflavum* e *Simulium subnigrum* presentes no Riacho dos Padres.

b) Adequar, em testes no presente experimento laboratorial, um aparato de aeração aquática na manutenção de larvas de manuseio simples, econômico, eficaz a fim de aferir a susceptibilidade em larvas às formulações acima especificadas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria ubíqua gram positiva, que em condições adversas ao crescimento vegetativo produz esporo e adjacente a este um corpo paraesporal característico. O corpo paraesporal sintetizado durante a esporulação compõe-se de glicoproteínas sólidas (RABINOVITCH *et al.*, 1998). As glicoproteínas são codificadas por diferentes genes, que se agregam para formar o cristal protéico inseticida (SCHNEPF *et al.*, 1998). Esta inclusão cristalina pode ser bipiramidal, cubóide, esférica ou rambóide. Os componentes tóxicos sintetizados pela bactéria são nomeados por Cry e Cyt toxinas (CHARLES & NIELSEN-LeROUX, 2000). A atividade inseticida é atribuída aos cristais paraesporais (SCHNEPF *et al.*, 1998; CHARLES & NIELSEN-LeROUX, 2000). Em formulações industriais, estes cristais constituem os componentes tóxicos letais para as larvas de ordens Diptera, Coleoptera e Lepidoptera, que contêm grupos de insetos importantes em áreas agrícolas, florestais e em saúde pública. Existe uma alta especificidade entre as toxinas e as espécies-alvo, atribuída à diversidade de toxinas produzidas pelos Bt (CHARLES & NIELSEN-LeROUX, 2000). Nos insetos sensíveis, a inclusão protéica é fracionada liberando protoxinas de

tamanhos que variam de 27 a 140 kDa e proteoliticamente é convertida em polipeptídeos tóxicos.

Durante a fase exponencial de crescimento do *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (Bti) é produzido um nucleotídeo ( $\beta$ -exotoxina) termoestável a 121°C (MORAES *et al.*, 2001; IPCS, 1999; CAMPBELL *et al.*, 1987), que atua a nível de DNA polimerase inibindo-a (RABINOVITCH *et al.*, 1998). A  $\beta$ -exotoxina também conhecida como thuringiensen é excretada no meio de cultura. Há uma ampla gama de insetos sensíveis à  $\beta$ -exotoxina que atua sobretudo nas ordens Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera, Hemiptera e Hymenoptera. Em formulações comerciais a exotoxina não é utilizada como bioinseticida devido ao seu amplo espectro de ação (RABINOVITCH *et al.*, 1998).

Sob o ponto de vista da ação de microrganismos patogênicos, os modos de introdução aos habitats de insetos podem ser reunidos em três grupos (MORAES & CAPALBO, 1986). O modo de ação do primeiro grupo acontece após a sua introdução numa população-alvo onde eles se multiplicam naturalmente, gerando um controle contínuo; no segundo grupo, a ação processa-se também após a aplicação no habitat-alvo, mas aí não ocorre a sua multiplicação, havendo necessidade de repetidas reaplicações; e o terceiro tipo de ação integra as duas formas acima referidas.

Os inseticidas formulados a partir de Bt são aplicados em folhagens, solos, ambientes aquáticos e em alimentos armazenados. Estes biopesticidas contêm proteínas tóxicas (cristal protéico) e esporos viáveis, mas nos produtos de Bti os esporos estão inativados (IPCS, 1999). WALTHER *et al.* (1986), analisando o potencial larvicida das células vegetativas de Bti, detectaram que a mortalidade de larvas ocorria em função da esporulação da bactéria durante os bioensaios e a formação do cristal tóxico. Em condições ambientais, Bti não se recicla e nem regenera. A sua toxicidade concentra-se em cristais formados durante a esporulação (GLARE & O'CALLAGHAN, 1998). Em larvas moribundas não se observou septicemia (LACEY *et al.*, 1978).

Em insetos-alvo, Bt produz efeito tóxico somente após a sua ingestão. As formulações devem ser aplicadas de tal forma que o ingrediente ativo permaneça na zona de alimentação por um longo período, mas isso nem sempre é possível. Após a

aplicação do produto, os cristais vão se depositando no leite e, posteriormente, são desativados. Os cristais aplicados são inativados por radiação ultravioleta solar e a chuva provoca a lavagem dos produtos bacterianos (LECADET & RAPOPORT, 1997). As condições físico-químicas da água, como temperatura, matéria orgânica, cloro, sais inorgânicos e pH são fatores que também podem comprometer o desempenho das formulações (Aquabac<sup>®</sup> Technical Bulletin, 2004).

Em processos de fermentação de Bt, as técnicas são sofisticadas e o controle de qualidade das variáveis ambientais, temperatura, oxigênio, pH, umidade e nutrientes é rigoroso. Os substratos utilizados para o crescimento da bactéria são altamente protéicos. Há cinco tipos de formulações de Bti para diferentes usos que são: líquidos, pós, grânulos, comprimidos (pellets) e briquetes.

Em geral, nas formulações de Bt existem outros ingredientes inativos que são materiais inertes mantidos pelos fabricantes como “trade secrets”. Por se tratar de componentes sigilosos, poucas informações são encontradas na literatura a este respeito. O hidróxido de sódio, o ácido sulfúrico, o ácido fosfórico, o fosfato de potássio, o metilparabeno e o sulfeto de sódio são exemplos de ingredientes inertes que podem estar presentes nas formulações (SWADENER, 1994). Tais elementos químicos são potencialmente os componentes mais tóxicos das formulações (SWADENER, 1994). Efeitos irritativos e/ou corrosivos podem ocorrer na pele, mucosas, olhos, nos sistemas digestivo e respiratório.

## **2.2. Histórico do *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* (Bt) inicialmente foi isolado de larvas doentes de *Bombyx mori* (Rasmussen, 1976) pelo japonês Ishiwata em 1901 (JOUNG & CÔTE, 2000). Berliner em 1911 na cidade de Thuringia da Alemanha isolou a bactéria em mariposas da farinha, descreveu e nomeou-a em homenagem à cidade como *Bacillus thuringiensis* (SWADENER, 1994; NEPPL, 2000). Na França, em 1938 surgiu o primeiro bioinseticida comercializado (DEACON, 2004). No entanto, só em meados de 1950 é que iniciou o interesse em comercializar produtos microbianos em larga escala para o controle de insetos susceptíveis (MORAES *et al.*, 2001).

Em 1976 a Organização Mundial da Saúde financiou um projeto que propiciou a descoberta de uma nova cepa de Bt por Goldberg e Margalit em 1977. Mais tarde, no Instituto Pasteur foi caracterizada e designada de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*, sorotipo H-14 (De Barjac, 1978) ou simplesmente Bti. Este sorovar foi isolado em mosquitos moribundos de charcos do deserto Negev, em Israel, contendo ação restrita a dípteros das famílias Culicidae e Simuliidae. No início de 1980, graças aos avanços tecnológicos existentes na produção de bioinseticidas, vários produtos foram desenvolvidos e testados. Hoje, as formulações baseadas em Bti são utilizadas mundialmente em programas de combate aos mosquitos e simulídeos (GLARE & O'CALLAGHAN, 1998).

Até 1998, sessenta e sete subespécies (=sorovares) de Bt haviam sido identificadas com base na sorotipagem flagelar (Ag-H) (IPCS, 1999). A classificação baseada em análises sorológicas foi introduzida no início da década de 1960 e atualmente os critérios morfológicos e bioquímicos têm sido acrescidos. As pesquisas para o isolamento de novos entomopatógenos são auspiciosas. É tão abundante a quantidade de dados produzidos por seqüência genômica que CRICKMORE *et al.* (1998) propuseram uma revisão na nomenclatura para acomodar melhor o grande número de novas proteínas. No Brasil, em 1995 duas novas subespécies de Bt foram isoladas, *Bacillus thuringiensis oswaldocruzi* e *Bacillus thuringiensis brasiliensis*. Nenhuma delas apresentou atividade inseticida em insetos testados (RABINOVITCH *et al.*, 1995). Posteriormente, foi isolada uma cepa de Bti (LFB - Fiocruz 710) que foi mais tóxica às larvas de *S. pertinax* em comparação à cepa referência IPS-82 (RABINOVITCH *et al.*, 1999). CAVADOS *et al.* (2001), isolaram de larvas de Simuliidae amostras de Bt e nomearam de auto-aglutinadoras. Em seguida submeteram as larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) às toxinas isoladas para verificar a sua toxicidade, o que foi confirmado.

Os bioinseticidas (Bt) têm especificidade a determinados grupos de insetos e são incluídos em cinco subespécies: *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Bacillus thuringiensis morrisoni*, ambos letais para lagartas de borboletas e mariposas; *Bacillus thuringiensis israelensis* letal para larvas de mosquitos e simulídeos; *Bacillus thuringiensis aizawai*

letal para lagartas de mariposa; *Bacillus thuringiensis tenebrionis*, (conhecido por *san diego*) letal para larvas de besouros (SWADENER, 1994; JOUNG & CÔTE, 2000).

### **2.3. Modo de ação do *Bacillus thuringiensis***

Após a ingestão do bioinseticida pelas larvas susceptíveis processa-se a solubilização da protoxina em meio alcalino do intestino médio. Este processo é desencadeado pelas proteases que ativam as protoxinas em toxinas biologicamente ativas ( $\delta$ -endotoxinas). A proteína ativada liga-se a receptores de alta afinidade (glicoproteínas) presente nas microvilosidades das células entéricas, levando a formação de poros e lise da membrana entérica. Estas reações químicas perturbam o balanço iônico das células (GLARE & O'CALLAGHAN, 1998; SWADENER, 1994; JOUNG & CÔTE, 2000; GILL *et al.*, 1992; IPCS, 1999; KNOWLES & ELLAR, 1987). Os efeitos mais característicos que ocorreram no intestino médio das larvas de *S. pertinax* foram a vacuolização de células colunares, danos nas microvilosidades e o conteúdo das células epiteliais passando para o lúmen seguido da morte da célula (CAVADOS *et al.*, 2004). Assim ocorre a paralisia do intestino e o inseto pára de alimentar-se e morre.

As proteases e pH intestinal alcalino (9 a 11) são condições requeridas para solubilizar e hidrolisar o cristal tóxico-inseticida no intestino do inseto sensível (LEE *et al.*, 2003; LACEY *et al.*, 1978; FAUST *et al.*, 1967). Enzimas proteolíticas no intestino médio menos reagentes ou a resistência do epitélio entérico ao ataque da  $\delta$ -endotoxina são os fatores que contribuem para que as espécies fiquem menos susceptíveis (LACEY *et al.*, 1978).

A inclusão cristalina de Bti, quando hidrolisada, desdobra-se em quatro proteínas com pesos moleculares de 135, 125, 68 e 28 kDa (CHARLES & NIELSEN-LeROUX, 2000). Estas proteínas são codificadas pelos genes Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1A (PARK *et al.*, 2003). Os genes que codificam os cristais protéicos inseticidas localizam-se principalmente em plasmídeos que podem ser transferidos de uma bactéria a outra através de conjugação. Estas proteínas permanecem dentro do corpo paraesporal conectadas pelas pontes de hidrogênio e ligações de dissulfeto (RABINOVITCH *et al.*, 1998; GILL *et al.*, 1992). As quatro proteínas reunidas em um único cristal parece serem mais eficientes na ação letal que a mistura de quatro inclusões (SCHNEPF *et al.*,

1998). As toxinas de Bti apresentam um complexo modo de ação provavelmente ao sinergismo de interação entre a proteína (27 kDa) e uma proteína de alto peso molecular, resultando no aumento da toxicidade (LEE *et al.* 2003; GLARE & O'CALLAGHAN, 1998). A toxina Cyt1A age de modo diferente da toxina Cry, pois ambas apresentam estruturas diferentes e parece que interagem em receptores diferenciados (SCHNEPF *et al.*, 1998). A associação das toxinas Cry e Cyt forma a base da interação sinérgica. A toxina ativada pode ser dividida em três regiões estruturais: a) região N-terminal que é o domínio tóxico; b) região conservada C-terminal e c) região variável com muitos aminoácidos diferentes (GILL *et al.*, 1992). Receptores específicos de membrana ligam-se ao domínio C-terminal da toxina ativa e, então, ocorre a formação de poros pelo domínio N-terminal.

#### **2.4. Resistência ao *Bacillus thuringiensis***

Uma nuvem negra ofuscou um pouco o brilho dos agentes biológicos Bt com o aparecimento de populações de mariposas *Plutella xylostella* Linnaeus, 1758 no campo com alto nível de resistência às proteínas Cry (McGAUGHEY & WHALON, 1992; TABASHNIK, 1994). A resistência em lepidóptera *Plodia interpunctella* Hübner, 1813 ainda que em baixo nível foi observada por VAN RIE *et al.* (1990). Estes autores evidenciaram que a resistência era devida a uma alteração nos sítios de ligação membrana-toxina, reduzindo a afinidade dos receptores da membrana com as proteínas tóxicas. (Em experimentos laboratoriais, foi observada a aquisição de resistência em coleópteros pragas da batata *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824), em lepidópteros pragas de brotos do tabaco *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) e de produtos armazenados *Cadra cautella* Walker, 1863 (McGAUGHEY & WHALON, 1992). NEPPL (2000) relata onze espécies resistentes as toxinas de cepas de Bt em testes laboratoriais, entre elas, *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 e *A. aegypti*.

A resistência é baseada na diminuição da susceptibilidade de uma população a um determinado inseticida e este fenômeno é evolutivo. Atualmente, as pesquisas estão direcionadas aos insetos de importância agrícola onde existem casos de resistência ao *Bacillus thuringiensis* em Lepidoptera (Noctuidae, Plutellidae e Pyralidae) (TABASHNIK, 1994). Em laboratório, foi verificada a pressão seletiva em

algumas espécies de ordens Diptera e Coleoptera aos formulados de Bt. Entretanto, não ocorre resistência cruzada entre os inseticidas químicos convencionais e Bt, graças aos seus mecanismos de ação diferenciada. Em formulados de Bt, poderia ocorrer resistência cruzada somente entre as toxinas que compartilham os mesmos sítios de ligação ou entre as cepas que compartilham as toxinas (TABASHNIK, 1994).

O mecanismo de resistência primária envolve a redução de afinidade em sítios de ligação entre as toxinas de Bt e as microvilosidades das células epiteliais entéricas. Os outros mecanismos potenciais seriam a redução da solubilização ou da ativação da toxina e redução na sensibilidade dos eventos pós-ligação (TABASHNIK, 1994).

Podem ser adotadas algumas táticas na tentativa de gerenciar os problemas de resistência, tais como a mistura de toxinas, o sinergismo (ocorre com as toxinas de Bti), a rotação de inseticidas, o mosaico (áreas adjacentes tratadas com diferentes toxinas), a alta dosagem e o refúgio (reservatórios com insetos susceptíveis), expressão da toxina em tecido e tempo específicos e combinação de Bt com inimigos naturais (TABASHNIK, 1994; NEPPL, 2000). Mas não há evidências suficientes para estas proposições.

Em controles de populações de borrachudos, ainda não foram registradas resistências adquiridas aos formulados de Bti. Este fato, provavelmente está relacionado ao complexo modo de ação. A proteína citotóxica CytA age de forma sinérgica com as proteínas Cry citolíticas, além disso, ambas apresentam alvos celulares diferenciados dificultando o aparecimento de resistência. As diferentes toxinas do Bti apresentam diferentes modos de ação. Recentemente, descobriram que a CytA é ativa também em besouros pragas de algodão. Surge assim, a esperança para o desenvolvimento de uma segunda geração de inseticidas biológicos pela combinação de proteínas CytA/Cry (A Strategy to Overcome Pest Resistance to Bt, 1997).

Devido ao efeito sinérgico supra mencionado a seleção de populações resistentes é dificultada, ao contrário, dos inseticidas químicos. ANDRADE & CASTELLO BRANCO JR. (1991) em controles com altas concentrações de Temephos perceberam ausência ou baixa mortalidade em populações nunca tratadas, porém, localizadas na adjacência de áreas tratadas. Os autores suspeitaram que a baixa susceptibilidade foi em



consequência do baixo grau de isolamento entre populações. No Paraná (Tibagi e Rolândia) e em São Paulo (Morungaba), CAMPOS & ANDRADE (2002) encontraram populações resistentes ao Temephos em áreas que nunca tinham sido submetidas ao controle direto. Estas regiões estão localizadas em áreas de intensa atividade agropecuária e a baixa susceptibilidade é explicada como resultado de resistência cruzada. Na Argentina, MONTAGNA *et al.*, (2003) detectaram populações de *Simulium* resistentes ao DDT e a piretróides na primeira aplicação. Estes inseticidas não são utilizados em controle de borrachudos. A resistência aos inseticidas supra referidos é atribuída à exposição prévia aos inseticidas agrícola. ARAÚJO-COUTINHO *et al.* (2003), no Rio Muricana do município de Parati, Rio de Janeiro, obtiveram redução no número de larvas de *S. pertinax* com 0,03 ppm de Temephos confirmando assim a eficácia onde não há populações resistentes ao ingrediente ativo deste químico. O mecanismo de resistência está associado à elevada atividade de esterase. Dois testes de campo, rápidos e práticos, foram propostos por ANDRADE & CASTELLO BRANCO JR. (1990) visando detectar resistência em populações de simulídeos. Um deles foi baseado no nível de esterases larvares e o outro, na resistência dos adultos expostos ao larvicida topicamente.

### **2.5. Avanços tecnológicos**

Nos últimos tempos, têm sido usados os benefícios da biotecnologia para aperfeiçoar ou para produzir novos inseticidas. Os pesquisadores inseriram genes de Bt, codificadores das  $\delta$ -endotoxinas, em culturas de algodão, batata, milho e tomates modificando-lhes o genoma. Estas plantas expressam toxina Cry ativa em seus tecidos e matam insetos-praga que delas se alimentam (DEACON, 2004). São plantas transgênicas que produzem sua própria proteína tóxica (VAN RIE *et al.*, 1990). Existe preocupação constante com o uso de pesticidas biológico ou químico, relacionados com a seleção de insetos resistentes ao ingrediente ativo. Este fato requer medidas estratégicas para minimizar os riscos de pressão seletiva de insetos (VAN RIE *et al.*, 1990; ALTMAN *et al.*, 1992; DEACON, 2004).

A biotecnologia também é utilizada para produzir cepas mutantes de Bt capazes de sintetizar maiores quantidade de  $\delta$ -endotoxinas por célula, isto deixa formulações

mais eficientes e econômicas (ZELSON & AGRIS, 1994).

PARK *et al.* (2003) descreveram uma cepa de Bti recombinante que produz Cyt1Aa, Cry11Ba e a toxina binária de *Bacillus sphaericus*, que é significativamente mais tóxica a larvas de *C. quinquefasciatus*.

No ambiente, o Bti é biodegradável após sua aplicação, apenas uma pequena atividade residual permanece por vários dias. A persistência mais longa no meio depende do tipo de formulação utilizada. Os comprimidos e briquetes são destinados para aumentar a atividade residual. LEE *et al.* (2003) preparam um complexo argila-toxina a partir de toxina do Bti para deixá-lo mais estável e resistente à degradação. Aplicaram este preparado em insetos-alvo e a mortalidade foi similar a da toxina livre de Bti (85-100%). Transcorridos 45 dias do preparo verificaram a persistência do complexo em água não estéril. Refizeram os bioensaios, obtendo resultado de mortalidade significativamente maior (63%) contra a toxina livre de Bti (25%). Uma outra formulação produzida na FIOCRUZ denominada INPALBAC com o objetivo de deixá-la menos densa que água a fim de permanecer mais tempo na sua superfície. Em teste de campo demonstrou alta eficiência (MARDINI *et al.*, 1999).

Constantemente são isoladas novas cepas de bactérias, como por exemplo, *Clostridium bifermentans* sorovar *malaysia* e *Clostridium bifermentans* sorovar *paraiba*. Ambas são altamente tóxicas para *Anopheles* Meigen, 1818 (CHARLES & NIELSEN-LEROUX, 2000). A primeira das duas cepas é tóxica também para *Simulium* sp, embora em menor índice que para Culicidae (CHARLES & NIELSEN-LEROUX, 2000). A clonagem de genes codificadores de toxinas em outras bactérias também tem sido utilizada.

Os avanços biotecnológicos destinados à obtenção de novos bioprodutos tóxicos requerem inúmeros ensaios laboratoriais para comprovar sua eficácia em organismos-alvo. Quando direcionados ao biocontrole de simulídeos, devem dispor de um aparato facilmente manejável, eficaz e econômico para proceder bioensaios laboratoriais com larvas de *Simulium*. Na literatura, encontram-se diversos aparatos utilizados em bioensaios laboratoriais que permitem verificar a susceptibilidade de larvas ou a

potência dos inseticidas biológicos (LACEY & MULLA, 1977; COLBO & THOMPSON, 1978; GAUGLER *et al.*, 1980; LACEY *et al.*, 1982; CAR, 1984; BARTON *et al.*, 1991). Contudo, estes aparatos nem sempre são viáveis em condições do espaço físico de que se dispõe para montá-los ou são economicamente inacessíveis. Em bioensaios laboratoriais com formulados, obtêm-se resultados preliminares que servem como base nas aplicações de campo. A partir de experimentos laboratoriais, é possível selecionar as melhores dosagens para aplicar em testes de campo. ARAÚJO-COUTINHO (1995) verificaram no campo a susceptibilidade de Bti com larvas de *S. pertinax* por ser epidemiologicamente importante no sul e sudeste do Brasil.

## 2.6. Controle de Simuliidae

O uso de proteínas tóxicas de Bti apresenta vantagens em relação aos inseticidas químicos, como por exemplo, o alto grau de especificidade ao organismo-alvo e a rápida degradação (McGAUGHEY & WHALON, 1992). Sendo assim, é uma alternativa ao controle de pragas e relativamente segura ao ambiente. Por ter um modo de ação específico, Bti é um inseticida com mínimos efeitos ambientais. O rótulo traz as advertências de que o produto pode ser tóxico se for inalado ou absorvido pela pele. Seguindo corretamente as recomendações, praticamente não há efeitos adversos sobre aplicadores, animais mamíferos, plantas, insetos benéficos, peixes, anelídeos, anfíbios, pássaros, moluscos e crustáceos (GLARE & O'CALLAGHAN, 1998; AQUABAC<sup>®</sup> Technical Bulletin, 2003). Algumas espécies de Chironomidae têm apresentado susceptibilidade a altas dosagens de Bti. ARAÚJO-COUTINHO *et al.* (2003) não detectaram nesta família espécies susceptíveis a dosagem testada, nem nos outros grupos da entomofauna fluvial associada a *S. pertinax*, como Bactidae, Blephariceridae, Megapodagrionidae e Hydropsychidae. MOLLOY (1992) atribuiu alta margem de segurança aos insetos não-alvos inclusive aos chironomídeos, excetuando as espécies filtradoras de *Rheotanytarsus* Thienemann & Bause, 1913, que são moderadamente susceptíveis. Chironomidae tem demonstrado susceptibilidade a altas dosagens de Bti, mas não aos níveis utilizados no campo nos programas de controle (IPCS, 1997). Espécimes de *Appis mellifera* Linnaeus, 1758 são susceptíveis quando expostas ao crescimento vegetativo de *Bacillus thuringiensis thuringiensis* e *Bacillus*

*thuringiensis kurstaki*, mas não aos esporos e cristais (IPCS, 1997). Entretanto, essa não tem demonstrado susceptibilidade às toxinas de Bti (*in* GLARE & O'CALLAGHAN *apud* Krieg *et al.* 1980). Igualmente, são seguros para humanos e outros mamíferos e em reservatórios de água destinada ao consumo (IPCS, 1997).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Localidade da coleta de larvas**

As larvas de simulídeos para os bioensaios laboratoriais com Bti foram coletadas na área rural, criadouro Riacho dos Padres da Chácara Evíssima, município Almirante Tamandaré (25°18'00"S, 49°18'00"W), distante cerca de 20 km da capital paranaense. A topografia do município é acidentada e guarnecida por rios e riachos que reúnem condições ideais para a procriação de simulídeos. O município situa-se a sudeste e ao norte da Região Metropolitana de Curitiba. É uma área de preservação ecológica ambiental planejada para realização de diversos eventos e lazer. Descrição detalhada da área pesquisada consta em capítulo 1.

#### **3.2. Substratos e coletas de larvas**

As coletas foram realizadas na plataforma de cimento nas dimensões de 10,48 m de comprimento por 1,07 m de largura de vertedouro do último tanque. Neste vertedouro e num trecho do leito do riacho, eram afixados substratos artificiais formados por fragmentos de fitas de plástico compostas de polietileno e polipropileno. Estes substratos permaneciam nestes locais de 15 a 20 dias para serem povoados pelos imaturos de *Simulium*. Decorrido este tempo, as larvas atingiam o tamanho pré-estabelecido ideal para os bioensaios. Nas coletas, as fitas colonizadas eram removidas e substituídas por novas. As colonizadas eram colocadas em sacos plásticos úmidos, acondicionadas em caixas de isopor, contendo cubos de gelo. O tempo de transporte deste material ao laboratório durava aproximadamente uma hora.

#### **3.3. Larvas utilizadas e manutenção no laboratório**

No laboratório, os substratos povoados de larvas foram fragmentados e depositados numa cesta de plástico vazada, submersa em oito litros de água do próprio criadouro fortemente aerada num aquário de vidro. Para evitar o estresse de larvas,

todo este processo de transferência não demorava mais que 20 minutos. A movimentação da água no aquário era acionada por um arejador poroso de sílica.

Em todos os bioensaios com as formulações de Bti optou-se somente por larvas em estágios mais evoluídos, ou seja, com histoblastos levemente diferenciados, nítidos, porém pouco pigmentados. Não foram utilizadas as larvas que atingiram pleno crescimento, apresentando histoblastos nitidamente visíveis e fortemente pigmentados. Estes instares larvares a qualquer momento podem cessar a ingestão do biolarvicida e entrar no estágio pré-pupal ou mesmo empuparem durante os testes. Também foram descartadas as larvas de tamanhos pequenos em estágios iniciais de crescimento. Segundo ANDRADE & CASTELLO BRANCO JR (1991) larvas imaturas são mais susceptíveis aos efeitos de inseticidas que as de últimos instares com histoblastos bem evidentes.

#### **3.4. Aparato simples e econômico para bioensaios**

Em cada bioensaio com Bti foram utilizados 12 frascos com capacidade de 3 litros em duas fileiras paralelas de seis para os bioensaios, acrescidos de outros dois para o controle. Em cada um destes frascos, foram introduzidos sacos de nylon ajustado à borda superior, 2 elementos arejadores porosos de sílica e 2 litros de água do criadouro. Para movimentar o conjunto de 28 elementos arejadores, serviram quatro compressores de ar (Big Air A420 super pump) dotados de três intensidades diferentes de borbulhamento (figura 1). Cada frasco do aparato montado recebeu em média 50 larvas de diferentes espécies, ou seja, neste quesito houve colonização aleatória sendo selecionado apenas o tamanho das mesmas. Os bioensaios foram realizados com um *pool* de larvas de diferentes espécies que foram identificadas no final do experimento ao microscópio estereoscópico. Dos substratos as larvas foram transferidas para as unidades do aparato com um pincel a fim de evitar algum ferimento. Convém destacar que o aparato utilizado é original e foi elaborado para executar os bioensaios em questão.

#### **3.5. Biolarvicidas e concentrações empregadas**

Três agentes industriais microbianos formulados a partir de Bti foram utilizados nesse trabalho: a) Suspensão aquosa de Aquabac<sup>®</sup>xt de Becker Microbial Products,

formulação com 1200UTI mg/l de Bti, sendo a dosagem recomendada de 0,5 a 75mg/l mantida por até 15min; **b)** Suspensão aquosa de Teknar<sup>®</sup> de HP-D Syngenta Proteção de cultivos Ltda, contendo cristais protéicos de linhagem não esporogênica de Bti sorotipo H-14 com 3000UAA mg/l e a dosagem recomendada é de 12ppm/10min e **c)** Solução aquosa de Vectobac<sup>®</sup> 12 AS produzido por Abbott Laboratories north Chicago, IL, contendo 1200UTI mg/l de Bti, e a dosagem sugerida é de 0,05 a 2,5mg/l/10min.

Os formulados de bioinseticida devem ser diluídos antes da sua utilização em bioensaios. Pipetar 1ml do formulado de Bti e diluir em 99ml de água (= solução mãe). Em seguida empregar 1ml desta solução mãe e diluí-la mais uma vez em 99ml de água. A partir desta solução utilizar um volume necessário para obter diferentes concentrações de i.a. contra os insetos-alvo. Este protocolo é recomendado pela WHO (1981). Nos bioensaios deste trabalho, as concentrações de i.a. dos três biolarvicidas variaram de 0,04 a 2,4mg/l. Estas diferentes concentrações de i.a. serviram para analisar as doses letais de 50% (CL<sub>50</sub>). As concentrações empregadas de Teknar<sup>®</sup> foram 0,04; 0,32; 0,5; 1,2; e 2,4mg/l, as de Vectobac<sup>®</sup> foram 0,3; 0,5; 2,1 e 2,4mg/l, e as de Aquabac<sup>®</sup> de 0,2; 0,32; 0,4; 0,52; 0,8; 1,2 e 2,4mg/l. Foram efetuadas quatro repetições para cada concentração. Os experimentos com estas concentrações foram executados de fevereiro a maio de 2004. A partir dos resultados de CL<sub>50</sub>, optou-se por avaliar as concentrações 0,2 e 0,32mg/l, porque estas estão próximas das médias encontradas para Vectobac<sup>®</sup> e Aquabac<sup>®</sup>. Estes bioensaios foram executados no período de fevereiro a setembro de 2004.

### **3.6. Colonização por larvas no aparato e procedimentos em bioensaios**

Com o auxílio de um pincel, cerca de 50 larvas de estágios supra especificados foram transferidas das fitas mantidas na cesta de aquário aerado para os frascos de bioensaios e de controle. Nestes recipientes, as larvas repousaram por 30 minutos antes de serem expostas aos biolarvicidas. A exposição de larvas ao biolarvicida durou 10 minutos. Decorrido este tempo, interrompeu-se a exposição aos ingredientes ativos, os sacos de nylon com larvas foram transferidos para outros frascos só com água do criadouro e deixadas assim durante 4h50, perfazendo um total de 5 horas de duração.



Figura 1. Aparato simples e econômico utilizado em bioensaios com formulações de Bti e larvas de espécies de *Simulium*.

Em seqüência interrompeu-se o experimento e conferiu-se o índice de mortalidade larvar. Foram consideradas larvas mortas as que não mais respondiam aos estímulos mecânicos ao toque feito com pinça ou pincel. Em cada bioensaio utilizou-se um *pool* de larvas de diferentes espécies que ao final da exposição foram identificadas e computadas.

### **3.7. Identificação das espécies de *Simulium***

Após a conclusão de cada série de bioensaios procedeu-se a identificação das larvas de *Simulium* submetidas ao experimento. A identificação das espécies de *Simulium* foi baseada em características morfológicas específicas das manchas de apótemas cefálicos e em ramificações dos filamentos branquiais contidos em histoblastos. As chaves taxonômicas de STRIEDER *et al.* (1992) e HAMADA *et al.* (2003) também serviram de suporte técnico na identificação.

### **3.8. Verificação de temperatura e pH**

Em cada bioensaio, as temperaturas iniciais e finais da água e do ambiente laboratorial foram verificadas com um termômetro de álcool de marca ARBA, com graduação negativa na escala de -10°C e positiva de 62°C. O pH da água também foi

conferido com um peagâmetro Nova Técnica. Estes dados acompanharam os registros da mortalidade de larvas nas planilhas de bioensaios.

### **3.9. Análise estatística dos resultados**

O programa de computador Micro Probit 3.0, IBM PC & Compatibles foi empregado para analisar as concentrações letais  $CL_{50}$ . A análise de probito é comumente utilizada para quantificar taxas de mortalidade de uma determinada população submetida a um componente tóxico. Com auxílio de planilhas eletrônicas em programa de Excel os resultados de  $CL_{50}$  foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e de Comparações Múltiplas. Para verificar se houve diferença significativa, entre os experimentos nas concentrações próximas de biolarvicidas de Bti utilizados, os resultados foram submetidos ao Ajuste do Modelo Estrutural Linear (= Análise das Categóricas) pelo Programa Computacional SAS 8.02.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Espécies de *Simulium* em bioensaios com diferentes formulados do Bti**

Nas análises de probito, para os cálculos das  $CL_{50}$ , levou-se em conta somente as espécies com presenças mais expressivas. Os experimentos com concentrações que variaram de 0,04 a 2,4mg/l foram realizados com *Simulium inaequale*, *S. perflavum*, *S. pertinax*, *S. orbitale* e *S. subnigrum*. E nos bioensaios com concentrações de 0,2 e 0.32mg/l foram executados com todas espécies supra citadas, incluindo *S. distinctum*. Em coletas de larvas no criadouro Riacho dos Padres, para os bioensaios, a quantidade de exemplares variou para as diferentes espécies de *Simulium*. Este fato explica o número diferente de exemplares de cada espécie em experimentos.

### **4.2. Variações da temperatura durante os testes**

Durante os bioensaios de  $CL_{50}$  ocorreram oscilações de temperatura do ambiente e da água contida nos recipientes do aparato. Em testes com Teknar<sup>®</sup>, a temperatura da água oscilou de 20,5°C a 24,5°C e a ambiental, de 21,8°C a 26,8°C. Em bioensaios com Vectobac<sup>®</sup>, a temperatura da água manteve-se entre 20,8°C e 23,0°C e a ambiental, entre 22,5°C e 25,8°C. Com o larvicida Aquabac<sup>®</sup>, a temperatura da água oscilou de 21,0°C a 25,0°C e a do ambiente, de 21,8°C a 27,3°C (tabela 5, apêndice).



Em geral, houve oscilação de temperatura da água e do ambiente nos testes com as três formulações de Bti, a máxima e mínima foi de 24,5°C a 20,5 (±4,0°C) e 27,3°C a 21,8 (± 5,5°C), respectivamente. A diferença registrada entre ambas foi de 1,5°C.

### 4.3. Proporções de espécies em bioensaios com diferentes concentrações de Bti

Nos bioensaios, em concentrações que variaram de 0,04 a 2,4mg/l, um total de 3.134 larvas foram expostas aos efeitos das formulações de Bti. Resultando 2.430 larvas que foram atingidas pelo biolarvicida e 704 que permaneceram vivas (tabela 1). Desse total 925 larvas (29,5%) eram de *S. perflavum*, 344 (10,9%) de *S. inaequale*, 810 (25,8%) de *S. orbitale*, 754 (24,1%) de *S. pertinax* e 301 (9,6%) de *S. subnigrum*. Estes bioensaios foram realizados com larvas coletadas nos meses de fevereiro, março, abril e maio de 2004. A proporção de larvas para cada espécie testada em cada uma das repetições foi diferenciada. Nos ensaios elaborados a taxa de mortalidade dos frascos controle foi inferior a 5%.

Tabela 1. Número total de larvas de espécies de *Simulium* analisadas em bioensaios com concentrações de 0,04 a 2,4 mg/l dos três biolarvicidas

Espécies Larvicida	<i>S. perflavum</i>		<i>S. inaequale</i>		<i>S. orbitale</i>		<i>S. pertinax</i>		<i>S. subnigrum</i>	
	☺	†	☺	†	☺	†	☺	†	☺	†
<b>Teknar<sup>®</sup></b>	63	224	17	94	65	227	26	154	17	71
<b>Vectobac<sup>®</sup></b>	70	181	10	60	21	168	29	153	8	74
<b>Aquabac<sup>®</sup></b>	130	257	29	134	110	219	79	313	30	101
<b>Subtotal</b>	<b>263</b>	<b>662</b>	<b>56</b>	<b>288</b>	<b>196</b>	<b>614</b>	<b>134</b>	<b>620</b>	<b>55</b>	<b>246</b>
<b>Porcentagem</b>	<b>8,4</b>	<b>21,1</b>	<b>1,8</b>	<b>9,2</b>	<b>6,2</b>	<b>19,6</b>	<b>4,3</b>	<b>19,8</b>	<b>1,7</b>	<b>7,8</b>
<b>Σ Total</b>	<b>925</b>		<b>344</b>		<b>810</b>		<b>754</b>		<b>301</b>	

Legenda: ☺ = larvas vivas; † = larvas mortas.

### 4.4. Concentrações letais CL<sub>50</sub>

#### a) Larvicida Teknar<sup>®</sup>

Para o larvicida Teknar<sup>®</sup>, as dosagens empregadas foram de 0,04; 0,32; 0,5; 1,2; e 2,4mg/l. Foram feitas quatro repetições para cada concentração e, ao final, após a análise através do programa de probito, foram obtidas as seguintes CL<sub>50</sub>: 0,054; 0,038; 0,049; 0,022 e 0,014mg/l (tabela 2). Estas dosagens correspondem respectivamente à *S. perflavum*, *S. inaequale*, *S. orbitale*, *S. pertinax* e *S. subnigrum*.

#### b) Larvicida Vectobac<sup>®</sup>

As dosagens de Vectobac<sup>®</sup> submetidas ao teste foram de 0,3; 0,5; 2,1 e 2,4mg/l, também com quatro repetições cada uma. A mesma seqüência utilizou-se para em espécies acima referidas e obtendo as CL<sub>50</sub> de 0,186; 0,373; 0,401; 0,040 e 0,404mg/l (tabela 2).

### c) Larvicida Aquabac<sup>®</sup>

Com o larvicida Aquabac<sup>®</sup>, sete diferentes dosagens foram avaliadas. São elas 0,2; 0,32; 0,4; 0,52; 0,8; 1,2 e 2,4mg/l, novamente com quatro repetições cada uma. As CL<sub>50</sub> foram 0,377; 0,245; 0,152; 0,050 e 0,240mg/l para as mesmas espécies e na mesma seqüência já mencionada (tabela 2).

De posse de resultados das variáveis de dosagens, total de larvas empregadas e das que responderam positivamente ao efeito do i.a. de Bti, calculou-se as CL<sub>50</sub> pelo Programa Micro Probit 3.0. A mortalidade larvar (CL<sub>50</sub>) difere no três formulados utilizados para as cinco espécies de *Simulium* (figura 2). Estas mesmas DL<sub>50</sub> foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e a comparações múltiplas (tabela 3).

Tabela 2. Concentração letal 50% (CL<sub>50</sub> mg/l) de Bti e intervalo de confiança para os três formulados nas concentrações de 0,04 a 2,4mg/l com larvas de *Simulium*

Espécies	F o r m u l a d o s		
	Teknar <sup>®</sup>	Vectobac <sup>®</sup>	Aquabac <sup>®</sup>
<i>S. perflavum</i>	CL <sub>50</sub> = 0.054 (0,015 - 0,107)	CL <sub>50</sub> = 0.186 (0,065 - 0,295)	CL <sub>50</sub> = 0.377 (0,000 - 0,783)
<i>S. inaequale</i>	CL <sub>50</sub> = 0.038 (0,008 - 0,079)	CL <sub>50</sub> = 0.373 (0,289 - 0,427)	CL <sub>50</sub> = 0.245 (0,003 - 0,363)
<i>S. orbitale</i>	CL <sub>50</sub> = 0.049 (0,024 - 0,080)	CL <sub>50</sub> = 0.401 (0,214 - 0,557)	CL <sub>50</sub> = 0.152 (0,023 - 0,256)
<i>S. pertinax</i>	CL <sub>50</sub> = 0.022 (0,002 - 0,064)	CL <sub>50</sub> = 0.040 (0,000 - 0,183)	CL <sub>50</sub> = 0.050 (0,002 - 0,124)
<i>S. subnigrum</i>	CL <sub>50</sub> = 0.014 (0,000 - 0,053)	CL <sub>50</sub> = 0.404 (0,164 - 0,651)	CL <sub>50</sub> = 0.240 (0,071 - 0,348)

CL: Concentração letal mg/l; valores entre parênteses são intervalos de confiança entre a maior e a menor dosagem ao nível de 95%.

As porcentagens de mortalidade das larvas de *S. perflavum*, *S. inaequale*, *S. orbitale*, *S. pertinax* e *S. subnigrum* variaram com as diferentes dosagens empregadas de Teknar<sup>®</sup>, Vectobac<sup>®</sup> e Aquabac<sup>®</sup>. Estas recorrências e as dosagens utilizadas mostraram-se suficientes para testar o aparato montado e para calcular as CL<sub>50</sub> pelo probito.

Tabela 3. Análise de variância e as médias das  $CL_{50}$  para três formulados de *Bacillus thuringiensis israelensis* em bioensaios com larvas de *Simulium*

Tratamentos	$CL_{50}$	Teste DMS*	Desvio padrão (s)
Teknar <sup>®</sup>	0,035	a	0,017
Vectobac <sup>®</sup>	0,281	bc	0,162
Aquabac <sup>®</sup>	0,213	c	0,121

\*Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ). DMS Diferença mínima significativa.

#### 4.5. Bioensaios em concentrações de 0,2, e 0,32mg/l

Em análises das  $CL_{50}$  de Vectobac<sup>®</sup> e Aquabac<sup>®</sup> percebeu-se que as concentrações estavam muito próximas (tabela 3). As médias de suas concentrações (0,281 e 0,213mg/l) não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Outros bioensaios foram reproduzidos com as concentrações 0,2 e 0,32mg/l a fim de averiguar se as duas formulações realmente se equivalem como biolarvicidas contra larvas de simúlídeos. Nestes bioensaios, 10.918 larvas foram testadas. Deste total, 6.658 foram sensíveis à ação tóxica do Bti com um índice de mortalidade de 61,0% (tabela 4).

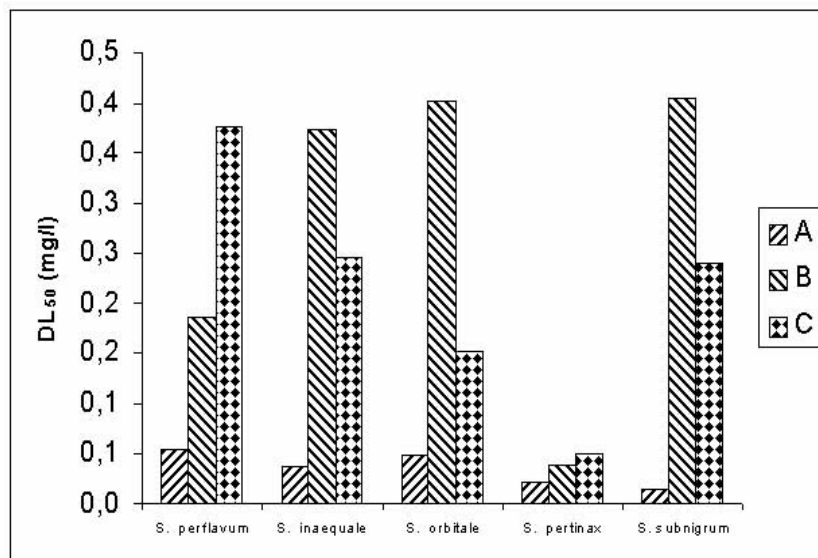


Figura 2. Concentrações letais ( $CL_{50}$ ) para os três tratamentos testados contra larvas de *Simulium*. Legenda: A Teknar, B Vectobac, C Aquabac.

No período da realização dos bioensaios, *S. orbitale*, *S. pertinax*, *S. perflavum* e *S. subnigrum* foram as espécies mais abundantes para as larvas com 3.434 (31,4%), 2.777 (25,4%), 2.189 (20,1%) e 1.798 (16,5%) exemplares, respectivamente. As outras duas

espécies, *S. inaequale* com 455 (4,2%) e *S. distinctum* com 265 (2,4%), acusaram presença em número de exemplares bastante inferiores.

Tabela 4. Número total de larvas de *Simulium* testadas e seus percentuais de mortalidade nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l dos biolarvicidas de Bti.

Larvicida	Testadas	Mortas	Vivas	% mortalidade
Teknar <sup>®</sup>	3646	2777	869	76,2 a
Vectobac <sup>®</sup>	3686	2289	1397	62,1 b
Aquabac <sup>®</sup>	3586	1592	1994	44,4 c
<b>Σ Total</b>	<b>10918</b>	<b>6658</b>	<b>4260</b>	<b>---</b>

Os percentuais de mortalidade em letras diferentes são significativamente diferentes entre si pela análise das categóricas ao nível de 95%.

Quando utilizadas as concentrações de 0,2 e 0,32mg/l, as temperaturas do ambiente e a da água, respectivamente, variaram de 15 a 28°C e 14 a 23,5°C em experimentos de Teknar<sup>®</sup>; de 14,5 a 28°C e 14 a 23,5°C em Vectobac<sup>®</sup> e de 14,5 a 27,3 e 14 a 25°C, em Aquabac<sup>®</sup>. As médias e os desvios padrão das temperaturas e do pH variaram pouco, já as percentagens de mortalidade oscilaram mais. O potencial hidrogeniônico (pH) durante os bioensaios variou de neutro a levemente básico (7,1 a 8,7). No geral, a diferença no gradiente hidrogeniônico durante os testes foi de apenas 1,6. Portanto, esta diferença não deve ter influenciado no índice da mortalidade de larvas (tabelas 10A e 11A, 12B e 13B, 14C e 15C, apêndices).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Considerações sobre fatores ambientais

Nos meses de execução de bioensaios a temperatura da água e do ambiente não foi controlada artificialmente. Alguns testes, nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l, foram executados nos meses de outono e inverno quando a temperatura mínima esteve próxima a 15°C. Esta temperatura não deve ter comprometido as taxas de mortalidade, pois PALMER *et al.* (1996) e COLBO & O'BRIEN (1984) registraram altos níveis de mortalidade em baixas temperaturas em torno de 11°C e 7°C, respectivamente. LACEY *et al.* (1978) não registraram diferenças significativas de mortalidade com Bti ao nível de confiança de 0,05 entre as temperaturas de 19° e 24°C.

Existe correlação positiva entre a gradação da temperatura e a mortalidade. LACEY *et al.* (1978) suspeitavam que a queda da mortalidade em temperaturas baixas fosse consequência de queda no pH intestinal ou na atividade alimentar. Entretanto, os experimentos laboratoriais não confirmaram estas hipóteses. Houve influência na taxa de alimento ingerido, mas sem diferenças significativas. É provável que a mortalidade diferenciada entre temperaturas baixa e elevada seja atribuída à cinética de ataque enzimático sobre a  $\delta$ -endotoxina com subseqüentes lesões do epitélio entérico. A variação de pH da água em bioensaios com 0,2 e 0,32mg/l foi de 7,1 a 8,7. Estes valores também não devem ter influenciado os resultados dos experimentos. Nos testes de LACEY *et al.* (1978), os efeitos com Bt na mortalidade em pH 6,0-7,0-8,2 e 10 não registraram diferenças.

## **5.2. Considerações sobre o aparato utilizado em bioensaios**

Os arejadores utilizados mantiveram alta oxigenação da água e permitiram o fluxo constante do alimento disponível na água para as larvas em testes. BARTON *et al.* (1991) recomendam que qualquer aparato utilizado em laboratório para a avaliação de formulados de Bti, contra larvas de simuliídeos, deve gerar na água turbulência capaz de estimular a alimentação por filtração normal de larvas. As dimensões destas partículas alimentares variam muito. LOZOVEI (1994) no estudo do conteúdo entérico de larvas de *Simulium* mediu 12.767 microalgas ingeridas cujos tamanhos predominaram de 1 a 100 $\mu$ m, embora houvesse maiores que 100 $\mu$ m. DELLOME-FILHO (1989) encontrou microalgas com dimensões desde 9 até 271 $\mu$ m no conteúdo intestinal de larvas. KETTLE (1995) refere que o tamanho das partículas ingeridas pelas larvas variaram de 0,091 $\mu$ m a 350 $\mu$ m de dimensão, ocorrendo mais comumente a ingestão de partículas de 10-100  $\mu$ m. O larvicida Aquabac<sup>®</sup> é formulado em partículas de 2 a 10 $\mu$ m e também outras sob a forma aglomerada (AQUABAC, 2003).

As informações sobre a dimensão de partículas alimentares ingeridas pelas larvas são úteis em aplicações de inseticidas. No entanto, os estudos deveriam prosseguir a fim de aprofundar estes conhecimentos e definir as dimensões mais apropriadas para os diferentes instares larvares, em especial para os instares iniciais.

Diversos aparatos foram desenvolvidos e testados, alguns até sofisticados tecnicamente com a pretensão de superar as dificuldades. Trata-se de insetos reófilos que requerem água em constante movimento. Vários mecanismos têm sido propostos e verificados para fazer a água circular em recipientes de bioensaios. Entre os citados por pesquisadores, destacam-se shaker orbital (BARTON *et al.*, 1991), barras e agitadores magnéticos (CAR, 1984; COLBO & THOMPSON, 1978; UNDEEN & BERL, 1979), haste rotatória interligada por roldanas (LACEY *et al.* 1982), bombas (GAUGLER *et al.*, 1980, UNDEEN & BERL, 1979) e ainda compressores de ar conectados aos arejadores (LACEY & MULLA, 1977). Condições físicas inadequadas ou situações econômicas muitas vezes limitam a possibilidade de utilizar estes aparatos.

Para os experimentos laboratoriais da presente pesquisa, elaborou-se um aparato capaz de fazer a água circular constantemente nos recipientes de 2 litros. O seu desempenho em bioensaios laboratoriais mostrou-se aplicável em testes com larvas de *Simulium*. O baixo custo, a rapidez, a simplicidade e a facilidade para transferir as larvas, contidas em sacos de nylon, de um frasco ao outro em bioensaios são vantagens que favoreceram o uso do aparato elaborado. Em frascos de controle, a taxa de mortalidade foi inferior a 5%. UNDEEN & LACEY (1982) consideram que checando preliminarmente os formulados em laboratório permite poupar tempo no campo. É também uma questão de economia.

### **5.3. Considerações sobre o método de avaliação**

No presente trabalho para evitar o contato de larvas com o larvicida o tempo todo, 10 min. após a exposição as larvas foram transferidas para frascos similares contendo também dois litros de água do próprio criadouro. Ao contrário, BARTON *et al.* (1991) expôs as larvas ao Bti durante 5 horas num aparato montado que funcionou num sistema fechado. ANDRADE (1989) considera que o sistema fechado tem a desvantagem de utilizar um volume limitado de água em circulação contínua.

Depois de alguns ensaios preliminares, optou-se pelo período de observação pós-exposição de 5 horas. BARTON *et al.* (1991) consideram que a leitura da mortalidade 5 horas após a exposição em testes rápidos é eficiente. Entretanto, CAR (1984) sugere que a baixa mortalidade larvar por ele obtida tenha sido provocada pelo período de

exposição de 6 horas e pela pequena quantidade de alimento ingerido. LACEY *et al.* (1982) recomendam determinar a mortalidade em 48 horas pós-exposição e LACEY & MULLA (1977) assim como LACEY *et al.* (1978) reduzem este tempo para 12 horas. ANDRADE & CASTELLO BRANCO JR. (1991) utilizando calhas de madeira, no leito do riacho, para avaliar a eficácia dos larvicidas Vectobac<sup>®</sup> e Abate 500 E a 20°C obtiveram 85,5% de mortalidade para o primeiro larvicida e ausência no segundo em 3 horas de exposição. Estes mesmos autores consideraram o tempo de 3 a 4 horas suficientemente adequado para expressar o efeito do larvicida. ANDRADE & CAMPOS (1995) obtiveram elevada taxa de mortalidade após 4 horas da aplicação que praticamente não se alterou na leitura em 24 horas depois da exposição.

Todos os bioensaios do presente trabalho foram executados com água do próprio criadouro a fim de aproximar às condições naturais de seu habitat fluvial. Desta forma, não houve necessidade de oferecer nutriente adicional às larvas em experimento, pois a própria água fornecia partículas alimentares. GAUGLER *et al.* (1980) também usaram água do criadouro natural em testes laboratoriais. CAR (1984), usando uma mistura de água da chuva e da torneira, a qual considerou como do criadouro natural e de um rio poluído obteve mortalidade de 100 e 80% respectivamente para a concentração de 30ppm.

#### **5.4. Mortalidade de larvas**

A análise de variância das  $CL_{50}$  mostrou que houve uma diferença estatisticamente significativa entre os biolarvicidas utilizados ( $p < 0,05$ ) (tabela 3). O tratamento com Teknar<sup>®</sup> difere estatisticamente dos demais. No entanto, estatisticamente não houve diferença significativa entre Vectobac<sup>®</sup> e Aquabac.

Obtiveram-se diferenças de mortalidade entre os biolarvicidas empregados neste trabalho, mas entre as larvas de *S. perflavum*, *S. inaequale*, *S. pertinax*, *S. subnigrum* e *S. orbitale* não houve diferença significativa de susceptibilidade aos três biolarvicidas. As larvas das espécies utilizadas responderam praticamente de forma semelhante aos efeitos destes formulados. Este resultado difere do que ocorreu no trabalho de LACEY *et al.* (1978) que ao investigarem a susceptibilidade de seis espécies de *Simulium*, coletadas no campo, concluíram que, dentre outras, *Simulium vittatum* Zetterstedt,

1838 e *Simulium argus* Williston, 1883 foram consideravelmente mais sensíveis aos efeitos do Bti. MOLLOY *et al.* (1981) entre as espécies testadas com Bti verificaram que *Simulium verecundum* Stone and Jamnback, 1955 foi significativamente mais susceptível que *S. vittatum*. ANDRADE & CASTELLO BRANCO JR. (1991) em experimento com Vectobac<sup>®</sup> perceberam que as larvas de *S. pertinax* foram altamente susceptíveis.

RUAS-NETO (1984), em testes de campo nas concentrações de 12ppm/1 min. de Vectobac e 15ppm/1min de Teknar<sup>®</sup> obteve resultados semelhantes de mortalidade entre os biolarvicidas utilizados por ele. ANDRADE (1989) também em campo obteve resultados semelhantes de mortalidade entre os larvicidas Teknar<sup>®</sup> e Vectobac<sup>®</sup>.

No presente trabalho a aplicação do teste do ajuste do modelo estrutural linear nos dados finais de mortalidade em concentrações com 0,2 e 0,32mg/l dos biolarvicidas testados mostrou que eles são significativamente diferentes entre si ao nível de 5% (tabela 4). ARAÚJO-COUTINHO & LACEY (1990) ao testarem três produtos em criadouros naturais não detectaram diferença significativa entre Teknar<sup>®</sup> e Vectobac<sup>®</sup>. LACEY & UNDEEN (1984) em condições naturais também não encontraram diferenças significativas entre estes biolarvicidas ( $p=0,01$ ).

## 6. CONCLUSÕES

Os testes estatísticos aplicados em resultados de bioensaios com Teknar<sup>®</sup>, Vectobac<sup>®</sup> e Aquabac<sup>®</sup> nas concentrações que variaram de 0,04, a 2,4mg/l certificaram que as larvas de *S. perflavum*, *S. inaequale*, *S. orbitale*, *S. pertinax* e *S. subnigrum* não apresentaram diferenças significativas quanto à susceptibilidade ( $p<0,05$ ). Disto depreende-se que as espécies em questão não necessitam de tratamento diferenciado com relação aos biolarvicidas utilizados.

Em bioensaios nas concentrações de 0,04 a 2,4 mg/l com biolarvicida Teknar<sup>®</sup> houve diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ). Ao contrário, nas concentrações dentro deste limiar em experimentos com Vectobac e Aquabac não houve diferenças estatisticamente significativas. Os bioensaios realizados com os três formulados



Teknar, Vectobac e Aquabac nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l indicaram que são estatisticamente diferentes entre si ao nível de 5%.

Dos três biolarvicidas utilizados Teknar<sup>®</sup> e Vectobac<sup>®</sup> foram mais efetivos que Aquabac<sup>®</sup> quanto a mortalidade larvar nas concentrações utilizadas em bioensaios laboratoriais. Estes biolarvicidas continuam sendo uma boa alternativa em programas de controle de simuliídeos.

O aparato elaborado e avaliado em bioensaios laboratoriais no presente trabalho mostrou-se funcional.

## 7. REFERÊNCIAS

ALTMAN, D.; WILSON, F.D.; BENEDICT, J.H. & GOULD, F. Biopesticides and resistance. **Science**, v. 255, n. 5047, p. 203-204, 1992.

ANDRADE, C.F.S. & CAMPOS, J. Efetividade de Bactivec, a base de *Bacillus thuringiensis* H-14 no controle de *Bacillus thuringiensis*). **Revista de Patologia Tropical**, v.24, n.2, p. 275-281, 1995.

ANDRADE, C.F. & CASTELO BRANCO JR. A. Susceptibilidade de populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (Culicomorpha, Simuliidae) ao temephos e a um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, n.5, p. 367-370, 1991.

ANDRADE, C.F. & CASTELO BRANCO JR. A. Methods for field detection of resistance to Temephos in simuliids. Larval esterase level and topical application of the inseticide to adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 3, p. 291-297, 1990.

ANDRADE, C.F.S. Manejo integrado de borrachudos. *In*: Seminários sobre Insetos e Ácaros, Anais 3 da Sociedade Entomológica do Brasil do **XI Congresso Brasileiro de Entomologia de 1987**, Campinas, Fundação Cargill, 1989. p. 141-157.

AQUABAC<sup>®</sup> Technical Bulletin. Disponível em:

<<http://www.biconet.com/biocontrol/infosheet/AquabacBulletin.pdf.htm>> Acesso em: 23 fev. 2004.

AQUABAC<sup>®</sup>xt. Biolarvicide biological larvicide aqueous suspension. Disponível em:

<<http://www.adapcoinc.com/displayitem.php?name=Aquabac+xt+Liquid.htm>> Acesso em: 23 fev. 2004.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. PINTO, A.B.; CUNHA, V.; SERRA-FREIRE, N.M. & MELLO, R.P. Evaluation of the impact of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* and

Temephos, used for the control of *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (Diptera, Simuliidae) on the associated entomofauna, Paraty, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 697-702, 2003.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Biological control program against simuliids in the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 1, p. 131-133, 1995.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. & LACEY, L.A. Controle de simulídeos com concentrado emulsionável de *Bacillus thuringiensis*. **Boletim of Sanitaria Panamericana**, v. 108, n. 3, p. 213-219, 1990.

A strategy to overcome pest resistance to Bt (ISB News), 1997. Disponível em: <<http://www.pmac.net/mosquito.htm>> Acesso em: 5 ago 2004.

BARTON, W.E.; NOBLET, R. & KURTAK, D.C. A simple technique for determining relative toxicities of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulations against larval blackflies (Diptera: Simuliidae), **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, n. 2, p. 313-315, 1991.

CAMPBELL, D.P.; DIEBALL, D.E. & BRACKETT, J.M. Rapid HPLC assay for the  $\beta$ -exotoxina of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 156-158, 1987.

CAMPOS, J. & ANDRADE, C.F.S. Resistência a inseticidas em populações de *Simulium* (Diptera, Simuliidae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 661-671, 2002.

CAR, M. Laboratory and field trials with two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products for *Simulium* (Diptera: Nematocera) control in a small polluted river in South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 141-144, 1984.

CAVADOS, C.F.G.; MAJEROWICZ, S.; CHAVES, J.Q.; ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. & RABINOVITCH, L. Histopathological and estrastructural effects of  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 493-498, 2004.

CAVADOS, C.F.G.; MAJOLA, C.; RABINOVITCH, L.; ALVES, R.S.A. Principais programas de controle de vetores de doenças no Brasil utilizando *Bacillus* entomopatogênicos **Vetores e Pragas**, v. 6, p. 19-22, 2000.

CAVADOS, C.F.G.; FONSECA, R.N.; CHAVES, J.Q.; ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. & RABINOVITCH, L. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) larvae and adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 1017-1021, 2001.

- CHARLES, J-F. & NIELSEN-LEROUX, C. Mosquitocidal bacterial toxins: diversidade, mode of action and resistance phenomena. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, suppl. 1, p. 201-206, 2000.
- COLBO, M.H. & O'BRIEN, H. a pilot black fly (Diptera: Simuliidae) control program using *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in Newfoundland. **The Canadian Entomologist**, v. 116, n. 8, p. 1085-1096, 1984.
- COLBO, M.H. & THOMPSON, B.H. An efficient technique for laboratory rearing of *Simulium verecundum* S. & J. (Diptera: Simuliidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, p. 507-510, 1978.
- CRICKMORE, J.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. & DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.
- CUNHA, M. C. I.Simulídeos (borrachudos). In: MARCONDES, C.B. **Entomologia médica e veterinária**. ed. Atheneu, São Paulo, p. 431, 2001.
- DEACON, J. The microbial world: *Bacillus thuringiensis*. Disponível em: <<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/htm>> Acesso em: 5 ago. 2004.
- DELLOME FILHO, JR. Simuliofauna do Rio Marumbi, Morretes, Paraná, Brasil. Microalgas como alimento de larvas se *Simulium incrustatum* Lutz, 1910 (Diptera, Simuliidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, supl. 4, p. 157-163, 1989.
- FAUST, R.M; ADAMS, J.R & HEIMPEL, A.M. Dissolution of the toxic parasporal crystals from *Bacillus thuringiensis* var *pacificus* by gut secretions of the silkworm, *Bombix mori*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, p. 488-99, 1967.
- GAUGLER, R.; MOLLOY, D.; HASKINS, T. & RIDER, G. A bioassay system for the evaluation of black fly (Diptera: Simuliidae) control agents under simulated stream conditions. **Canadian Entomologist** v. 112, p. 1271-1276, 1980.
- GILL, S.S.; COWLES, E.A. & PIETRANTONIO, P.V. The modo of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, v.37, p. 615-636, 1992.
- GLARE, T. R. & O'CALLAGHAN, N. M. **Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis***. Report For The Ministry Of Health. 1998, 58p.
- HAMADA, N.; ALE-ROCHA, R. & LUZ, S.L.B. Description of *Simulium damascenoi* (Diptera: Simuliidae) male and the blackfly species from the state of Amapá, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 353-360, 2003.

IPCS (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY). Environmental Health Criteria 217, *Bacillus thuringiensis*, World Health Organization, 1999. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm>> Acesso em: 19 nov. 2003.

JOUNG, K.B & CÔTE, J.C. A review of the environmental impacts on the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*, **Technical Bulletin**, n. 29, p. 16, 2000.

KETTLE, D.S. **Medical and Veterinary Entomology**. Singapore: CAB International, 1995. 725 p.

KNOWLES, B.H & ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 924, p. 509-518, 1987.

LACEY, L.A. & UNDEEN, A.H. Effect of formulation, concentration, and application time on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* (H-14) against black fly (Diptera: Simuliidae) larvae under natural conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 77, n. 2, p. 412-418, 1984.

LACEY, L.A. & UNDEEN, A.H. & CHANCE, M.M. Laboratory procedures for the bioassay and comparative efficacy evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype 14) against black flies (Simuliidae). **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 12, n. 4, p. 19-23, 1982.

LACEY, L.A.; MULLA, M.S. & DULMAGE, H.T. Some factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against blackflies. **Environmental Entomology**, v. 7, p. 583-588, 1978.

LACEY, L.A. & MULLA, M.S.; A new bioassay unit for evaluating larvicides against blackflies. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 4, p. 453-456, 1977.

LECADET, M. & RAPOPORT, G. La lutte bactériologique contre les insectes. **Annales de l'Institut Pasteur Actualités**, 1997. Disponível em: <<http://www.pasteur.fr/actu/presse/com/dossiers/lutbio.html>> Acesso em: 11 abr. 2003.

LEE, L.; SAXENA, D. & STOTZKY, G. Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4111-4115, 2003.

LOZOVEI, A.L.L. Microalgas na alimentação em larvas de simulídeos (Diptera) em criadouro natural em Curitiba, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 38, n. 1, p. 91-95, 1994.

MARDINI, L.B.L.F.; TORRES, M. A.N.; SILVEIRA, G. L. da.; ATZ, A. M. V.; *Simulium spp* control program in Rio Grande do Sul, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 211-214, 2000.

MARDINI, L.B.L.F.; SOUZA, M.A.T.; RABINOVITCH, L.; ALVES, R.S.A.; SILVA, C.M.B. Field studies whit the bacterial larvicide INPALBAC for *Simulium spp*. Control in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 679-681, 1999.

McGAUGHEY, W.H. & WHALON, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Science**, v. 258, p. 1451-1455, 1992.

MELO, J.L.B.; SOUZA, M.A.T.; OLIVEIRA, S.J.B. Considerações gerais sobre o método de controle mecânico dos simulídeos. **B. Saúde**, v. 11, n. 2, p. 12-16, 1984.

MOLLOY, D.P. Impact of the black fly (Diptera: Simuliidae) control agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on chironomids (Diptera: Chironomidae) and other nontarget insects: results of ten field trials. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 8, n. 1, p. 24-31, 1992.

MOLLOY, D.; GAUGLER, R.; JAMNBACK, H. Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of black fly<sup>1</sup> larvae<sup>2</sup>. **Journal of Economic Entomology**, v. 74, n. 1, 61-64, 1981.

MONTAGNA, C.M.; ANGUIANO, O.L.; GAUNA, L.E. & PECHEN de D-ANGELO, A.M. Mechanisms of resistance to DDT and pyrethroids in Patagonian populations of *Simulium* blackflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 1, p. 95-105, 2003.

MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. & ARRUDA, R. de O.M. Produção de Bioinseticidas. In: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. & SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial, Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001, p.249-276.

MORAES, I.O. & CAPALBO, D.M.F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1986, 1418 p.

NEPPL, C.C. Management of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins, 2000. Disponível em <<http://camillapede.tripod.com/bapaper.html>> Acesso em: 18 ago. 2004.

PALMER, R.W.; EDUARDES, M. & NEVILL, E.M. Downstream carry of larvicides used in the control of pest black flies (Diptera: Simuliidae) in the Orange river, South Africa. **Journal of Vector Ecology**, v. 21, p. 37-47, 1996.

PARK, H-W.; BIDESHI, D.K. FEDERICI, B.A. Recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* producing Cyt1A, Cry11B, and the *Bacillus sphaericus* binary toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1331-1334, 2003.

PETRY, F.; LOZOVEI, A.L.; FERRAZ, M.E. & SANTOS NETO, L.G. Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanque de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 1, p. 127-132, 2004.

RABINOVITCH, L.; CAVADOS, C. de F.G.; CHAVES, J.Q. & ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C.; A new strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* very active against blackfly larvae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 683-685, 1999.

RABINOVITCH, L.; CAVADOS, C.F.G. & LIMA, M.M. Dos *Bacillus* entomopatogênicos o que se espera? **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 6, p. 40-41, 1998.

RABINOVITCH, L.; JESUS, F.F.; CAVADOS, C.F.G.; ZAHNER, V.; MOMEN, H.; SILVA, M.H.L.; COSMAO DUMANOIR, V.; FRACHON, E.; LECADET, M.M. *Bacillus thuringiensis* subsp. *oswaldocruzi* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, two novel brazilian strains which determine new serotype H 38 and H 39, respectively. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 1, p. 41-42, 1995.

RUAS NETO, A.L. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como alternativa no controle de simúlideos no Rio Grande do Sul. 1- Susceptibilidade a campo. **Boletim de Saúde**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 21-26, 1984.

RUAS NETO, A.L.; CALDAS, E.P.; SOUZA, M.A.T. Programa estadual de controle de borrachudos no Rio Grande do Sul, aspectos gerais. **Boletim de Saúde**, v. 11, n. 2, p. 4-7, 1984.

SATO, G.; PEGORARO, R.A. & MOREIRA, G.R.P. Biologia dos simúlideos do Vale do Itajaí. Resumos do Iº **Seminário sobre Vetores Urbanos e Animais Sinantrópicos**, de 2 a 4 jul, São Paulo, S.P. p. 21-22, 1986.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SOUZA, M.A.T.; MAGNI, S.T. Observações preliminares sobre predação de simúlideos por pássaros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL, 1. E CONGRESSO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO ECOLÓGICA, 3., 1988, Ibirubá. **Anais**, p. 4-6.

STRIEDER, M.N.; CORSEUIL, E. & PY-DANIEL, V. Espécies do gênero *Simulium* (Diptera, Simuliidae) ocorrentes no Rio Grande do Sul-Brasil, com chaves para sua identificação. **Acta Biológica Leopoldensia**, v. 14, n. 2, p. 53-74, 1992.

SWADENER, C. *Bacillus thuringiensis* (B.t.). **Journal of Pesticide Reform**, v.14, n.3, p.1-14, 1994. Disponível em: <<http://eap.ncgill.ca/MagRack/JPR/JPR22.htm>> Acesso em 31 dez. 2003.

TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Entomology**, v. 39, p. 47-79, 1994.

TEKNAR<sup>®</sup> LARVICIDA. Solução eficaz contra mosquitos e borrachudos. **Syngenta**, 2002.

UNDEEN, A.H. & LACEY, L.A. Field procedures for the evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype 14) against black flies (Simuliidae) and nontarget organisms in streams. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v 12, n. 4, p. 25-30, 1982.

UNDEEN, A.H. & BERL, D. Laboratory studies on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac against *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) larvae. **Mosquito News**, v. 39, n. 4, p. 742-745, 1979.

VAN RIE, J.; MCGAUGHEY, W.H.; JOHNSON, D.E.; BARNETT, B.D. & VAN MELLAERT, H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 247, n. 4938, p. 72-74, 1990.

VECTOBAC 12 AS. Products. Disponível em: <<http://www.agrobiological.com/products/P87.htm>> Acesso em: 15 dez. 2003.

VECTOBAC 12 AS. Biological Larvicide. Disponível em: <http://www.plymouthmosquito.com/vectobac.htm> Acesso em: 5 ago. 2004.

WALTHER, C.J.; COUCHE, G.A.; PFANNENSTIEL, M.A.; EGAN, S.E.; BIVIN, L.A. & NICKERSON, K.W. Analysis of mosquito larvicidal potencial exhibited by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 650-653, 1986.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on informal consultation on standardization of *Bacillus thuringiensis* H-14. Mimeographed documents TDR/BVC/BTH-14, WHO/VCB/81-828, Geneva, 1981.

ZELSON, S.T. & AGRIS, C.H. Disponível em: <[http://www.nal.usda.gov/bic/Biotech\\_Patents/1994patents/05279962.html](http://www.nal.usda.gov/bic/Biotech_Patents/1994patents/05279962.html)> Acesso em 2 jan. 2004.

## APÊNDICES

Tabela 5. Oscilação da temperatura da água e ambiental durante os bioensaios com diferentes formulações de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

Larvicida	Temperatura da água (°C)	Variação (°C)	Temperatura ambiente (°C)	Variação (°C)
<b>Teknar</b>	20,5-24,5	4	21,8-26,8	5
<b>Vectobac</b>	20,8-23	2,2	22,5-25,8	3,3
<b>Aquabac</b>	21-25	4	21,8-27,3	5,5

Tabela 6. Frequência de larvas das diferentes espécies no conjunto capturado no mês de fevereiro e usado em bioensaios com diferentes concentrações do bioinseticida *Bacillus thuringiensis israelensis*.

	<i>S. perflavum</i>		<i>S. Inaequale</i>		<i>S. orbitale</i>		<i>S. pertinax</i>		<i>S. subnigrum</i>	
	☺	†	☺	†	☺	†	☺	†	☺	†
<b>Teknar</b>	21	48	13	36	44	89	15	60	14	39
<b>Vectobac</b>	5	51	2	26	3	63	13	105	4	42
<b>Subtotal</b>	26	99	15	62	47	152	28	165	18	81
<b>Σ Total</b>	<b>125</b>		<b>77</b>		<b>199</b>		<b>193</b>		<b>99</b>	

Tabela 7. Frequência de larvas das diferentes espécies no conjunto capturado no mês de março e usado em bioensaios com diferentes concentrações do bioinseticida *Bacillus thuringiensis israelensis*.

	<i>S. perflavum</i>		<i>S. Inaequale</i>		<i>S. orbitale</i>		<i>S. pertinax</i>		<i>S. subnigrum</i>	
	☺	†	☺	†	☺	†	☺	†	☺	†
<b>Teknar</b>	10	100	1	23	3	73	3	62	2	23
<b>Vectobac</b>	31	75	3	11	2	34	2	18	1	20
<b>Aquabac</b>	63	191	11	90	85	180	65	289	24	88
<b>Subtotal</b>	104	366	15	124	90	287	70	369	27	131
<b>Σ Total</b>	<b>470</b>		<b>139</b>		<b>377</b>		<b>439</b>		<b>158</b>	

Tabela 8. Frequência de larvas das diferentes espécies no conjunto capturado no mês de abril e usado em bioensaios com diferentes concentrações do bioinseticida *Bacillus thuringiensis israelensis*.

	<i>S. perflavum</i>		<i>S. Inaequale</i>		<i>S. orbitale</i>		<i>S. pertinax</i>		<i>S. subnigrum</i>	
	☺	†	☺	†	☺	†	☺	†	☺	†
<b>Teknar</b>	32	76	3	35	18	65	8	32	1	9
<b>Vectobac</b>	28	48	4	22	15	61	10	13	3	8
<b>Aquabac</b>	67	66	18	44	25	39	14	24	6	13
<b>Subtotal</b>	127	190	25	101	58	165	32	69	10	30
<b>Σ Total</b>	<b>317</b>		<b>126</b>		<b>223</b>		<b>101</b>		<b>40</b>	



Tabela 9. Frequência de larvas das diferentes espécies no conjunto capturado no mês de maio e submetidas aos bioensaios com diferentes concentrações do bioinseticida *Bacillus thuringiensis israelensis*.

	<i>S. perflavum</i>		<i>S. Inaequale</i>		<i>S. orbitale</i>		<i>S. pertinax</i>		<i>S. subnigrum</i>	
	☺	†	☺	†	☺	†	☺	†	☺	†
<b>Vectobac</b>	6	7	1	1	1	10	4	17	0	4
<b>Subtotal</b>	6	7	1	1	1	10	4	17	0	4
<b>Σ Total</b>	<b>13</b>		<b>2</b>		<b>11</b>		<b>21</b>		<b>4</b>	

Tabela 10A. Médias e desvios padrão da temperatura da água e do ambiente durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l do biolarvicida Teknar.

Espécies	Temperatura da água		Temperatura ambiente	
	0,2mg/l	0,32mg/l	0,2mg/l	0,32mg/l
<i>S. distinctum</i>	18,3 ± 3,2	21,3 ± 1,4	20,3 ± 3,9	22,9 ± 1,6
<i>S. perflavum</i>	18,3 ± 3,2	21,3 ± 1,4	20,3 ± 3,9	22,9 ± 1,6
<i>S. inaequale</i>	18,3 ± 3,2	21,3 ± 1,4	20,3 ± 3,9	22,9 ± 1,6
<i>S. orbitale</i>	18,3 ± 3,2	21,3 ± 1,4	20,3 ± 3,9	22,9 ± 1,6
<i>S.pertinax</i>	18,3 ± 3,2	21,3 ± 1,4	20,3 ± 3,9	22,9 ± 1,6
<i>S.subnigrum</i>	18,3 ± 3,2	21,3 ± 1,4	20,3 ± 3,9	22,9 ± 1,6

Tabela 11A. Médias e desvios padrão do pH e percentagem de mortalidade durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l do biolarvicida Teknar.

Espécie	pH		Mortalidade (%)	
	0,2mg/l	0,32mg/l	0,2mg/l	0,32mg/l
<i>S. distinctum</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	66,7	68,7
<i>S. perflavum</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	56,1	78,9
<i>S. inaequale</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	67,3	75
<i>S. orbitale</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	71,7	79,2
<i>S.pertinax</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	77	78,9
<i>S.subnigrum</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	74,5	99,5

Tabela 12B. Médias e desvios padrão da temperatura da água e do ambiente durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l do biolarvicida Vectobac.

Espécie	Temperatura da água		Temperatura ambiente	
	0,2mg/l	0,32mg/l	0,2mg/l	0,32mg/l
<i>S. distinctum</i>	18,6 ± 3,3	21,2 ± 1,4	20,7 ± 4,2	22,9 ± 1,5
<i>S. perflavum</i>	18,6 ± 3,3	21,2 ± 1,4	20,7 ± 4,2	22,9 ± 1,5
<i>S. inaequale</i>	18,6 ± 3,3	21,2 ± 1,4	20,7 ± 4,2	22,9 ± 1,5
<i>S. orbitale</i>	18,6 ± 3,3	21,2 ± 1,4	20,7 ± 4,2	22,9 ± 1,5
<i>S.pertinax</i>	18,6 ± 3,3	21,2 ± 1,4	20,7 ± 4,2	22,9 ± 1,5
<i>S.subnigrum</i>	18,6 ± 3,3	21,2 ± 1,4	20,7 ± 4,2	22,9 ± 1,5

Tabela 13B. Médias e desvios padrão do pH, e da percentagem de mortalidade durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l do biolarvicida Vectobac.

Espécie	pH		Mortalidade (%)	
	0,2mg/l	0,32mg/l	0,2mg/l	0,32mg/l
<i>S. distinctum</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	52,1	72,7
<i>S. perflavum</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	20,5	63,6
<i>S. inaequale</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	51,1	73,4
<i>S. orbitale</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	60,7	76,9
<i>S.pertinax</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	60,9	60,2
<i>S.subnigrum</i>	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	52	76,4

Tabela 14C. Médias e desvios padrão da temperatura da água e do ambiente durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32mg/l do biolarvicida Aquabac.

Espécie	Temperatura da água		Temperatura ambiente	
	0,2mg/l	0,32mg/l	0,2mg/l	0,32mg/l
<i>S. distinctum</i>	17,5 ± 3,1	21,1 ± 1,4	19,1 ± 3,4	22,8 ± 1,6
<i>S. perflavum</i>	17,5 ± 3,1	21,1 ± 1,4	19,1 ± 3,4	22,8 ± 1,6
<i>S. inaequale</i>	17,5 ± 3,1	21,1 ± 1,4	19,1 ± 3,4	22,8 ± 1,6
<i>S. orbitale</i>	17,5 ± 3,1	21,1 ± 1,4	19,1 ± 3,4	22,8 ± 1,6
<i>S.pertinax</i>	17,5 ± 3,1	21,1 ± 1,4	19,1 ± 3,4	22,8 ± 1,6
<i>S.subnigrum</i>	17,5 ± 3,1	21,1 ± 1,4	19,1 ± 3,4	22,8 ± 1,6

Tabela 15C. Médias e desvios padrão do pH, e da percentagem de mortalidade durante os bioensaios nas concentrações de 0,2 e 0,32 mg/l do biolarvicida Aquabac.

Espécie	pH		Mortalidade (%)	
	0,2mg/l	0,32mg/l	0,2mg/l	0,32mg/l
<i>S. distinctum</i>	7,6 ± 0,5	7,7 ± 0,5	60	50
<i>S. perflavum</i>	7,6 ± 0,5	7,7 ± 0,5	43,8	45,8
<i>S. inaequale</i>	7,6 ± 0,5	7,7 ± 0,5	45,6	50,5
<i>S. orbitale</i>	7,6 ± 0,5	7,7 ± 0,5	31,7	43,2
<i>S.pertinax</i>	7,6 ± 0,5	7,7 ± 0,5	51,7	55,7
<i>S.subnigrum</i>	7,6 ± 0,5	7,7 ± 0,5	38	53,6