

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E MANEJO  
DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

PAULA COSTA LIS

SUSCETIBILIDADE DE LARVAS DE SIMULIIDAE (DIPTERA) A UM NOVO  
FORMULADO A BASE DE *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*, E ASPECTOS  
BIOECOLÓGICOS DE CRIADOUROS EM RIACHOS DE CASCAVEL - PR

CASCAVEL-PR  
AGOSTO/2021

**PAULA COSTA LIS**

**SUSCETIBILIDADE DE LARVAS DE SIMULIIDAE (DIPTERA) A UM NOVO  
FORMULADO A BASE DE *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*, E ASPECTOS  
BIOECOLÓGICOS DE CRIADOUROS EM RIACHOS DE CASCAVEL - PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos  
Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências  
Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do  
Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre em Conservação e Manejo de  
Recursos Naturais

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves

Coorientador: Prof. Dr. João Antônio Cyrino Zequi

Cascavel-PR  
AGOSTO/2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Costa Lis, Paula

Susceptibility of Simuliidae larvae (Diptera) to a new solid formulation based on Bacillus thuringiensis 2 var. israelensis (Bti), and bioecological aspects of the breeding sites in Cascavel - Paraná, Brazil. / Paula Costa Lis; orientador Luis Francisco Angeli Alves; coorientador João Antônio Cyrino Zequi. -- Cascavel, 2021.

71 p.

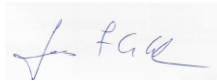
Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, 2021.

1. Borrachudos. 2. Simulium. 3. Controle Biológico . 4. Bioinseticida. I. Angeli Alves, Luis Francisco, orient. II. Cyrino Zequi, João Antônio, coorient. III. Título.

**PAULA COSTA LIS**

**Suscetibilidade de larvas de Simuliidae (Diptera) a um novo formulado a base de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*, e aspectos bioecológico de criadouros em riachos de Cascavel, PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biologia aplicada e indicadores de qualidade no ambiente terrestre, APROVADA pela seguinte banca examinadora:



Orientador - Luis Francisco Angeli Alves

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



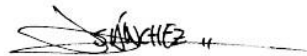
João Antônio Cyrino Zequi

Universidade Estadual de Londrina - (UEL)



Rosilene Luciana Delariva

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Óscar Sanchez Molina

Fundação Oswaldo Cruz - (FIOCRUZ)

Cascavel, 25 de agosto de 2021

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Ao professor Dr. Luis Francisco Angeli Alves, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel (PR), pela oportunidade e orientação.

Ao professor Dr. João Zequi, da Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR), pela oportunidade e coorientação.

Ao professor Dr. Francisco de Assis Marques, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR) pela parceria e processamento dos formulados.

A professora Dr. Ana Tereza Bittencourt Guimarães, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel (PR), pelas aulas e processamento dos dados.

A todos os professores, técnicos e colaboradores do Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais da Unioeste.

A Secretaria Municipal de Saúde de Cascavel (PR), pela autorização para o desenvolvimento do mestrado.

Ao professor Arion Tulio Aranda e ao professor Óscar Sánchez Molina, pelas orientações, suporte e identificação das amostras de Simulídeos encaminhados. Assim como a todos os técnicos do Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ).

A Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNDETEC, de Cascavel (PR) pela realização das análises de água.

A minha família.

"Pium é outra casta de mosquitos tamanhos como pulgas grandes com asas; e em chegando estes à carne, logo sangram sem se sentir, e em lhes tocando com a mão, se esborracham; os quais estão cheios de sangue; cuja mordedura causa muita comichão depois, e quer-se espremida do sangue por não fazer guadelhão na carne."

(Souza, 1587)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS E BIOLÓGICAS DA FAMÍLIA SIMULIIDAE NEWMAN (1843). .....	3
<b>3. VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS</b> .....	<b>6</b>
<b>4. INIMIGOS NATURAIS</b> .....	<b>6</b>
<b>5. DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO</b> .....	<b>7</b>
6.1 USO DE BIOINSETICIDAS .....	9
6.2 MECANISMO DE AÇÃO DE <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> .....	11
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
7.1 OBJETIVO GERAL.....	13
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>8. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
8.1 BIOINSETICIDA.....	14
<b>8.1.1 Bactéria</b> .....	<b>14</b>
<b>8.1.2 Produção da bactéria</b> .....	<b>14</b>
<b>8.1.3 Formulação</b> .....	<b>14</b>
<b>8.1.4 Bioensaios</b> .....	<b>17</b>
8.2 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA .....	24
8.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ÁGUA E INTEGRIDADE FÍSICA DO CÓRREGO SANTA ROSA – DISTRITO DE SEDE ALVORADA – CASCAVEL, PR. 24	
8.4 FOLDER.....	26
<b>9. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
9.1 ATIVIDADE LARVICIDA DAS SUSPENSÕES - SCREENING.....	26
9.2 ATIVIDADE LARVICIDA DOS FORMULADOS SÓLIDOS - SCREENING. ....	27
<b>9.2.1 Comprimidos de 2, 5 e 10 mg (prospecto)</b> .....	<b>27</b>
<b>9.2.2 Comprimidos de 15, 20 e 25 mg</b> .....	<b>27</b>
<b>9.2.3 Comprimidos de 30, 35 e 40 mg</b> .....	<b>28</b>
9.3 ESTIMATIVA DO TEMPO DE AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE DO GRUPO TESTEMUNHA. ....	28
9.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ÁGUA E INTEGRIDADE FÍSICA DE TRECHO DO CÓRREGO SANTA ROSA – DISTRITO DE SEDE ALVORADA – CASCAVEL, PR .....	29
9.5 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA .....	31
9.6 FOLDER.....	33
<b>10. DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
10.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE ATIVIDADE LARVICIDA DOS BIOINSETICIDAS	33
10.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESTIMATIVA DO TEMPO DE AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE DO GRUPO TESTEMUNHA .....	35

10.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ÁGUA E INTEGRIDADE FÍSICA DO CÓRREGO SANTA ROSA – DISTRITO DE SEDE ALVORADA – CASCAVEL, PR.....	36
10.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE A IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA .....	38
10.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O FOLDER.....	39
<b>11. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>40</b>
<b>12. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>40</b>
<b>13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>48</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>54</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Paciente atendido em Unidade de Saúde com queixa de lesões causadas por hematofagia de simulídeos, em Cascavel - Pr. Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Cascavel – Pr, 2019. ....	5
<b>Figura 2. A</b> - Guia para orientação aos municípios sobre manejo integrado, controle e gestão de insetos da família Simuliidae (Diptera, Nematocera) no Rio Grande do Sul - 2006. <b>B</b> - Chave para identificação de pupas da família Simuliidae (Diptera, Nematocera) para apoio às equipes regionais e municipais na determinação das espécies – 2006. <b>C</b> - Vigilância entomológica da família Simuliidae no Rio Grande do Sul. Guia prático para orientação das coletas de simulídeos (Diptera, Nematocera, Simuliidae) - 2008; <b>D</b> – Caderno Vigilância Ambiental de simulídeos (Diptera, Simuliidae) no Rio Grande do Sul – Brasil: Orientação para gestão nos municípios – 2018. Fonte: CEVS/RS, 2021.....	10
<b>Figura 3.</b> Formulado comercial (A); Suspensão de Bti Tradicional (B) e formulado de Bti Nova Formulação (C). Fonte: A autora, 2021.....	15
<b>Figura 4.</b> Prensa hidráulica manual utilizada para confecção dos comprimidos sólidos efervescentes no Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais da Universidade Federal do Paraná. Fonte: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques – UFPR – Curitiba – 2021.....	16
<b>Figura 5.</b> Comprimidos efervescentes. Fonte: A autora, 2021.....	17
<b>Figura 6.</b> Ponto 1 de coleta de imaturos: Rio São Francisco Verdadeiro - montante (A) e jusante (B), Cascavel – PR.. Setembro/2019. Fonte: A autora, 2019.....	18
<b>Figura 7.</b> Ponto 2 de coleta de imaturos: Vertedouro do Parque Municipal Paulo Gorski, local onde foram instalados os fitilhos para colonização de imaturos. Cascavel – PR. Março/2020. Fonte: A autora, 2020.....	19
<b>Figura 8.</b> Fitolho que foi instalado no vertedouro do Parque Municipal Paulo Gorski, onde se observa massa de ovos de Simuliidae (A). Ovos de Simuliidae coletados nos fitilhos e observados em microscópio (aumento de 40x) (B). Fonte: A autora, 2020.....	20
<b>Figura 9.</b> Ponto 3 de coleta de imaturos de Simuliidae: Córrego Santa Rosa à montante (A) e jusante (B). Jan/2020 – Jul/2021. Fonte: A autora, 2020.....	20
<b>Figura 10.</b> A - Massa de ovos de Simuliidae aderidos a rocha no riacho (área circunscrita em amarelo). B – Fragmento de massa de ovos de Simuliidae quando observados ao microscópio	

(aumento de 40 x). - Córrego Santa Rosa – Distrito de Sede Alvorada – Cascavel - Pr. Fonte: A autora, 2021. ....	21
<b>Figura 11.</b> A - Larvas e pupas aderidas ao folhíço de correnteza. B - Coleta de larvas, onde observam-se as teias secretadas. Fonte: A autora, 2021.....	21
<b>Figura 12.</b> Aparato de bioensaio e compressor (aerador de aquário) utilizado na oxigenação dos recipientes. Fonte: A autora, 2021. ....	23
<b>Figura 13.</b> A - Talude do córrego apresentando instabilidade; B – Mata ciliar apresentando falhas e quebras; C – Lama predominante no fundo do córrego; D – Corredeira apresentando retenção de galhos que se movem com o fluxo. Fonte: A autora, 2021.....	31
<b>Figura 14.</b> Massa de proteínas e cristais de Bti apresentando aglutinação após a diluição e agitação do comprimido de 40 mg em 100 mL de água.....	35
<b>Figura 15.</b> Presença de bovinos as margens do Ponto 3 de coleta (Córrego Santa Rosa), onde foram identificados exemplares da espécie zoofílica <i>S. rubrithorax</i> . Fonte: A autora, 2021. .	39

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição percentual dos componentes das formulações de comprimidos larvicidas efervescentes elaborados pelo Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais da Universidade Federal do Paraná -UFPR.....	16
<b>Tabela 2.</b> Mortalidade média de larvas de Simuliidae submetidas ao tratamento com suspensões à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , após 4 horas da exposição.....	26
<b>Tabela 3.</b> Mortalidade de larvas de Simuliidae, submetidas ao tratamento com larvicidas à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , após 24 horas da exposição.....	27
<b>Tabela 4.</b> Mortalidade média de larvas de Simuliidae, submetidas ao tratamento de larvicidas sólidos à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , após 18 horas da exposição. ....	28
<b>Tabela 5.</b> Mortalidade média de larvas de Simuliidae, submetidas ao tratamento de larvicidas à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , após 18 horas da exposição. ....	28
<b>Tabela 6.</b> Mortalidade de larvas de Simuliidae observada nos grupos testemunha em razão do tempo de permanência das larvas em condições de laboratório, sem aplicação de Bti.....	29
<b>Tabela 7.</b> Médias semanais das condições físico-químicas da água do Córrego Santa Rosa – Bacia do Paraná 3 – Cascavel, Paraná, Brasil, monitorado no período de 10/03/2021 a 28/04/2021.....	29
<b>Tabela 8.</b> Condições físico-químicas da água do Córrego Santa Rosa – Bacia do Paraná 3 – Cascavel, Paraná, Brasil, monitorado semanalmente no período de 10/03/2021 a 28/04/2021. ....	30
<b>Tabela 9.</b> Pesquisa de Coliformes Totais na água do Córrego Santa Rosa – Bacia do Paraná 3 – Cascavel, Paraná, Brasil, monitorado semanalmente no período de 10/03/2021 a 28/04/2021. ....	30
<b>Tabela 10.</b> Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> na água do Córrego Santa Rosa – Bacia do Paraná 3 – Cascavel, Paraná, Brasil, monitorado semanalmente no período de 10/03/2021 a 28/04/2021. ....	30
<b>Tabela 11.</b> Exemplares de Simuliidae coletados em Cascavel – PR, no período de 2019 – 2020 e encaminhadas para o Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Instituto Oswaldo Cruz (LSO/IOC) para identificação. ....	32
<b>Tabela 12.</b> Espécies de Simuliidae encontradas nos pontos amostrados e identificadas pelo Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Instituto Oswaldo Cruz (LSO/IOC). Cascavel – PR – Brasil, 2019 -2020. ....	32

**Tabela 13.** Espécies de Simuliidae encontradas por pontos amostrados e identificadas pelo Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Instituto Oswaldo Cruz, caracterizadas segundo o local de coleta. Cascavel – PR – Brasil, 2019 -2020.....33

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Produtos comercializados no Brasil à base de Bti para uso no controle de simúldeos e respectivas informações técnicas sobre sua utilização. ....	11
---	----

## RESUMO

As espécies hematófagas de Simuliidae, quando abundantes, são responsáveis por prejuízos econômicos, de saúde pública e veterinária. Desempenham importantes funções ecológicas, mas em muitos locais, impactados por ações antrópicas, que favorecem as espécies generalistas, o monitoramento e o controle dessas populações são necessários. Atualmente os produtos recomendados para o controle são bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* (Bti), utilizados para a fase larval do inseto, sendo que para o Brasil existem dois produtos importados disponíveis. *Bacillus thuringiensis israelensis* é uma bactéria de solo gram-positiva formadora de esporos entomopatogênicos específicos. Este projeto teve por objetivo avaliar a suscetibilidade de larvas de Simuliidae (Diptera) a um novo formulado a base de Bti em condições de laboratório e abordar aspectos bioecológicos de criadouros de simuliídeos em riachos de Cascavel – PR. O fermentado de Bti foi produzido no Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias da Universidade Estadual de Londrina – UEL e sua toxicidade foi verificada no laboratório de Entomologia Médica em 2.700 Unidades Tóxicas Internacionais/mg. O produto foi processado pelo Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba – Pr, onde foram preparados dois tipos de formulações: líquida e sólida. Para execução dos bioensaios foram utilizados copos plásticos e aeradores, a fonte das larvas e da água foi do próprio córrego, (24°49'15.9"S e 53°37'51.2"W). Nas suspensões líquidas, a mortalidade observada não ultrapassou 20%, não diferindo significativamente da testemunha. Entre os formulados sólidos a mortalidade observada não ultrapassou 19,6% para a concentração de 30 mg/L, não diferindo significativamente da testemunha. Para a concentração de 40 mg/L observou-se mortalidade média de 34,3%. Para a concentração de 50 e 60 mg/L a mortalidade média foi de 50,6% e 64,2%, respectivamente, e ambos não diferiram significativamente do formulado padrão comercial Vectobac® 12 AS (Lote 301-886-N930), no tempo de exposição de 1 minuto e após o período de avaliação de 18 horas. Por outro lado, as concentrações de 70 e 80 mg/L apresentaram resultados comparáveis aos do grupo controle, com 35,7 e 31,7% de mortalidade respectivamente. A ausência de atividade larvicida provavelmente foi devido a indisponibilidade do Bti para a ingestão pelas larvas devido ao tamanho excessivo das partículas. O Córrego amostrado, para avaliação dos parâmetros de qualidade, apresentou contaminação fecal externa durante as oito semanas de monitoramento e parâmetros que poderiam interferir na eficiência do controle com Bti no local. Foram identificadas seis espécies, entre elas *Simulium pertinax*, *Simulium subpallidum*; *Simulium nigrimanum*; *Simulium rubrithorax*; *Simulium perflavum*; e *Simulium inaequale*, sendo a primeira identificação de espécies da família Simuliidae, para o município de Cascavel – Pr. Os dados obtidos no trabalho indicaram o potencial do formulado efervescente em condições de laboratório, com necessidade de aprimoramento. As avaliações bioecológicas demonstraram a relevância do diagnóstico e monitoramento ambiental na otimização de protocolos de controle de *Simulium* sp.

Palavras-chave: Borrachudos. *Simulium*. Controle Biológico. Bioinseticida.

SUSCEPTIBILITY OF SIMULIIDAE LARVAE (DIPTERA) TO A NEW FORMULATED  
BASED ON *Bacillus thuringiensis* SUBSP. *israelensis*, AND BIOECOLOGICAL  
ASPECTS OF BREEDS IN STREAMS OF CASCAVEL – PR.

ABSTRACT

The hematophagous species of Simuliidae, when abundant, are responsible for economic, public and veterinary health losses. They perform important ecological functions, but in many places, impacted by anthropic actions, which favor generalist species, the monitoring and control of these populations is necessary. Currently, the products recommended for control are bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), used for the larval stage of the insect, and for Brazil there are two imported products available. *Bacillus thuringiensis israelensis* is a gram-positive soil bacterium that forms specific entomopathogenic spores. This project aimed to evaluate the susceptibility of Simuliidae larvae (Diptera) to a new formulation based on Bti in laboratory conditions and address bioecological aspects of simuliid breeding sites in streams of Cascavel – PR. The fermented Bti was produced in the Laboratory of Genetics and Taxonomy of Bacteria at the State University of Londrina – UEL and its toxicity was verified in the Medical Entomology laboratory at 2,700 International Toxic Units/mg. The product was processed by the Laboratory of Chemical Ecology and Synthesis of Natural Products at the Federal University of Paraná (UFPR), in Curitiba – PR, where two types of formulations were prepared: liquid and solid. To carry out the bioassays were used plastic cups and aerators, the source of larvae and water was from the stream itself, (24°49'15.9"S and 53°37'51.2"W). In liquid suspensions, mortality observed did not exceed 20%, not differing significantly from the witness. Among the solid formulates, the observed mortality did not exceeded 19.6% for a concentration of 30 mg/L, not differing significantly from the witness. For a concentration of 40 mg/L, it was observed mean mortality of 34.3%. For concentrations of 50 and 60 mg/L to mean mortality was 50.6% and 64.2%, respectively, and both did not significantly differed from the commercial standard formulation Vectobac® 12 AS (Lot 301-886-N930), in the exposure time of 1 minute and after the period of 18 hour evaluation. On the other hand, concentrations of 70 and 80 mg/L presented results comparable to those of the control group, with 35.7 and 31.7% of mortality respectively. Absence of larvicidal activity it was probably due to the unavailability of Bti for ingestion

by the larvae due to excessive particle size. The stream sampled, for evaluation of quality parameters, showed external fecal contamination during the eight weeks of monitoring and parameters that could interfere with the efficiency of control with Bti in place. Were identified six species, among them *Simulium pertinax*, *Simulium subpallidum*; *Simulium nigrimanum*; *Simulium rubritorax*; *Simulium perflavum*; and *Simulium inaequale*, being the first identification of species of the family Simuliidae, for the municipality of Cascavel - PR. The data obtained in the work indicated the potential of the effervescent formulation under laboratory conditions, requiring enhancement. Bioecological estimates tolerate the diagnosis and environmental monitoring in the optimization of control protocols from *Simulium* sp.

Key words: Blackflies. *Simulium*. Biological control. Bioinsecticide.



## 1. INTRODUÇÃO

Os borrachudos, Simuliidae, são dípteros considerados cosmopolitas. Os adultos são encontrados no ambiente terrestre, medem de 1 a 5 mm de comprimento e são facilmente reconhecidos por sua coloração escura e seu formato convexo, com o dorso semelhante a uma corcunda (DUKNIĆ *et al.*, 2019). Apresentam adaptações morfológicas e fisiológicas para desenvolvimento em ecossistemas lóticos. Seus estágios iniciais, ovos, larvas e pupas tem adaptações para se fixarem ao substrato, e são conhecidos mundialmente pelo incômodo que algumas espécies causam ao realizar a atividade hematófaga em humanos e animais (ADLER e MCCREADIE, 2018). As fêmeas dos simulídeos fazem a postura dos ovos em substratos, naturais ou artificiais, presentes próximos à lâmina de água. Após a eclosão dos ovos, as larvas se fixam aos substratos, onde se beneficiam da intensa oxigenação, se alimentando de componentes orgânicos presentes no fluxo de água (LACEY, 1997).

O processo fisiológico de repasto sanguíneo das fêmeas de algumas espécies de simulídeos, desencadeia agravos de natureza irritativa e alérgica, sendo possíveis condicionantes à infecção bacteriana secundária em humanos e animais. Altas densidades populacionais de espécies hematófagas de borrachudos estão associadas ao baixo grau de bem-estar e perdas econômicas no setor de turismo e pecuária, afetando a qualidade de vida e produtividade dos trabalhadores rurais ou de áreas periurbanas associadas a riachos (SÁ e MAIA-HERZOG, 2003).

Há espécies responsáveis por focos de antroponoses, sendo vetores responsáveis pela transmissão de parasitas causadores da doença denominada oncocercose. Certas espécies de simulídeos quando parasitados por nematódeos, denominados *Onchocerca volvulus* Bickel, 1982, veiculam através da picada, as larvas desse parasita. Denominada de “cegueira dos rios” ou “mal dos garimpeiros”, os sinais clínicos da oncocercose incluem nódulos cutâneos, prurido e cegueira. No Brasil o foco principal está localizado no norte do país, onde a doença apresenta-se em fase de pré-eliminação entre os indígenas Yanomamis do Amazonas e Roraima (MORAES, 1991). Em 1985 foi relatado por Gerais e Ribeiro (1986) o primeiro caso autóctone de oncocercose em população não indígena, na Região Centro-Oeste do Brasil, no município de Minaçu, Goiás. Acredita-se que o foco teve início devido a migração de garimpeiros provindos do Território Federal de Roraima.

Em geral, a alta densidade de populações de borrachudos vem sendo associada como consequência de deficiências na integridade ambiental, como, perda de biodiversidade e consequente redução dos predadores naturais, e ao excesso de matéria orgânica presente em

córregos antrópicos e poluídos. O excesso de carga orgânica no ambiente lótico foi configurado como fator predisponente a redução da diversidade de algumas espécies de simuliídeos e aumento da densidade populacional de espécies antropofílicas, em especial *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (STRIEDER; DOS SANTOS; VIEIRA, 2006).

O uso de inseticidas de largo espectro de ação, também está relacionado a desequilíbrios populacionais de simuliídeos, já que causam impactos negativos na fauna benéfica e consequente desestruturação dos níveis tróficos (CAPALBO, 1995). O fato das formas imaturas dos simuliídeos se nutrirem de componentes carregados pelo fluxo hídrico permite que sejam adotadas medidas de controle nas quais produtos são aplicados no ambiente lótico. Antigos protocolos baseados em produtos sintéticos, principalmente com organoclorados como o DDT (diclorodifeniltricloreto), BHC (Hexaclorociclo-hexano) e organofosforados como o temefós levaram à necessidade da adoção de métodos de controle integrados sustentáveis, pois o uso de inseticidas químicos induziu à seleção de populações de simuliídeos resistentes a estes compostos, assim como, apresentam efeitos impactantes sobre a biodiversidade e saúde (WHO 1988; KURTAK, 1986; MONTAGNA *et al.*, 1999).

Experiências em diversos locais têm sugerido que os protocolos de controle devem se pautar na avaliação da integridade ambiental, com análise dos indicadores de qualidade e atuação sobre os condicionantes e determinantes que desencadeiam o desequilíbrio populacional das espécies, e, em situações específicas, o uso de medidas remediativas, como o uso de produtos biológicos, são as formas mais rápidas e seguras de se reduzir o incômodo (MAIA *et al.* 2014; RIO GRANDE DO SUL, 2018).

Para o controle sustentável, a recomendação da Organização Mundial da Saúde se baseia na utilização de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner (WHO, 2011). *Bacillus thuringiensis israelensis* é uma bactéria encontrada naturalmente no solo de diversas regiões do mundo. Possui um corpo paraesporal (cristal) composto de protoxinas proteicas, que apresentam toxicidade quando ingeridos por larvas de borrachudos, pois tem potencial de destruir as células epiteliais do intestino médio levando à seps e morte (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Segundo dados do MAPA (2021), somente no ano de 2020 foram registrados 95 produtos biológicos no Brasil. Os números se alinham a tendência mundial em reduzir o uso de agroquímicos, considerando que seu uso excessivo tem sido relacionado à diversas enfermidades humanas de natureza aguda e principalmente crônicas (PARANÁ, 2018). Embora o Brasil tenha expressado um crescimento da produção de bio defensivos superior ao percentual observado no mercado internacional, a disponibilidade de bioinseticidas a base de Bti para o

combate dos borrachudos ainda demanda que sejam importados produtos a custos elevados (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

A obtenção de formulados nacionais para o controle de simulídeos, com baixo custo de produção quando comparado aos produtos importados, otimizaria a sua utilização junto aos programas de Manejo Integrado no controle de borrachudos. Além disso, a implementação de produções regionais é vantajosa para o estado, com a redução dos custos da implantação dos programas de controle. Igualmente, para a academia, pois é um nicho de pesquisa, e para a sociedade, pois a envolve na produção de tecnologia nacional de grande utilidade. O uso de bioinseticidas ainda traz vantagens em relação a redução da aplicação de produtos químicos por iniciativas individuais como forma de resolução do incômodo.

O uso de apresentações sólidas para o controle de simulídeos, apresentado neste trabalho, é inovador, e visa facilitar o processo de aplicação, principalmente em áreas de difícil acesso e vislumbra a possibilidade de em breve se obter um produto efervescente que possa ser aplicado diretamente no rio sem necessidade de diluição prévia.

Os formulados sólidos podem ainda apresentar uma maior precisão na concentração de aplicação do produto quando comparados aos líquidos e, se bem manejados, menor possibilidade de exposição a fatores adversos como a luz ultravioleta. Su, Thieme e Cheng (2018) citam que formulações sólidas tem vantagens em relação as líquidas pois tendem a ser mais estáveis.

Portanto, este trabalho tem o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de novas formulações de *Bacillus thuringiensis israelensis* para controle de *Simulium* sp.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS E BIOLÓGICAS DA FAMÍLIA SIMULIIDAE NEWMAN (1843).

A grande diversidade de regiões biogeográficas da América do Sul abriga 115 das 150 famílias de Diptera, dentre elas a família Simuliidae (CARVALHO; COURI; HASEYAMA, 2016). Popularmente, simulídeos são conhecidos na região Norte e Nordeste do Brasil como piuns, na região Sul e Sudeste como borrachudos, e como *blackflies*, *buffalo gnat* e *buffalo flies* na língua inglesa (MALLOCH, 1914; RIO GRANDE DO SUL, 2018).

De acordo com o Inventário Taxonômico e Geográfico de Adler (2021), Simuliidae apresenta 2.384 espécies distribuídas em 31 gêneros, mais 17 fósseis, havendo um incremento de 53 espécies vivas do ano de 2020 para o ano 2021. A distribuição do grupo é ampla, tendo representantes em todos os continentes exceto na Antártida, no extremo do polo Norte e em algumas ilhas oceânicas, sendo encontrados desde latitudes abaixo do nível do mar, até 5.000 m acima do nível do mar (ADLER; MCCREADIE, 2018).

Os ovos dos simulídeos tem formato oval ou triangular e são depositados em forma de pequenos aglomerados, em substratos, que podem ser naturais (vegetação, rochas, raízes) ou artificiais (plástico, cimento, canos), próximos a lâmina de água (ADLER; MCCREADIE, 2018). Classificados como insetos bentônicos agarradores, as larvas dos simulídeos são em sua maioria de coloração marrom claro, esverdeadas ou enegrecidas, tem a região posterior do corpo alargada, tendo em sua extremidade um disco de ganchos que geralmente se apresenta fortemente aderido ao substrato, característica resultante das adaptações de colonização de áreas de erosão e turbilhonamento. As formas larvais apresentam eficiente capacidade de deslocamento em movimentos análogos a lagarta mede-palmos, com alternância de fixação da região cefálica com fixação do segmento posterior, em busca de condições de sobrevivência. A larva possui ainda um par de leques cefálicos responsáveis pela filtração da matéria orgânica do fluxo lótico (HAMADA; NESSIMIAN; QUERINO., 2014).

Em condições de laboratório, a oviposição ocorre no período diurno após um período médio de pré oviposição de 4,9 a 6,2 dias e posteriormente ao período de incubação de aproximadamente 4,0 a 6,5 dias, emergem as larvas. O período mínimo de desenvolvimento larval em criadouro semi-natural foi de 21 dias e período pupal de 3 a 4 dias (PEGORARO, 1993). Na condição de larva, o inseto tece um casulo, formado por fios de seda, que abriga a fase pupal aquática. Ao final do desenvolvimento, os adultos emergem junto a uma bolha de ar em direção ao meio externo, onde rapidamente ocorre o acasalamento (RIO GRANDE DO SUL, 2018). Os simulídeos adultos vivem por aproximadamente 30 dias e as espécies membros do complexo *Simulium damnosum* Theobald, 1903, podem apresentar até mais de 20 gerações anuais (ADLER; MCCREADIE, 2018).

Os adultos têm potencial para voar em média até 5 km de distância do ponto de emergência (ADLER; MCCREADIE, 2018). A energia utilizada para o voo de machos e fêmeas é oriunda de carboidratos, sendo considerados oportunistas, podendo extrai-los de néctar floral ou até mesmo de excretas açucaradas de insetos, o “*honey-dew*” (BURGIN; HUNTER, 1997).

Especificamente, as fêmeas podem ser subdividas de acordo com os hábitos nutricionais em dois grupos: autógenas e anautógenas. Autógenas são aquelas em que as peças bucais não permitem o corte da pele. Se alimentam somente de néctar de flores e seiva, e não necessitam de sangue para completar seu ciclo gonadotrófico pois a energia para a produção dos ovos vem da fase larval. Nas espécies anautógenas, as fêmeas são dependentes da ingestão de sangue, para a maturação dos ovos e conclusão do ciclo reprodutivo, sendo que, a hematofagia é necessária para mais de 90% das espécies de simuliídeos do mundo (ADLER; MCCREADIE, 2018).

As espécies hematófagas de Simuliidae estão entre os poucos artrópodes responsáveis por mortes de animais por exsanguinação durante ataques massivos, porém somente de 10 a 20% destas são consideradas pragas para humanos e animais (ADLER; MCCREADIE, 2018).

Algumas espécies são vetores de filárias, como *Onchocerca volvulus*, sendo 12 morfoespécies vetoriais, cada uma com características individuais, informações estas que devem ser consideradas em estratégias de controle (SHELLEY, 1991). Espécies hematófagas também são responsáveis pela doença denominada Síndrome hemorrágica de Altamira (Pará), que é caracterizada pelo surgimento de hemorragias subcutâneas e de mucosas e seria uma resposta fisiológica a toxina de picadas de borrachudos (PINHEIRO FILHO *et al.*, 1974). A espoliação leva a laceração da pele, resultando em lesões com descarga serossanguinolenta (Figura 1), muitas vezes dolorosas e pruriginosas, com risco de evolução para linfadenopatia, aumento da temperatura corporal, cefaleia e artralgia (SITARZ; BUCZEK; BUCZEK., 2021).



**Figura 1.** Paciente atendido em Unidade de Saúde com queixa de lesões causadas por hematofagia de simuliídeos, em Cascavel - Pr. Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Cascavel – Pr, 2019.

### 3. VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS

As variáveis limnológicas são fatores determinantes tanto para a abundância das espécies de simulídeos, quanto para a distribuição das mesmas (VIVIANI *et al.*, 2012). Alterações do leito de ribeirões, uso e ocupação do solo próximo as margens dos corpos hídricos e falta de conservação das matas ciliares tem sido relacionados a locais com alta de espécies antropofílicas. A elevada concentração de nitrato oriundo da suinocultura na água de dois arroios do Sul do Brasil, foi relacionada com à alta distribuição e abundância de imaturos de *S. pertinax*, espécie considerada antropofílica (STRIEDER; DOS SANTOS; VIEIRA, 2006). Já em ambientes muito poluídos existem condições prejudiciais aos macroinvertebrados em geral, como a eutrofização, com impactos diretos sobre a distribuição dos simulídeos (JÚNIOR, 2003; VIVIANI *et al.*, 2012).

As espécies de simulídeos, e suas distribuições em cada habitat, estão diretamente relacionadas a fatores ambientais, existindo padrões de microdistribuições, que variam ao longo de centímetros ou metros, e padrões de macrodistribuições, de muitos metros a quilômetros. A textura do substrato, profundidade da água, hidrodinâmica e a interação com outros organismos, como o comportamento de territorialismo, são fatores que afetam a microdistribuição. A macrodistribuição é afetada pela vazão, temperatura, composição química da água e oferta de nutrientes em quantidade e qualidade (ADLER; MCCREADIE, 2018). Sabe-se que grandes rios podem produzir até um bilhão de borrachudos por quilômetro de leito diariamente, e que mesmo quando não picam, o comportamento de enxame pode provocar uma perturbação intolerável pois entram em orifícios faciais (ADLER; MCCREADIE, 2018). Além dos pontos já mencionados, as condições observadas na água têm efeitos diretos sobre a eficiência dos protocolos de controle (ATWOOD *et al.*, 1992).

### 4. INIMIGOS NATURAIS

São predadores das fases aquáticas de simulídeos presentes no Rio Grande do Sul, o lambari *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758, o caranguejo de água doce *Aegla platensis* Schmitt, 1942, e insetos membros das ordens Megaloptera, Trichoptera, Plecoptera e Odonata (RIO GRANDE DO SUL, 2008). Na cidade de Morretes no litoral do Paraná, dentre 153 exemplares de peixes coletados, foram encontrados imaturos de simulídeos, no trato gastrointestinal de 109 exemplares. Entre as espécies de peixes estão *Microglanis cottoides* Boulenger, 1981, *Heptapterus* sp., *Characidium* sp., *Rivulus* sp., *Corydoras nattereri*

Steindachner, 1876, *Pseudancistrus* sp. e *Rineloricaria* sp. (DELLOME FILHO, 1992). Na África do Sul, além dos peixes, aves nativas também atuam como predadores das formas adultas de simulídeos, assim como insetos e crustáceos (MOOR, 1992). Em estudo com morcegos da espécie *Myotis daubentonii* Kuhl, 1819, monitorados na Finlândia, observou-se que os borrachudos são fontes de alimento para a espécie, quando o alimento principal, mosquitos da família Chironomidae, estão escassos (VESTERINEN *et al.*, 2016), assim como outros estudos já comprovaram que várias espécies de quirópteros possuem os simulídeos como parte da sua dieta (CLARE; SYMONDSON; FENTON, 2014; KRÜGER *et al.*, 2014).

## 5. DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO

Abordagens de controle devem essencialmente serem iniciadas após prévio diagnóstico da situação, embora o incômodo ocasionado pela presença de grandes quantidades de borrachudos seja real, muitas vezes podem ser confundidos com outros dípteros hematófagos também presentes no ambiente periurbano e rural. A Unidade Básica de Saúde local pode ser uma das primeiras fontes de informação sobre a presença de simulídeos, através do recebimento de pacientes com queixas de picadas (RIO GRANDE DO SUL, 2018) ou através das Conferências de Saúde promovidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), onde a sociedade civil tem direito a participação.

A partir da existência da demanda os esforços iniciais devem ser realizados com o objetivo de levantamento dos dados, como mapeamento de rios e de criadouros potenciais, investigar a possibilidade de migração dos simulídeos, identificação das espécies predominantes e condições ambientais da região. Com os dados de mapeamento pode-se realizar um ensaio experimental para verificar a distância de carreamento do produto, a eficácia do uso do inseticida e a presença de migração, com posterior definição do programa com seus protocolos e cronogramas. A continuidade e monitoramento é essencial para o sucesso do protocolo de controle (RIO GRANDE DO SUL, 2018; WHO, 2015).

No Brasil o emprego de produtos biológicos em corpos hídricos superficiais para controle do crescimento desordenado ou indesejável de organismos da fauna é regulamentado pela Resolução N° 467, de 16 de julho de 2015 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). A resolução proíbe o uso de produtos não registrados e prevê, entre outras exigências, que a autorização de uso seja requerida aos órgãos ambientais com protocolo prévio de um projeto com responsável técnico (BRASIL, 2015).

## 6. CONTROLE DE SIMULÍDEOS

O uso de inseticidas químicos sintéticos objetivando o controle de simulídeos em diversos locais do mundo, ao longo de décadas, ocasionou a seleção de populações resistentes aos produtos utilizados. Desde o início do controle na África Ocidental em 1975 e até 1980, o larvicida temefós foi utilizado no Programa de Controle da Oncocercose. Em abril de 1980, uma série de falhas de tratamento demonstrou que a pressão de uso do inseticida provocou a seleção de populações de *Simulium damnosum* Theobald, 1903, resistentes ao produto (KURTAK, 1986). Na Argentina foi observada resistência a deltametrina, DDT, fenvalerato e cipermetrina em simulídeos coletados em canais de irrigação impactados por pesticidas (MONTAGNA *et al.*, 1999).

Ensaio de campo realizados em Ubatuba e Ilhabela, litoral norte do Estado de São Paulo, revelaram ausência total de mortalidade de larvas de borrachudos com temefós, inseticida do grupo químico dos organofosforados (ANDRADE; CASTELLO BRANCO, 1991). Resistência ao temefós e possível resistência cruzada a outros organofosforados foi constatada em Caarapó-MS, em razão, possivelmente, do uso destes na agricultura, pois foram encontrados imaturos resistentes em locais que nunca tinham sido alvo de ações de controle de simulídeos, mas que apresentavam uso intensivo de inseticidas agrícolas (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Por outro lado, na região metropolitana de Curitiba – PR, com uso de controle integrado, que associou controle biológico ao controle mecânico, resultou em redução de 88,8% de larvas de borrachudos. No mesmo estudo foi observado um resultado reducional de 90,57% com uso somente do controle mecânico (PETRY *et al.*, 2004). O manejo mecânico consiste basicamente na remoção dos imaturos com seus respectivos substratos, quando possível, assim como a varrição ou escovação de lajes e demais estruturas colonizadas. Embora o controle mecânico seja eficiente, apresenta limitações em locais de difícil acesso aos criadouros ou quando estes são muito extensos. A vantagem do manejo mecânico em relação ao uso de produtos é que a limpeza retira além das larvas, os ovos e as pupas, o que atrasa o surgimento de novas gerações (PETRY *et al.*, 2004).

Diante da problemática em se utilizar inseticidas químicos no controle das populações de simulídeos, atualmente opta-se pela utilização de protocolos de manejo integrado (MIP) que tenham como base o uso do Bti. O bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelenses* (Bti), é específico e passível de produção “in vitro”. Os produtos disponíveis no



Brasil são importados e demandam alto investimento do consumidor, sendo assim, é de importância a pesquisa de novos formulados, tendo como objetivo subsidiar o desenvolvimento de formulações nacionais (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

Bons resultados de controle demandam que as ações sejam desenvolvidas com critérios técnicos, incluindo um mínimo de conhecimento dos condicionantes ambientais do local. Os intervalos de aplicação devem ser respeitados, pois já foram constatadas que em seções de córregos tratado com Bti predominam instares menores de larvas, quando comparados a córregos não tratados, o que significa que há uma constante recolonização dos córregos tratados (DOCILE *et al.*, 2021). O estabelecimento de protocolos de forma indiscriminada pode levar ao risco de extinção de espécies de simulídeos (CHEKE *et al.*, 2008) e a falta de critérios também acarreta o desperdício de produtos (CAPALBO; MORAES, 1987; RIVERS-MOORE; BANGAY; PALMER, 2008).

## 6.1 USO DE BIOINSETICIDAS

O estado do Rio Grande do Sul foi pioneiro na utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de borrachudos no Brasil, tendo iniciado seu uso na década de 1980, e sendo mantido e aperfeiçoado até os dias atuais. O controle é coordenado pela Secretaria de Saúde do Estado, especificamente pelo Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS), o qual orienta e coordena a execução das ações desenvolvidas pelos municípios, denominadas de “Manejo Integrado, Controle e Gestão de borrachudos no Rio Grande do Sul”. Dentre as normativas do Programa de controle, vigoram as ações educativas e de proteção e recuperação ambiental, tendo como pressupostos a associação com práticas de reflorestamento, saneamento, manejo populacional e ações de remoção mecânica dos imaturos, assim como envolvimento das comunidades na execução do Programa (RIO GRANDE DO SUL, 2018).

O Programa de controle do RS está respaldado em legislações como o Decreto Estadual do Rio Grande do Sul, 31.211 de 1983, que incluiu o item III no Artigo 47 do Decreto 23.430, de 24 de outubro de 1974, que passou a considerar os borrachudos como insetos de interesse a saúde e passíveis de controle dentro dos princípios do Sistema Único de Saúde (SUS) devido ao impacto causado sobre a saúde pública (RIO GRANDE DO SUL, 2018).

*“Decreto 23.430, de 24 de outubro de 1974.*

*Aprova Regulamento que dispõe sobre a promoção, proteção e recuperação da Saúde Pública.*

### SECÇÃO III

*Artrópodes Importunos Art. 47 - Os principais artrópodes importunos a serem considerados e que podem vir a exigir providências de controle nas circunstâncias adiante indicadas, são as espécies dos gêneros:*

*I - “Culex” (pernilongos) em ambiente urbano, ou habitações domiciliares, quando em grande densidade;*

*II - “Pulex” (pulgas), “Climex” (percevejos) e “Pediculos” (piolhos), quando existentes em estabelecimentos coletivos ou locais de reunião;*

*III - “Simulídeos” (borrachudos)”.*

Com o objetivo de padronizar os procedimentos em todo o estado, foi criado o Programa de Controle de Simulídeos, tendo lançamento de diversos guias de orientação aos municípios (Figura 2) (RIO GRANDE DO SUL, 2006a; 2006b; 2008; 2018).



**Figura 2.** **A** - Guia para orientação aos municípios sobre manejo integrado, controle e gestão de insetos da família Simuliidae (Diptera, Nematocera) no Rio Grande do Sul - 2006. **B** - Chave para identificação de pupas da família Simuliidae (Diptera, Nematocera) para apoio às equipes regionais e municipais na determinação das espécies – 2006. **C** - Vigilância entomológica da família Simuliidae no Rio Grande do Sul. Guia prático para orientação das coletas de simulídeos (Diptera, Nematocera, Simuliidae) - 2008; **D** – Caderno Vigilância Ambiental de simulídeos (Diptera, Simuliidae) no Rio Grande do Sul – Brasil: Orientação para gestão nos municípios – 2018. Fonte: CEVS/RS, 2021.

Os protocolos de aplicação dos bioinseticidas preveem que estes sejam dosados com base na vazão do riacho observada no momento da aplicação, para disponibilidade correta da concentração do bioinseticida para as larvas.

Os produtos comerciais disponíveis atualmente no Brasil para o controle de simulídeos são: VectoBac® 12 AS e Teknar® SC (Quadro 1). Ambos os produtos estão disponíveis em galões de 10 L, sendo um fator limitante pois tem custos relativamente altos, e para riachos de baixa vazão a quantidade de produto a ser utilizada é pequena.

**Quadro 1.** Produtos comercializados no Brasil à base de Bti para uso no controle de simulídeos e respectivas informações técnicas sobre sua utilização.

Nome comercial	Fabricante/Distribuidor	Composição	Recomendação de uso
VectoBac® 12 AS (solução aquosa).	Valent BioSciences Corporation: USA; Sumitomo Chemical: Latin America.	Bti sorotipo H 14 / 1.200 UIP/mg; Cepa AM 65-52.	0,5 a 25 ppm; 1 – 20 min.
Teknar® SC (solução concentrada).	Valent BioSciences Corporation: USA; Sumitomo Chemical: Latin America; Syngenta: BR.	Bti sorotipo H 14 / 1.200 UIP/mg; Cepa SA3A.	1,2 ppm/10 min; 12,5 ppm/1 min.

ppm= partes por milhão. UIP= Unidades Internacionais de Potência.

Existem produtos em formulações sólidas a base de Bti, e são voltados ao controle de dípteros que se desenvolvem em ambientes de água de lenta ou parada, como *Aedes aegypti*, (Linnaeu, 1762). Devido a isso, possuem características de ação residual prolongada, não havendo no momento nenhum produto sob apresentação não líquida registrado no Brasil, para o controle de simulídeos.

## 6.2 MECANISMO DE AÇÃO DE *Bacillus thuringiensis israelensis*

*Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* é uma bactéria de solo gram-positiva formadora de esporos entomopatogênicos. Durante a fase de esporulação, a bactéria produz cristais paraesporais, que são compostos por uma ou mais proteínas biodegradáveis e específicas (pró-toxinas). Secretadas como proteínas solúveis em água, após sua ativação no mesêntero as toxinas resultantes levam à formação de poros e sofrem alterações conformacionais para posteriormente serem inseridas nas membranas celulares dos insetos alvo. Após serem ingeridos, os cristais são hidrolisados por enzimas digestivas da larva e pelo pH alcalino do trato digestivo, resultando em quatro proteínas (toxinas ativas) de massa molecular de 27, 65, 128 e 135 Quilodalton (kDa). A toxicidade é gerada pela interação entre as proteínas de 25 kDa (resultante da degradação da proteína de 27 kDa) com uma ou mais proteínas de maior massa molecular (LEE; SAXENA; STOTZKY, 2003). As toxinas ativas afetam o trato gastrointestinal levando a morte da larva por sepsise (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). O intestino das larvas dos simulídeos apresenta altos níveis de proteinases alcalinas, com

atividade proteolítica no intestino médio, sendo adaptados para digerirem algas, e a alcalinidade do intestino é a responsável pela ativação das toxinas de *B. thuringiensis* (MARTIN *et al.*, 1985).

Com base no conhecimento da eficiência de ação do Bti, foram estabelecidos métodos de produção do bioinseticida. Assim, utilizando-se meios à base água, fontes de carbono, nitrogênio, sais minerais e linhagens adaptadas ao processo fermentativo, há possibilidade de maximização da produção e consequente viabilidade econômica. De forma geral, os processos se iniciam com a inoculação e incubação do pré-fermentado no meio de cultura para fermentação, posteriormente se realiza a recuperação dos esporos e toxinas, seguindo-se de padronização, bioensaio e formulação (CAPALBO; MORAES, 1987). Contudo, a falta de conhecimento bioecológico das espécies de simuliídeos e da eficiência dos protocolos adotados podem acarretar dificuldades à implantação de programas de controle, e ensaios de campo permitem a verificação da eficiência dos larvicidas sob condições naturais, e adaptação dos protocolos (ANDRADE; CASTELLO BRANCO, 1991). *Bacillus thuringiensis* tem destaque entre as bactérias utilizadas para controle biológico, porém no Brasil esta tecnologia ainda não é tão difundida quanto em países desenvolvidos, o que demanda que produções regionais sejam desenvolvidas e estabelecidos incentivos de modo a fortalecer a produção nacional (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

## 7. OBJETIVOS

### 7.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliação da suscetibilidade de larvas de Simuliidae (Diptera) a um novo formulado a base de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*, em condições de laboratório, correlacionando-a à aspectos bioecológicos de criadouros de simulídeos em riachos na região de Cascavel – Paraná.

### 7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade larvicida de um novo formulado a base de *Bacillus thuringiensis israelensis* em larvas de Simuliidae.
- Identificação das espécies dos imaturos coletados.
- Caracterização dos parâmetros da água e de integridade física de um Córrego com presença de criadouros de simulídeos (Córrego Santa Rosa – Bacia do Paraná 3 – Distrito de Sede Alvorada – Cascavel – Pr).
- Elaboração de um produto educativo com linguagem de fácil entendimento, explicando contextos básicos dos condicionantes à presença de altas populações de borrachudos, e formas de controle, com objetivo de popularização e divulgação científica para a comunidade não acadêmica.

## 8. MATERIAL E MÉTODOS

### 8.1 BIOINSETICIDA

#### 8.1.1 Bactéria

A bactéria utilizada para elaboração do fermentado foi *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* BR101. A linhagem faz parte do Banco de Bactérias Entomopatogênicas do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias da Universidade Estadual de Londrina, onde é mantida na forma esporulada.

#### 8.1.2 Produção da bactéria

O fermentado de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelenses* (Bti) foi produzido no Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias da Universidade Estadual de Londrina – UEL, do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, do Centro de Ciências Biológicas (CCB) – Londrina PR, sua toxicidade foi verificada no laboratório de Entomologia Médica em 2.700 Unidades Tóxicas Internacionais/mg (BOCALETI, 2019). O processo incluiu a hidratação dos esporos previamente obtidos e liofilizados. Em seguida, realizada a inoculação do Bti em placa de Petri, na superfície de meio sólido (ágar nutriente). A partir desse inóculo, foi preparado um em meio líquido, mantendo-se em estufa à 30°C para crescimento. Na sequência, foi preparado meio líquido LB (Luria Bertani) (triptona, 10 g/L; extrato de levedura, 5 g/L; cloreto de sódio, 5 g/L), inoculado e incubado sob agitação à 30°C por 6 horas. O inóculo foi adicionado a um biorreator com meio NYSM (Nutrient Yeast Extract Salt Medium) e mantido à 30° C ± 2, 300 rpm (rotações por minuto), pH 7,0 (potencial hidrogeniônico), com fornecimento de ar constante, por cerca de 40 horas, até esporulação. Posteriormente, o fermentado foi centrifugado e seu sobrenadante descartado.

#### 8.1.3 Formulação

O produto foi processado pelo Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba, PR. Foram preparados dois tipos de formulações, líquida e sólida, agregando ao material bacteriano previamente produzido, os excipientes e a proteína em diferentes combinações em cada formulação. A apresentação dos formulados líquidos foi suspensão aquosa e dos sólidos foi de comprimidos efervescentes.

### 8.1.3.1 Suspensões

Os testes iniciais avaliaram a eficiência de dois bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de apresentação líquida (Figura 3).

Uma das suspensões se apresentava em seu estado bruto líquido, diretamente da produção do fermentado na UEL e sendo denominada de Suspensão de Bti Tradicional. O segundo produto, foi denominado de Formulado de Bti Nova Formulação, elaborado a partir da Suspensão de Bti Tradicional no Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais da Universidade Federal do Paraná. As suspensões foram preparadas com 3 g de Bti, em 10 mL de água destilada e mantidas sob agitação magnética por 1 h.

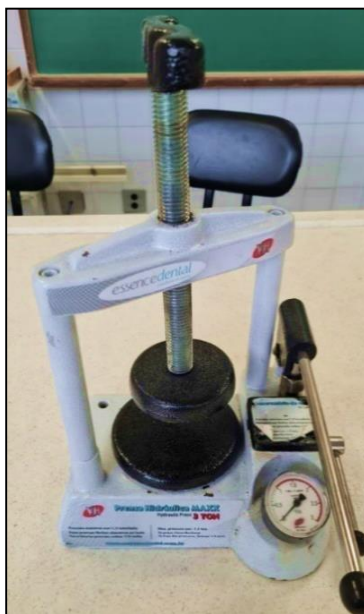
Foi preparada uma dispersão de um polímero natural em solução ácida ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Em seguida, 1 mL da suspensão de Bti Tradicional foi adicionada em uma célula de medição de potencial zeta, e a cada 100 segundos foram adicionadas alíquotas de  $100 \mu\text{L}$  da dispersão do polímero sobre a suspensão de Bti. O potencial zeta médio da Bti aferido foi de  $-28,4 \pm 1,2 \text{ mV}$ . Após a adição de  $400 \mu\text{L}$  da dispersão do polímero natural sobre a suspensão de Bti o valor de potencial zeta no plano de cisalhamento foi próximo a  $0 \text{ mV}$ , ocasionando a floculação do material. Para a floculação de 1 mL de Bti ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) foi realizada a adição de  $0,4 \text{ mL}$  da dispersão do polímero ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ).



**Figura 3.** Formulado comercial (A); Suspensão de Bti Tradicional (B) e formulado de Bti Nova Formulação (C). Fonte: A autora, 2021.

### 8.1.3.2 Formulados sólidos

Os comprimidos e efervescentes foram preparados por compressão direta utilizando-se uma prensa hidráulica manual (Figura 4), punção plano circular, com diâmetro de 11 mm. Foi padronizada uma força compressora de 500 Kgf aplicada por 30 segundos, resultando em comprimidos com 2 mm de espessura (Figura 5).



**Figura 4.** Prensa hidráulica manual utilizada para confecção dos comprimidos sólidos efervescentes no Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais da Universidade Federal do Paraná. Fonte: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques – UFPR – Curitiba – 2021.

Foram preparadas nove formulações, mantendo-se constante a presença da mistura efervescente como desintegrante, e utilizado um diluente solúvel e uma substância como pó como molhante/desintegrante. Um segundo diluente foi utilizado em concentrações variáveis para acertar a massa final de cada comprimido, padronizada em 250 mg. A quantidade do precipitado de Bti foi utilizada em concentração crescente (Tabela 1).

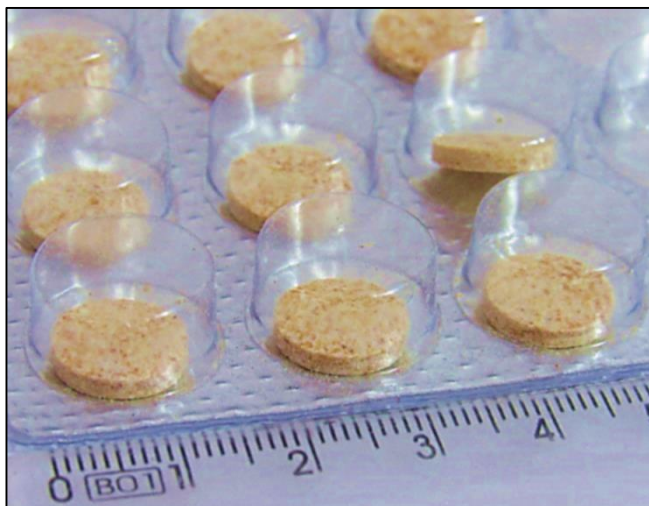
**Tabela 1.** Composição percentual dos componentes das formulações de comprimidos larvicidas efervescentes elaborados pelo Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais da Universidade Federal do Paraná -UFPR.

Composição	Comprimidos								
	2 mg	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg	35 mg	40 mg
Mistura efervescente	42,2	42,2	42,2	42,2	42,2	42,2	42,2	42,2	42,2
Diluente 2	16,9	15,8	13,8	11,8	9,8	7,8	5,8	3,8	1,8
Diluente solúvel	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Cristais p. + esporos Bti *	0,8	2	4	6	8	10	12	14	16
Molhante/desintegrante	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

\* Cristais proteicos + esporos de Bti. Fonte: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques – UFPR – Curitiba – 2021;



A mistura efervescente foi preparada no momento da mistura final conforme descrito em Prista, Alves e Morgado (1967). Todos os materiais utilizados foram padronizados por tamis 32 e 60 *mesh*, utilizando-se o retido no tamis 60 *mesh*.



**Figura 5.** Comprimidos efervescentes. Fonte: A autora, 2021.

#### 8.1.3.3 Formulado padrão

Como padrão de comparação dos formulados em teste foi utilizado o produto comercial Vectobac® 12 AS (formulação líquida) com 1.200 UTI /mg (Lote 301-886-N930), adquirido no mercado nacional. A concentração sugerida para o produto é de 0,5 a 25 ppm/L para 1 minuto de exposição, nos testes foi estipulado como padrão a quantidade de 0,2 mL/0,5L (400 ppm). Definiu-se esta concentração acima do recomendado pelo fabricante, levando-se em consideração a facilidade de aplicação evitando-se assim a necessidade de diluições seriadas. Além disso, o produto foi utilizado com o objetivo de validação da metodologia aplicada, ou seja, avaliação da resposta de presença ou ausência de mortalidade em razão do Bti, não tendo o objetivo de testar a potência do produto comercial.

#### 8.1.4 Bioensaios

Para execução dos bioensaios foi utilizada metodologia modificada de Araújo e Coutinho *et al.* (2005), em que grupos de larvas são colocadas em recipientes plásticos contendo água coletada diretamente do ambiente em que foram coletadas. Isso porque, há uma grande dificuldade em se criar esse inseto em laboratório. Para suprimento de oxigênio, foi mantida aeração da água permanentemente por compressores de ar de duas saídas (Boyu®, SC – 7500 - 2x3L/MIN, 127 V).

#### 8.1.4.1 Busca de larvas para o bioensaio

As coletas de larvas foram realizadas com autorização Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio – cadastrada sob a numeração 73993-1 no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, Ministério do Meio Ambiente – MMA (ANEXO A).

As buscas com a intenção de encontrar pontos de criadouros que fornecessem larvas para o experimento foram realizadas em córregos na área urbana e rural da cidade de Cascavel - PR, sendo inspecionados diferentes substratos, diretamente no leito rochoso, vegetação marginal pendente na linha de água ou submersa e folhiço de correnteza. Em três dos sete locais pesquisados, foram encontrados exemplares de imaturos, e o local com maior abundância foi selecionado como fonte das larvas para execução dos bioensaios.

#### **Ponto 1:** Rio São Francisco Verdadeiro.

O Rio São Francisco Verdadeiro (Figura 6), ponto georreferenciado  $24^{\circ}51'39.4''S$  e  $53^{\circ}35'18.3''W$ , é um rio tributário e pertence a Bacia Hidrográfica do Rio Paraná 3, nasce dentro da cidade de Cascavel, atravessando a área urbana (PARANÁ, 2014).

Margeando seu curso de água, e de seus tributários da área rural, se instalaram diversas propriedades de suinocultura, bovinocultura, avicultura, piscicultura e agricultura. Os esforços de coleta foram realizados em setembro de 2019, onde foi observado que no trecho inspecionado havia intensa presença de pontos de criadouros de simulídeos.



**Figura 6.** Ponto 1 de coleta de imaturos: Rio São Francisco Verdadeiro - montante (A) e jusante (B), Cascavel – PR.. Setembro/2019. Fonte: A autora, 2019.

Posteriormente, em março de 2020 foi realizado retorno ao local e após busca de aproximadamente 30 minutos por uma extensão de aproximadamente 100 m do rio, observou-

se que não existiam mais pontos de criadouros. Segundo o proprietário da área, no local estava sendo realizada aplicação de um produto biológico a base de Bti, o que eliminou os criadouros, portanto o local foi descartado como fonte de larvas para o bioensaio.

**Ponto 2:** Vertedouro do Lago Municipal de Cascavel – Parque Ecológico Paulo Gorski.

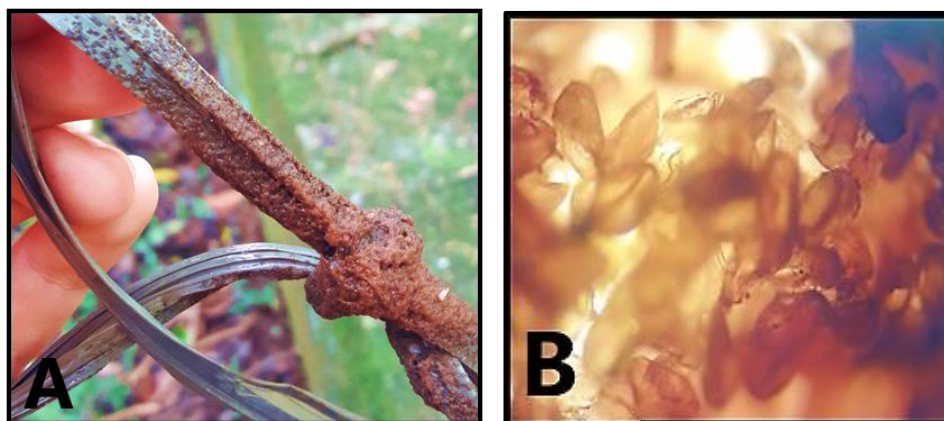
O Parque Ecológico Paulo Gorski está situado na área urbana da cidade e faz parte da bacia hidrográfica do rio Iguaçu. Neste ponto, o esforço de coleta de imaturos foi realizado no mês de março de 2020, no ponto de geocalização 24°57'58.9"S e 53°26'03.2"W. Apenas foram encontradas pupas e exúvias aderidas em folhiço no local. Na extensão do canal do vertedouro (Figura 7), foram instalados fragmentos de fitilhos visando a colonização por imaturos.



**Figura 7.** Ponto 2 de coleta de imaturos: Vertedouro do Parque Municipal Paulo Gorski, local onde foram instalados os fitilhos para colonização de imaturos. Cascavel – PR. Março/2020. Fonte: A autora, 2020.

Após 10 dias observou-se que houve intensa postura de ovos de simulídeos nos fitilhos, com formação de massas densas (Figura 8), porém, os ovos não chegaram a ser viáveis, em razão da inconstância da vazão e escassez de chuvas que resultava em seu ressecamento. O local também foi descartado como fonte de larvas para os bioensaios.





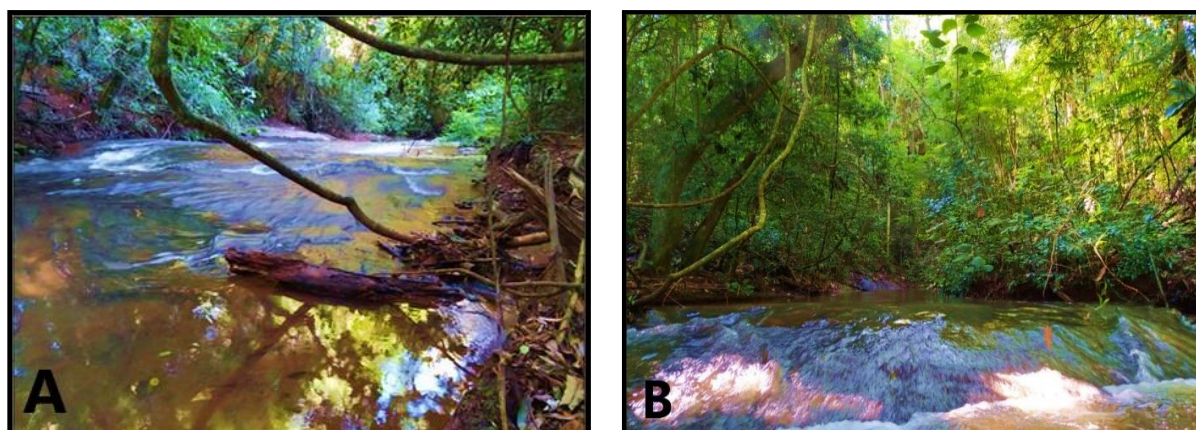
**Figura 8.** Fitolho que foi instalado no vertedouro do Parque Municipal Paulo Gorski, onde se observa massa de ovos de Simuliidae (A). Ovos de Simuliidae coletados nos fitilhos e observados em microscópio (aumento de 40x) (B). Fonte: A autora, 2020.

**Ponto 3:** Córrego Santa Rosa – Distrito de Sede Alvorada.

Sede Alvorada é um distrito de Cascavel, que fica a aproximadamente 23 km da área urbana. A alta infestação de borrachudos no distrito foi pauta das Conferências Municipais de Saúde realizadas nos anos de 2011, 2013, 2015 e 2017, quando os moradores solicitavam intervenções alegando que os insetos estavam afetando as atividades rotineiras desenvolvidas no local (CASCAVEL, 2011, 2013, 2015, 2017).

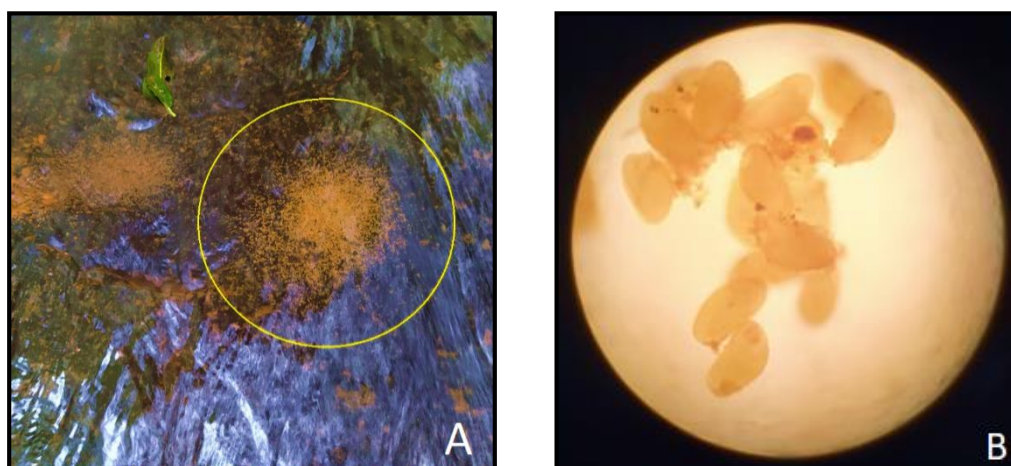
O Córrego Santa Rosa, se localiza no distrito de Sede Alvorada, área rural do município de Cascavel. Possui 7 km de extensão, e é um afluente do Rio São Francisco Verdadeiro, localizado em 24°49'15.9"S e 53°37'51.2"W.

No córrego é observado que o desnível em relação ao ponto mais alto do relevo é de 40 m na nascente e chega a 140 m na sua foz. O ponto de coleta se encontrava há aproximadamente 1,5 km do centro do distrito de Sede Alvorada (Figura 9).



**Figura 9.** Ponto 3 de coleta de imaturos de Simuliidae: Córrego Santa Rosa à montante (A) e a jusante (B). Jan/2020 – Jul/2021. Fonte: A autora, 2020.

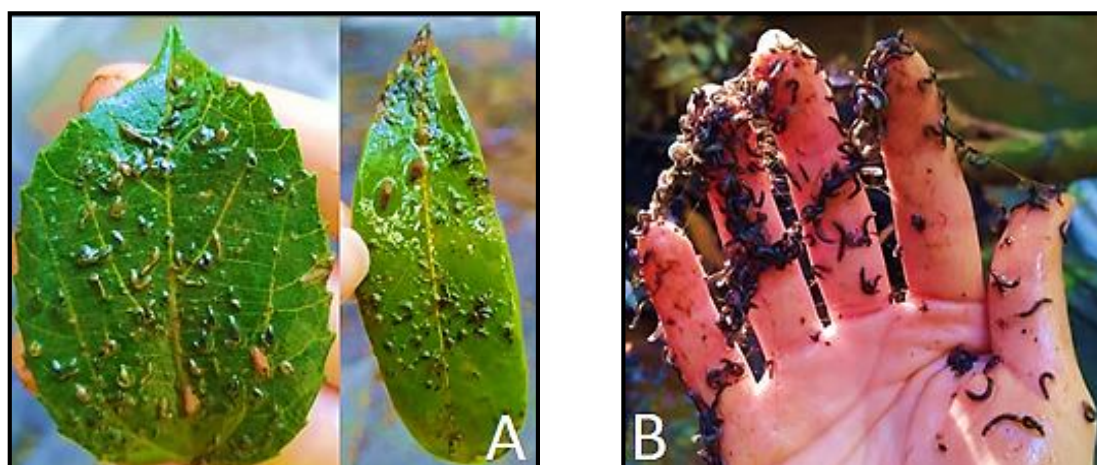
A escolha do córrego Santa Rosa como fonte das larvas utilizadas no bioensaio justifica-se pela presença de grandes quantidades de larvas encontradas inclusive podem ser visualizados criadouros com massas de ovos aderidos a rocha, (Figura 10) e que o local não estava sendo alvo de bioinseticidas ou outros produtos visando o controle dos borrachudos.



**Figura 10.** A - Massa de ovos de Simuliidae aderidos a rocha no riacho (área circunscrita em amarelo). B – Fragmento de massa de ovos de Simuliidae quando observados ao microscópio (aumento de 40 x). - Córrego Santa Rosa – Distrito de Sede Alvorada – Cascavel - Pr. Fonte: A autora, 2021.

#### 8.1.4.2 Coleta de larvas para o bioensaio

Para realização do bioensaio de avaliação dos larvicidas foram utilizadas larvas diretamente do ambiente natural. As larvas foram coletadas manualmente, retirando-as das rochas submersas no mesmo sentido da vazão do rio (Figura 11).



**Figura 11.** A - Larvas e pupas aderidas ao folhíço de correnteza. B - Coleta de larvas, onde observam-se as teias secretadas. Fonte: A autora, 2021.

Em seguida, as larvas foram transferidas para um recipiente plástico contendo água coletada do rio e um aerador portátil, que garantia a oxigenação da água durante o transporte ao laboratório. Somente foram utilizadas larvas coletadas no mesmo dia do ensaio, evitando-se assim que o tempo de laboratório interferisse de forma mais significativa na mortalidade.

#### 8.1.4.3 Preparo para o bioensaio (*screening*)

No laboratório, as larvas foram avaliadas quanto à motilidade e viabilidade, evitando as que apresentavam histoblasto branquial evidente, pois é uma característica de último estágio de desenvolvimento, apresentando risco de empupar durante o experimento. Com um pincel foram transferidas para os recipientes plásticos abastecidos com 400 mL de água do próprio rio, oxigenados individualmente e ininterruptamente, com compressor aerador Boyu®, SC – 7500 - 2x3L/MIN, 127 V. As larvas foram submetidas ao período de aclimação de 3 horas e posteriormente avaliadas quanto a sua fixação as paredes do recipiente, as desprendidas eram descartadas e outras repostas no local, garantindo que somente larvas sadias fossem avaliadas (LACEY, 1997). Em razão da fonte de água do experimento ser do próprio córrego não foram aplicadas fontes nutricionais externas na água do bioensaio.

Para cada um dos produtos em teste e para a testemunha, foram preparados três copos, cada um considerado uma repetição. Com exceção do teste simples realizado para avaliar a concentração inicial com os comprimidos de 2, 5 e 10 mg, que foi executado em uma única repetição (Figura 12) e dos testes para os comprimidos de 30, 35 e 40 mg, onde foram realizadas 5 repetições.

Devido às larvas serem oriundas de campo, apresentavam sensibilidade ao processo de coleta, manuseio, transporte e ambiente de laboratório. Assim, para o experimento foi aceito como ponto de corte aceitável a mortalidade de 20% do grupo testemunha (LACEY, 1997).

#### 8.1.4.4 Aplicação das suspensões de Bti

Previamente, as suspensões foram homogeneizadas na quantidade de 0,2 mL de suspensão de Bti para 100 mL de água do próprio rio. Posteriormente, a mistura foi aplicada dentro dos respectivos recipientes com as larvas.

Após 1 minuto, tempo aguardado para que as larvas fizessem a ingestão do Bti, a água de cada recipiente foi cuidadosamente descartada, ficando as larvas aderidas às paredes. Em



seguida, o recipiente foi abastecido com 500 mL de água do rio sem Bti. A temperatura da água durante a coleta, transporte e experimento foi mantida com mínimo de 20 °C e admitido máximo de até 25 °C, mensurado com termômetro digital.

A mortalidade foi aferida, através de estímulo feito com um pincel, sendo consideradas mortas as larvas que não respondiam ao toque e as que perderam a capacidade de se fixar.

#### 8.1.4.5 Aplicação dos formulados sólidos

Para a aplicação dos formulados sólidos realizou-se a diluição dos comprimidos em 100 mL de água do próprio rio, sendo que os formulados apresentaram uma média de 10 a 15 minutos para completa solvência. A mistura foi aplicada nos respectivos recipientes, após, foi aguardado o tempo de 1 minuto para que as larvas fizessem a ingestão do Bti.

Posteriormente, foram adotados os mesmos procedimentos descritos para o formulado líquido.



**Figura 12.** Aparato de bioensaio e compressor (aerador de aquário) utilizado na oxigenação dos recipientes. Fonte: A autora, 2021.

#### 8.1.4.6 Análise dos dados

Todos os bioensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado. Os dados de mortalidade das larvas foram submetidos à análise de variância e teste de normalidade dos resíduos, Shapiro-Wilk (5%). Em seguida, avaliou-se a homogeneidade da variância com teste de Bartlett (5%) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

## 8.2 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Uma das premissas da realização de programas de controle é a identificação taxonômica das espécies que habitam os córregos que serão alvo das ações. As coletas não foram realizadas com o objetivo exclusivo de identificação taxonômica, portanto as espécies identificadas são somente uma amostragem da diversidade de espécies desses locais. Estudos mais abrangentes e com protocolos de coleta específicos devem ser instituídos para que a fauna local possa ser representativamente identificada.

Assim, parte do material coletado para o bioensaio no período de 2019 a 2020, foi selecionado, conservado em microtubos com álcool 70% e encaminhado para identificação. Foram encaminhadas larvas imaturas e maduras, sendo consideradas larvas maduras aquelas que apresentavam histoblasto branquial evidente, o que é característico de larvas de último estágio de desenvolvimento, e garantem maior segurança na identificação dos caracteres para identificação das espécies.

As pupas foram mantidas no próprio substrato em que foram encontradas, ou quando não foi possível a coleta, foram retiradas cuidadosamente do substrato, e colocadas em via seca dentro de um microtubo, possibilitando, em alguns casos a emergência do adulto. Posteriormente o conjunto, adulto emergido e exúvia pupal foram conservados em álcool 70%. Por inviabilidade algumas pupas não apresentaram a emergência do adulto, e após aguardado o período de 4 dias foram conservadas em álcool 70%.

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Instituto Oswaldo Cruz (LSO/IOC) no Rio de Janeiro, para identificação taxonômica das espécies. O Laboratório abriga a Coleção de Simulídeos do Instituto Oswaldo Cruz (CSIOC) sendo referência em representatividade para Simuliidae no Brasil, o laudo de identificação das espécies pode ser visualizado no ANEXO B.

## 8.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ÁGUA E INTEGRIDADE FÍSICA DO CÓRREGO SANTA ROSA – DISTRITO DE SEDE ALVORADA – CASCAVEL, PR.

Considerando que as características da água podem afetar a atividade larvívora do Bti, e que, além de base para protocolos de controle, o monitoramento da água é um indicador dos determinantes e condicionantes da presença de criadouros de simulídeos, afetando também a



distribuição das espécies, foram realizadas análises para avaliar quais seriam os parâmetros de qualidade da água com o objetivo de obter dados que poderiam servir de subsídio para um posterior protocolo de intervenção no Córrego Santa Rosa, e auxiliariam na interpretação dos dados taxonômicos levantados.

Foram realizadas coletas para análise das características físico-químicas e microbiológicas da água do córrego Santa Rosa – córrego fonte das larvas para o bioensaio. As coletas foram realizadas com frequência semanal, do período de 10/03/2021 a 27/04/2021, final do verão ao início do outono, entre 08:00h AM e 10:00h AM, totalizando 8 semanas de monitoramento, sendo submetidas à análise de parâmetros físico-químicos e microbiológicos, na Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNDETEC, Cascavel, PR.

As coletas foram realizadas em águas superficiais em função da pequena profundidade do curso, de forma manual (ABNT, 1987), em duplicatas, na calha central do rio. Para as coletas de análise físico-química foram utilizados frascos de polietileno com capacidade para 500 mL de água, e para as coletas de análises microbiológicas foram utilizados frascos de polipropileno, estéreis, com preservante tiosulfato e capacidade para 100 mL. A partir do momento de coleta, as amostras foram mantidas em caixa térmica com gelo reciclável e encaminhadas para o laboratório em no máximo 3 horas. As análises foram realizadas em triplicata (CETESB, 2011).

Os parâmetros físico-químicos analisados em laboratório foram o potencial hidrogeniônico (pH), condutividade elétrica, turbidez, sólidos totais, nitrito, nitrato e fosfato. A análise microbiológica investigou a presença de coliformes totais e de *Escherichia coli* a qual é indicador de contaminação fecal, pois habita exclusivamente o intestino humano e de animais homeotérmicos (BRASIL, 2005). A temperatura da água, temperatura do ar e umidade relativa do ar, foram observados no momento da coleta da água.

Para verificação da integridade do trecho foi aplicado no local o *Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats em trechos de bacias hidrográficas* (PAR), de Callisto *et al.* (2002), adaptado de Hannaford *et al.* (1997). A aplicação do protocolo visa avaliar as condições observadas no trecho da bacia, a influência antrópica, as condições do habitat e o nível de conservação. Na aplicação do protocolo é designada uma pontuação para cada característica observada no local, o somatório de pontos variando de 0 a 40 representa que o trecho é “impactado”; de 41 a 60 pontos são designados como trechos “alterados”; e acima de 60 pontos como trechos “naturais”.

## 8.4 FOLDER

Com o objetivo de produzir um produto educativo com linguagem de fácil entendimento, que explicasse os contextos básicos dos condicionantes à presença de borrachudos e as possíveis formas de controle, foi elaborada a proposta de um veículo de comunicação de caráter informativo.

Foram utilizados os conceitos de elaboração de material educativo em saúde, propostos por Moreira *et al.* (2003). O público-alvo pretendido foi determinado como sendo adultos, alfabetizados, que residem, trabalham ou frequentem locais em que os borrachudos são encontrados em grandes quantidades.

A mensagem do produto foi determinada com base nos objetivos de informar, modificar atitudes e adotar medidas preventivas. O veículo de comunicação adotado foi o de material impresso (folder) (apêndice A e B).

A tiragem inicial proposta é de 300 unidades, os pontos de distribuição serão os serviços públicos municipais, com foco para a Unidade de Saúde do Distrito de Sede Alvorada, que registrou solicitações de intervenção nas Conferências Municipais de Saúde realizadas nos anos de 2011 (10°), 2013 (11°), 2015 (12°) e 2017 (13°), devido à alta quantidade de borrachudos constatada no distrito. A proposta será encaminhada para a Secretaria Municipal de Saúde e solicitado o subsídio da impressão, tendo em vista sua relevância para a saúde pública.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 ATIVIDADE LARVICIDA DAS SUSPENSÕES - SCREENING.

A mortalidade variou nos tratamentos entre 14,6% e 73,7%. Contudo, para as suspensões testadas, a mortalidade observada não ultrapassou 20%, não diferindo significativamente da testemunha (Tabela 2). Por outro lado, para o formulado padrão, a mortalidade média foi de 73,7%, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos demais grupos avaliados.

**Tabela 2.** Mortalidade média de larvas de Simuliidae submetidas ao tratamento com suspensões à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, após 4 horas da exposição.

Tratamentos	Mortalidade média (%)*
Formulado Padrão	73,7 a
Suspensão de Bti tradicional	14,6 b
Formulado de Bti Nova formulação	20,0 b
Testemunha	9,7 b

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## 9.2 ATIVIDADE LARVICIDA DOS FORMULADOS SÓLIDOS - SCREENING.

### 9.2.1 Comprimidos de 2, 5 e 10 mg (prospecto)

Na primeira avaliação (4 horas) verificou-se grande variação na mortalidade entre os tratamentos de formulados testados e ao formulado padrão. Considerando a baixa resposta aos formulados testados nesse tempo, o experimento foi estendido para 24 horas de avaliação. Contudo, observou-se que no tempo de 24 horas houve mortalidade de larvas no grupo testemunha acima de 20%, o que é considerado alto (Tabela 3).

Quando utilizados os comprimidos de 2 e 5 mg, concentração de 4 mg e 10 mg/L respectivamente, verificou-se mortalidade similar ao grupo testemunha, e a mortalidade foi mais expressiva a partir de 10 mg, concentração de 20 mg/L, sendo 24,5% superior ao grupo controle.

**Tabela 3.** Mortalidade de larvas de Simuliidae, submetidas ao tratamento com larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, após 24 horas da exposição.

Tratamentos	Mortalidade (%)
Formulado padrão	73,1
Comprimido 2 mg	24,5
Comprimido 5 mg	28,9
Comprimido 10 mg	52,8
Testemunha	28,6

### 9.2.2 Comprimidos de 15, 20 e 25 mg

Independente do tratamento, a mortalidade variou entre 19,6 e 75,4% (Tabela 4). Para a formulação de 15 mg, concentração de 30 mg/L, a mortalidade observada não ultrapassou 19,6%, não diferindo significativamente da testemunha. Para o formulado de 20 mg, concentração de 40 mg/L, observou-se mortalidade significativa em relação a testemunha, com média de 34,3%. O formulado de 25 mg, concentração de 50 mg/L, apresentou mortalidade média de 50,6%, e não diferiu significativamente do formulado padrão comercial, assim como não diferiu do formulado de 20 mg.

O formulado padrão comercial, apresentou mortalidade média de 75,4% após o tempo de avaliação de 18 horas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Mortalidade média de larvas de Simuliidae, submetidas ao tratamento de larvicidas sólidos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, após 18 horas da exposição.

Tratamentos	Mortalidade média (%)*
Formulado padrão	75,4 a
Comprimidos 25mg	50,6 ab
Comprimidos 20mg	34,3 bc
Comprimidos 15mg	19,6 c
Testemunha	11,3 c

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### 9.2.3 Comprimidos de 30, 35 e 40 mg

A mortalidade variou nos tratamentos entre 21,7 e 85,7% (Tabela 5). Para o formulado de 30 mg, concentração de 60 mg/L, observou-se mortalidade significativa, com média de 64,2%, não diferindo significativamente do formulado padrão. O formulado de 35 mg, concentração de 70 mg/L, apresentou média de mortalidade 35,8%, e não diferiu significativamente do formulado de 40 mg, concentração de 80 mg/L, que por sua vez, apresentou média de 31,7% de mortalidade.

O formulado padrão, apresentou mortalidade média de 78% ( $p < 0,05$ ).

Após a dissolução dos comprimidos foram visualizadas reações de aglutinação das partículas de proteína, em especial nos comprimidos de 35 e 40 mg. Neste caso, as partículas eram superiores a 1 mm (Figura 14).

**Tabela 5.** Mortalidade média de larvas de Simuliidae, submetidas ao tratamento de larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, após 18 horas da exposição.

Tratamentos	Mortalidade média (%)*
Formulado padrão	78 a
Comprimidos 30mg	64,2 a
Comprimidos 35mg	35,8 b
Comprimidos 40mg	31,7 bc
Testemunha	17,8 c

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### 9.3 ESTIMATIVA DO TEMPO DE AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE DO GRUPO TESTEMUNHA.

Com base na variabilidade dos tempos de avaliação da mortalidade recomendados na literatura e nos resultados deste trabalho, foram realizados testes para a confirmação dos resultados da mortalidade observada no grupo sem Bti.

No tempo de 4 horas a mortalidade observada foi de 6,9% a 11,1%. Para o período de avaliação de 18 horas foi observada mortalidade natural entre 5,6% e 17,6%. No tempo de 24 horas os resultados foram superiores a 20%, estando entre 28,5% e 34% (Tabela 6).

**Tabela 6.** Mortalidade de larvas de Simuliidae observada nos grupos testemunha em razão do tempo de permanência das larvas em condições de laboratório, sem aplicação de Bti.

Mortalidade (%)				
Tempo	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média
4 horas	11,1	6,9	11,1	<b>9,7</b>
18 horas	10,0	5,6	17,6	<b>11,1</b>
24 horas	33,9	28,5	34,0	<b>32,2</b>

#### 9.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ÁGUA E INTEGRIDADE FÍSICA DE TRECHO DO CÓRREGO SANTA ROSA – DISTRITO DE SEDE ALVORADA – CASCAVEL, PR

Ocorreram oscilações semanais nos componentes avaliados, principalmente na quantidade de Sólidos Totais, que apresentou mínimo de 72,1 e máximo de 423,9 ppm (CV% = 70,8) e os parâmetros de Nitrato, de 0,9 a 1,6 ppm (CV% = 16,8). (Tabela 7 e Tabela 8).

**Tabela 7.** Médias semanais das condições físico-químicas da água do Córrego Santa Rosa – Bacia do Paraná 3 – Cascavel, Paraná, Brasil, monitorado no período de 10/03/2021 a 28/04/2021.

Variáveis	10/03	17/03	24/03	31/03	07/04	14/04	22/04	28/04
pH	7,9	7,3	7,8	6,7	6,7	6,9	7	7
Cond. (µS/cm)	17,5	16,2	19,1	16,9	16,8	17,1	17	18
Turbidez (NTU)	18,3	21,4	13,3	16,9	16,8	17,1	17	18
Sólid. T. (ppm)	109,7	217,8	196,5	-	423,9	116	82,6	72,1
Nitrito (ppm)	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Nitrato (ppm)	0,9	1,3	1,2	1,5	1,6	1,5	1,5	1,3
Fosfato (ppm)	8,9	7,9	7,8	8,7	8,2	9,2	8	8,5
T. água (°C)	20,3	20,9	21,2	20,2	19,7	20,5	18,7	17,1
T. amb (°C)	21,5	21,7	21,9	21,3	20,4	21,8	19,8	18,2
UR (%)	69	71	80	76	74	74	65	56

pH= potencial hidrogeniônico; Cond. ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) = condutividade micro-Siemens por centímetro; NTU = Unidade de Turbidez Nefelométrica; Sólid. T.= sólidos totais; ppm = partes por milhão; T. água = temperatura da água; T. amb = temperatura do ambiente;  $^{\circ}\text{C}$  = graus celsius; UR = Umidade relativa do ambiente.

**Tabela 8.** Condições físico-químicas da água do Córrego Santa Rosa – Bacia do Paraná 3 – Cascavel, Paraná, Brasil, monitorado semanalmente no período de 10/03/2021 a 28/04/2021.

Variáveis	* Média $\pm$ DP	CV (%)	Mín.	Máx.
Ph	7,2 $\pm$ 0,5	6,5	6,7	7,9
Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	17,3 $\pm$ 0,9	5,1	16,2	19,1
Turbidez (NTU)	17,4 $\pm$ 2,2	12,9	13,3	21,4
Sólidos Totais (ppm)	174,1 $\pm$ 123,2	70,8	72,1	423,9
Nitrito (ppm)	< 0,010	0	0	0
Nitrato (ppm)	1,4 $\pm$ 0,2	16,8	0,9	1,6
Fosfato (ppm)	8,4 $\pm$ 0,5	6	7,8	9,2
Temperatura da água ( $^{\circ}\text{C}$ )	19,8 $\pm$ 1,3	6,8	17,1	21,2
Temperatura ambiente ( $^{\circ}\text{C}$ )	20,8 $\pm$ 1,3	6,2	18,2	21,9
Umidade relativa %	70,6 $\pm$ 7,4	10,5	56	80

\*: Média geral. DV: Desvio padrão; CV: Coeficiente de variabilidade; Mín: Mínimo; Máx: Máximo; pH= potencial hidrogeniônico;  $\mu\text{S}/\text{cm}$ = micro-Siemens por centímetro; NTU= Unidade de Turbidez Nefelométrica; ppm= partes por milhão.

Observou-se a presença de coliformes totais e *Escherichia coli* em todas as coletas realizadas (Tabela 9 e Tabela 10).

**Tabela 9.** Pesquisa de Coliformes Totais na água do Córrego Santa Rosa – Bacia do Paraná 3 – Cascavel, Paraná, Brasil, monitorado semanalmente no período de 10/03/2021 a 28/04/2021.

C. Totais	10/03	17/03	24/03	31/03	07/04	14/04	22/04	28/04
Amostra 1	+	+	+	+	+	+	+	+
Amostra 2	+	+	+	+	+	+	+	+

OBS: C. Totais: Coliformes totais; (+) = Presença.

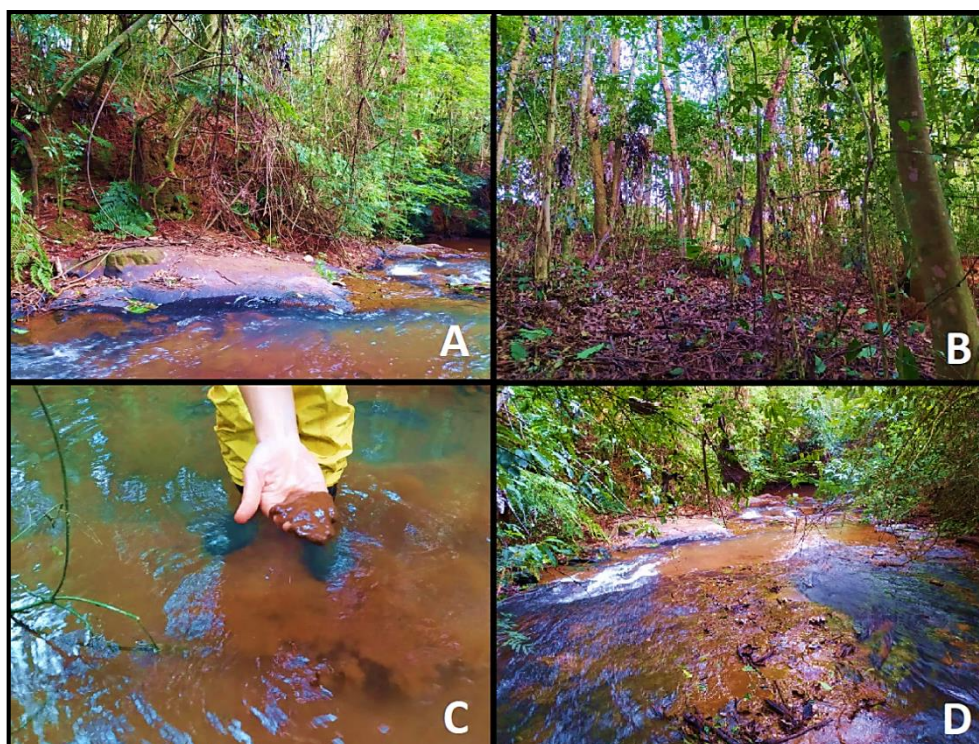
**Tabela 10.** Pesquisa de *Escherichia coli* na água do Córrego Santa Rosa – Bacia do Paraná 3 – Cascavel, Paraná, Brasil, monitorado semanalmente no período de 10/03/2021 a 28/04/2021.

<i>E. coli</i>	10/03	17/03	24/03	31/03	07/04	14/04	22/04	28/04
Amostra 1	+	+	+	+	+	+	+	+
Amostra 2	+	+	+	+	+	+	+	+

OBS: *E. coli*: *Escherichia coli*; (+) = Presença.

No trecho investigado do Córrego Santa Rosa o padrão de uso da terra além da zona de vegetação ribeirinha era de pastagens e cultivos agrícolas de ciclo curto, a largura da mata ciliar em ambos os lados era de 23 m e apresentava quebra frequente com algumas cicatrizes e

barrancos, dentro de uma faixa de 10 m da mata ciliar foram visualizadas espécies de árvores pioneiras mescladas com maduras e vários troncos, de árvores que foram retiradas. No leito do córrego existiam rochas e troncos presentes movendo-se com o fluxo, mas na maior parte com sedimentos, o canal era preenchido quase em sua totalidade por material argiloso, exceto nas corredeiras rochosas. Os taludes do rio apresentavam-se, em sua maioria, instáveis, com solo solto e facilmente perturbável, havendo escavações nas curvas e constrictões. As áreas de corredeiras separadas com longos poções. A vegetação aquática restrita, quando presente, com musgos e manchas de algas, e os poucos detritos presentes, compostos principalmente por folhas e material lenhoso com sedimento (Figura 13). De acordo com o Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats em trechos de bacias hidrográficas (PAR) (Callisto *et al*, 2002) o trecho pode ser caracterizado como ambiente natural (ANEXO C).



**Figura 13.** A - Talude do córrego apresentando instabilidade; B – Mata ciliar apresentando falhas e quebras; C – Lama predominante no fundo do córrego; D – Corredeira apresentando retenção de galhos que se movem com o fluxo. Fonte: A autora, 2021.

## 9.5 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Ao todo foram analisadas 22 exúvias, 55 pupas, 10 adultos, 42 larvas maduras e 299 larvas imaturas (Tabela 11).

**Tabela 11.** Exemplos de Simuliidae coletados em Cascavel – PR, no período de 2019 – 2020 e encaminhadas para o Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Instituto Oswaldo Cruz (LSO/IOC) para identificação.

Local	Larvas	Larvas	Exúvias	Pupas	Adultos
	Imaturas	Maduras			
<b>Ponto 1.</b> Rio São Francisco Verdadeiro	53	2	0	0	0
<b>Ponto 2.</b> Parque Ecológico Paulo Gorski	20	7	15	4	1♂
<b>Ponto 3.</b> Córrego Santa Rosa	226	32	7	51	6♀/3♂
<b>Total</b>	<b>299</b>	<b>42</b>	<b>22</b>	<b>55</b>	<b>10</b>

Foram registradas seis espécies pertencentes ao gênero *Simulium* Latreille, 1802, e identificados quatro subgêneros, com destaque para os subgêneros *Chirostilbia* Enderlein, 1921, e *Trichodagmia* Enderlein, 1934, que apresentaram duas espécies de representatividade cada um (Tabela 12). Observou-se ainda que, *Simulium inaequale* Paterson & Shannon, 1927; *Simulium pertinax* Kollar, 1832; *Simulium nigrimanum* Macquart, 1838; e *Simulium subpallidum* Lutz, 1910; estiveram presentes em dois dos pontos de amostragem. *S. subpallidum* e *S. nigrimanum* foram observados tanto na área urbana da cidade, caracterizada pelo Ponto 2 de coleta, quanto nas áreas rurais, caracterizadas pelo Ponto 1 e Ponto 3 de coleta.

**Tabela 12.** Espécies de Simuliidae encontradas nos pontos amostrados e identificadas pelo Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Instituto Oswaldo Cruz (LSO/IOC). Cascavel – PR – Brasil, 2019 -2020.

Gênero	Subgênero	Espécie
<i>Simulium</i> Latreille, 1802	<i>Chirostilbia</i> Enderlein, 1921	<i>Simulium subpallidum</i> Lutz, 1910
		<i>Simulium pertinax</i> Kollar, 1832
	<i>Trichodagmia</i> Enderlein, 1934	<i>Simulium nigrimanum</i> Macquart, 1838
		<i>Simulium rubrithorax</i> Lutz, 1909
	<i>Psilopelmia</i> Enderlein, 1934	<i>Simulium perflavum</i> Roubaud, 1906
<i>Psaroniocompsa</i> Enderlein, 1934	<i>Simulium inaequale</i> Paterson & Shannon, 1927	

O Ponto de coleta 3 foi o ponto de maior diversidade com um total de seis espécies, o que pode ser devido a maior quantidade de amostras coletadas neste local, *S. perflavum* e *S. rubrithorax*, só foram identificadas no Ponto 3 de coleta (Tabela 13).



**Tabela 13.** Espécies de Simuliidae encontradas por pontos amostrados e identificadas pelo Laboratório de Simulídeos e Oncocercose do Instituto Oswaldo Cruz, caracterizadas segundo o local de coleta. Cascavel – PR – Brasil, 2019 -2020.

Local	Latitude (S)	Longitude (W)	Espécies
Ponto 1	24°51'39.4"	53°35'18.3"	<i>S. inaequale</i> Paterson & Shannon, 1927
			<i>S. pertinax</i> Kollar, 1832
Ponto 2	24°57'58.9"	53°26'03.2"	<i>S. subpallidum</i> Lutz, 1910
			<i>S. nigrimanum</i> Macquart, 1838
Ponto 3	24°49'15.9"	53°37'51.2"	<i>S. perflavum</i> Roubaud, 1906
			<i>S. inaequale</i> Paterson & Shannon, 1927
			<i>S. rubrithorax</i> Lutz, 1909
			<i>S. pertinax</i> Kollar, 1832
			<i>S. nigrimanum</i> Macquart, 1838
			<i>S. subpallidum</i> Lutz, 1910

## 9.6 FOLDER

O texto do folder foi dividido em: introdução, desenvolvimento e conclusão. Para introdução foram apresentadas noções sobre a identificação das larvas, ciclo e ambiente em que são encontradas, que são informações básicas e primordiais para ações de controle de simulídeos. Para ilustrar as informações contidas na introdução foram anexadas duas fotos com a intenção de mostrar os aspectos macroscópicos das larvas, possibilitando que os leitores tenham conhecimento visual das larvas de simulídeos e evitando que sejam confundidas com outros macroinvertebrados.

O desenvolvimento do material educativo faz referência ao controle mecânico, sendo utilizada a figura de uma vassoura para ilustrar o método, cita formas de evitar criadouros e quais são os condicionantes e determinantes do problema, sendo utilizadas fotos de predadores naturais para finalização do tópico. Para a conclusão optou-se por orientar sobre prevenção e cuidados com a saúde humana e uma foto do ambiente lótico, representando as características dos locais onde as larvas podem ser encontradas.

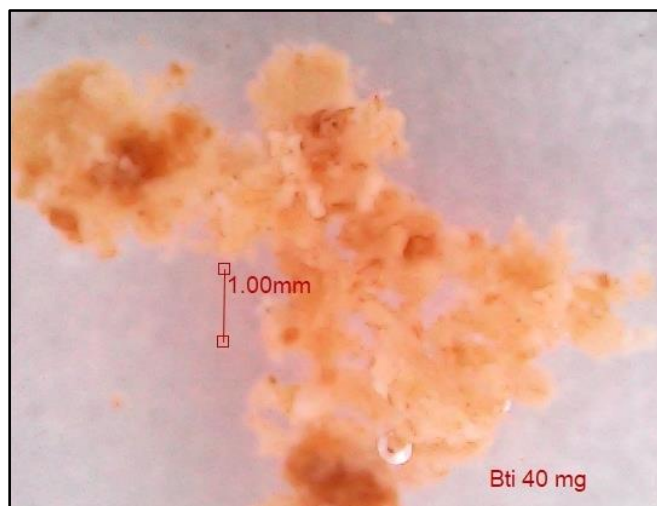
## 10. DISCUSSÃO

### 10.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE ATIVIDADE LARVICIDA DOS BIOINSETICIDAS

Sobre as suspensões líquidas, apesar do Formulado de Bti Nova Formulação ter causado mortalidade média superior à Suspensão de Bti Tradicional, ambos não apresentaram resultados satisfatórios de atividade larvicida para o período de exposição de 1 minuto e sob as condições avaliadas. Por outro lado, as apresentações de comprimido efervescente, de concentrações a partir de 40 mg/L expressaram melhores resultados, onde a análise de variância demonstrou taxa de mortalidade significativa em razão do formulado. Os resultados foram ainda mais expressivos para os formulados de 25 e 30 mg, concentração de 50 e 60 mg/L respectivamente, sendo que ambos não diferiram estatisticamente do observado no formulado padrão.

No presente trabalho foi utilizado o tempo de exposição de 1 min associado a altas concentrações de Bti, não sendo observado em nenhum dos tratamentos a mortalidade total das larvas, o que pode ser explicado pelo reduzido tempo de exposição. Cavados *et al.*, (2004), avaliaram os efeitos histológicos de *Bacillus thuringiensis* no intestino médio de larvas de *S. pertinax*, constatando que a concentração de Bti de 2 mg/L, durante 4 h de exposição causava poucas alterações histológicas em um número reduzido de células colunares do epitélio intestinal, e sem causar morte de larvas. Na concentração de 4 mg/L, após 3 h de exposição, os autores verificaram alterações mais expressivas nas células intestinais, igualmente sem mortalidade total das larvas. Na concentração de 6 mg/L utilizando um tempo de exposição de 1 hora, houve mortalidade total das larvas, porém o tempo considerado é muito diferente do que ocorre nas aplicações em campo.

Neste trabalho foi observado mortalidade mais elevada com o uso dos comprimidos de 25 e 30 mg, em relação aos de 35 e 40 mg. Os resultados podem ser em decorrência da indisponibilidade do Bti para a ingestão pelas larvas, devido ao tamanho das partículas, maiores que o esperado, por reação de aglutinação das proteínas (Figura 14). Isto porque, na fase larval os simulídeos são classificados como pertencentes ao grupo funcional de alimentação coletor-filtrador, e se alimentam de matéria orgânica particulada fina em decomposição, ingerindo partículas menores que 1 mm (HAMADA; NESSIMIAN; QUERINO, 2014). Em experimento conduzido em laboratório, Kurtak (1978) verificou que as larvas testadas ingeriram partículas de 150 µm de diâmetro que eram filtradas por seus leques cefálicos. Com base nestes resultados os processos de produção estão sendo reavaliados para verificar a necessidade de mudanças na formulação.



**Figura 14.** Massa de proteínas e cristais de Bti apresentando aglutinação após a diluição e agitação do comprimido de 40 mg em 100 mL de água.

## 10.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESTIMATIVA DO TEMPO DE AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE DO GRUPO TESTEMUNHA

Sabe-se que populações de simulídeos em campo apresentam sensibilidade a manutenção em condições artificiais, sobretudo em relação a oxigenação e ao turbilhonamento da água, o que pode elevar a mortalidade durante os experimentos, por baixas concentrações de oxigênio e deficiências nutricionais (LACEY, 1997). Na definição do tempo ideal para experimentação em laboratório, no tempo de 4 horas de avaliação a média foi de 9,7% de mortalidade do grupo testemunha. Considerando as informações de Chilcott *et al.* (1990) que dizem que, após a administração de 4  $\mu\text{g/mL}$  de Bti, o esperado é que com 1h as larvas deixem de se alimentar, a atividade seja reduzida após 2 horas, com 4 horas as larvas apresentem lentidão extrema e paralisia geral em 6 horas. Assim, pode-se inferir que o tempo de 4 horas poderia prejudicar a avaliação da eficiência dos produtos larvicidas, pois estariam expressando lentidão e não mortalidade.

Andrade e Campos (1995), testando um formulado de Bti (TEKNAR®), não observaram mortalidade do grupo testemunha de *Simulium* spp. após 24 h, porém o experimento foi realizado em condições próximas às naturais, utilizando um sistema de rampas instaladas em um riacho.

No período de avaliação de 18 horas a mortalidade natural variou entre 5,6% e 17,6%, sendo um resultado satisfatório segundo Lacey (1997), pois foi menor que 20%. Assim,

admitiu-se que 18 horas após a administração do Bti um período apropriado de avaliação da mortalidade para a metodologia utilizada.

Nos testes realizados, o tempo de avaliação de 24 horas resultou em alta mortalidade do grupo testemunha, sendo de 28,6%. Lacey (1997), sugere que as avaliações da resposta aos larvicidas devem ser realizadas com tempo de 24h, mas também que a mortalidade do grupo testemunha não deve ser superior a 20%.

### 10.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ÁGUA E INTEGRIDADE FÍSICA DO CÓRREGO SANTA ROSA – DISTRITO DE SEDE ALVORADA – CASCAVEL, PR

No presente estudo a temperatura da água do córrego variou entre 17,1 e 21,2°C. Em experimento conduzido por Wilson *et al.* (2005), foi observado que a temperatura, condutividade e turbidez da água influenciaram diretamente a resposta larvicida a um produto a base de Bti contra *S. damnosum*, sendo observados melhores resultados a medida em que a temperatura aumentava, o que atribuíram a influência desta no metabolismo das larvas e consequentemente maiores ingestões de toxinas pelas larvas.

Atwood *et al.* (1992), em experimento conduzido com larvas de *Cnephia pecuarum* Riley 1887, (Simuliidae) observaram que houve redução da mortalidade larval em resposta ao Bti quando a temperatura da água diminuía, recomendando que o controle seja realizado antes que a temperatura fique abaixo de 9°C. Portanto, a mesma recomendação poderia ser aplicada para o Córrego Santa Rosa, em especial nos meses de inverno, com aferição deste parâmetro e o tratamento realizado somente se a água apresentar temperaturas superiores a 9°C.

Além disso, no Córrego Santa Rosa observou-se média de condutividade de 16,2 a 19,1 µS/cm. Wilson *et al.* (2005) constataram que a alta condutividade da água propiciava melhor desempenho larvicida do produto, obtendo melhor resultado na condutividade de 323 mS (milisiemens). Porém, segundo os autores, como a maioria dos córregos não apresenta condutividades tão altas em condições naturais, o parâmetro não deve ser um fator decisório no uso do produto.

Para o parâmetro turbidez, o Córrego Santa Rosa apresentou variação média de 13,3 até 21,4 NTU. Wilson *et al.* (2005) observaram melhores respostas ao Bti quando a turbidez da água estava abaixo de 4,2 NTU, e recomendaram que, para o uso operacional do produto deva-se evitar águas turvas. Portanto, a turbidez avaliada no córrego Santa Rosa poderia influenciar

negativamente a resposta larvicida ao Bti. O valor máximo de turbidez (21,4 NTU), observado após precipitação de 11,44 mm que cessou 12h antes da coleta, portanto se um protocolo de controle de simuliídeos fosse instituído no córrego seria importante a realização de um acompanhamento da qualidade da água e da pluviosidade, comparando as informações com a eficiência larvicida do produto, visto que os parâmetros da água podem apresentar oscilações em razão da pluviosidade e descargas de matéria orgânica.

A média dos parâmetros de sólidos totais observados no Córrego Santa Rosa variaram de 72,1 a 423,9 ppm, o que poderia ser um fator prejudicial a atividade larvicida do Bti. Em bioensaio para avaliação da eficácia de biolarvicida, comparando o uso de água destilada e água deionizada com nutrientes suspensos, foi confirmado que quando o alimento está presente na água, as larvas têm mais facilidade em ingerir as partículas de Bti, pois estas se associam as partículas de alimentos (KERR; GRAY; BATZER, 2020). Porém, em outro estudo observou-se a interrupção da ingestão em *S. vittatum* Zetterstedt, 1838, quando ofertado alimento acima de 50 mg/L de partículas em suspensão, sob condições simuladas, atribuindo-se o fato ao preenchimento rápido do intestino das larvas (GAUGLER; MOLLOY, 1980).

No córrego Santa Rosa a variação da média de nitrato foi de 0,9 a 1,6 ppm e houve a identificação de *S. pertinax*, o que se assemelha aos resultados de um estudo conduzido em uma bacia impactada do sul do Brasil, onde se encontrou associação correlativa entre a ocorrência de *S. pertinax* e concentrações de nitrato de 1,0 mg/L a 1,75 mg/L, relacionado a arroios com maior poluição orgânica e degradação ambiental, em locais de produção de aves e suínos (STRIEDER; DOS SANTOS; VIEIRA, 2006).

As médias das variáveis pH, turbidez, sólidos totais, nitrito e nitrato na água do Córrego Santa Rosa estavam enquadradas na Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005, como valores observados para Classe 1 de padrões de qualidade águas doces, (que é o melhor padrão de classificação, podendo ser utilizada para consumo humano após desinfecção). Contudo, a análise microbiológica indicou a presença de coliformes totais e do bioindicador *Escherichia coli*, de forma que o Córrego Santa Rosa apresentou contaminação fecal externa durante as oito semanas de monitoramento, o que poderia ser relacionado à presença de bovinos e outros animais nas propriedades próximas. Acredita-se também que a contaminação externa possa ser a fonte de matéria orgânica para a manutenção dos criadouros de imaturos no córrego.

Apesar de o *Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats em trechos de bacias hidrográficas* (PAR), ter apresentado 66 pontos, que é configurado como trecho “natural”, foram diagnosticadas diversas alterações no córrego, entre elas a presença de contaminação por coliformes termotolerantes, erosão e desmatamento. Tais alterações, se

persistirem, podem vir a alterar a pontuação do trecho no futuro, considerando que já está muito próximo de ser classificado como um ambiente alterado (60 pontos). Sendo assim, a associação entre perda de qualidade da água e a presença criadouros pode dar direcionamento para que a comunidade se envolva e se responsabilize na intenção de reduzir os condicionantes ambientais geradores do desequilíbrio que sejam advindos das atividades desenvolvidas nas localidades, assim como, gera informações que serão úteis na formulação de políticas públicas, principalmente ambientais e de saúde.

#### 10.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE A IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Uma das espécies identificadas em Cascavel foi *S. nigrimanum*, que é associada ao desenvolvimento da doença pênfigo em humanos, também conhecida como fogo selvagem, uma doença autoimune caracterizada por extensas lesões bolhosas e erosões cutâneas, ainda sem uma definição de sua causa. Diversos fatores como predisposição genética e fatores ambientais, entre eles a picada dos borrachudos da espécie *S. nigrimanum*, sejam os desencadeantes (AOKI *et al.*, 2005; EATON *et al.*, 1998).

Entre as espécies identificadas, foi observada a presença de *S. pertinax*, que é uma das mais importantes socioeconomicamente. Apresenta intensa hematofagia e é encontrada em altas densidades em riachos antropizados, sendo a principal alvo em programas de controle de simulídeos (HENTGES; MENZEL; STRIEDER, 2019). A presença de *S. pertinax* no Ponto 3 de análise (Córrego Santa Rosa), pode estar associada com a concentração de nitrato que variou de 0,51 a 2,53 ppm, sendo encontrados resultados semelhantes em trabalho publicado por Strieder, Dos Santos e Vieira (2006).

*Simulium rubrithorax* é uma espécie zoofílica de cavalos e provavelmente de gado sendo encontrada em rochas e em grandes grupos. Suas larvas se destacam pelo tamanho, podendo alcançar cerca de 1,3 cm (MAIA-HERZOG *et al.*, 1984; SHELLEY *et al.*, 1997). A característica zoofílica desta espécie é compatível com o local onde foi coletada, Ponto 3, pois observou-se a presença de animais de produção, como bovinos, nas propriedades próximas (Figura 15).

Apesar de os simulídeos serem amplamente conhecidos por seu potencial de incômodo, possuem importantes funções ecológicas nos ecossistemas, principalmente como fonte de alimento para diversas espécies, além de existirem espécies que não são hematófagas, mas que são afetadas igualmente pelos métodos de controle, reforçando a necessidade de que se conheça

a biodiversidade das espécies existentes na localidade e que essas informações subsidiem a atuação sustentável e eficiente do controle (MALMQVIST *et al.*, 2004).

Este é o primeiro registro de identificação de espécies do gênero para o município de Cascavel – Pr, e considerando que as coletas foram realizadas em apenas três fragmentos de ambientes lóticos, e somente duas das três bacias hidrográficas, acredita-se que a diversidade de espécies na área urbana e rural da cidade possa ser maior.



**Figura 15.** Presença de bovinos as margens do Ponto 3 de coleta (Córrego Santa Rosa), onde foram identificados exemplares da espécie zoonótica *S. rubrithorax*. Fonte: A autora, 2021.

## 10.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O FOLDER

Moreira, *et al.* (2003) citam que os materiais escritos têm grande importância na educação em saúde, e que a mensagem deve ser de fácil entendimento para o público-alvo, e cita também a importância de se avaliar a resposta do público a mensagem do material, e que para isto podem ser realizadas entrevistas, aplicação de questionário ou trabalhos em grupo.

Considerando que o material está em processo de elaboração, por meio deste trabalho, e que depende de posterior aprovação e impressão, sugere-se que após a validação do material ele seja submetido a uma avaliação para verificação do seu potencial de informação para o público-alvo.

## 11. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em relação a proposta do novo formulado existem diversos pontos que podem ser aprofundados ainda em laboratório, como a resposta larvicida em tempos diferentes de exposição do formulado, a realização de avaliações das alterações histológicas que o produto provoca nas células intestinais das larvas tratadas, e finalmente a realização de testes em campo.

Em relação as questões ecológicas envolvendo os simulídeos, poderia ser avaliada a suscetibilidade dos insetos aos principais inseticidas químicos sintéticos utilizados na região, pois embora não tenha havido um programa de controle de simulídeos com produtos químicos, deve-se levar em consideração que os córregos locais são impactados por atividades agrícolas.

Considerando as condições limnológicas e suas potenciais influências no controle de simulídeos, seria importante a elaboração de um protocolo ambiental que pudesse ser respondido pelos próprios agricultores ou moradores, e que a partir dos dados levantados pudessem ser elaboradas estratégias de diagnóstico, monitoramento e controle que considerassem as particularidades de cada local, como, tipo de corpo de água, melhor cronograma de uso do produto ou de manejo mecânico, médias de vazão e suas flutuações, recomendações de quantidade de produto, entre outras.

Em relação a simuliofauna, trabalhos futuros poderiam levantar informações sobre as espécies de simulídeos presentes na região, correlacionando-as com os aspectos ecológicos em áreas impactadas e preservadas, com um protocolo que abrangesse trechos de diversos córregos nas três bacias hidrográficas das quais a região faz parte.

## 12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos trabalho indicam o potencial do formulado efervescente, com necessidade de aprimoramento.

A identificação das espécies demonstra que existe uma biodiversidade da fauna de simulídeos associada aos riachos urbanos e da área rural do município de importância de saúde pública e veterinária e as avaliações bioecológicas reforçam a relevância do diagnóstico e monitoramento ambiental na otimização de protocolos de controle de *Simulium* sp.



### 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira De Normas Técnicas. **NBR 9898** - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.pdf. Rio de Janeiro, 1987. Disponível em: <https://document.onl/documents/nbr-9898-1987-nb-1050-preservacao-e-tecnicas-de-amostragem-de-efluentes.html>. Acesso em: 20 jun. 2021.

ADLER, P. H. **World Blackflies (Díptera: Simuliidae): A Comprehensive Revision of the Taxonomic and Geographical Inventory**. The Natural History Museum, p. 1–120, 2021.

ADLER, P. H.; MCCREADIE, J. W. Black flies (Simuliidae). *In: Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier. p. 237–259, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-814043-7.00014-5. 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128140437000145>. Acesso em: 17 abr.

ANDRADE, C. F. S.; CASTELLO BRANCO Jr. A. Susceptibility of populations of *Simulium* (Chirostilbia) *pertinax* Kollar, 1832 (Culicomorpha, Simuliidae) to temephos and to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* - based formulation. **Revista de saúde pública**, v. 25, n. 5, p. 367–370, 1991. DOI: 10.1590/s0034-89101991000500007.

ANDRADE, C. F. S.; CAMPOS G., J. Efetividade de Bactivec, a base de *Bacillus Thuringiensis* H-14 no controle de *Simulium pertinax* (Díptera, Simuliidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 24, n. 2., 1995. DOI: 10.5216/rpt.v24i2.19697.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: Características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945–958, 2010. DOI: 10.5433/1679-0359.2010v31n4p945.

AOKI, V. *et al.* Historical profile of the immunopathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2005. DOI: 10.1590/s0365-05962005000300010.

ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. *et al.* A bioassay method for black flies (Díptera: Simuliidae) using larvicides. **Neotropical Entomology**. v. 34, n. 3, pp. 511-513. 2005. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000300022>>. Epub 12 Sept 2005. ISSN 1678-8052.

ATWOOD, D. W. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against larvae of the southern buffalo gnat, *Cnephia pecuarum* (Diptera: Simuliidae), and the influence of water temperature. **J Am Mosq Control Assoc.** 8(2):126-30. PMID: 1431853. 1992.

BOCALETI, A. da S; 2019. Novos formulados à base de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* para controle de Culicidae (Diptera). 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução CONAMA N° 357, de 17 De Março de 2005**. Brasília DF. 2005 Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res\\_conama\\_357\\_2005\\_classificacao\\_corpos\\_agua\\_rtfcd\\_a\\_altrd\\_res\\_393\\_2007\\_397\\_2008\\_410\\_2009\\_430\\_20](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_20)

11.pdf.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução CONAMA Nº467, de 16 de julho de 2015**. Brasília – DF. 2015.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**. vol. 49,4: 423-35. 2007 DOI:10.1016/j.toxicon.2006.11.022.

BURGIN, S. G.; HUNTER, F. F. Evidence of honeydew feeding in black flies (Díptera: Simuliidae). **Canadian Entomologist**, v. 129, n. 5, p. 859–869, 1997. DOI: 10.4039/ent129859-5.

CALLISTO, M. et al. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividades de ensino e pesquisa (MG-RJ). *Acta Limnologica Brasiliensia*, v.14, n 1, p. 91-98, 2002.

CAPALBO, D. M. F. *Bacillus thuringiensis*: fermentation process and risk assessment: a short review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 90, n. 1., pp. 135-138. 1995. Available from: <<https://DOI.org/10.1590/S0074-02761995000100026>>. Epub 26 May 2009. ISSN 1678-8060.

CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I. O. PRODUÇÃO DE INSETICIDA BIOLÓGICO COM *Bacillus thuringiensis*. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA**, 1987.

CARVALHO, J. B, *et al.* Por que os Dípteros Ocorrem na América do Sul?| Um Enfoque a Partir dos Muscídæ (Insecta, Díptera). *In: Biogeografia da América do Sul - Análise de Tempo, Espaço e Forma*. 2|2016 ed.: Roca, 2016. p. 259–276, 2016.

CASCAVEL. **10º Conferência Municipal de Saúde de Cascavel – PR**. “SUS, patrimônio do povo brasileiro”. 2011.

CASCAVEL. **11º Conferência Municipal de Saúde de Cascavel – PR**. “Saúde Pública em Cascavel: o que temos é o que queremos?”. 2013.

CASCAVEL. **12º Conferência Municipal de Saúde de Cascavel – PR**. “Saúde de qualidade é direito do povo. 2015.

CASCAVEL. **13º Conferência Municipal de Saúde de Cascavel – PR**. “Políticas de saúde – Contexto e desafios do SUS na atualidade com participação popular”. 2017.

CAVADOS, C.F.G. et al. Histopathological and ultrastructural 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, pp.493-498, 2004.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras - Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos.**, p. 326p, 2011.

CHEKE, R. A, *et al.* Elimination of the Djodji form of the blackfly *Simulium sanctipauli* sensu stricto as a result of larviciding by the WHO Onchocerciasis Control Programme in West

Africa. **Méd. Vet. Entomol.** 22(2):172-4, 2008.

CHILCOTT C. N. *et al.* Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis israelensis* Parasporal Body. In: de Barjac H., Sutherland D.J. (eds) *Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies*. Springer, Dordrecht, 1990.

CLARE, E. L.; SYMONDSON, W. O. C.; FENTON, Melville Brockett. An inordinate fondness for beetles? Variation in seasonal dietary preferences of night-roosting big brown bats (*Eptesicus fuscus*). In: **Molecular Ecology Blackwell Publishing Ltd.** p. 3633–3647, 2014. DOI: 10.1111/mec.12519.

DELLOME FILHO, J. Simúliofauna do Rio Marumbi, Morretes, Paraná, Brasil. II. Substratos naturais e artificiais dos imaturos e fauna associada (Díptera, Simuliidae). **Acta Biológica Paranaense**, v. 21, n. 0, 1992. DOI: 10.5380/abpr.v21i0.742. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/acta/article/view/742>. .

DOCILE, T., *et al.* Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the Black Fly Communities (Díptera, Simuliidae) in Tropical Streams. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 2, p. 269–281, 2021. DOI: 10.1007/s13744-020-00842-2.

DUKNIĆ, J., *et al.* Phylogeography of *Simulium* Subgenus *Wilhelmia* (Díptera: Simuliidae)-Insights from Balkan Populations. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 4, p. 967–978, 2019. DOI: 10.1093/jme/tjz034.

EATON, D. P., *et al.* Comparison of Black Fly Species (Díptera: Simuliidae) on an Amerindian Reservation with a High Prevalence of Fogo Selvagem to Neighboring Disease-Free Sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 120–131, 1998. DOI: 10.1093/jmedent/35.2.120.

GAUGLER, R.; MOLLOY, D. Feeding Inhibition in Black Fly Larvae (Díptera: Simuliidae) and Its Effects on the Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Environmental Entomology**, v. 9, n. 5, p. 704–708, 1980. DOI: 10.1093/ee/9.5.704. Disponível em: <https://academic.oup.com/ee/article-lookup/DOI/10.1093/ee/9.5.704>.

GERAIS, B. B.; RIBEIRO, T. C. Onchocerca volvulus – 1º caso autóctone da região Centro - Oeste. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Supl.**, 19:68, 1986.

HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, R. B. **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Manaus: Editora do INPA, 2014.

HENTGES, S. M.; MENZEL, T. C.; STRIEDER, M. N. Diversidade e distribuição de espécies de borrachudos (Díptera: Simuliidae) do Rio Grande do Sul, Brasil: inventário faunístico da mesoregião noroeste riograndense. In: **Biological Sciences Foudantions.**: p. 46–52. 2019. DOI: 10.22533/at.ed.7321913035. Disponível em: <https://portaleventos.ufrs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/3779>.

JÚNIOR, W. B. **Estatística Aplicada a Dados Ambientais: Influência da Qualidade d'água da Sub-Bacia do Lajeado dos Fragosos sobre a População de Borrachudos**. 2003. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/443248/estatistica-aplicada-a-dados-ambientais-influencia-da-qualidade-dagua>

da-sub-bacia-do-lajeado-dos-fragosos-sobre-a-populacao-de-borrachudos.

KERR, S. M.; GRAY, E. W.; BATZER, D. Evaluation of larval medium in the controlled current toxicity test. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 35, n. 4, p. 295–298, 2020. DOI: 10.2987/19-6837.1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31922940/>.

KRÜGER, F. *et al.* An integrative approach to detect subtle trophic niche differentiation in the sympatric trawling bat species *Myotis dasycneme* and *Myotis daubentonii*. In: **Molecular Ecology**. Blackwell Publishing Ltd, 2014. p. 3657–3671. DOI: 10.1111/mec.12512.

KURTAK, D. C. Insecticide resistance in the Onchocerciasis control programme. **Parasitology today** (Personal ed.) vol. 2,1: 20-1, 1986. DOI:10.1016/0169-4758(86)90070-0.

KURTAK, D. C. Efficiency of filter feeding of black fly larvae (Díptera: Simuliidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, n. 7, p. 1608–1623. 1978. DOI: 10.1139/z78-222. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/DOI/abs/10.1139/z78-222>.

LACEY, L. A. Bacteria. In: **Manual of Techniques in Insect Pathology**. : Elsevier. p. 79–90. 1997. DOI: 10.1016/b978-012432555-5/50007-5.

LEE, L. N; 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. DOI: 10.1128/AEM.69.7.4111-4115.2003. Disponível em: <http://aem.asm.org/>.

MAIA-HERZOG, M. *et al.* Comparação entre *Simulium Brachycladum* e *S. Rubrithorax*, suas posições no subgênero Hemicnetha e notas sobre uma espécie próxima, *S. Scutistriatum* (Díptera: Simuliidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 3, p. 341–356, 1984. DOI: 10.1590/s0074-02761984000300008.

MAIA, A. *et al.* Controle biológico de simulídeos (Díptera: Simuliidae): panorama e perspectivas. **Cadernos UniFOA**, v. 9, n. 25, p. 89–104, 2014. Disponível em: [www.unifoa.edu.br/cadernos/ojs](http://www.unifoa.edu.br/cadernos/ojs)  
[www.unifoa.edu.br/cadernos/ojs](http://www.unifoa.edu.br/cadernos/ojs)

MALLOCH, J. American black flies or buffalo gnats. **Bureau of Entomology**, n. 26, 1914.

MALMQVIST, B. *et al.* Black flies in the boreal biome, key organisms in both terrestrial and aquatic environments: A review. **Ecoscience**, v. 11, n. 2, p. 187–200, 2004. DOI: 10.1080/11956860.2004.11682824.

MAPA. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Mapa registra recorde de 95 defensivos de controle biológico em 2020**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/Mapa-registra-recorde-de-95-defensivos-biologicos-em-2020>. 2021.

MARTIN, M. M. *et al.* The digestive enzymes of larvae of the black fly *Prosimulium fuscum* (Díptera, Simuliidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 82. 1985.

MONTAGNA, C. M. Resistance to Pyrethroids and DDT in a Field-Mixed Population of Argentinean Black Flies (Diptera: Simuliidae), **Journal of Economic Entomology**, Volume 92, Issue 6, Pages 1243–1245, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/92.6.1243>

MOOR, F. C. Parasites, generalist and specialist predators and their role in limiting the population size of blackflies and in particular *Simulium chutteri* Lewis (Díptera: Simuliidae) in and along the Vaal River, South Africa. **Annals of the Cape Provincial Museums (Natural History)**, v. 18, p. 271–291, 1992.

MORAES, M. A. P. Oncocercose entre os índios Yanomámi. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 7, n. 4, p. 503–514, 1991. DOI: 10.1590/s0102-311x1991000400004. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X1991000400004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1991000400004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt).

MOREIRA, M. de F. *et al.* Comunicação escrita: contribuição para a elaboração de material educativo em saúde. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 56, n. 2, pp. 184-188, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-71672003000200015>>

PARANÁ. **Plano da Bacia Hidrográfica do Paraná 3: Características Gerais da Bacia**. Produto 1, p. 124, 2014.

PARANÁ. **Plano de Vigilância e Atenção à Saúde de Populações Expostas aos Agrotóxicos do Estado do Paraná 2017 a 2019**. 2018.

PEGORARO, R. A. Ciclo biológico de *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax* Kollar, 1832. (Díptera: Simuliidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, n. 1, p. 29–38, 1993.

PETRY, FABIANE. *et al.* Controle integrado de espécies de *Simulium* (Díptera, 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. DOI: 10.1590/s0085-56262004000100021.

PINHEIRO FILHO, F. de P. *et al.* Haemorrhagic syndrome of Altamira. 1974. Disponível em: <http://patua.iec.gov.br/handle/iec/351>.

PRISTA, L.V.N; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3 ed. p. 790. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.1967.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Simulídeos: Programa Estadual - Rio Grande do Sul, Brasil: **Guia para orientação aos municípios sobre manejo integrado, controle e gestão de insetos da família Simuliidae (Díptera, Nematocera) no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: CEVS, 2006a.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Simulídeos: Programa Estadual - Rio Grande do Sul, Brasil: **Chave para identificação de pupas da família Simuliidae (Díptera, Nematocera) para apoio às equipes regionais e municipais na determinação das espécies**. Porto Alegre: CEVS, 2006b.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Simulídeos: Programa Estadual - Rio Grande do Sul, Brasil: vigilância entomológica da

família Simuliidae no Rio Grande do Sul: **Guia prático para orientação das coletas de simuliídeos (Díptera, Nematocera, Simuliidae)**. Porto Alegre: CEVS, 2008.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Vigilância Ambiental de Simuliídeos (Díptera, Simuliidae) no Rio Grande do Sul: **Orientação para gestão nos municípios**. Porto Alegre CEVS/RS, 2018.

RIVERS-MOORE, N. A.; BANGAY, S.; PALMER, R. W. Optimisation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Vectobac®) applications for the blackfly control programme on the Orange River, South Africa. 2008. Disponível em: <http://www.wrc.org.za>.

SÁ, M. R.; MAIA-HERZOG, M. Overseas disease: comparative studies of onchocerciasis in Latin America and Africa. **História, ciências, saúde-Manguinhos**, v. 10, n. 1, p. 251–258, 2003. DOI: 10.1590/s0104-59702003000100008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-59702003000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702003000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt).

SHELLEY, A. J. Simuliidae and the transmission and control of human Onchocerciasis in Latin America. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 7, n. 3, p. 310–327, 1991. DOI: 10.1590/s0102-311x1991000300003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X1991000300003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1991000300003&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

SHELLEY, A. J. *et al.* Biosystematic studies on the Simuliidae (Díptera) of the Amazonia onchocerciasis focus. **Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology Series (United Kingdom)**, v. 66, n. 1, p. 1–121, 1997. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/76468>.

SITARZ, M.; BUCZEK, A.; BUCZEK, W. Skin Lesions and Systemic Reactions in Humans Infested by Blackflies (Díptera: Simuliidae) in Recreational Areas in Southeastern Poland. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 4, p. 788, 2021. DOI: 10.3390/jcm10040788. Disponível em: <https://DOI.org/10.3390/jcm10040788>.

STRIEDER, M. N.; DOS SANTOS, J. E.; VIEIRA, E. M. Distribution, abundance and diversity of Simuliidae (Díptera) in an impacted watershed in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p. 119–124, 2006. DOI: 10.1590/S0085-56262006000100018. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0085-56262006000100018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0085-56262006000100018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt).

SU, T.; THIEME J.L.; CHENG, M.L. Impact of Storage and Handling Temperatures On the Activities of Mosquito Larvicides. **J Am Mosq Control Assoc.** 34(3):244-248. 2018. DOI: 10.2987/18-6770.1. PMID: 31442175.

TEIXEIRA, T. Z. *et al.* Suscetibilidade de Larvas de Simuliídeos ao Larvicida Temephos em Caarapó, MS. **BioAssay**, v. 9, 2014. DOI: 10.14295/ba.v9.123. Disponível em: [www.bioassay.org.br](http://www.bioassay.org.br).

VESTERINEN, E. J. *et al.* What you need is what you eat? Prey selection by the bat *Myotis daubentonii*. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 7, p. 1581–1594, 2016. DOI: 10.1111/mec.13564.

VIVIANI, A. de B. P. *et al.* Distribuição e abundância de larvas de *Simulium* spp. em córregos do estado de São Paulo nos diferentes níveis de qualidade da água. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 7, n. 1, p. 48–56, 2012. DOI: 10.4013/nbc.2012.71.07. Disponível em: [www.ufmt.br/barra/biologia.html](http://www.ufmt.br/barra/biologia.html).

WILSON, M.D., *et al.* Field and laboratory studies on water conditions affecting the potency of VectoBac® (*Bacillus thuringiensis* serotype H-14) against larvae of the blackfly, *Simulium damnosum*. **Medical and Veterinary Entomology**, 19: 404-412, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00591.x>

WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality, fourth edition.**: 2011. Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/dwq\\_guidelines/en/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/index.html).

WHO - World Health Organization. **DDT Resistance in *Simulium Damnosum* (Diptera, Simuliidae) in West Africa.** 1988. Disponível em: [https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/pleins\\_textes\\_5/b\\_fdi\\_20-21/28700.pdf](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_5/b_fdi_20-21/28700.pdf)

WHO - World Health Organization & African Programme for Onchocerciasis Control (APOC). **Guide for decision making and implementation of vector control as alternative treatment strategies for elimination of onchocerciasis.** African Programme for Onchocerciasis Control, 2015. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/343030>.

## APÊNDICE A

### FACE EXTERNA

#### PROTEJA-SE

- ✓ Use repelente.
- ✓ Use roupas longas e claras ao fazer atividades ao ar livre.
- ✓ Não coce, esprema ou passe remédios por conta própria nas picadas. Se o desconforto for muito grande, procure auxílio médico.



Este material é um produto de mestrado, do Curso de Conservação e Manejo de Recursos Naturais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Cascavel – Divisão de Vigilância em Saúde Ambiental – Setor de Controle de Zoonoses.

## ORIENTAÇÕES SOBRE O CONTROLE DE BORRACHUDOS





## APÊNDICE B

### FACE INTERNA

Os borrachudos geralmente são encontrados na grama, mas são em águas rápidas como rios, riachos, vertedouros, entre outros, onde nascem. Nestes locais podem ser encontradas suas larvas, são pequenas, escuras e ficam presas às pedras, capins, lixo ou até cimento. É importante lembrar que os borrachudos não estão presentes em água parada ou lenta, como lagoas ou dentro de açudes.



Faça buscas em locais com água corrente, principalmente em cachoeirinhas. Verifique se nas pedras, folhço de correnteza, capins, lajes e canos, existem pequenas larvas pretas ou marrons. As larvas produzem uma substância parecida com teia de aranha, que gruda nas mãos quando tocada, sendo fácil de identificar.

#### COMO FAZER O CONTROLE DOS BORRACHUDOS?

Varrer pedras, lajes e vertedouros, com uma vassoura rígida, a cada 15 dias, evita que milhares de larvas se desenvolvam.



#### CUIDANDO DA ÁGUA

As larvas de borrachudos se alimentam da matéria orgânica que a água carrega. A presença destas substâncias na água pode aumentar, e muito, a quantidade de borrachudos. Não jogue esgoto, restos de ração ou esterco nos rios e mantenha currais e estábulos distantes dos rios.

#### OUTRAS FORMAS DE CONTROLE

- ✓ Limpe o rio! Elimine o lixo e os capins da beirada que caem para dentro da água, eles ajudam na fixação das larvas.
- ✓ Não aplique inseticidas e agrotóxicos no rio ou na grama! O uso desses produtos pode aumentar o problema, pois podem matar os animais que comem os borrachudos, o que faz com que a quantidade de mosquitos aumente posteriormente, e com o passar das aplicações os borrachudos ficam resistentes à estes produtos e não morrem.
- ✓ Replante e preserve a mata ciliar. Os animais que vivem nela, e nos rios, se alimentam de borrachudos, são eles os sapos, peixes, pássaros e morcegos insetívoros. Proteja-os!



## ANEXO A



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 73993-1	Data da Emissão: 10/02/2020 17:23:16	Data da Revalidação*: 10/02/2021
-----------------	--------------------------------------	----------------------------------

De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

#### Dados do titular

Nome: Paula costa Lis	CPF: 066.458.549-35
Título do Projeto: Solicitação de coleta e transporte de imaturos (larvas) espécies do gênero <i>Simulium</i> (borrachudos) para análise em laboratório de novo formulado de produto biológico a base de bacillus thuringiensis israelensis e posterior identificação das espécies e inclusão na coleção do INSTITUTO OSWALDO CRUZ - IOC/Fiocruz - LABORATÓRIO DE SIMULÍDEOS E ONCOCERCOSE - LSO/IOC.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE	CNPJ: 78.680.337/0003-46

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	COLETA DE SIMULÍDEOS	02/2020	12/2020

#### Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Bacia do Paraná 3	Cascavel-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0739930120200210

Página 1/3

## ANEXO B

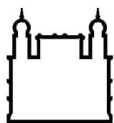
“Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats em trechos de bacias hidrográficas. Fonte: Callisto et al. (2002) modificado do protocolo da Agência de Proteção Ambiental de Ohio (EUA) (EPA,1987). Os campos correspondentes ao observado no Córrego Santa Rosa estão em negrito e sublinhados.”

Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats				
DESCRIÇÃO DO AMBIENTE				
Localização: 24°49'15.9" S / 53°37'51.2" W – Córrego Santa Rosa – Bacia do Paraná 3. Cascavel – Paraná.				
Data da Coleta: 10/07/2021 Hora da Coleta: 09:50				
Tempo (situação do dia): Ausência de precipitação / nublado				
Modo de coleta (coletor): Manual por Paula Costa Lis				
Tipo de ambiente: Córrego				
Largura média: 3,28 m				
Profundidade média: 27,2 cm				
Temperatura da água: 15,5°C				
PARÂMETROS	PONTUAÇÃO			
	4 pontos	2 pontos	0 ponto	
1. Tipo de ocupação das margens do corpo d'água (principal atividade)	<u>Vegetação natural</u>	Campo de pastagem/Agricultura/ Monocultura/ Reflorestamento	Residencial/ Comercial/ Industrial	
2. Erosão próxima e/ou nas margens do rio e assoreamento em seu leito	Ausente	<u>Moderada</u>	Acentuada	
3. Alterações antrópicas	<u>Ausente</u>	Alterações de origem doméstica (esgoto, lixo)	Alterações de origem industrial/ urbana (fábricas, siderurgias, canalização, retificação do curso do rio)	
4. Cobertura vegetal no leito	Parcial	Total	<u>Ausente</u>	
5. Odor da água	<u>Nenhum</u>	Esgoto (ovo podre)	Óleo/industrial	
6. Oleosidade da água	<u>Ausente</u>	Moderada	Abundante	
7. Transparência da água	<u>Transparente</u>	Turva/cor de chá-forte	Opaca ou colorida	
8. Odor do sedimento (fundo)	<u>Nenhum</u>	Esgoto (ovo podre)	Óleo/industrial	
9. Oleosidade do fundo	<u>Ausente</u>	Moderado	Abundante	
10. Tipo de fundo	<u>Pedras/cascalho</u>	Lama/areia	Cimento/canalizado	
	5 pontos	3 pontos	2 pontos	0 ponto

<b>11. Tipos de fundo</b>	Mais de 50% com habitats diversificados; pedaços de troncos submersos; cascalho ou outros habitats estáveis.	30 a 50% de habitats diversificados; habitats adequados para a manutenção das populações de organismos aquáticos.	<b>10 a 30% de habitats diversificados; disponibilidade de habitats insuficiente; substratos frequentemente modificados.</b>	Menos que 10% de habitats diversificados; ausência de habitats óbvia; substrato rochoso instável para fixação dos organismos.
<b>12. Extensão de Rápidos</b>	<b><u>Rápidos e corredeiras bem desenvolvidas; rápidos tão largos quanto o rio e com o comprimento igual ao dobro da largura do rio.</u></b>	Rápidos com a largura igual à do rio, mas com comprimento menor que o dobro da largura do rio.	Trechos rápidos podem estar ausentes; rápidos não tão largos quanto o rio e seu comprimento menor que o dobro da largura do rio.	Rápidos ou corredeiras inexistentes.
<b>13. Frequência de Rápidos</b>	<b><u>Rápidos relativamente frequentes; distância entre rápidos dividida pela largura do rio entre 5 e 7.</u></b>	Rápidos não frequentes; distância entre rápidos dividida pela largura do rio entre 7 e 15.	Rápidos ou corredeiras ocasionais; habitats formados pelos contornos do fundo; distância entre rápidos dividida pela largura do rio entre 15 e 25.	Geralmente com lâmina d'água "lisa" ou com rápidos rasos; pobreza de habitats; distância entre rápidos dividida pela largura do rio maior que 25.
<b>14. Tipos de Substrato</b>	Seixos abundantes (prevalecendo em nascentes).	Seixos abundantes; cascalho comum.	Fundo formado predominantemente por cascalho; alguns seixos presentes.	<b><u>Fundo pedregoso; seixos ou lamoso.</u></b>
<b>15. Deposição de Lama</b>	Entre 0 e 25% do fundo coberto por lama.	Entre 25 e 50% do fundo coberto por lama.	<b><u>Entre 50 e 75% do fundo coberto por lama.</u></b>	Mais de 75% do fundo coberto por lama.
<b>16. Depósitos Sedimentares</b>	Menos de 5% do fundo com deposição de lama; ausência de deposição nos remansos.	Alguma evidência de modificação no fundo, principalmente como aumento de cascalho, areia ou lama; 5 a 30% do fundo afetado; suave deposição nos remansos.	<b><u>Deposição moderada de cascalho novo, areia ou lama nas margens; entre 30 a 50% do fundo afetado; deposição moderada nos remansos.</u></b>	Grandes depósitos de lama, maior desenvolvimento das margens; mais de 50% do fundo modificado; remansos ausentes devido à significativa deposição de sedimentos.
<b>17. Alterações no canal do rio</b>	<b><u>Canalização (retificação) ou dragagem ausente ou mínima; rio com padrão normal.</u></b>	Alguma canalização presente, normalmente próximo à construção de pontes; evidência de modificações há mais de 20 anos.	Alguma modificação presente nas duas margens; 40 a 80% do rio modificado.	Margens modificadas; acima de 80% do rio modificado.
<b>18. Características do fluxo das águas</b>	Fluxo relativamente igual em toda a largura do rio; mínima quantidade	<b><u>Lâmina d'água acima de 75% do canal do rio; ou</u></b>	Lâmina d'água entre 25 e 75% do canal do rio, e/ou maior parte do substrato nos	Lâmina d'água escassa e presente apenas nos remansos.

	de substrato exposta.	<b><u>menos de 25% do substrato exposto.</u></b>	“rápidos” exposto.	
<b>19. Presença de mata ciliar</b>	Acima de 90% com vegetação ripária nativa, incluindo árvores, arbustos ou macrófitas; mínima evidência de desflorestamento; todas as plantas atingindo a altura “normal”.	Entre 70 e 90% com vegetação ripária nativa; desflorestamento evidente mas não afetando o desenvolvimento da vegetação; maioria das plantas atingindo a altura “normal”.	<b><u>Entre 50 e 70% com vegetação ripária nativa; desflorestamento óbvio; trechos com solo exposto ou vegetação eliminada; menos da metade das plantas atingindo a altura “normal”.</u></b>	Menos de 50% da mata ciliar nativa; desflorestamento muito acentuado.
<b>20. Estabilidade das Margens</b>	Margens estáveis; evidência de erosão mínima ou ausente; pequeno potencial para problemas futuros. Menos de 5% da margem afetada.	<b><u>Moderadamente estáveis; pequenas áreas de erosão frequentes. Entre 5 e 30% da margem com erosão.</u></b>	Moderadamente instável; entre 30 e 60% da margem com erosão. Risco elevado de erosão durante enchentes.	Instável; muitas áreas com erosão; frequentes áreas descobertas nas curvas do rio; erosão óbvia entre 60 e 100% da margem.
<b>21. Extensão de mata ciliar</b>	<b><u>Largura da vegetação ripária maior que 18 m; sem influência de atividades antrópicas (agropecuária, estradas, etc.).</u></b>	Largura da vegetação ripária entre 12 e 18 m; mínima influência antrópica.	Largura da vegetação ripária entre 6 e 12 m; influência antrópica intensa.	Largura da vegetação ripária menor que 6 m; vegetação restrita ou ausente devido à atividade antrópica.
<b>22. Presença de plantas Aquáticas</b>	Pequenas macrófitas aquáticas e/ou musgos distribuídos pelo leito.	Macrófitas aquáticas ou algas filamentosas ou musgos distribuídos no rio, substrato com perifiton.	Algas filamentosas ou macrófitas em poucas pedras ou alguns remansos, perifiton abundante e biofilme.	<b><u>Ausência de vegetação aquática no leito do rio ou grandes bancos macrófitas (p.ex. aguapé).</u></b>
<b>PONTUAÇÃO TOTAL: 66 PONTOS.</b>				

## ANEXO C



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

 Instituto Oswaldo Cruz  
 Coleção de Simulídeos

**LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO**

Nº da Solicitação 01/2021

**DADOS DO SOLICITANTE**

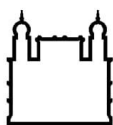
Nome	Dr. Luis Francisco Angeli Alves (Orientador de Paula Costa Lis)
Cargo	Docente
Laboratório/ Departamento	Laboratório de Biotecnologia Agrícola
Instituição	UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Documento de Identificação (tipo, número e órgão emissor)	RG 16702918 – SSP/SP
Endereço completo	Rua Universitária, 2069 - Cascavel, PR, Brasil, 85819-110
Endereço eletrônico institucional	<a href="https://www.unioeste.br/portal/">https://www.unioeste.br/portal/</a> <a href="mailto:luis.alves@unioeste.br">luis.alves@unioeste.br</a>
Telefone e FAX	04532203288

**PROCEDÊNCIA DO MATERIAL BIOLÓGICO**

- Ladrão do lago, Cascavel, PR (Coordenadas: -24.966367, -53.434223);
- Sítio do Evandro, Cascavel, PR (Coordenadas: -24.860930, -53.588403);
- Córrego Santa Rosa, Cascavel, PR (Coordenadas: -24.821072, -53.630888);  
Município/Estado/País: Cascavel, Paraná, Brasil

Obs: Os sequenciais 1 a 40 correspondem aos listados na documentação original enviada pelo solicitante (REG20210202). Os sequenciais 41 a 58 são lotes desmembrados dos originais, com a # indicando seu sequencial de origem.

# Sequencial da planilha de amostras	Nome científico	Determinador e data.	Número de exemplares/Ethol 80%	Local de Coleta
1	<i>Simulium subpallidum</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	08 exúvias	Ladrão do lago



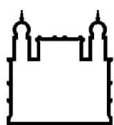
Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
 Instituto Oswaldo Cruz  
 Coleção de Simulídeos



2	<i>S. nigrimanum</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	2 pupas, 1 macho + 1 exúvia	Ladrão do lago
3	<i>S. nigrimanum</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 pupa	Ladrão do lago
4	<i>S. subpallidum</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 pupa + 6 exúvias	Ladrão do lago
5	<i>Simulium sp.</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	19 larvas imaturas	Sítio do Evandro
6	<i>Simulium sp.</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	10 larvas imaturas	Sítio do Evandro
7	<i>Simulium sp.</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	24 larvas imaturas	Sítio do Evandro
8	<i>Simulium sp.</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	11 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
9	<i>S. perflavum</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 pupa	Córrego St. Rosa
10	<i>S. perflavum</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 pupa	Córrego St. Rosa
11	<i>S. inaequale</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 fêmea	Córrego St. Rosa
12	<i>S. rubrithorax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	2 larvas maduras e 2 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
13	<i>S. rubrithorax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	2 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
14	<i>S. rubrithorax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 macho + exúvia	Córrego St. Rosa
15	<i>S. nigrimanum</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 pupa	Córrego St. Rosa
16	<i>S. rubrithorax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 pupa	Córrego St. Rosa

2/2





Ministério da Saúde

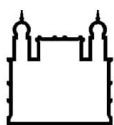
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

 Instituto Oswaldo Cruz  
 Coleção de Simulídeos


17	<i>S. pertinax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 fêmea + exúvia	Córrego St. Rosa
18	<i>S. rubrithorax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 pupa	Córrego St. Rosa
19	<i>S. rubrithorax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	2 larvas maduras	Córrego St. Rosa
20	<i>S. rubrithorax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 fêmea + exúvia	Córrego St. Rosa
21	<i>S. rubrithorax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	1 pupa	Córrego St. Rosa
22	<i>S. pertinax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	4 pupas	Córrego St. Rosa
23	<i>S. rubrithorax</i>	A.T.Aranda, 25/02/2021	2 larvas maduras	Córrego St. Rosa
24	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	5 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
25	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	1 larva madura	Córrego St. Rosa
26	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	1 fêmea + exúvia	Córrego St. Rosa
27	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	9 pupas	Córrego St. Rosa
28	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	8 pupas	Córrego St. Rosa
29	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	4 pupas, 1 macho + 1 exúvia	Córrego St. Rosa
30	<i>S. rubrithorax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	6 pupas	Córrego St. Rosa
31	<i>S. rubrithorax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	1 fêmea + exúvia	Córrego St. Rosa

3/2





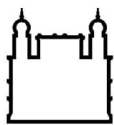
Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

 Instituto Oswaldo Cruz  
 Coleção de Simulídeos


32	<i>S. rubrithorax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	9 larvas maduras	Córrego St. Rosa
33	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	4 larvas maduras	Córrego St. Rosa
34	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	1 pupa	Córrego St. Rosa
35	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	1 macho, 1 fêmea e 2 exúvias	Córrego St. Rosa
36	<i>S. rubrithorax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	2 larvas maduras	Córrego St. Rosa
37	<i>S. rubrithorax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	3 larvas maduras	Córrego St. Rosa
38	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	9 larvas maduras	Córrego St. Rosa
39	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	10 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
40	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	2 pupas	Córrego St. Rosa
41 (#40)	<i>S. rubrithorax</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	2 pupa e 1 larva madura	Córrego St. Rosa
42 (#40)	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	04 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
43 (#40)	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	2 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
44 (#38)	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	60 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
45 (#37)	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	44 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
46 (#36)	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	11 larvas imaturas	Córrego St. Rosa

4/2



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

 Instituto Oswaldo Cruz  
 Coleção de Simulídeos


47 (#6)	<i>S. inaequale</i>	O.S.Molina, 05/03/2021	1 larva madura	Sítio do Evandro
48 (#34)	<i>S. nigrimanum</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	3 pupas	Córrego St. Rosa
49 (#7)	<i>S. pertinax</i>	O.S.Molina, 05/03/2021	1 larva madura	Sítio do Evandro
50 (#8)	<i>S. nigrimanum</i>	O.S.Molina, 05/03/2021	1 larva madura	Córrego St. Rosa
51 (#33)	<i>S. nigrimanum</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	1 larva madura	Córrego St. Rosa
52 (#33)	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	9 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
53 (#32)	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	10 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
54 (#27)	<i>S. perflavum</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	1 pupa	Córrego St. Rosa
55 (#19)	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	11 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
56 (#25)	<i>Simulium sp.</i>	O.S.Molina, 25/02/2021	11 larvas imaturas	Córrego St. Rosa
57 (#8)	<i>S. rubrithorax</i>	O.S.Molina, 05/03/2021	1 larva madura	Córrego St. Rosa
58 (#27)	<i>S. subpallidum</i>	A.T.Aranda, 05/03/2021	05 pupas	Córrego St. Rosa

Assinatura dos responsáveis pela identificação:

Assinatura do Curador:

Gostaríamos de solicitar que a Coleção de Simulídeos do IOC – CSIOC seja mencionada em eventuais publicações, bem como seja considerada possibilidade de colaboração, caso as informações taxonômicas sejam utilizadas em artigo científico.

5/2

Avenida Brasil, 4365, Caixa Postal 926, CEP 21.040-900, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. Pav. Rocha Lima, SIs 514,513 e 512.  
 Tel e Fax: + 55 21 2562-1630/1627/1628, 2560-8607  
 E-mail: [csioc@fiocruz.br](mailto:csioc@fiocruz.br)