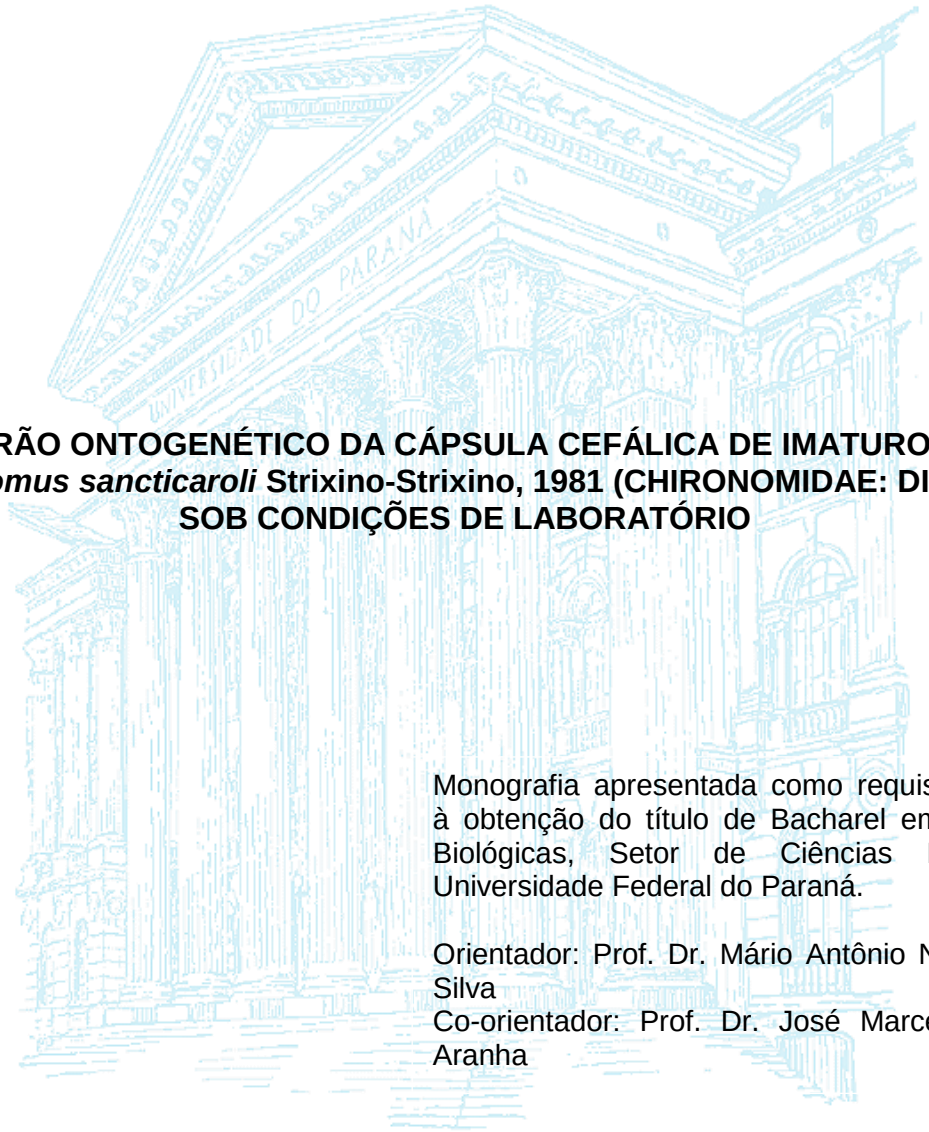
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA REBECHI

PADRÃO ONTOGENÉTICO DA CÁPSULA CEFÁLICA DE IMATUROS DE *Chironomus sancticaroli* Strixino-Strixino, 1981 (CHIRONOMIDAE: DIPTERA) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

CURITIBA
2009

DÉBORA REBECHI



PADRÃO ONTOGENÉTICO DA CÁPSULA CEFÁLICA DE IMATUROS DE *Chironomus sancticaroli* Strixino-Strixino, 1981 (CHIRONOMIDAE: DIPTERA) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. José Marcelo Rocha Aranha

CURITIBA
2009

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento”

Platão

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que fazem parte da minha vida acadêmica e pessoal, que tornaram a produção desse trabalho satisfatória e compensadora.

Aos meus pais, Vilson e Solange, pessoas muito importantes para mim e que sempre estão ao meu lado, agradeço o apoio, dedicação, a preocupação, ao carinho e amor incomparável. Vocês são os melhores.

Ao meu amor, Rafa, por todos os conselhos e dedicação nos períodos mais críticos, que não foram poucos. Agradeço todos os incríveis momentos ao seu lado, você me faz muito feliz.

As minhas queridas irmãs, Denise e Viviane, que por serem mais velhas e experientes que eu, me deixam mais segura e confiante nas escolhas que faço, são exemplos de vida para mim.

Ao meu cunhado, Yuri, agradeço pelo apoio em muitos momentos e a minha sobrinha, Letícia, por ser ótima e linda e fazer a minha vida mais alegre.

A toda minha família, avós, tios, primos, que mesmo de longe vivem me apoiando muito.

Ao meu orientador, Prof. Mário, pelos conselhos, paciência, dedicação e sábias palavras nos momentos certos.

Ao pessoal do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV), pela amizade e apoio. Principalmente a Carol, por todas as dicas e recomendações.

Ao meu co-orientador, Prof. Marcelo, pelas conversas esclarecedoras e conselhos nas horas difíceis.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia de Rios: Ana, Fagner, Karine, Su, Thais e Van, pela verdadeira amizade e por fazerem de meus dias uma verdadeira festa, tornando o trabalho mais fácil. Especialmente ao Vini, grande companheiro, agradeço pela constante ajuda e parceria em todas as horas. Você se tornou o irmão que nunca tive.

A todos os professores da Universidade Federal do Paraná por terem contribuído para a minha formação acadêmica.

A Bam, Flavinho, Gux, Peter, Poli, as Rês, Samuca, Tigela e a todos da minha turma, que tornaram a faculdade um lugar muito prazeroso. Especialmente a Carol e a Dadi, amigas do coração, vocês fizeram quatro anos maravilhosos passarem rápido demais.

Aos amigos do Colégio Medianeira: Victor e PC, grandes companheiros para a vida inteira.

A Bia, amiga do peito, distante, mas sempre perto. A sua amizade me deixa muito segura.

À Lia, sua amizade é pura e verdadeira, me acompanha faz tempo, mas a faculdade me deixou vê-la novamente com outros olhos, obrigada.

As minhas amadas popcorns: Dani, Jú, Lú e Má, que desde sempre estão em minha vida, acompanharam todas as minhas trajetórias e mais uma fase termino ao lado de vocês. Amo todas.

Com carinho,

Débora

RESUMO

Em ambientes aquáticos, quironomídeos são um dos grupos de macroinvertebrados mais abundantes, principalmente por tolerarem condições adversas do meio, como baixos níveis de oxigênio dissolvido. Sofrem alterações morfológicas quando expostos a contaminantes e por isso são utilizados como bioindicadores de qualidade de água. Dessa forma, trabalhos que objetivem a morfologia e suas transformações ao longo do desenvolvimento larval tornam-se extremamente necessários. Neste trabalho, foram analisadas seis estruturas da cápsula cefálica (antena, mandíbula, mento, pente epifaríngeo, placa ventromental e pré-mandíbula) entre os quatro ínstares larvais de *Chironomus sancticaroli* Strixino-Strixino, 1981, como elemento subsidiário para determinar as alterações que ocorrem no padrão morfológico durante a ontogenia. Além disso, quatro dessas estruturas foram mensuradas para testá-las como possíveis ferramentas na definição e identificação dos quatro ínstares presentes na espécie alvo. Foram selecionadas 165 larvas distribuídas entre os quatro ínstares, estas foram fixadas em álcool 70%, diafanizadas em KOH 6% para a montagem das lâminas, que foram analisadas em microscopia óptica. Foi possível definir o padrão morfológico das seis estruturas selecionadas durante o desenvolvimento larval e através da morfometria de quatro estruturas (antena, mandíbula, mento e placa ventromental) foi confirmada a sua possível utilização como ferramenta para determinação dos ínstares larvais.

Palavras-chave: *Chironomus sancticaroli*, padrão morfológico, morfometria.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*.....2
FIGURA 2 – Abordagem ecotoxicológica.....12
FIGURA 3 – Mapa do local da coleta das massas ovígeras de *Chironomus sancticaroli*.....16
FIGURA 4 – Esquema da obtenção do material biológico.....17
FIGURA 5 – Esquema da montagem das lâminas de *Chironomus sancticaroli*.....18
FIGURA 6 – Cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli* na posição ventral, evidenciando as seis estruturas selecionadas para análise.....19
FIGURA 7 – Estruturas analisadas da cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli*.....20
FIGURA 8 – Estruturas mensuradas da cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli*.....22

LISTA DE FOTOGRAFIAS

FOTO 1 - Mento do 1º ínstar. Aumento - 1000X.....30
FOTO 2 - Mento do 2º ínstar. Aumento - 1000X.....30
FOTO 3 - Mento do 3º ínstar. Aumento - 400X.....30
FOTO 4 - Mento do 4º ínstar. Aumento - 200X.....30

LISTAS DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Frequência das proporções antenais das larvas de *Chironomus sancticaroli* de primeiro ao quarto ínstar,.....26
GRÁFICO 2 – Frequência em μm do comprimento das mandíbulas das larvas de *Chironomus sancticaroli* do primeiro ao quarto ínstar.....28
GRÁFICO 3 – Frequência em μm do comprimento do mento das larvas de *Chironomus sancticaroli* do primeiro ao quarto ínstar.....31
GRÁFICO 4 – Frequência em μm do comprimento das placas ventromentais das larvas de *Chironomus sancticaroli* do primeiro ao quarto ínstar.....34
GRÁFICO 5 – Frequência em μm do comprimento ventral da cápsula cefálica das larvas de *Chironomus sancticaroli* do primeiro ao quarto Ínstar.....37

LISTA DE PRANCHAS DE DESENHO

PRANCHA 1 – Padrão morfológico natural das antenas de larvas de *Chironomus sancticaroli*.....25
PRANCHA 2 – Padrão morfológico natural das mandíbulas de larvas de *Chironomus sancticaroli*.....28
PRANCHA 3 – Padrão morfológico natural do mento de larvas de *Chironomus sancticaroli*.....29
PRANCHA 4 – Padrão morfológico natural do pente epifaríngeo de larvas de *Chironomus sancticaroli*.....32
PRANCHA 5 – Padrão morfológico natural das placas ventromentais de larvas de *Chironomus sancticaroli*.....34
PRANCHA 6 – Padrão morfológico natural das pré-madíbulas de larvas de *Chironomus sancticaroli*.....35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Medidas em μm para o mínimo, a máxima e as médias com seus respectivos desvios e intervalos de confiança, encontrados para a proporção antenal, comprimento da cápsula cefálica, mandíbulas, mento e placas ventromentais, de primeiro ao quarto ínstar de larvas se *Chironomus sancticaroli*.....24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 FAMÍLIA CHIRONOMIDAE 1
1.2 GÊNERO *CHIRONOMUS* 7
1.3 ESPÉCIE *CHIRONOMUS SANCTICAROLI* 9
1.4 MORFOMETRIA EM INSETOS 10
1.5 BIOMONITORAMENTO UTILIZANDO INSETOS AQUÁTICOS 11
2. OBJETIVOS 15
2.1 OBJETIVO GERAL 15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 15
3. METODOLOGIA 16
3.1 COLETA 16
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO 17
3.3 MONTAGEM DAS LÂMINAS 18
3.4 ESTRUTURAS ANALISADAS 19
3.5 ANÁLISE DAS LÂMINAS E DAS MEDIDAS 21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 23
4.1 PADRÃO MORFOLÓGICO DAS ANTENAS 25
4.2 PADRÃO MORFOLÓGICO DAS MANDÍBULAS 27
4.3 PADRÃO MORFOLÓGICO DO MENTO 29
4.4 PADRÃO MORFOLÓGICO DO PENTE EPIFARÍNGEO 32
4.5 PADRÃO MORFOLÓGICO DAS PLACAS VENTROMENTAIS 33
4.6 PADRÃO MORFOLÓGICO DAS PRÉ-MANDÍBULAS 35
4.7 COMPRIMENTO VENTRAL DA CÁPSULA CEFÁLICA 36
5. CONCLUSÕES 38
REFERÊNCIAS 39

1. INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA CHIRONOMIDAE

Membros da família Chironomidae, são conhecidos popularmente como mosquitos não picadores (nome derivado ao reduzido aparato bucal nos adultos) (CRANSTON, 2004). Com mais de 15000 espécies descritas no mundo inteiro, possuem ampla distribuição geográfica e frequentemente são os insetos mais abundantes em ambientes de água doce. Estão incluídos entre os macroinvertebrados bentônicos e em certas condições, como baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, larvas de quironomídeos podem ser os únicos insetos presentes no sedimento (ARMITAGE *et al*., 1995).

As espécies estão divididas em 11 subfamílias: Prodiamesinae, Buchonomyiinae, Chilenomyiinae, Usumbaromyiinae, Podonominae, Aphroteniinae, Telmatogetoninae, Diamesinae, Tanypodinae; Orthocladiinae e Chironominae (SAETHER, 2000). As três últimas são as mais numerosas e existe uma variação na distribuição geográfica mundial dessas subfamílias, principalmente em relação à temperatura. A maioria dos Tanypodinae e Chironominae são essencialmente termófilos e adaptados para viverem em ambientes lênticos. Já o número de Orthocladiinae decresce nessas condições (OLIVER, 1971).

Por serem insetos holometábolos, os quironomídeos possuem quatro estágios distintos em seu ciclo de vida: ovo, larva (com quatro ínstares), pupa e adulto (FIGURA 1).

O estágio de ovo é temperatura dependente e relacionado com a duração total do ciclo de vida. Os ovos não apresentam diapausa (CRANSTON, 2004) e são ovipostos em uma matriz gelatinosa protetora, que se expande em água. O número de ovos é bem variável, para a espécie Chironomus sancticaroli vai de 500 a 1045 ovos (TRIVINHO-STRIXINO & STRIXINO, 1981). A forma da massa e o arranjo dos ovos também variam, e cada subfamília tem um tipo característico de massa ovígera. As duas formas principais são um tipo linear e um modelo mais compacto. O tipo linear é característico do Orthocladiinae e Diamesinae, em que os ovos são

obliquamente dispostos ao longo do eixo central da matriz. O segundo tipo é característico de Tanypodinae e Chironominae, é normalmente esférica, mas pode ser cilíndrica, e geralmente ligada a um objeto sólido por uma haste gelatinosa (OLIVER, 1971).

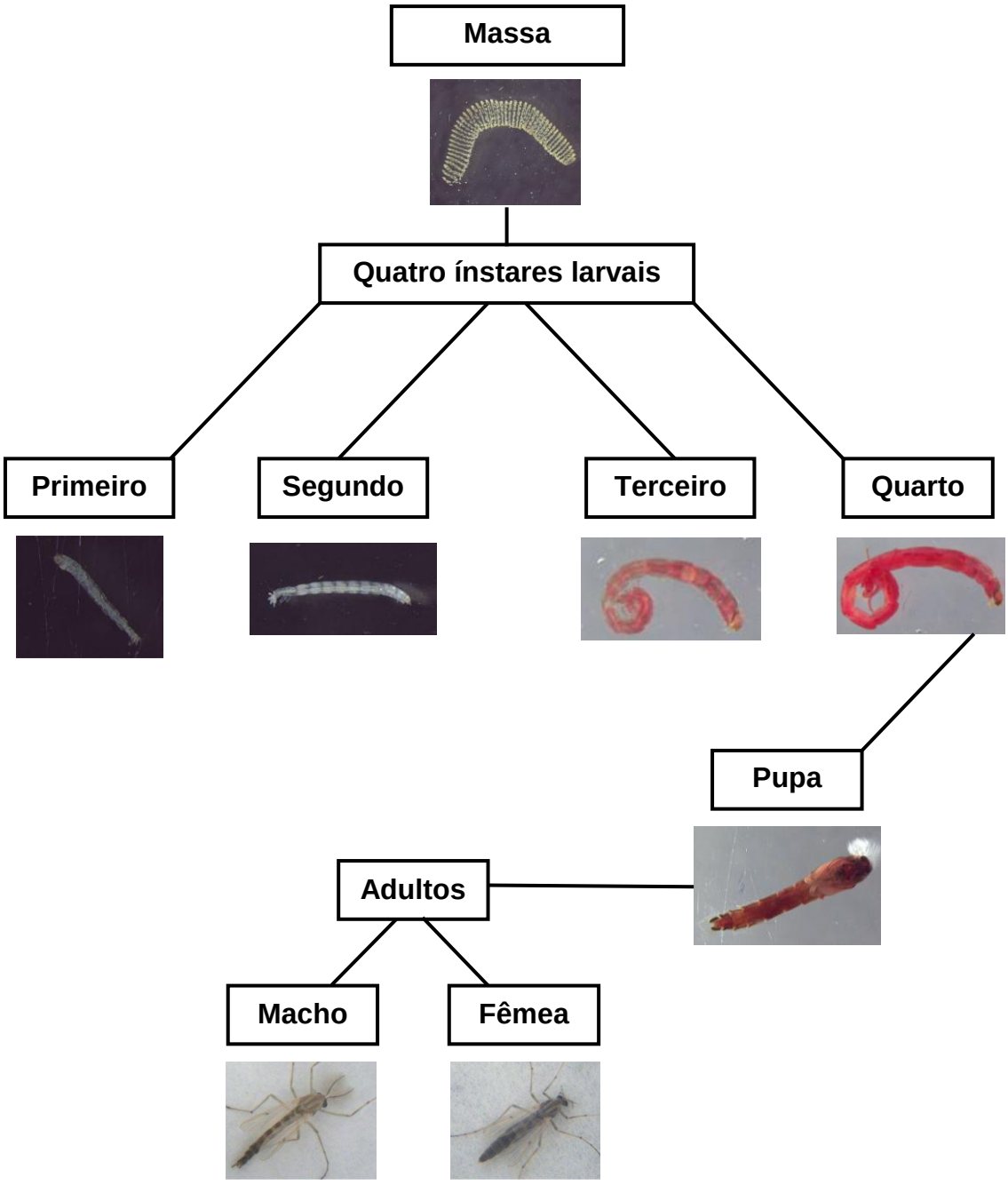


FIGURA 1 – Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*

As larvas apresentam características típicas de dípteros Nematocera, como: cápsula cefálica esclerotinizada completa (EPLER, 2001), prognata (orientadas para frente) (CRANSTON, 2004), bem desenvolvida, não retrátil e com mandíbulas com

movimentos de oblíquo a horizontal; corpo segmentado, alongado, estreito e sem pernas torácicas. Diferenciam-se de outros nematóceros por serem, em sua maioria, apnêusticas (falta de espiráculos funcionais) e apresentarem dois pares de pseudópodos (localizados ventralmente nos segmentos protorácico e anal) e um par de procercos (localizado dorsalmente no segmento anal, cada um com um tufo de cerdas em seu ápice) (ARMITAGE *et al.* 1995).

A duração do estágio larval pode variar de duas semanas a muitos anos, dependendo da espécie e das condições ambientais. Em geral, água com temperatura elevada, alta qualidade e disponibilidade de alimento e espécies pequenas indicam curtos ciclos de vida (MERRIT & CUMMINS, 1996).

Todos Orthocladiinae e Chironominae, com exceção de algumas espécies predadoras, constroem tubos de seda dentro ou fora do substrato em que vivem. Estes são formados por partículas do substrato unidas por seda, secretada pelas glândulas salivares (WALSHE, 1951). Esses tubos fornecem proteção contra predadores (TOKESHI, 1995) e, em espécies que os irrigam ativamente (através da ondulação do corpo para gerar correntes de água), aumentam a aquisição de alimento (WALSHE, 1951) e oxigênio (BRACKENBURY, 2000).

Segundo MCKIE (2004), o investimento em tubos de seda pode dar aos quironomídeos tubículas mais prejuízos quando distúrbios físicos ou as ações de outros organismos (predadores e competidores) induzem a dispersão e/ou destruição dos tubos. O período gasto para localizar um determinado sítio de construção e para a produção do tubo pode ocupar tempo de forrageamento (CUKER, 1983; STEVENS *et al*., 1999). Se frequentemente a reconstrução dos tubos impõe deficiências na aquisição de alimento, durante o período larval, então os adultos podem emergir menores e menos férteis (MCKIE, 2004).

Em ecossistemas aquáticos, muitos são os fatores que influenciam a distribuição espacial de macroinvertebrados bentônicos, mas as condições hidráulicas são um dos mais importantes. O movimento da água tem um efeito direto sobre os organismos, mas também influencia indiretamente, através de níveis de oxigênio dissolvido e da qualidade e quantidade de partículas orgânicas (incluindo algas), disponíveis como itens alimentares (SYROVÁTKA & BRABEC, 2008).

As larvas de quironomídeos apresentam diferenças específicas em sua resistência às baixas concentrações de oxigênio, e este fator frequentemente determina a sua presença ou ausência em um habitat particular. A maioria das

espécies que são capazes de tolerar condições muito baixas de oxigênio pertencem às subfamílias Chironominae e Tanypodinae, e alguns dos tubos de Chironominae são relatados para resistir períodos prolongados de condições anaeróbias (CURRY, 1955 *apud* OLIVER, 1971).

Algumas larvas de Chironomidae são comumente chamadas de vermes de sangue porque possuem o pigmento hemoglobina, como por exemplo, nos gêneros *Polypedilum* e *Chironomus* (CRANSTON, 2004). Segundo GULLAN & CRANSTON (2008), a tolerância a baixos níveis de oxigênio dissolvido em água pode estar associada à presença da hemoglobina.

Dentre os insetos aquáticos, somente algumas larvas de quironomídeos e alguns Notonectidae (Hemiptera) possuem esse pigmento. A hemoglobina dos vertebrados possui “baixa afinidade” por oxigênio, por isso, este é obtido a partir de ambientes com altos níveis de oxigênio e é descarregado em ambientes ácidos, o chamado Efeito Bohr. Em contraste, a hemoglobina dos quironomídeos possui “alta afinidade” por oxigênio. As larvas podem saturar suas hemoglobinas ondulando seus corpos dentro de seus tubos de seda, a fim de permitir que a água minimamente oxigenada circule sobre a cutícula (ARMITAGE *et al.*, 1995).

A maioria das espécies vive em água com um pH entre 6,0 e 9,0 (PINDER, 1986), com temperaturas entre 0° C e 32° C. Dentro de certos limites, a medida que a temperatura aumenta o desenvolvimento larval avança em um ritmo mais rápido de crescimento. Portanto, larvas que se desenvolvem em altas temperaturas são menores (KONSTANTINOV, 1958 *apud* OLIVER, 1971). No entanto, a situação é mais complexa: o tamanho de uma larva fisiologicamente madura e capaz de empupar é também influenciado pelo sexo. Segundo FORD (1959) a distribuição bimodal dos tamanhos de várias estruturas da cápsula cefálica do quarto ínstar está relacionada com o sexo, sendo as estruturas do sexo feminino maiores.

Segundo CUMMINS & KLUG (1979), a maioria dos imaturos de Chironomidae são onívoros oportunistas, que ingerem uma variedade de itens alimentares, entre os quais se destacam algas, detritos e microrganismos associados, macrófitas, detritos vegetais e alguns invertebrados. Nos últimos anos, o interesse pelo comportamento alimentar e qualidade do alimento ingerido pelas larvas de Chironomidae tem aumentado muito. Isto se deve principalmente pelo reconhecimento da importância energética destes animais para os ecossistemas

aquáticos (BERG, 1995). Os mecanismos de alimentação dos Chironominae foram descrito em detalhes por WALSHE (1951).

Segundo OLIVER (1971), em comparação com a fase larval, a duração do estágio de pupa é muito breve, variando de algumas horas a alguns dias. Nas pupas de Chironominae e Orthocladinae a respiração ocorre através de um órgão respiratório plumoso, chamado de *thoracic horn* (corno torácico) (CRANSTON. 1995 a). Quando o desenvolvimento está completo, a pupa nada para a superfície da água, onde o adulto usualmente emerge em poucos segundos (MUNDIE, 1956 *apud* PINDER, 1986).

Este é provavelmente um dos momentos mais críticos no ciclo de vida dos quironomídeos, não só pela exposição das pupas a predação, mas precede e em um sentido determina, a emergência dos adultos em um conjunto muito diferente de condições ambientais (OLIVER, 1971).

Quironomídeos adultos possuem tempo de vida curto de alguns dias, com exceção de algumas espécies que vivem por poucas semanas. Apresentam aparelho bucal reduzido e geralmente não se alimentam (ARMITAGE *et al*., 1995). São observados principalmente quando os machos formam as revoadas de acasalamento, usualmente perto de sítios reprodutivos. As fêmeas são menos evidentes, mas elas podem ser vistas dentro do enxame de machos ou quando elas retornam para a oviposição na água (CRANSTON, 2004).

O dimorfismo sexual pode ser evidenciado principalmente pelas antenas: nos machos, a antena é proeminente, plumosa, compreendendo uma base estreita, um pedicelo globular e flagelômeros cilíndricos (em número de 11 a 14). As fêmeas possuem antenas com pedicelos menores, sem pluma e, a maioria, com menos flagelômeros (CORREIA, 2004).

O interesse na ecologia de Chironomidae aumentou nos últimos anos, pois passaram a ser amplamente aceitos como organismos teste em estudos sobre a poluição ambiental (BENOIT *et al*., 1997).

Embora existam algumas larvas não aquáticas, cerca de 95% de todas as espécies passam este estágio de seu ciclo de vida na água (CRANSTON, 2004), por isso as larvas de quironomídeos podem ocupar posição importante na dinâmica trófica de ecossistemas aquáticos de água doce, representando o maior elo entre produtores e consumidores secundários (TOKESHI, 1995) e um papel fundamental na reciclagem de nutrientes dos sedimentos, através da alteração da composição da

matéria orgânica particulada fina (SANKARPERUMAL & PANDIAN, 1992 *apud* ABÍLIO *et al.*, 2005).

Considerando sua ampla distribuição e sua frequente abundância, tanto como larvas quanto adultos, não é surpreendente o fato de que os quironomídeos possam interferir nas atividades humanas de alguma forma. Na literatura estão registrados inúmeros problemas ocasionados pelas altas densidades numéricas de Chironomidae. Os adultos, embora não sugadores, quando emergem em abundância em ambientes aquáticos próximos a rodovias, áreas residenciais ou industriais tornam-se bastante incômodos (CORREIA, 2004).

Segundo ALI (1995), alguns enxames de quironomídeos podem limitar a atividade humana ao ar livre porque os adultos podem ser inalados ou voar ate a boca, olhos ou orelhas, causando asfixia. Nas estradas, podem cobrir os faróis e pára-brisas dos carros, criando condições de risco para os motoristas. Além disso, os adultos geram consideráveis perdas econômicas para a indústria de turismo, tinta, farmacêutica e de comida em muitas situações no mundo todo.

Os adultos não são vetores de doenças, porém quando emergem de algum habitat poluído eles podem transportar bactérias e inseticidas orgânicos para o ambiente terrestre. Dessa forma, os quironomídeos podem estar associados com reações alérgicas humanas, como: conjuntivites, dermatites, rinites e asmas (ARMITAGE *et al.,* 1995).

1.2 GÊNERO *CHIRONOMUS*

Segundo CORREIA (2004), *Chironomus* Meigen, 1803 protagonizou durante 55 anos uma discussão acerca da nomenclatura correta de sua família. Depois de mais de um século de uso da nomenclatura *Chironomus*, originada por MEIGEN (1803), foi descoberto por F. Hendel um manuscrito de autoria de Meigen datado de 1800 que descrevia o mesmo gênero e o denominava *Tendipes*. A partir disso, alguns pesquisadores argumentaram ser necessário aplicar a lei de prioridade das Regras Internacionais de Nomenclatura Zoológica, substituindo a nomenclatura de MEIGEN (1803) pela de MEIGEN (1800).

Em 1963, o Comitê Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) estabeleceu que o manuscrito MEIGEN (1800) deveria ser considerado inválido, suprimindo formalmente a denominação de *Tendipes* para o gênero e recomendando que a nomenclatura de família, subfamília e tribo fossem baseadas na publicação de MEIGEN (1803) (OLIVER, 1971). Entretanto, mesmo após a decisão do ICZN, alguns autores ainda persistIram na utilização de *Tendipes* e Tendipedidae (ASHE, 1983).

O gênero Chironomus é cosmopolita, porém, ainda são escassas as pesquisas sobre as relações entre as espécies dos diferentes continentes. Apresenta ampla distribuição ecológica com espécies vivendo em ambientes lóticos e lênticos, em baixas e altas profundidades, e em águas poluídas ou não (CORREIA, 2004). Segundo SILVA *et al*. (2008 a), o hábito alimentar desse gênero pode chegar a ser 100% detritívoro.

Muitas de suas espécies são consideradas importantes indicadores de qualidade de água e utilizadas em programas de biomonitoramento ou ensaios de toxicidade, como por exemplo, *Chironomus tentans* Fabricius, 1805 (LONDOÑO *et al*., 2004); *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (HA & CHOI, 2008); *Chironomus yoshimatsui* Martin e Sublette, 1972 (YOSHIMI *et al*., 2009).

Os imaturos são importantes itens alimentares de peixes e, considerando o valor econômico representado por eles, a produtividade de quironomídeos salienta-se em estudos de piscicultura (ZUR, 1980). Dentre as espécies, destacam-se as do gênero *Chironomus*, que em geral, são de maior tamanho e tendem a apresentar

elevada biomassa, contribuindo para altos valores de produção (TOKESHI, 1995) e, portanto, um maior valor como presa (MANOBARAM, 1984). As trutas (*Oncorhynchus sp.*), por exemplo, podem se alimentar, por um determinado período, exclusivamente de larvas de *Chironomus* (ARMITAGE *et al*., 1995).

1.3 ESPÉCIE *CHIRONOMUS SANCTICAROLI*

A espécie *Chironomus sancticaroli*, foi descrita por Strixino & Strixino em 1981, a partir de exemplares encontrados na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil. Após sua identificação algumas informações sobre sua biologia já foram publicadas.

A espécie possui de 16 a 18 gerações ao ano (STRIXINO & TRIVINHO-STRIXINO, 1985), esta variação está relacionada principalmente com a temperatura, diferenças de apenas 5º C fazem o tempo do ciclo de vida dobrar, portanto, no período do ano em que as condições térmicas são mais favoráveis devem ocorrer, provavelmente, picos de emergência bastante próximos entre si, ocasionando curtas explosões populacionais (TRIVINHO-STRIXINO & STRIXINO,1982).

A temperatura e alimentação influenciam também a maturidade, fecundidade e sobrevivência de *C. sancticaroli*. Nas fêmeas adultas o tempo necessário para o amadurecimento do ovócito é de aproximadamente 33horas após a emergência, entre 22 e 25° C e 72 horas entre 15 e 18° C. Dependendo das condições tróficas em que as larvas são expostas a fecundidade dos adultos varia, quanto mais alimentação maior a fecundidade. (TRIVINHO-STRIXINO & STRIXINO, 1989).

Na área de citogenética FREITAS *et al*. (1985), estudaram o conjunto cromossômico da espécie e concluíram que este é composto por quatro cromossomos politênicos: dois grandes, um intermediário e um pequeno. Cada um possuindo um padrão de bandeamento peculiar, o que torna a identificação fácil, podendo assim ser utilizado para a taxonomia do grupo.

MOREIRA *et. al*. (1992), analisaram o rDNA de *Chironomus sancticaroli* e o compararam com outras duas (C. *tentans* e C. *thummi*) e observaram um elevado grau de conservação entre as espécies, porém apontaram a necessidades de maiores estudos a respeito.

1.4 MORFOMETRIA EM INSETOS

Segundo BOOKSTEIN (1982), morfometria é a fusão empírica da geometria com a biologia. Praticantes de morfometria devem extrair informações da geometria e utilizá-las no formato biológico para fins comparativos, como o estudo do crescimento, da anormalidade, ou diferenças taxonômicas.

Um dos mais tradicionais e mais difundidos usos da morfometria em Entomologia é para a determinação da classificação etária dos insetos, ou seja, número de ínstares ou a idade relativa dentro de um estágio (GULLAN & CRANSTON, 2008). O crescimento pós-embrionário nos insetos é descontínuo, isto é, incrementos importantes estão limitados as mudas periódicas do tegumento (DALY, 1985).

Uma das primeiras tentativas para quantificar a progressão no tamanho dos insetos foi de H. G. Dyar, que em 1890 estabeleceu uma “regra” a partir de observações em lagartas de 28 espécies de Lepidoptera. As medidas de Dyar mostram que a largura da cápsula cefálica aumentava em uma proporção linear regular, em ínstares sucessivos, por uma proporção que era constante para uma dada espécie (GULLAN & CRANSTON, 2008).

Segundo McCAULEY (1974), uma das medidas mais utilizadas para se determinar o número de ínstares na fase larval de espécies de insetos é a largura da cápsula cefálica. Muitos estudos com a família Chironomidae são realizados com esse parâmetro (DYAR, 1890; ECOLE *et al*., 1999; SILVA *et al*., 2008 b), mas o comprimento ventral da cápsula cefálica também vem sendo utilizado (McCAULEY, 1974; TRIVINHO-STRIXINO & STRIXINO, 1982; CORBI & TRIVINHO-STRIXINO, 2006).

GULLAN & CRANSTON (2008) citaram que é possível obter o número de ínstares larvais de uma dada espécie através de um histograma de frequencias das medidas de uma parte do corpo esclerotinizada, como mandíbulas. Porém, existem poucos trabalhos que demonstram a mensuração de estruturas esclerotinizadas, como as peças bucais e antenas, presentes na cápsula cefálica, para tal função.

1.5 BIOMONITORAMENTO UTILIZANDO INSETOS AQUÁTICOS

O uso abusivo e descontrolado da água levou à poluição preocupante dos recursos hídricos, em escala mundial, resultando, em muitas regiões, na escassez de água de boa qualidade para a dessedentação dos seres vivos, produção de alimentos e outros usos indispensáveis para a vida (KNIE & LOPES, 2004).

Dentre as principais formas de impactos que atingem os corpos hídricos pode-se notar o desmatamento das matas ciliares, a erosão, a alteração de canais de rios e margens de lagos por meio de diques, a canalização, drenagem e inundação de áreas alagáveis, a dragagem para navegação, a extensa produção de efluentes domésticos e industriais, a agropecuária nas áreas de entorno, dentre diversas outras formas impactantes principalmente relacionadas com o adensamento populacional das regiões (KARR, 1991).

Segundo KNIE & LOPES (2004), gigantescas quantidades de substâncias químicas (xenobióticos) chegam aos corpos hídricos e provocam modificações negativas do seu estado biológico, químico e físico. Isso acontece, na maioria dos casos, em consequência da primazia dada ao crescimento econômico de um país em detrimento da proteção dos seus recursos naturais.

Além de medidas políticas corretivas necessárias para impedir a continuação da poluição sistemática dos recursos hídricos, é imprescindível uma fiscalização rigorosa do manejo e da liberação de produtos químicos no meio ambiente, bem como um controle abrangente e eficiente da qualidade das águas e dos caminhos de sua contaminação (KNIE & LOPES, 2004).

Segundo o supracitado, a qualidade hídrica pode ser controlada de duas formas distintas, embora complementares: uma é a análise química que identifica e quantifica as substâncias químicas; a outra é a análise biológica, que qualifica os efeitos causados pelas substâncias.

Inserida na análise biológica está a abordagem ecotoxicológica (FIGURA 2), que segundo MELLO (1981) se preocupa em estudar como os ecossistemas metabolizam, transformam, degradam, eliminam, acumulam e sofrem ação da toxicidade dos produtos químicos que nele penetram.

Entende-se por toxicidade a propriedade inerente de um agente químico produzir efeitos deletérios (agudos, subletais, letais ou crônicos) sobre um organismo (RAND, 1995). A toxicidade varia em função da concentração, composição e propriedades, como também do tempo de exposição (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

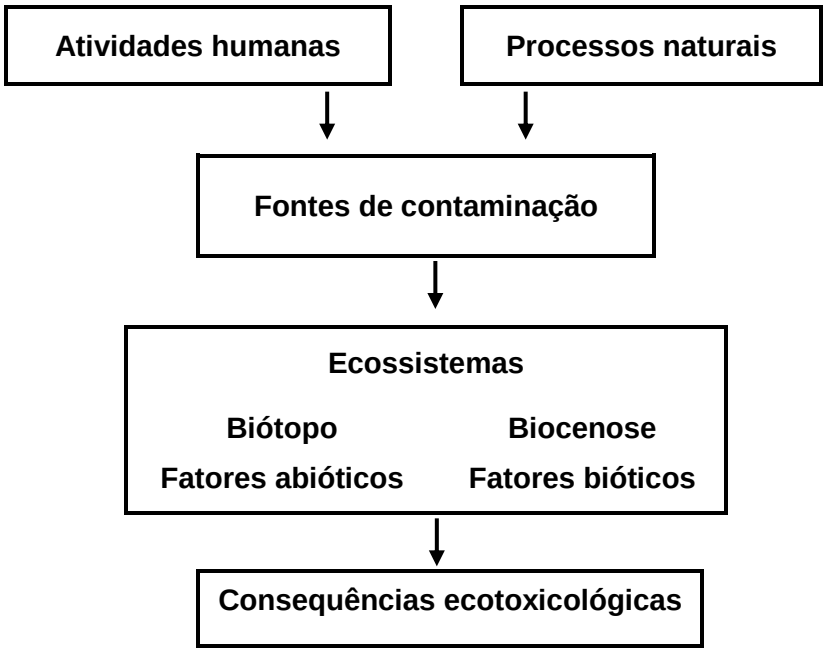


FIGURA 2 – Abordagem ecotoxicológica
FONTE: BOUDU & RIBEYRE (1989).

Segundo MATTEWS *et al.* (1982), o monitoramento biológico pode ser definido como o uso sistemático de respostas biológicas para avaliar as mudanças no ambiente com a intenção de usar esta informação em um programa de controle de qualidade.

Um programa ideal de biomonitoramento ambiental é o que integra medições físicas, químicas e biológicas, permitindo a caracterização físicoquímica dos ecossistemas aquáticos de uma bacia hidrográfica e o estudo da ecologia dos organismos bioindicadores de qualidade de água (CALLISTO *et al*., 2005, CALLISTO & GONÇALVES, 2005, MORENO & CALLISTO, 2006).

A primeira etapa do biomonitoramento é a pesquisa pelo indicador biológico (ou bioindicador) cuja presença, abundância, e/ou comportamento refletem os efeitos estressores sobre a biota. Um indicador pode ser utilizado para biomonitorar diferentes níveis de organização, desde o nível sub-organizacional (por exemplo,

genes, células e tecidos) a organismos, populações, comunidades, e até mesmo ecossistemas (NIEMI & McDONALD, 2004 *apud* MORENO & CALLISTO, 2006).

Os macroinvertebrados bentônicos são o grupo que atualmente vem sendo utilizado em mais de dois terços de todos os métodos biológicos modernos (ROSENBERG & RESH, 1993; FRIBERG & JOHNSON, 1995).

Segundo CALLISTO & ESTEVES (1998), as principais razões para esta escolha são:

- A estrutura das comunidades de macroinvertebrados bentônicos reflete a qualidade ambiental uma vez que as espécies têm diferentes níveis de tolerância a poluentes;
- Os macroinvertebrados bentônicos são conspícuos, muitas vezes abundantes, e são relativamente sedentários;
- Para os macroinvertebrados dispõe-se de metodologias de coletas adequadas já estabelecidas;
- Os macroinvertebrados bentônicos têm ciclos de vida relativamente longos quando comparados aos organismos planctônicos

Apesar de espécies de vários filos terem invadido os ecossistemas aquáticos continentais, algumas tiveram especial sucesso. A macrofauna bentônica da maioria desses ecossistemas é dominada numericamente (e em termos de biomassa) pelos Insecta (WARD, 1992). Em geral, as formas imaturas de insetos aquáticos e semi-aquáticos são mais importantes do que os adultos nos ecossistemas lóticos e lênticos (CALLISTO & ESTEVES 1998).

Dentre os Diptera, a família Chironomidae é o grupo mais importante em termos de amplitude de habitats que ocupam, diversidade de hábitos alimentares, estratégias adaptativas (CRANSTON, 1995 b) e tolerância às diversas condições ambientais (PINDER, 1986). Estas e outras características fazem desses organismos importantes bioindicadores ecológicos, porém, um dos problemas de se utilizar essa família é o fato de muitas espécies serem de difícil identificação, e a literatura possui numero elevado de estudos realizados com Chironomidae sem identificação específica (EPLER, 2001).

Segundo ROSENBERG (1992), em contraste com os indicadores fisiológicos e bioquímicos, os quironomídeos são dominantes entre os organismos utilizados em estudos de deformidades morfológicas.

Avaliar a resposta dos animais às mudanças nas suas formas naturais é a base para muitas estratégias de monitoramento biológico (CAREW *et al*., 2003). Neste sentido, as malformações das larvas de quironomídeos são frequentemente utilizadas para se estimar a toxicidade do sedimento (DI VEROLI *et al*., 2008).

Segundo (NAZAROVA *et al*., 2004) as deformidades morfológicas das antenas e do aparato bucal das larvas são consideradas indicadoras de estresse ambiental. Estruturas como: mento, mandíbulas, pré-mandíbulas, pente epifaríngeo, lamela labral e seta labral, pertencentes à cápsula cefálica de quironomídeos, sofrem muitas alterações quando em contato com xenobióticos (WARWICK, 1985; WARWICK & TISDALE, 1988; SERVIA *et al*., 1998; JEYASINGHAM & LING, 2000; JANSSENS DE BISTHOVEN *et al*., 2001; JANSSENS DE BISTHOVEN & GERHARDT, 2003; NAZAROVA *et al*., 2004; BHATTACHARYAY *et al.,* 2005; MacDONALD & TAYLOR, 2006).

Para determinar se um local inspecionado está poluído, é necessário quantificar a incidência das deformidades, porque algumas larvas são deformadas naturalmente. A falta de conhecimento sobre a frequência das deformidades naturais, em ambientes sem a presença de xenobióticos, especialmente para outras espécies além das geralmente estudadas, atrapalha as aplicações dos métodos de biomonitoramento (van URK *et al*., 1992 *apud* MacDONALD & TAYLOR, 2006).

Apesar das deformidades serem amplamente utilizadas em vários estudos como indicadores de toxicidade do sedimento, poucos trabalhos foram feitos para analisar as possíveis alterações no desenvolvimento larval e ciclo de vida em relação à ocorrência destas malformações (SERVIA *et al*., 1999). Por isso, dados claros sobre a causa, origem e a ontogênese dessas anomalias ainda são escassos (SERVIA *et al*., 2000).

Diante de todas essas informações nota-se a importância de estudos que objetivem a definição do padrão morfológico ao longo de toda ontogenia dessas espécies que possuem relevância em biomonitoramentos de ambientes aquáticos, aplicando-as em futuras comparações em pesquisas tanto de impactos ambientais quanto de ensaios laboratoriais que envolvam as deformidades morfológicas provocadas por agentes externos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar morfométricamente as estruturas da cápsula cefálica larval de *Chironomus sancticaroli* visando à determinação dos ínstares, a definição do padrão e possíveis alterações morfológicas naturais durante o seu desenvolvimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definição das estruturas da cápsula cefálica relevantes para a definição dos ínstares larvais e padrão morfológico natural para a espécie;
- Definição dos ínstares larvais através da morfometria de estruturas da cápsula cefálica;
- Analisar e definir o padrão morfológico da espécie e suas variações naturais através da realização de pranchas de desenhos das estruturas da cápsula cefálica que representem o padrão morfológico natural da espécie para os quatro ínstares larvais.

3. METODOLOGIA

3.1 COLETA

A coleta foi realizada dia 23/ii/2008 em cavas do Alto Rio Iguaçu, no município de Fazenda Rio Grande, estado do Paraná, Brasil (FIGURA 3). Vinte e três massas ovígeras foram coletadas com peneira na vegetação marginal das cavas e levadas para o Laboratório de Ecologia de Rios da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde foram identificadas como *Chironomus sancticaroli* e uma colônia foi estabelecida em sala de criação com temperatura controlada de 25° C (± 2°C) e fotoperíodo 12h claro/12h escuro.

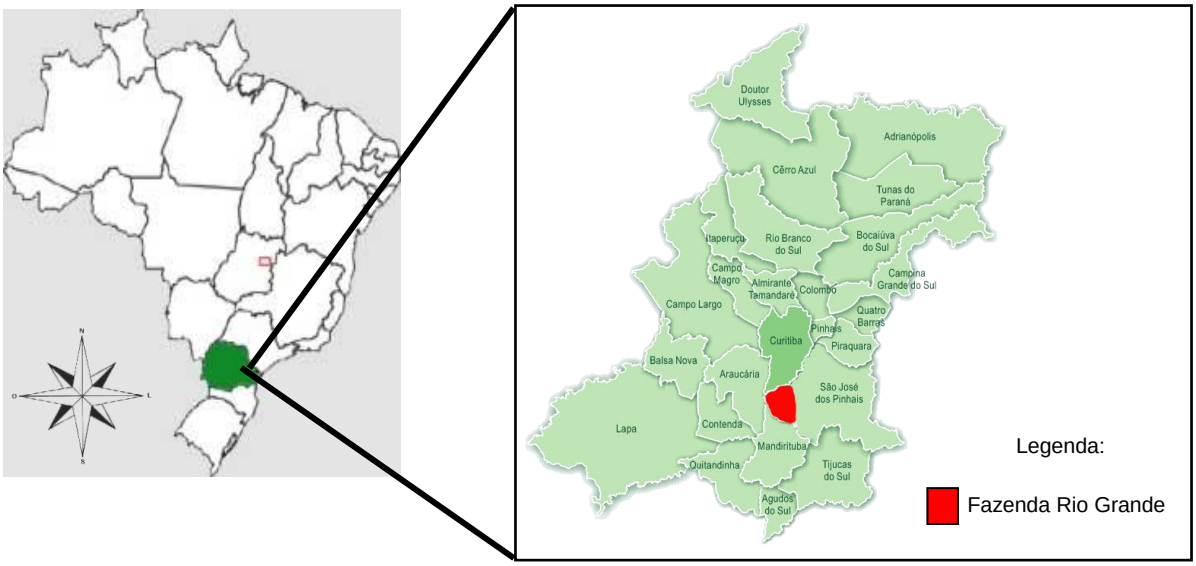


FIGURA 3 – Mapa do local da coleta das massas ovígeras de *Chironomus sancticaroli*
FONTE: O autor (2009).

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram retiradas da colônia de criação três massas ovígeras, separadas em três bandejas diferentes para o desenvolvimento das larvas em câmara de germinação, com condições controladas de temperatura (25°C) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro).

A partir da eclosão dos imaturos de cada massa ovígera foram retiradas diariamente quinze larvas, até o início do desenvolvimento das primeiras pupas, aproximadamente dezesseis dias, totalizando 240 larvas por massa ovígera. A escolha das larvas a serem retiradas foi aleatória, tentando abranger todos os tamanhos existentes no dia. As larvas foram armazenadas em álcool 70% em potes devidamente etiquetados e individualizados para cada dia (FIGURA 4).

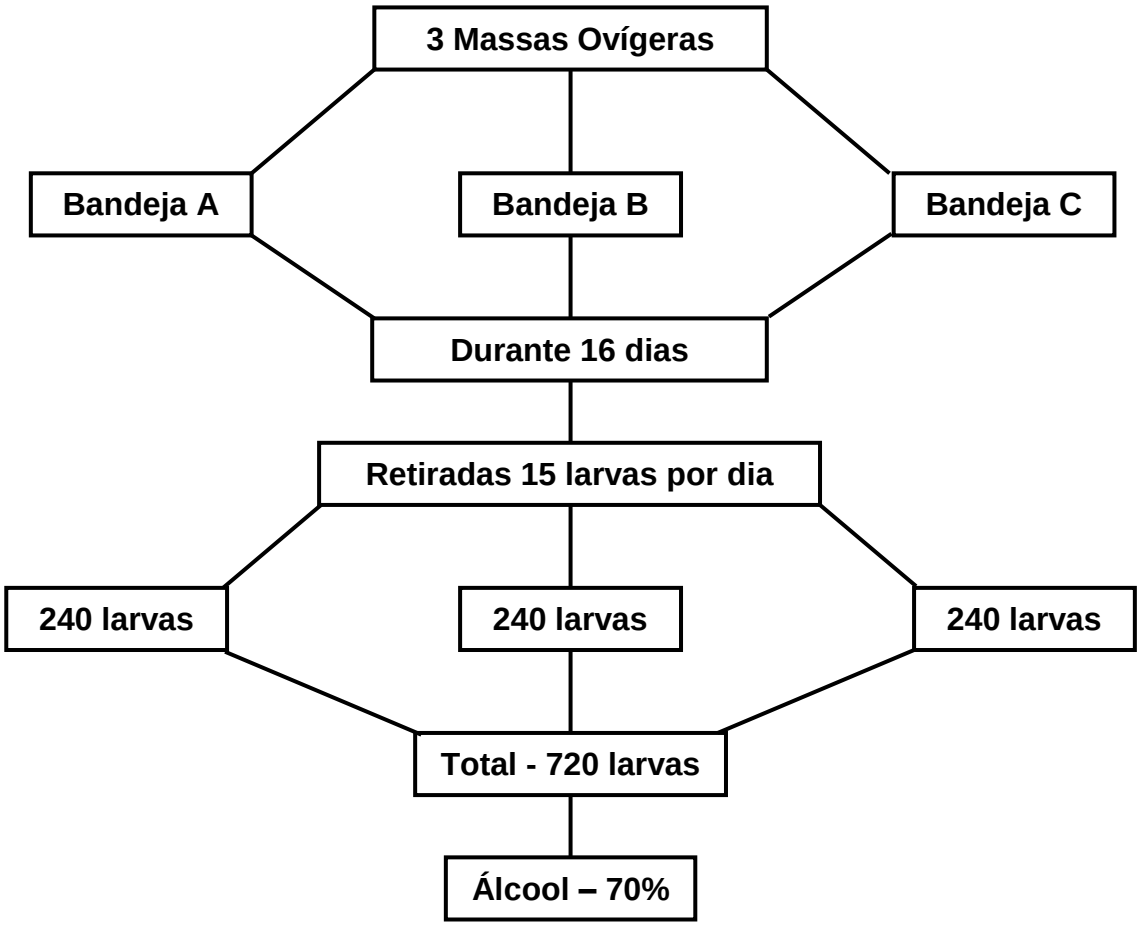


FIGURA 4 – Esquema da obtenção do material biológico

3.3 MONTAGEM DAS LÂMINAS

Foram selecionadas aproximadamente 165 larvas, sendo 30 de primeiro ínstar, 30 de segundo ínstar, 45 de terceiro ínstar e 60 de quarto ínstar, para a montagem das lâminas. A escolha do número de larvas por ínstar foi relacionada ao tempo de duração de cada um, respectivamente do primeiro ao quarto ínstar: três, um, quatro e dez dias.

As larvas foram retiradas do álcool 70% e ficaram 15 minutos na água para retirar o álcool de sua superfície. Então foram colocadas no KOH (Hidróxido de Potássio) a 6% com a intenção de clarear as estruturas esclerotinizadas da cápsula cefálica. Cada ínstar sofreu uma alteração no tempo de diafanização em KOH, do primeiro ao quarto ínstar, respectivamente: 30 min; 2h; 4h; 6h, em estufa a 50°C.

Foram montadas aproximadamente 82 lâminas semipermanentes (com duas larvas em cada uma) de primeiro ao quarto ínstar em solução de glicerina e álcool 3:1. As larvas foram posicionadas ventralmente e a lamínula foi selada com esmalte (FIGURA 5).

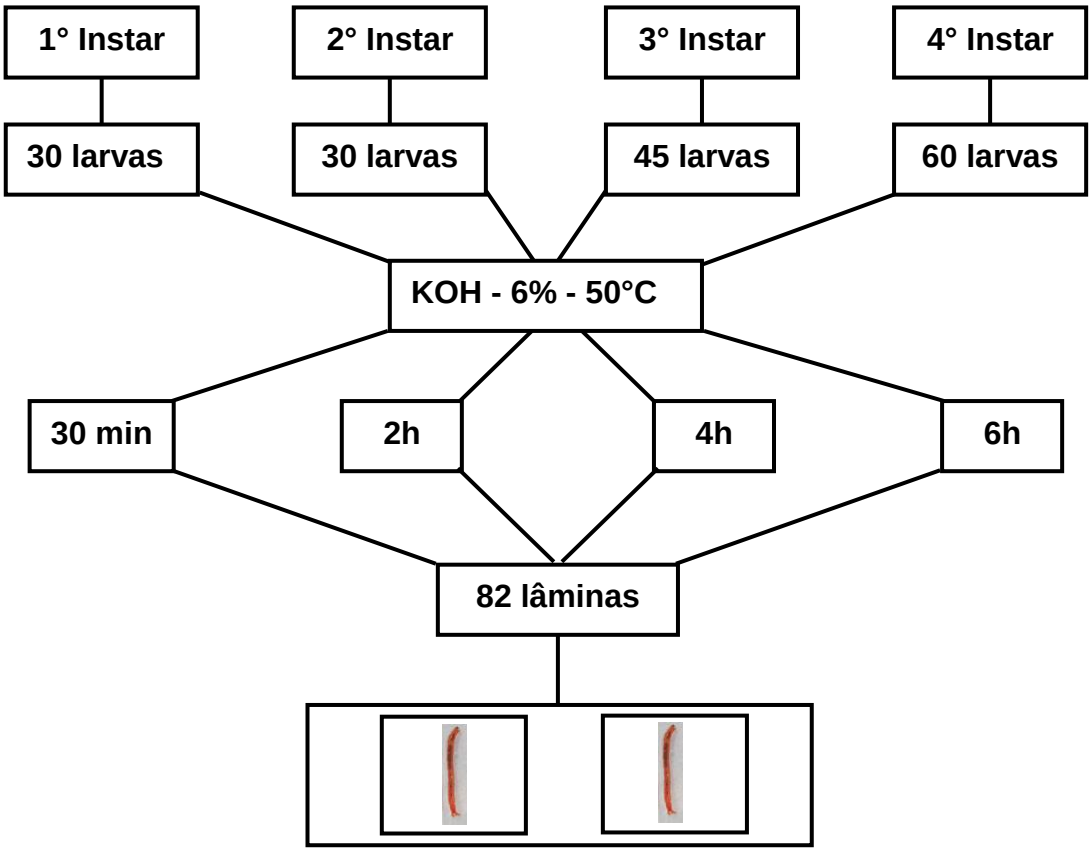


FIGURA 5 – Esquema da montagem das lâminas de *Chironomus sancticaroli*

3.4 ESTRUTURAS ANALISADAS

As seis estruturas da cápsula cefálica analisadas foram: antena, mandíbula, mento, pente epifaríngeo, placa ventromental e pré-mandíbula (FIGURAS 6 e 7). Estas estruturas foram escolhidas por sofrerem deformidades graves em suas morfologias quando expostas a xenobióticos.

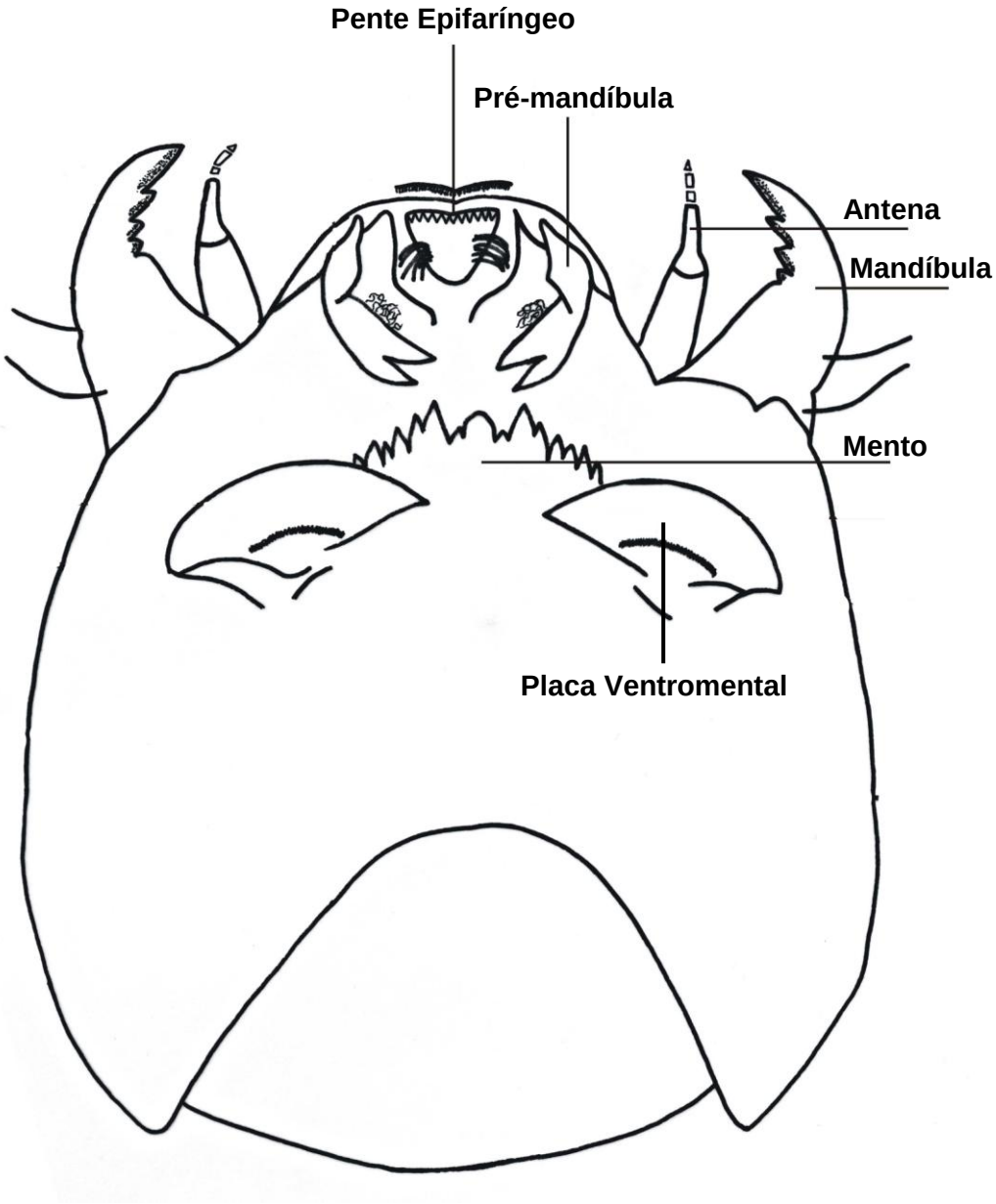


FIGURA 6 – Cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli* na posição ventral, evidenciando as seis estruturas selecionadas para análise.

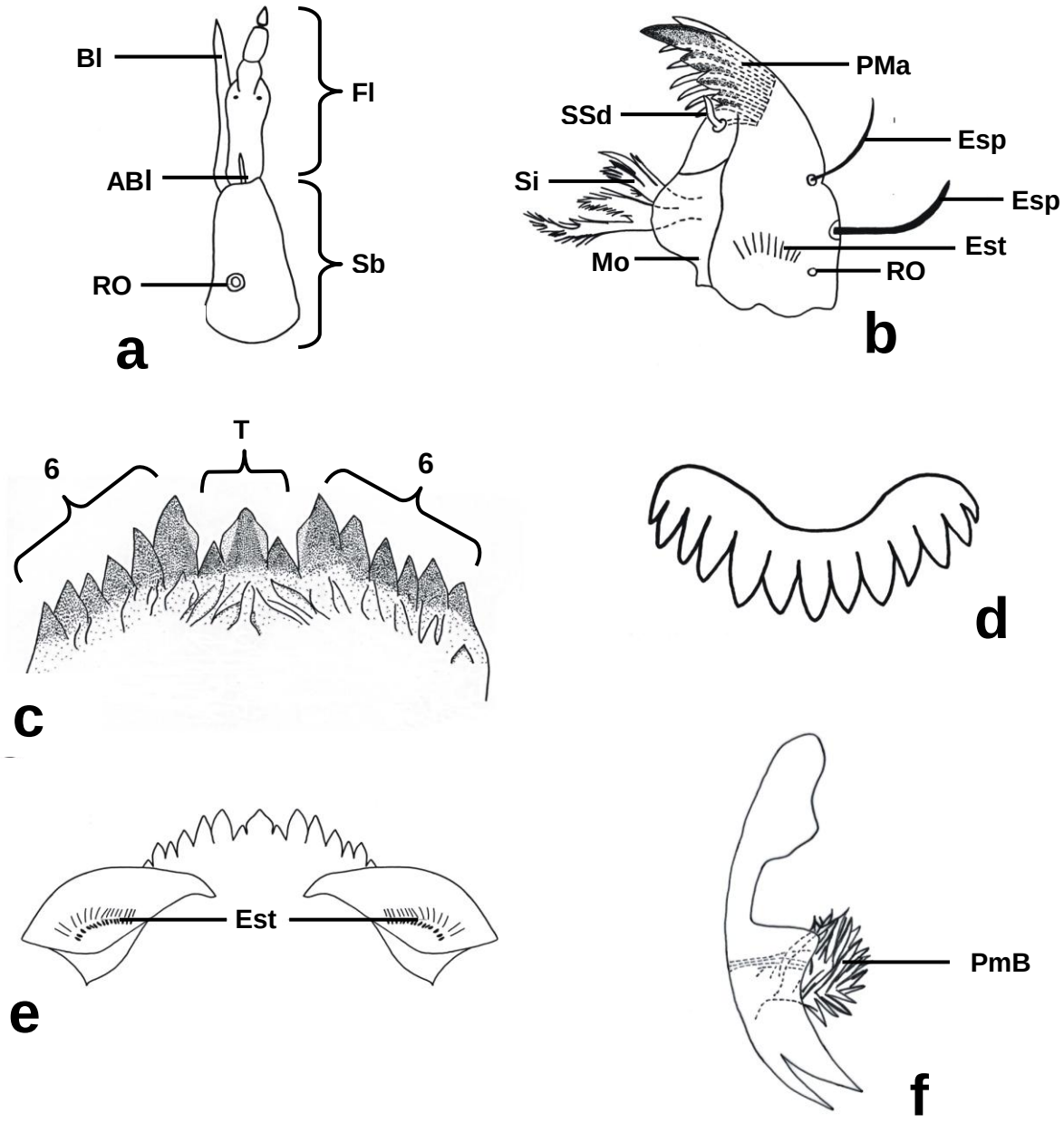


FIGURA 7 – Estruturas analisadas da cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli*. **a.** Antena. **b**. Mandíbula. **c**. Mento. **d**. Pente epifaríngeo. **e**. Placas ventromentais. **f**. Pré-mandíbula. (**ABl**: lâmina acessória, **Bl**: lâmina antenal, **Esp**: espinho, **Est**: estrias, **Fl**: flagelo antenal, **Mo**: mola, **PMa**: pente mandibular, **PmB**: pré-mandibular *brush*, **RO**: órgão anelar, **Sb**: segmento basal, **Si**: seta interna, **SSd**: seta subdentalis, **T**: dente trífido)

3.5 ANÁLISE DAS LÂMINAS E DAS MEDIDAS

A terminologia utilizada para a análise morfológica das estruturas seguiu o descrito por SAETHER (1980). Esta análise foi realizada na sala de imagens do Departamento de Zoologia da UFPR através do microscópio óptico com câmera fotográfica acoplada da marca *Olympus*.

O padrão morfológico natural das seis estruturas (antenas, mandíbulas, mento, placas ventromentais, pente epifaríngeo e pré-mandíbulas) foi obtido com auxilio da câmara clara, scaneado com o Scaner HP Scanjet 2400 e as devidas correções foram feitas no programa Adobe Photoshop cs2.

A mensuração de quatro estruturas mais o comprimento ventral da cápsula cefálica foi realizado com a ocular milimetrada do próprio microscópio, seguindo um mesmo padrão para todos os instares. Foram medidos os comprimentos das placas ventromentais, das mandíbulas, do mento e a região ventral da cápsula cefálica. Nas antenas, foi realizada a proporção antenal, que é uma razão entre o comprimento do segmento basal e o comprimento do flagelo (FIGURA 8).

Para demonstrar que além do comprimento ventral da cápsula cefálica (GRÁFICO 5), as mensurações de outras estruturas da cápsula cefálica também podem ser utilizadas para diferenciar os instares larvais, um histograma com as frequencias das medidas observadas nos quatro ínstares larvais foi realizado para cada uma das quatro estruturas medidas (GRÁFICOS 1, 2, 3, e 4).

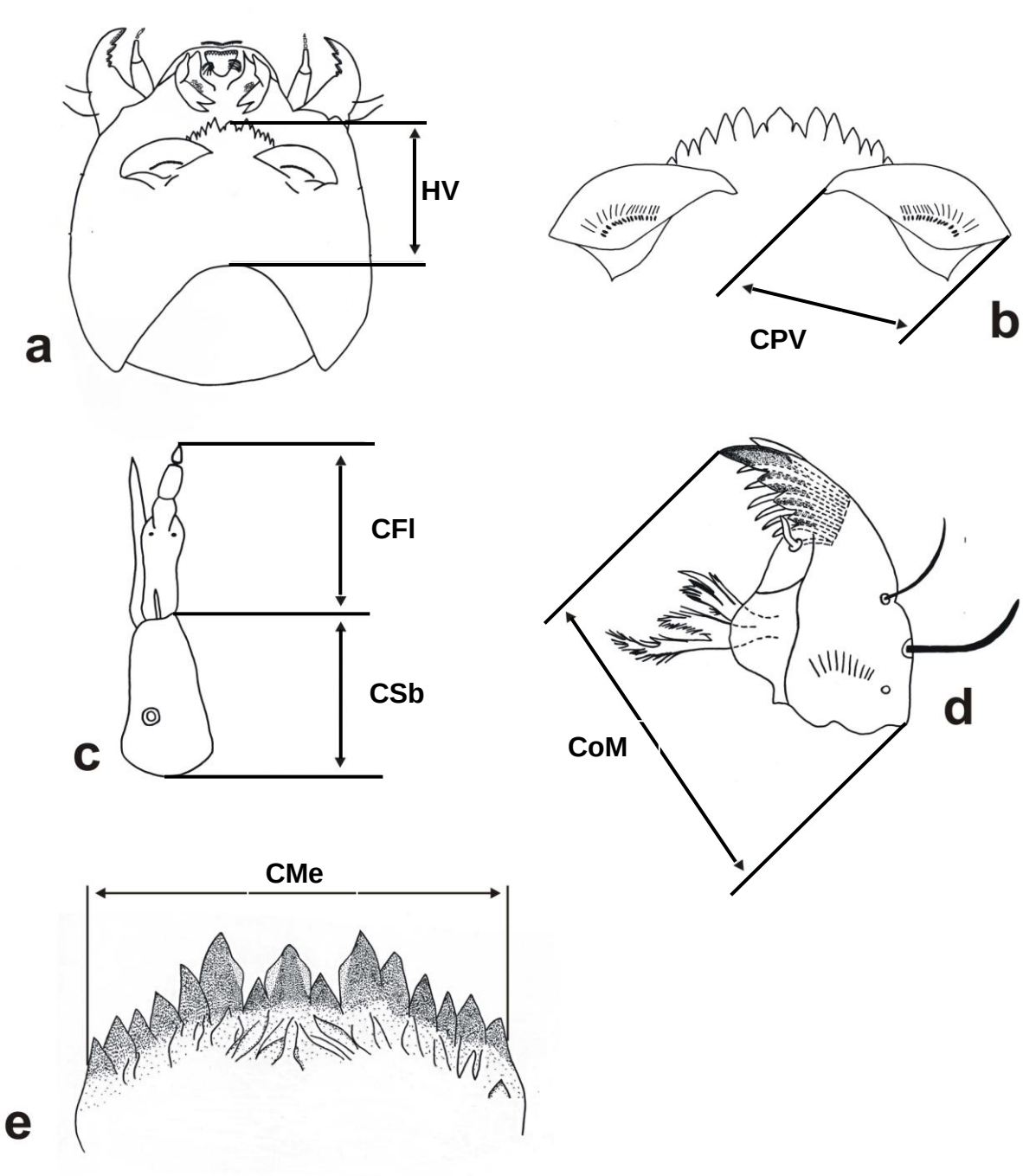


FIGURA 8 – Estruturas mensuradas da cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli*. **a**. Cápsula cefálica. **b**. Placas ventromentais. **c**. antena. **d**. mandíbula. **e**. mento. (**CFl**: comprimento do flagelo, **CMe**: comprimento do mento, **CoM**: comprimento da mandíbula, **CSb**: comprimento do segmento basal, **CPV**: comprimento das placas ventromentais, **HV**: comprimento ventral da cápsula cefálica).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No monitoramento de ambientes aquáticos, as deformidades morfológicas das larvas de quironomídeos oferecem uma maneira útil de se estimar a toxicidade do sedimento, ao contrário de outros parâmetros como, por exemplo, a taxa de mortalidade e o tempo de desenvolvimento, que podem ser influenciados por estressores não tóxicos (VERMEULEN, 1998).

As larvas de quironomídeos entram em contato direto e ingerem os xenobióticos, dessa forma, as deformidades morfológicas geralmente aparecem nas estruturas da cápsula cefálica, como antena e peças bucais. Estudos dos padrões naturais dessas estruturas e suas possíveis alterações são extremamente necessários (DI VEROLI *et al.*, 2008).

Frequentemente as medidas mais utilizadas para a definição dos ínstares larvais de Chironomidae são o comprimento ventral (McCAULEY, 1974; TRIVINHO-STRIXINO & STRIXINO, 1982; CORBI & TRIVINHO-STRIXINO, 2006) e a largura da cápsula cefálica (DYAR, 1890; ECOLE *et al*., 1999; SILVA *et al*., 2008). Na tentativa de criar outras alternativas ao método tradicional foram mensuradas outras quatro estruturas da cápsula cefálica (antenas, mandíbulas, mento e placas ventromentais) que foram comparadas com os resultados obtidos para o comprimento ventral da cápsula cefálica.

Todas as quatro estruturas seguiram o mesmo padrão de frequencia observado para as medidas do comprimento ventral da cápsula cefálica. Por possuírem desvios pequenos (TABELA 1), não houve sobreposição de medidas entre os ínstares larvais, dessa forma, classes específicas correspondentes aos quatro ínstares foram caracterizadas para as antenas, mandíbulas, mento e placas ventromentais (GRÁFICOS 1, 2, 3, e 4).

Os resultados estão demonstrados primeiramente com a prancha da estrutura (PRANCHAS 1-6), representando o padrão natural para a espécie, seguido do gráfico (GRÁFICOS 1-4) que demonstra a sua utilização como ferramenta para a determinação dos ínstares larvais.

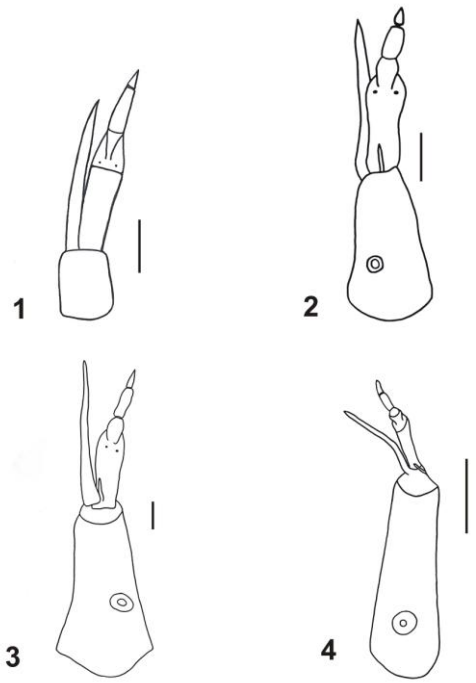
Tabela 1 - Medidas em μm para o mínimo, a máxima e as médias com seus respectivos desvios e intervalos de confiança encontrados para a proporção antenal, comprimento da cápsula cefálica, mandíbulas, mento e placas ventromentais, de primeiro ao quarto ínstar larval de *Chironomus sancticaroli*, mantidas sob condições de laboratório.

Medidas em μm	Instar	Nº larvas	Min.	Max.	Média	SD	Int. Conf.
Proporção antenal	I	30	0,25	0,34	0,30	0,027	0,281-0,328
	II	30	0,50	0,78	0,67	0,070	0,632-0,714
	III	45	0,86	1,15	0,99	0,071	0,952-1,050
	IV	60	1,31	2,00	1,57	0,156	1,500-1,692
Comp. ventral da cápsula cefálica	I	30	6,10	6,60	6,33	0,149	6,225-6,400
	II	30	9,70	11,20	10,23	0,315	9,960-10,460
	III	45	16,18	19,17	17,92	0,590	17,680-18,430
	IV	60	27,50	32,00	29,31	1,365	29,000-31,000
Comp. das mandíbulas	I	30	4,40	5,10	4,70	0,215	4,500-4,900
	II	30	6,20	8,40	7,62	0,398	7,470-7,719
	III	45	11,95	14,44	13,47	0,595	13,130-13,940
	IV	60	19,00	31,00	23,24	1,585	22,500-24,000
Comp. do mento	I	30	3,50	4,00	3,71	0,131	3,600-3,800
	II	30	5,47	5,97	5,59	0,161	5,478-5,727
	III	45	9,20	10,95	10,24	0,377	9,960-10,460
	IV	60	17,00	22,00	18,90	1,001	18,000-19,500
Comp. das placas ventromentais	I	30	2,80	3,30	3,06	0,129	3,000-3,200
	II	30	5,10	5,80	5,53	0,178	5,400-5,625
	III	45	9,20	12,45	10,87	0,530	10,460-11,210
	IV	60	18,00	23,50	20,45	1,090	19,750-21,000

4.1 PADRÃO MORFOLÓGICO DAS ANTENAS

As antenas são constituídas pelo segmento basal, flagelo formado por quatro segmentos, pela lâmina antenal, lâmina acessória e pelo órgão anelar (FIGURA 7 – a). Esses componentes não se alteram muito ao longo do desenvolvimento, exceto nas larvas de primeiro ínstar, as quais o órgão anelar encontra-se ausente, o segmento basal é excepcionalmente curto e achatado e possuem uma lâmina antenal longa e desproporcional (PRANCHA 1, figura 1).

ARMITAGE *et al.* (1995), encontraram esses mesmos resultados analisando a subfamília Chironominae, a qual esta espécie pertence. Segundo o autor, a primeira muda resulta em mudanças nas antenas, especialmente no que diz respeito ao comprimento do segmento basal.



PRANCHA 1 – Padrão morfológico natural das antenas de larvas de *Chironomus sancticaroli* mantidas sob condições de laboratório. Antenas do primeiro ao quarto instar (1-4). 1, 2 e 3 escala: 0,01mm; 4 escala: 0,05 mm.

Quando os quironomídeos se desenvolvem em ambientes aquáticos de baixa qualidade como, por exemplo, águas contaminadas com poluentes, muitas alterações ocorrem nas antenas dos imaturos. SERVIA *et al*. (1998), observaram perdas dos segmentos antenais, deslocamento dos órgãos sensoriais, reduções do segmento basal, presença de estruturas com homologia desconhecida, quando

larvas de *Prodiamesa olivacea* Meigen, 1818 foram coletadas de um rio com enriquecimento orgânico proveniente de esgoto doméstico e resíduos industriais.

BHATTACHARYAY *et al*. (2005), encontraram para as antenas de *Chironomus plumosus* Linnaeus, 1758 expostas a metais pesados, as seguintes deformidades: perda de segmentos individuais, aparecimento de novas estruturas, segmentos adicionais e, por vezes deslocamento ou perda total do órgão anelar.

Segundo DICKMAN *et al*. (1992), existe uma correlação direta entre a porcentagem de deformidade e a concentração de metais pesados nos sedimentos, a qual foi confirmada em casos de antenas de várias espécies.

Uma ferramenta muito importante para a taxonomia é a proporção antenal (FIGURA 8 - c). Neste estudo foi testada sua eficácia na definição e diferenciação dos ínstares larvais, os resultados encontrados do primeiro ao quarto ínstar foram, respectivamente: 0,30 (± 0,02717), 0,67 (± 0,07010), 0,99 (± 0,07129), 1,57 (± 0,15696) (TABELA 1).

STRIXINO & STRIXINO (1981), quando descreveram a espécie, utilizaram 15 larvas para a análise e obtiveram para larvas de quarto ínstar uma proporção antenal de 1,74, com mínimo de 1,57 e máximo de 1,90. Utilizando uma amostra quatro vezes maior, foi detectado uma amplitude mais elevada para a proporção antenal deste ínstar, com um mínimo de 1,31 e máximo de 2,00, englobando os valores descritos pelos autores.

Através das proporções antenais, foi possível estabelecer classes específicas de tamanhos equivalentes aos quatro ínstares larvais encontrados na espécie alvo (GRÁFICO 1).

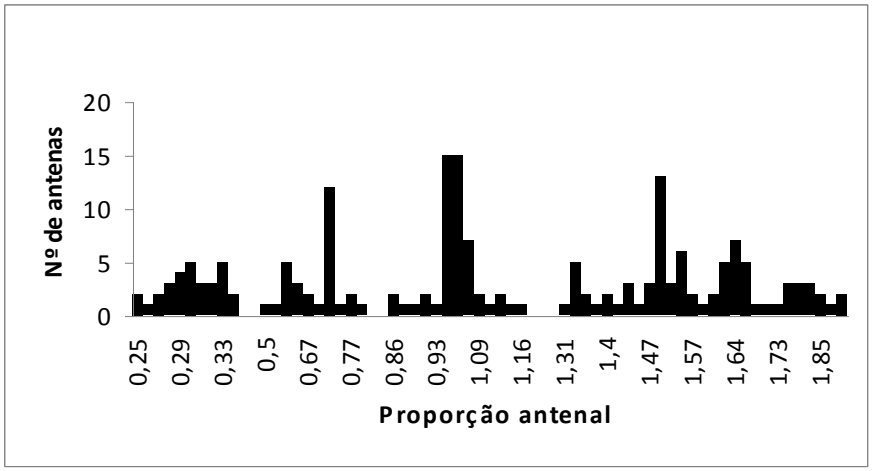


GRÁFICO 1 – Frequência das proporções antenais das larvas de *Chironomus sancticaroli* de primeiro ao quarto ínstar, mantidas sob condições de laboratório.

4.2 PADRÃO MORFOLÓGICO DAS MANDÍBULAS

As mandíbulas fazem parte do aparato bucal mastigador dos quironomídeos e são formadas por: cinco dentes (quatro ventrais e um dorsal), espinhos, estrias, órgão anelar, mola, seta interna, seta subdentalis e pente mandibular (FIGURA 7 - b). Possuem um formato triangular e um longo dente apical.

No primeiro ínstar estão ausentes a seta interna, o pente mandibular, as estrias e o órgão anelar (PRANCHA 2, figura 5). OLAFSSON (1992), quando comparou a morfologia durante o desenvolvimento larval de seis espécies da tribo Chironomini (*Chironomus riparius*, *Cryptochironomus defectus* gr., *Endochironomus albipennis*, *Glyptotendipes pallens*, *Microtendipes pedellus*, *Parachironomus arcuatus*), também observou a ausência do pente mandibular e da seta interna no ínstar inicial.

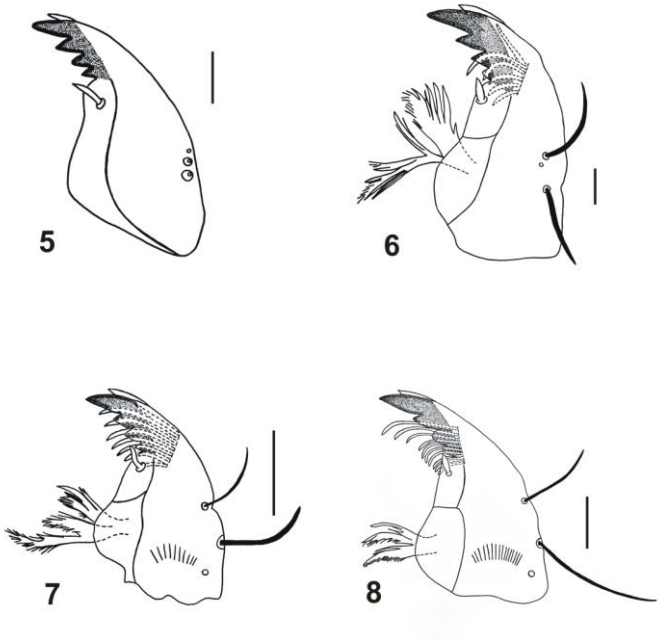
No segundo ínstar continuam ausentes as estrias e o órgão anelar, mas o pente mandibular e a seta interna já estão bem desenvolvidos, assim como observado em OLAFSSON (1992) para quatro espécies (*Chironomus riparius*, *Endochironomus albipennis*, *Glyptotendipes pallens*, *Microtendipes pedellus*) (PRANCHA 2, figura 6).

No terceiro e quarto ínstar todas as estruturas estão presentes (PRANCHA 2, figuras 7 e 8). Na descrição da espécie feita por (STRIXINO & STRIXINO, 1981), é indicado para as mandíbulas de quarto ínstar apenas quatro dentes visíveis, após análise do parátipo da espécie, o quinto dente (dorsal) pode ser reconhecido, o qual foi incluído nas análises.

As mandíbulas possuem evidentes deformidades morfológicas quando as larvas entram em contato com substâncias tóxicas. SERVIA *et al*. (1998), encontraram nas mandíbulas de *Prodiamesa olivacea* coletadas em um rio da Espanha, enriquecido com esgoto doméstico e resíduos industriais, muitas alterações como, por exemplo: perda de dentes, presença de dentes extras e variações do formato natural das mandíbulas.

JANSSENS DE BISTHOVEN *et al*. (2001), encontraram mandíbulas com dentes adicionais em larvas de *Chironomus riparius* expostas a cádmio.

WILLIAMS *et al*. (2001), analisando nove espécies de quironomídeos coletados de vários ambientes aquáticos ao redor de Chernobyl, após o acidente com a usina nuclear, observaram para as mandíbulas: dentes com formatos anormais, espaçamento ou sobreposições dos mesmos; dentes extras; ausência de espinhos, cerdas e setas.



PRANCHA 2 – Padrão morfológico natural das mandíbulas de larvas de *Chironomus sancticaroli* mantidas sob condições de laboratório. Mandíbulas de primeiro a quarto instar (5-8). 5 e 6 escala: 0,01 mm; 7 e 8 escala: 0,05 mm.

As frequências das medidas do comprimento das mandíbulas (FIGURA 8 - d) de primeiro a quarto ínstar são constituídas por classes, que se equivalem aos quatro instares larvais (GRÁFICO 2).

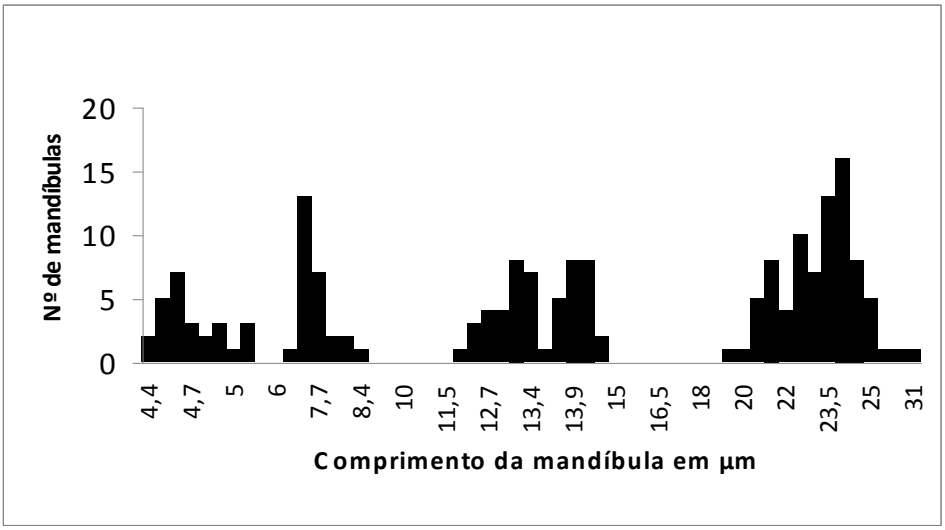


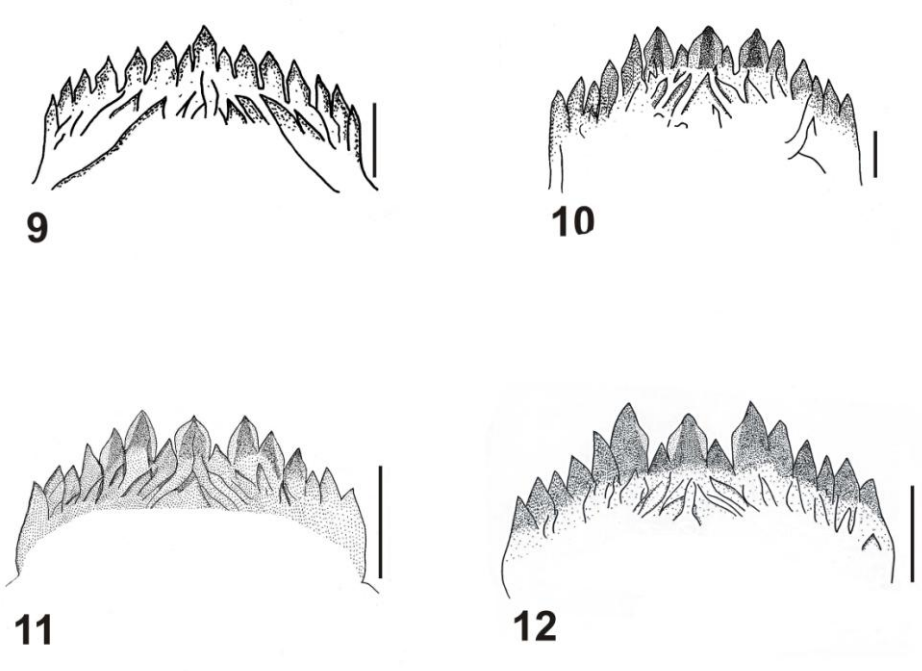
GRÁFICO 2 - Frequência em µm do comprimento das mandíbulas de larvas de *Chironomus sancticaroli* do primeiro ao quarto ínstar, mantidas sob condições de laboratório.

4.3 PADRÃO MORFOLÓGICO DO MENTO

O mento é caracterizado por possuir 13 dentes, seis em cada lado (chamados de laterais) e um central trífido (FIGURA 7 - c) O padrão de coloração e tamanho (comprimento e largura) dos dentes varia visualmente ao longo do desenvolvimento larval (PRANCHA 3 e FOTOS 1-4).

No primeiro ínstar os dentes em geral são mais estreitos e compridos, com suas pontas bem afiladas, mas o dente central trífido é maior que todos os outros (FOTO 1). No segundo ínstar, os dentes começam a ficar mais largos e o dente central trífido possui o mesmo tamanho que os dois primeiros laterais subsequentes. Já se pode notar que o quarto dente lateral, contando a partir do central trífido, está levemente menor que o terceiro e o quinto (FOTO 2).

No terceiro e quarto ínstar o mento é praticamente igual, o dente central trífido é menor que os primeiros laterais e o quarto lateral é menor que o terceiro e o quinto (FOTOS 3 e 4). Estes resultados são os mesmos encontrados por STRIXINO & STRIXINO (1981) na descrição para a espécie, assumindo assim o padrão final da estrutura.



PRANCHA 3 – Padrão morfológico natural do mento de larvas de *Chironomus sancticaroli* mantidas sob condições de laboratório. Mento de primeiro ao quarto instar (9-12). 9 e 10 escala: 0,01 mm; 11 e 12 escala: 0,05 mm.

FOTO 1: Mento do 1º ínstar. Aumento - 1000X

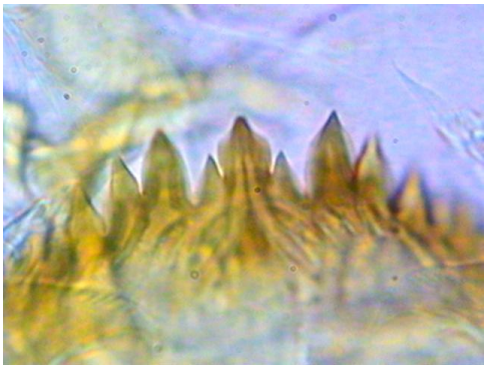


FOTO 2: Mento do 2º ínstar. Aumento - 1000X

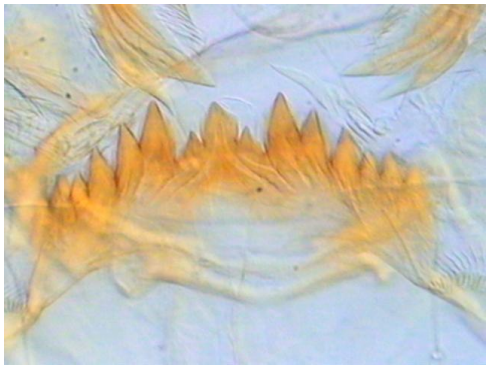


FOTO 3: Mento do 3º ínstar. Aumento – 400X

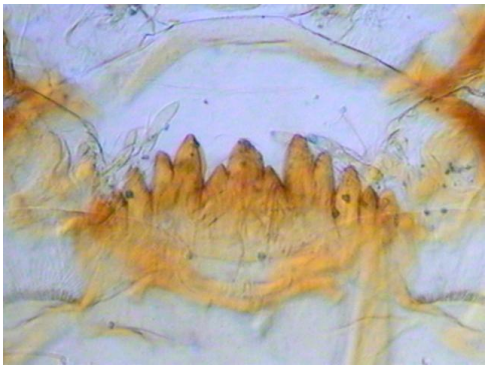


FOTO 4: Mento do 4º ínstar. Aumento – 200X

O mento é a principal estrutura utilizada em protocolos de biomonitoramento ambiental, visto que suas deformidades são as mais comuns e fáceis de visualizar (MacDONALD & TAYLOR, 2006).

Di Veroli (2008), estudando larvas de *C. plumosus* e *Procladius* sp em um lago da Itália central, naturalmente eutrofizado, encontrou deformidades morfológicas no mento. Estas foram classificadas de acordo com um protocolo modificado de JANSSENS DE BISTHOVEN et al. (1998):

- Classe 1 (Cl 1 – amostras sem quaisquer deformidades morfológicas);
- Classe 2 (Cl 2 – amostras com deformidades fracas: um dente adicional ou ausente, um ou dois dentes arredondados, assimetria fraca, um dente bífido, dois dentes unidos);
- Classe 3 (Cl 3 – amostras com deformidades fortes: “Gap Köhn”, dentes muito redondos, dois ou mais dentes ausentes ou adicionais, dentes não desenvolvidos, três ou mais dentes juntos).

NAZAROVA *et al.* (2004), analisando a exposição de quironomídeos (*Goeldichironomus* sp. e *Chironomus* sp.) a metais pesados, observaram as

seguintes alterações do mento: abrasão e ruptura, divisões periféricas dos dentes laterais, assimetrias.

Deformidades como: um ou mais dentes centrais extras, presença de lacunas entre os dentes centrais, grupos de dentes laterais extras foram encontradas por SERVIA *et al*. (1998), em mentos de *Prodiamesa olivacea*, provenientes de um rio da Espanha, enriquecido com esgoto doméstico e resíduos industriais.

Após o acidente com a usina nuclear em Chernobyl, WILLIAMS *et al*. (2001), analisaram nove espécies de quironomídeos coletados ao redor da cidade, o mento apresentou severas alterações como, por exemplo, espaço extra entre os dentes, deformidades no formato e ausência de dentes.

JANSSENS DE BISTHOVEN *et al.* (2001), analisando larvas de C. *riparius* expostas a cádmio, observaram larvas que possuíam mentos com pequena divisão no dente central.

Através da mensuração do comprimento do mento (FIGURA 8 - e), classes de tamanho são formadas. Estas podem ser ótimas ferramentas para a definição e/ou diferenciação dos quatro ínstares larvais presentes para C. *sancticaroli* (GRÁFICO 3).

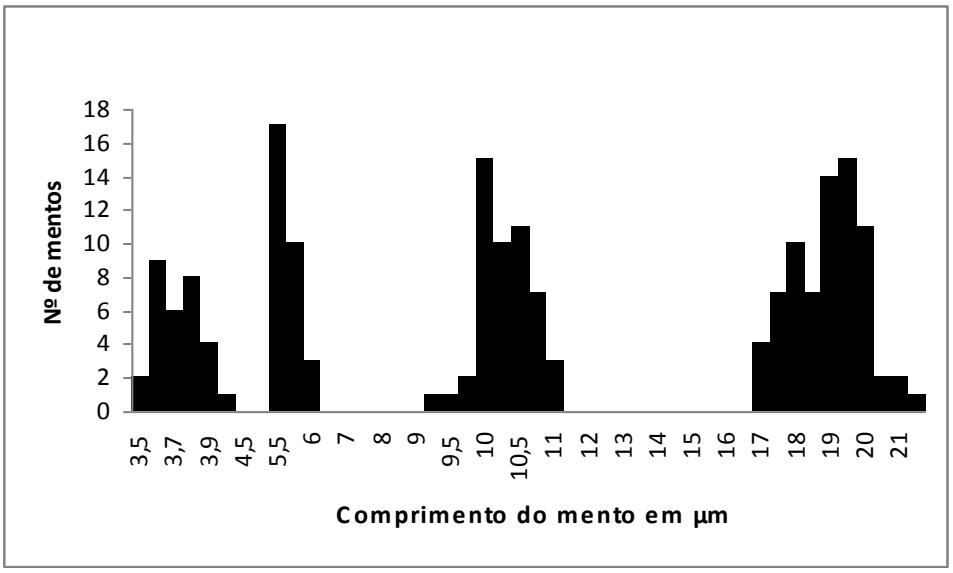


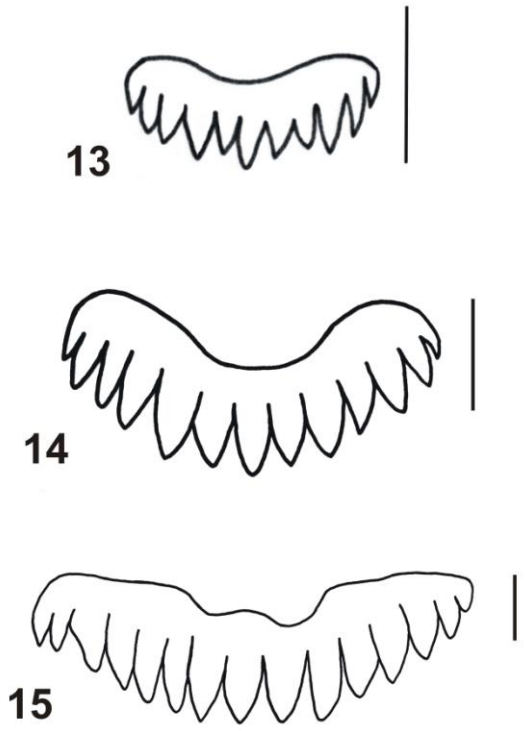
GRÁFICO 3 – Frequência em µm do comprimento do mento de larvas de *Chironomus sancticaroli* do primeiro ao quarto ínstar, mantidas sob condições de laboratório.

4.4 PADRÃO MORFOLÓGICO DO PENTE EPIFARÍNGEO

O pente epifaríngeo também faz parte do aparato bucal mastigador das larvas. No primeiro ínstar esta estrutura está ausente e no restante do desenvolvimento o padrão morfológico dos dentes não se altera, exceto o seu tamanho e quantidade: 2° ínstar – 9 a 11; 3° ínstar – 11 a 13; 4° ínstar – 14 a 17. (PRANCHA 4, figuras13 - 15).

STRIXINO & STRIXINO (1981), descreveram a larvas de quarto ínstar com 15 dentes no pente epifaríngeo. Este dado está presente nos resultados encontrados para este estudo.

Pode ser observada uma sobreposição no número de dentes do segundo para o terceiro ínstar, dessa forma, o pente epifaríngeo não pode ser utilizado para diferenciar esses dois ínstares, porém pode ser aplicado para diferenciá-los do ultimo ínstar larval. Esta é uma ferramenta quantitativa, podendo ser aplicada eficientemente para a diferenciação dos últimos ínstares larvais, porém não foi encontrada bibliografia que utilize esta estrutura para tal função.



PRANCHA 4 – Padrão morfológico natural do pente epifaríngeo de larvas de *Chironomus sancticaroli* mantidas sob condições de laboratório. Pentes epifaríngeos de segundo ao quarto instar (13-15). 13,14 e 15 escala: 0,01 mm.

O comprimento não foi mensurado por esta ser uma estrutura curvada e de difícil visualização de suas margens em um mesmo plano do microscópio.

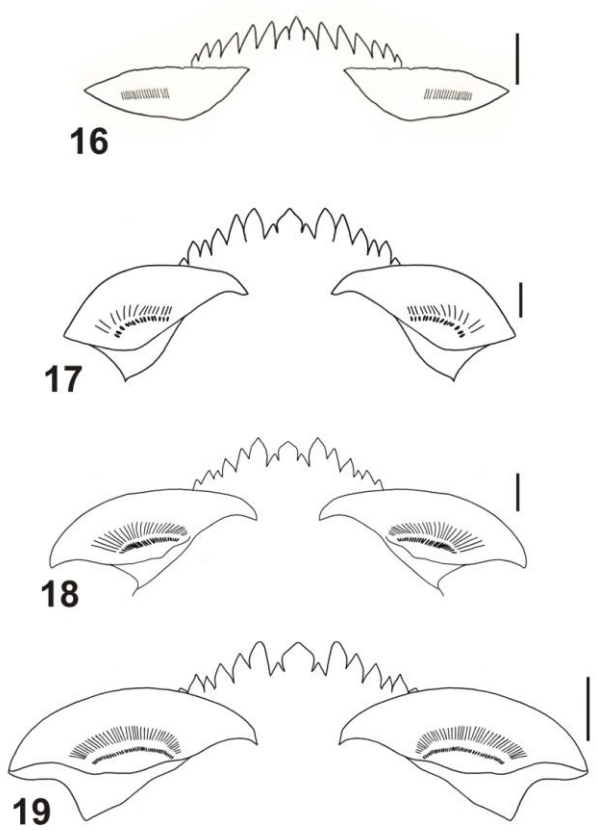
O pente epifaríngeo presente na cápsula cefálica de imaturos de C. *sancticaroli* apresenta deformidades morfológicas evidentes quando ocorre o contato com xenobióticos. Larvas de nove espécies de quironomídeos coletadas nos arredores de Chernobyl, oito anos após o acidente nuclear, apresentaram pentes epifaríngeos com variações nos tamanhos e curvaturas dos dentes, fusão e redução do número de dentes e formato anormal dos dentes (WILLIAMS *et al*., 2001).

Segundo KOSALWAT & KNIGHT (1987) e GUTCHE & URK (1989), vários experimentos com espécies de *Chironomus* indicam relações diretas entre os níveis de metais pesados e deformidades no pente epifaríngeo. Estes resultados são promissores no que diz respeito ao desenvolvimento de futuros índices específicos, no entanto, muitos trabalhos ainda são requisitados para caracterizar as relações entre contaminantes individuais e deformidades.

4.5 PADRÃO MORFOLÓGICO DAS PLACAS VENTROMENTAIS

Segundo BERG (1995), as placas ventromentais possuem a função de auxiliar a produção da seda. As secreções salivares são forçadas através das ranhuras na borda anterior das placas ventromentais, dessa forma, uma rede de seda é constituída.

Do primeiro ao quarto ínstar o número de estrias (FIGURA 7 - e) varia: inviável quantificar no 1° ínstar; de 12 a 16 no 2° ínstar; de 20 a 24 no 3° ínstar e de 36 a 40 no 4° ínstar (PRANCHA 5, figuras 16 - 19). O número de estrias forma classes específicas para cada ínstar, portanto as placas ventromentais podem ser importantes ferramentas para a identificação e/ou definição dos ínstares larvais, porém nenhum estudo foi relatado utilizando-se dessa estrutura para tal função.



PRANCHA 5 – Padrão morfológico natural das placas ventromentais de larvas de *Chironomus sancticaroli* mantidas sob condições de laboratório. Placas ventromentais de primeiro ao quarto instar. 16, 17 e 18 escala: 0,01 mm; 19 escala: 0,05 mm.

O comprimento das placas ventromentais (FIGURA 8 - b) ao longo da ontogenia também forma classes específicas para cada ínstar (GRÁFICO 4).

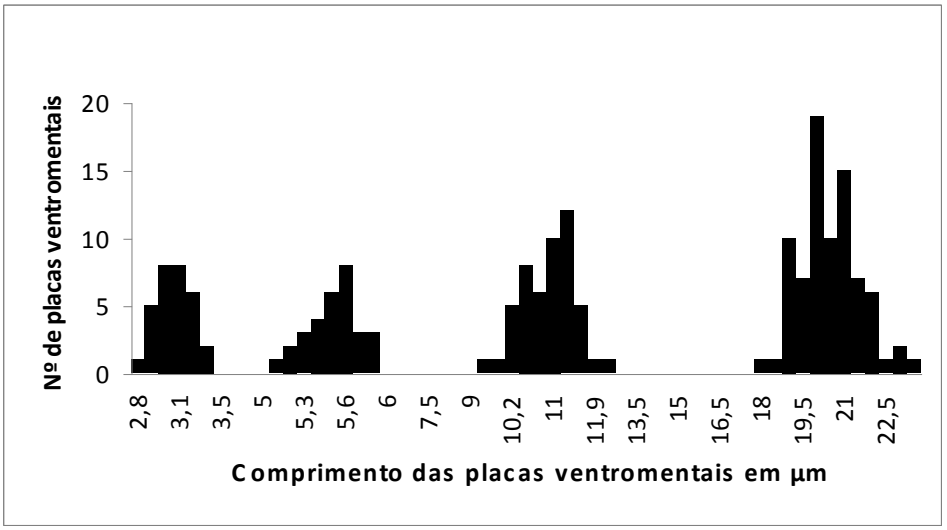


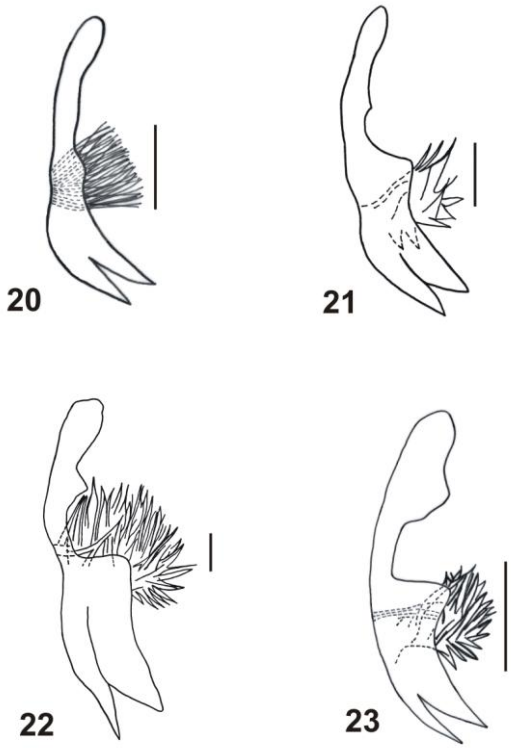
GRÁFICO 4 - Frequência em µm do comprimento das placas ventromentais de larvas de *Chironomus sancticaroli* do primeiro ao quarto ínstar, mantidas sob condições de laboratório.

4.6 PADRÃO MORFOLÓGICO DAS PRÉ-MANDÍBULAS

A função das pré-mandibulas não é muito bem conhecida. Sua estrutura e posição na região labral indicam que elas servem tanto para reforçar o lábio enquanto empurra os itens alimentares, quanto para afastar as partículas presas na seta labral e movê-las para o esôfago (OLAFSSON, 1892).

STRIXINO & STRIXINO (1981), na descrição da espécie não citam as pré-mandibulas, mas segundo ARMITAGE *et al*. (1995) elas são caracterizadas por serem bífidas e possuírem o premandibular *brush* (FIGURA 7 - f), características encontradas para todos os ínstares larvais neste trabalho (PRANCHA 6, figuras 20-23).

Segundo OLAFSSON (1892), as pré-mandíbulas do primeiro ínstar não possuem o premandibular *brush* em todas as espécies analisadas por ele (*Chironomus riparius*, *Cryptochironomus defectus* gr., *Endochironomus albipennis*, *Glyptotendipes pallens*, *Microtendipes pedellus*, *Parachironomus arcuatus*), o que não foi observado neste estudo.



PRANCHA 6 – Padrão morfológico natural das pré-madíbulas de larvas de *Chironomus sancticaroli* mantidas sob condições de laboratório. Pré-mandíbulas do primeiro ao quarto ínstar. 20, 21 e 22 escala: 0,01 mm; 23 escala: 0,05 mm.

Apesar das pré-mandíbulas não se alterarem durante a ontogenia do organismo, elas sofrem extremas deformidades quando expostas a poluentes.

SERVIA *et al*. (1998), encontraram nas pré-mandíbulas de *Prodiamesa olivacea* coletadas em um rio da Espanha, enriquecido com esgoto doméstico e resíduos industriais, algumas deformidades, como por exemplo: perda de dentes, presença de dentes extras e variações do formato natural das pré-mandíbulas.

JANSSENS DE BISTHOVEN *et al.* (2001), também encontraram deformidades nas pré-madíbulas de larvas de C. *riparius* expostas a cádmio, porém o numero de deformidades foi maior em baixas concentrações.

O comprimento não foi mensurado por esta ser uma estrutura curvada e de difícil visualização de suas margens em um mesmo plano do microscópio.

4.7 COMPRIMENTO VENTRAL DA CÁPSULA CEFÁLICA

A identificação do ínstar do inseto é geralmente baseada na mensuração da largura ou comprimento da cápsula cefálica (DYAR, 1890). Porém este procedimento deve ser rejeitado quando as espécies são analisadas em microscópio, pois a compactação causada pela montagem das lâminas resulta em alterações consideráveis de suas dimensões (FORD, 1959).

Como alternativa, diversas estruturas do interior da cápsula cefálica podem ser selecionadas como parâmetros para a determinação dos ínstares. O comprimento ventral da cápsula cefálica é uma delas (FIGURA 8 - a).

Neste estudo, foi mensurado o comprimento ventral da cápsula cefálica de primeiro ao quarto ínstar para a comparação de um parâmetro amplamente utilizado com parâmetros pouco utilizados, como: comprimento da mandíbula, mento, placas ventromentais e proporção antenal.

Pode-se observar que todas as medidas formam classes específicas de tamanho equivalente aos quatro ínstares larvais, inclusive o comprimento ventral da cápsula cefálica, resultado esperado previamente (GRÁFICO 5).

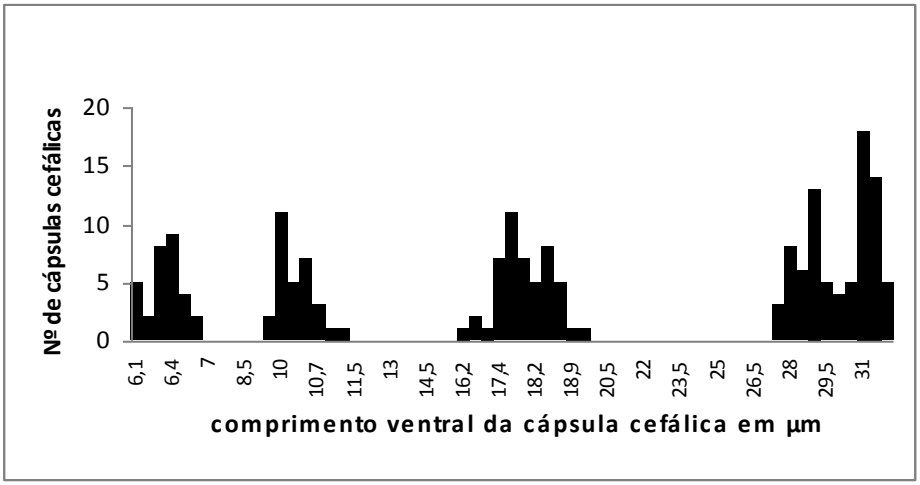


GRÁFICO 5 - Frequência em µm do comprimento ventral da cápsula cefálica de larvas de *Chironomus sancticaroli* do primeiro ao quarto ínstar, mantidas sob condições de laboratório.

5. CONCLUSÕES

Através da análise morfológica e morfométrica das estruturas da cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli* ao longo do desenvolvimento larval, foram alcançadas as seguintes conclusões:

- Em *Chironomus sancticaroli* é possível a definição dos ínstares larvais utilizando as antenas, mandíbulas, mento, placas ventromentais e pente epifaríngeo.
- Em *Chironomus sancticaroli* é possível determinar o padrão morfológico utilizando as antenas, mandíbulas, mento, pente epifaríngeo, placas ventromentais e pré-mandíbulas, uma vez que poucas variações foram observadas dentro de um mesmo ínstar.
- É possível definir o padrão morfológico das estruturas selecionadas presentes na cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli* para os quatro ínstares larvais.
- A determinação dos quatro ínstares larvais é possível utilizando-se separadamente da morfometria das antenas, mandíbulas, mento e placas ventromentais, as quais formaram classes de tamanho especificas para cada ínstar.

REFERÊNCIAS

ABILIO, F. J. P., FONSECA-GESSNER, A. A., WATANABE, T., LEITE, R. L. Fauna de Chironomidae e outros insetos aquáticos de açudes do semi-árido paraibano, Brasil. **Entomologia y Vectores**. v.12, n. 2, p. 255-264, 2005.

ALI, A. Nuisance, economic impact and possibilities for control. In: Armitage, P. D.; Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. (eds). **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges.** Chapman & Hall, London, UK, p.339-363, 1995.

ARMITAGE, P. D.; CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. **The Chironomidae: the Biology and Ecology of non-biting midges,** 572 p. 1995.

ASHE, P. A catalogue of chironomid genera and subgenera of the world including synonyms (Diptera: Chironomidae). **Entomologica Scandinavica Suplements**. v. 17, p. 3-17, 1983.

AZEVEDO, F. A. de; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003 – São Paulo, 340p.

BENOIT, D. A., SIBLEY, P. K., JUENEMANN, J. L., ANKLEY, G. T. *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v. 16, p. 1165–1176., 1997.

BERG, H. B. Larval food and feeding behaviour. In: Armitage, P. D.; Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. (eds). **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges.** Chapman & Hall, London, UK, p.136-168, 1995.

BHATTACHARYAY, G.; SADHU, A. K.; MAZUMDAR, A.; CHAUDHURI, P. K. Antennal deformities of chironomid larvae and their use in biomonotoring of heavy metal pollutants in the river Damodar of west Bengal, India. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 108, p. 67-84, 2005.

BOOKSTEIN, F. L. Foundation of morphometrics. **Annual Review of Ecology, Evolution end Systematic**. v.13, p. 451-70, 1982.

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Fundamentals concepts in aquatic ecotoxicology. In: BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. (Ed.). **Aquatic Ecotoxicology: fundamental concepts and methodologies**. Boca R: CRC Press, Inc. v.1, p. 35-74, 1989.

BRACKENBUTY, J. Locomotory modes in the larva and pupa of Chironomus plumosus (Diptera, Chironomidae). **Journal of Insect Physiology**, 46, 1517–1527, 2000.

CALLISTO, M., ESTEVES, F. A. Biomonitoramento da macrofauna bentônica de Chironomidae (Diptera) em dois igarapés amazônicos sob influência das atividades de uma mineração de bauxita. p. 299-309. **In Ecologia de insetos aquáticos**. Nessimian, J. L. & Carvalho, A. L. (eds). Series Oecologia Brasiliensis, vol. V. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil. 1998.

CALLISTO, M., GONÇALVES, J.F. Bioindicadores Bentônicos. *In:* Fabio Roland, Dionéia Cesar e Marcelo Marinho (Eds). **Lições de Limnologia**, São Carlos, Ed. Rima, pp. 371-379, 2005.

CALLISTO, M.; GONÇALVES, J.F., MORENO, P. Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores. *In:* Goulart, E.M.A. (Eds). **Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais**, 555-567, 2005.

CAREW, M. E.; PETTIGROVE, V.; HOFFMANN, A. A. Identifying chironomids (Diptera:Chironomidae) for biological monitoring with PCR–RFLP. **Bulletin of Entomological Research.** v. 93, p. 483–490, 2003.

CORBI, J.J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Ciclo de vida de duas espécies de *Goeldchironomus* (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v.50, p. 72-75, 2006.

CORREIA, L. C. S. **Contribuição para o conhecimento do gênero Chironomus Meigen, 1803 na região neotropical São Carlos**. Tese de doutorado,148p. 2004.

CRANSTON, P. S. Morphology. In: Armitage, P. D.; Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. (eds). **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges.** Chapman & Hall, London, UK, p.13-30, 1995 a.

CRANSTON, P. S. Chironomids: From gene to ecosystems. **Proceedings of the 12th International Symposium on Chironomidae**. East Melbourne, 450p. 1995 b.

CRANSTON, P. S. Insecta: Diptera, Chironomidae. **Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region.** 2004.

CUKER, B.E. Competition and coexistence among the grazing snail Lymnaea, Chironomidae, and microcrustacea in an arctic epilithic lacustrine community. **Ecology**. v. 64, p. 10–15, 1983.

CUMMINS, K. W.; KLUG, M. J. Feeding ecology on stream invertebrates. **Annual Review of Ecology and Systematic**. v. 10, p.147-172, 1979.

CURRY, L. L. A survey of environmental requirements for the midge. In Biological Problems in Water Pollution, 127-41. Cincinnati: U.S. **Public Health Service**. 376 pp, 1955.

DALY, H. V. Insect Morphometrics. **Annual Reviews of Entomology**. v. 30, p. 4/5-38. 1985.

DI VEROLI, A. *et al.* Incidence of larvae mouthpart deformities in *Chironomus Plumosus* (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) and *Procladius sp*. (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) from Piediluco Lake, Italy. **Proceedings of the 16th International Chironomid Symposium**. v 13, p. 13-20, 2008.

DICKMAN, M., BRINDLE, I., BENSON, M. Evidence of teratogens in sediments of the Niagara River watershed as reflected by Chironomid (Diptera: Chironomidae) deformities. **Journal of Great Lakes Research**. v. 18, n. 3, 467–480, 1992.

DYAR, H.G. The number of molts of Lepidopterous larvae. **Psyche**. v. 5, p. 420-422, 1890.

ECOLE, C. C. Determinação do número de ínstares larvais em Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) **Acta Scientiarum.** v. 21, n. 2, p. 331-335, 1999.

EPLER, J. H. Identification manual for the larval CHIRONOMIDAE (DIPTERA) of North and South Carolina. **Aquatic Entomologist**. 526pp, 2001.

FORD, J. B. A study of larval growth, the number of instars and sexual differentiation in the Chironomldae. **Proceedings of the Royal Entomological Society of London.** v. 34, p.151-60, 1959.

FREITAS, F.; FLOETER-WINTER, L. M.; LEONCINI, O. Cytological and cytochemical characterization of the polytene chromosomes of *Chironomus sancticaroli* (DIPTERA: Chironomidae). **Revista Brasileira de Genética**. v. VIII, n. 1, p. 47-60, 1985.

FRIBERG, N.; JOHNSON, R. K. **Methods for biological monitoring of streams in the Nordic coutries based on macroinvertebrates**. NMR report, Uppsala, 12 p. 1995.

GUCHTE, C. van, Urk, G. van. Discrepancies in the Effects of Field and Artificially Heavy Metal Contaminated Aquatic Sediments upon Midge Larvae. in Vernet, J. P. (ed.), Heavy Metals in the Environment, **7th International Conference**, Geneva, 1989.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os Insetos: um resumo de entomologia**. 3 ed. São Paulo: Roço, 2008.

HA, M., CHOI, J. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, Chironomus riparius (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. **Chemosphere**. v. 71, p. 1928–1936, 2008.

JANSSENS DE BISTHOVEN, L.; POSTMA, J.; VERMEULEN, A.; GOEMANS, G.; OLLEVIER, F. Morphological deformities in *Chironomus riparius* Meigen Larvae after exposure to cadmium over several generations. **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 129, p. 167–179, 2001.

JANSSENS DE BISTHOVEN, L.; GERHARDT, A. Chironomidae (DIPTERA, NEMATOCERA) fauna in three small streams of Skania, Sweden. **Environmental Monitoring and Assessment.** v. 83, p. 89–102, 2003.

JEYASINGHAM, K.; LING, N. Seasonal influence on head capsule deformities in *Chironomus zealandicus* (Hudson) (Diptera: Chironomidae). **Hydrobiologia**. v. 427, p. 75–82, 2000.

KARR, J. R. Biological integrity: a long-neglected aspect of water resource management. **Journal of Ecology Applied**. v.1, p. 66-84, 1991.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos, métodos, técnicas e aplicações**. 288 p. 2004.

KONSTANTINOV, A. S. On the growth type of chironomid larvae. **Doklady Akad Nauk.** v. 120, p. 1151-1154, 1958.

KOSALWAT, P., KNIGHT, A. W. 1987, Chronic toxicity of copper to a partial life cycle of the midge *Chironomus decorus.* **Archives of Environmental Contamimation and Toxicology**. v. 16, p. 283–290, 1987.

LONDOÑO, D. K., SIEGFRIED, B. D., LYDY, M. J. Atrazine induction of a family 4 cytochrome P450 gene in Chironomus tentans (Diptera: Chironomidae) **Chemosphere**. v. 56, p. 701–706, 2004.

MacDONALD, E. E.; TAYLOR, B. R. Incidence of mentum deformities in midge larvae (Diptera:Chironomidae) from Northern Nova Scotia. **Canada Hydrobiologia** v. 563, p. 277–287, 2006.

MANOBARAM, M. J. J. Effect of body size on food utilization in the fish, *Macropodus capanus*. **Indian Journal of Animal Research**. v. 18, n.1, p. 57-60, 1984.

MATTHEWS, R. A.; BUIKEMA, A. L.; CAIRNS Jr., J. Biological monitoring. Part IIA - Receiving system functional methods, relationships and indices. **Water Research**. v. 16, p. 129-139, 1982.

McCAULEY, V. J. E. Instar differentiation in larval Chironomidae (DIPTERA). **Canadian Entomologistic**. v. 106, p. 179-200, 1974.

MCKIE, B. G. Disturbance and investment: developmental responses of tropical lotic midges to repeated tube destruction in the juvenile stages. **Ecological Entomology** v. 29, p. 457–46, 2004.

MELLO, D. Ecotoxicologia: introdução, conceito, principais ramos. In: **Jornada Brasileira de Ecologia**. Campinas, p. 127-131, 1981.

MERRIT, R.W.; CUMMINS, K.W. **An Introduction to the Aquatic Insects of North America**. 3º ed., Dabuqye Iowa: Kendall/ Hunt Publishing Company, 1996.

MOREIRA, M. A. M.; SILVA, L. A. F.; BEZERRA, J. P.; LEONCINI, O. Analysis of the rDNA of *Chironomus sancticaroli* (DIPTERA, CHIRONOMIDAE). **Revista Brasileira de Genética**. v. 15, n.4, p. 821-829, 1992.

MORENO, P. & CALLISTO, M. Benthic macroinvertebrates in the watershed of an urban reservoir in southeastern Brazil. **Hydrobiologia**. v. 560, p. 311-321, 2006.

MUNDIE, J. H. The biology of flies associated with water supply. **Public Health Engineering**. v. 55, p.178-93, 1956.

NAZAROVA, L. B.; RISS, H. W.; KAHLHEBER, A. Some observation of buccal deformities in chironomid larvae (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) from the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. **Caldasia**. v. 26, n.1, p. 275-290, 2004.

NIEMI, G.J.; MCDONALD, M.E. Application of ecological indicators. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic**. v. 35, p. 89-111, 2004.

OLAFSSON, J. S. A comparative study on morphology of certain larvae of Chironomini (Díptera: Chironomidae) with reference to the larval feeding habits. **Journal of Zoology London**. v. 228, p. 183-204, 1992.

OLIVER, D. R. Life history of the chironomidae. **Annual Reviews of Entomology**. v. 16 p. 211-230, 1971.

PINDER, L. C. V. Biology of freshwater Chironomidae. **Annual Review of Entomology**. v.31, p.1-23, 1986.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatici toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.** 2.ed. Washington, D. C.: Taylor and Francis, 1995.

ROSENBERG, D. M. Freswater biomonitoring and Chironomidae. **Netherlands journal of aquatic ecology**. v. 26, n. 2-4, p. 101-122, 1992.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. Chapman & Hall, New York, 488 p. 1993.

SANKARPERUMAL, G.; PANDIAN, T. J. Larval abundance of *Chironomus circundatus* in relation to biotic factors. **Hydrobiologia**. v. 246, p. 205-212, 1992.

SEATHER, O. A. Glossary of chironomid morphology terminology (Diptera: Chironomidae). **Entomologica Scandinavica Suplements**. v. 14. p. 1-51, 1980.

SEATHER, O. A. Phylogeny of the subfamilies of Chironomidae (Diptera). **Systematic Entomology**. v. 25, p. 393-403, 2000.

SERVIA, M. J., COBO, F., GONZÁLEZ, M. A. Deformities in larval *Prodiamesa olivacea* (Meigen, 1818) (Diptera, Chironomidae) and their use as bioindicators of toxic sediment stress. **Hydrobiologia.** v. 385, p. 153–162, 1998.

SERVIA, M. J.; COBO, F.; GONZÁLEZ, M. A. Sobre la posible repercusión de la presencia de deformidades en el coclo vital de *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae). **Boletín de la Asociación Española de Entomología**. Ent. v. 23, n. 1-2, p. 105-113, 1999.

SERVIA, M. J.; COBO, F.; GONZÁLEZ, M. A. Incidence and causes of deformities in recently hatched larvae of *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae). **Archiv für Hydrobiologie**. v. 149, p. 387-401, 2000.

SILVA, F. L., MOREIRA, D. C., BOCHINI, G. L., RUIZ, S. S. Hábitos alimentares de larvas de Chironomidae (Insecta: Diptera) do córrego Vargem Limpa, Bauru, SP, Brasil. **Biotemas**. v. 21, n. 2, p. 155-159, 2008 a.

SILVA, D. S. da; KAMINSKI, L.A.; ERBA, R.D.; MOREIRA, G. R. P. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais: VII. Dryadula phaetusa (Linnaeus) (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 52, n. 4, p. 500-509, 2008 b.

STEVENS, D. J., HANSELL, M. H., FREEL, J. A. & MONAGHAN, P. Developmental trade-offs in caddis flies: increased investment in larval defence alters adult resource allocation. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**. v. 266, p. 1049–1054, 1999.

STRIXINO, G.; TRIVINHO-STRIXINO, S. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (DIPTERA: CHIRONOMIDAE). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 3, n. 4, p.177-180, 1985.

SYROVÁTKA, V.; BRABEC, K. The response of Chironimid larvae to hydraulic conditions: Synorthocladius semivirens (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) in two different rivers. **Boletim do Museu Municipal do Funchal**, n. 13, p. 161-167, 2008.

TOKESHI, M. Production ecology. In: Armitage, P. D.; Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. (eds). **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges.** Chapman & Hall, London, UK, p.269-296, 1995.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Nova espécie do gênero *Chironomus* MEIGEN do sul do Brasil (DIPTERA: CHIRONOMIDAE). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 25, n. 4, p. 333-340, 1981.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 183-189, 1982.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Observações sobre a biologia da reprodução de um quironomídeo da região neotropical (DIPTERA, CHIRONOMIDAE). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 33, n. 2, p. 207-216, 1989.

van URK, G.; KERKIM, F. C. M.; SMIT, H. Life cycle patterns, density, and frequency of deformities in Chironomus larvae (Diptera: Chironomidae) over a contaminated sediment gradient. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v. 49, p. 2291–2299, 1992.

VERMEULEN, A. **Head capsule deformation in Chironomus riparius larvae (Diptera): causality, ontogenesis and its application in biomonitoring**. Ph. D. Thesis. Faculty of Sciences, University of Leuven, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Belgium. 207 pp, 1998.

WALSHE, B. M.. The feeding habits of certain chironomid larvae (subfamily Tendlpedlnae). **Proceedings of Zoological Society of London**. n. 121, p. 63-79, 1951.

WARD, J. V. **Aquatic Insect Ecology: Biology and habitat**. J. Wiley & Sons Inc., New York, 438p. 1992.

WARWICK, W. F.; TISDALE, N. A. Morphological deformities in *Chironomus*, *Cryptochironomus*, and *Procladius* larvae (Diptera: Chironomidae) from two differentially stressed sites in Tobin Lake, Saskatchewan. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v. 45, p. 1123–1144, 1988.

WARWICK, W. F. Morphological abnormalities in Chironomidae (Diptera) larvae as measures of toxic stress in freshwater ecosystems: Indexing antennal deformities in *Chironomus* Meigen. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v. 42, p. 1881–1914, 1985.

WILLIAMS, D, D.; NESTEROVICH, A. I.; TAVARES.; MUZZATTI, E. G. Morphological deformities occurring in Belarusian chironomids (Diptera: Chironomidae) subsequent to the Chernobyl nuclear disaster. **Freshwater Biology.** v. 46, p. 503-512, 2001.

YOSHIMI, T.; ODAGIRI, K.; HIROSHIGE, Y.; YOKOBORI, S.; TAKAHASHI, Y.; SUGAYA, Y.; MIURA, T. Induction profile of HSP70-cognate genes by environmental pollutants in Chironomidae**. Environmental Toxicology and Pharmacology.** v. 28, p. 294–301, 2009.

ZUR, O. The importance of chironomid larvae as natural feed and biological indicator of soil condition in ponds containing common carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Sarotherodon aureus*). **Bamidgeh**, v. 32, p. 66-77, 1980.