



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

FERNANDO PEREIRA DOS SANTOS

**NOVA METODOLOGIA PARA A APLICAÇÃO DE
BIOINSETICIDAS NO CONTROLE DE BORRACHUDOS EM
RIBEIRÕES COM FLUXO DE ÁGUA IRREGULAR**

Londrina
2007

FERNANDO PEREIRA DOS SANTOS

**NOVA METODOLOGIA PARA A APLICAÇÃO DE
BIOINSETICIDAS NO CONTROLE DE BORRACHUDOS EM
RIBEIRÕES COM FLUXO DE ÁGUA IRREGULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Dr. José Lopes

Londrina
2007

FERNANDO PEREIRA DOS SANTOS

**NOVA METODOLOGIA PARA A APLICAÇÃO DE
BIOINSETICIDAS NO CONTROLE DE BORRACHUDOS EM
RIBEIRÕES COM FLUXO DE ÁGUA IRREGULAR**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Antônio Cyrino Zequi – UniFil

Profa. Dra. Gislayne Fernandes Lemes
Trindade Vilas Boas – UEL/CCB

Prof. Dr. Pedro Oliveira Janeiro Neves
UEL/CCA

Profa. Dra. Olívia Márcia Nagy Arantes
UEL/CCA

Prof. Dr. José Lopes –UEL
Orientador

Londrina, 26 de janeiro de 2007.

A Deus,
AGRADEÇO

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares em especial aos meus pais, Miguel Pereira dos Santos e Grácia de Fátima Gregório dos Santos, à minha noiva Giselle de Andrade Ishida, aos pais e familiares de minha noiva Francisco Tsugio Ishida, Roselene de Andrade Ishida, Roger Tsugio Ishida e Pâmela de Andrade Ishida, ao meu irmão Miguel Pereira dos Santos Júnior, à minha cunhada Luciana Ap. Schmidt dos Santos, minha sobrinha e afilhada Giovana Schmidt dos Santos e ao meu orientador Prof. Dr. José Lopes.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço ao meu orientador prof. Dr. José Lopes, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade.
- Ao professor e amigo Dr. João Antônio Cyrino Zequi, pelo apoio e incentivo durante todo o período necessário a pesquisa.
- Ao acadêmico do curso de Ciências Biológicas da Unifil, Murillo Bernardi Rodrigues pelo apoio nas coletas.
- Aos meus familiares que me incentivaram e me apoiaram em todo o momento.
- Aos colegas de laboratório que juntos proporcionaram momentos agradáveis.
- Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo durante o desenvolvimento do trabalho.
- Ao programa de pós graduação e aos docentes.

Os que sabem pouco convencem-se facilmente de que
a ciência pode substituir a religião.
Mas os que sabem muito (estou a pensar agora em Einstein ou Max Plank...) vão
ver que,
quanto mais avançam, mais se aproximam de concepções que correspondem a
religião.

Jean Guitton, filósofo Francês

SANTOS, Fernando Pereira dos. **Nova metodologia para a aplicação de bioinseticidas no controle de borrachudos em ribeirões com fluxo de água irregular**: 2007. 49f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Os simulídeos, conhecidos popularmente como borrachudos, desempenham um papel importante como vetores de agentes etiológicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nova metodologia para aplicação de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* em ribeirões com fluxo de água irregular, visando o controle desse díptero e identificar as espécies coletadas. O experimento foi realizado em três ribeirões – Alto ribeirão Cambé, Tamapuã e Cafezal, todos localizados na região norte do estado do Paraná, Brasil. Dentre estes, os dois primeiros apresentam as condições geomorfológicas desejadas, ou seja fluxo irregular, e o terceiro, ao contrário, apresenta fluxo regular. O produto biológico utilizado foi o Teknar® 3.000 AAU/mg, lote 13700-3381 – 04-4849/R2. A proposta da nova metodologia foi comparada com a metodologia tradicional já existente. Na metodologia tradicional os volumes de produto utilizado para controlar todo o trecho do ribeirão estudado, e a mortalidade correspondente (%), foram respectivamente: Alto ribeirão Cambé: 493 mL/ 43,33% de mortalidade; Cafezal: 150 mL/ 99,16% de mortalidade; Tamapuã: 170 mL/ 13,88%. Já na Nova metodologia, os volumes e suas respectivas taxas de mortalidades (%), foram respectivamente: Alto ribeirão Cambé: 297 mL/ 99,56%; Cafezal: não foi necessária aplicação pois sua característica geomorfológica é considerada ideal, com ausência de remansos de grandes dimensões; Tamapuã: 444 mL/ 99,36%. Foram coletadas 214.400 imaturos durante todo o experimento, sendo as espécies *Grenieriella pruinosum* Lutz, 1910 e *Chirostilbia pertinax* Kollar, 1832, as mais abundantes nesta região. Pode-se concluir que a nova metodologia apresenta eficiência e eficácia no controle de simulídeos em locais com leito irregular, sendo no entanto, necessários estudos adicionais para minimizar mão-de-obra com a possibilidade de economia de produto a ser aplicado.

Palavras-chave: Controle biológico. Simuliidae. *B. thuringiensis israelensis*. Utilização.

SANTOS, Fernando Pereira dos. **New methodology for the bioinsecticide application in the black fly control in ribeirões with flow of irregular water:** 2007. 49f. Dissertation (Master's Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

The simuliids, known popularly as borrachudos, play an important part as vectors of agents pathogenic. The objective of this work was to develop a new methodology for application of biological products to the base of *Bacillus thuringiensis israelensis* in streams with flow of irregular water, seeking the control of that dipter and to identify the collected species. The experiment was accomplished in three ribeirões – Streams Cambé, Tamapuã and Cafezal, every body located in the north area of the state of Paraná, Brazil. Dentre these, the two first they present the conditions wanted geomorfológicas, that is to say irregular flow, and the third, to the opposite, present regular flow. The used biological product was Teknar® 3.000 AAU/mg, lot 13700-3381 - 04-4849/R2. The proposal of the new methodology was already compared with the traditional methodology existent. In the traditional methodology the product volumes used to control the whole space of the studied ribeirão, and the corresponding mortality (%), they were respectively: High ribeirão Cambé: 493 mL /43,33% of mortality; Cafezal: 150 mL /99,16% of mortality; Tamapuã: 170 mL /13,88%. Already in the New methodology, the volumes and its respective rates of mortalities (%), they were respectively: High ribeirão Cambé: 297 mL /99,56%; Coffee plantation: it was not necessary application because its characteristic geomorfológica is considered ideal, with absence of immobilities of great dimensions; Tamapuã: 444 mL /99,36%. 214.400 were collected immature during whole the experiment, being the species *Grenieriella pruinosum* Lutz, 1910 and *Chirostilbia pertinax* Kollar, 1832, the most abundant in this area. It can be concluded that the new methodology presents efficiency and effectiveness in the simuliids control in places with irregular bed, being however, necessary additional studies to minimize labor with the possibility of product economy to be applied.

Keywords: Control biological. Simuliidae. *B. thuringiensis israelensis*. Use.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
3 ARTIGO: NOVA METODOLOGIA PARA APLICAÇÃO DE BIOINSETICIDAS NO CONTROLE DE BORRACHUDOS EM RIBEIRÕES COM FLUXO DE ÁGUA IRREGULAR	19
Resumo	20
Abstract	21
Introdução	22
Material e Métodos	23
Resultados e Discussão	32
Conclusão	39
Referências	39
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Os Simuliidae (Diptera), por sua atividade hematofágica, desempenham papel como vetores de agentes patogênicos, principalmente, nas zonas rurais e turísticas cujas consequências repercutem especialmente em medicina humana e veterinária, pois muitas espécies são vetores de agentes etiológicos (LANE & CROSSKEY 1993). Nas Regiões Afrotropical e Neotropical, as espécies do gênero *Simulium* Latreille, 1802 são as responsáveis pela transmissão de *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893). Embora esta filária parasite especificamente o homem, houve casos de macacos-aranha naturalmente infectados na Guatemala e de gorila, no Congo. (EEZZUDUEMHOI & WILSON 2002)

Os simulídeos apresentam ampla diversidade específica, e até o ano de 2002, haviam sido descritas 1787 espécies de simulídeos (CROSSKEY, 2002). Cada região zoogeográfica tem suas espécies-praga hematofagas e seus vetores biológicos de patógenos. As espécies hematofagas do gênero *Austrosimulium* Tonnoir, 1925 distribuem-se na Austrália e Nova Zelândia; de *Cnephia* Enderlein, 1921 ocupam a região Holoártica; de *Prosimulium* Roubaud, 1906 distribuem-se nas regiões Holoártica, no leste e no sudeste da África, enquanto *Simulium* tem distribuição cosmopolita, excetuando-o somente a Nova Zelândia (LANE & CROSSKEY 1993).

No Brasil, a oncocercose ocorre sob forma endêmica, cujas manifestações são lesões dermatológicas, nódulos subcutâneos e eventualmente cegueira (MORAES 1991). Esta endemia ocorre entre os índios Yanomami, e este fato é curioso, uma vez que estes nunca tiveram contato com os escravos africanos e nem com seus descendentes. Provavelmente, a doença tenha seguido um caminho indireto através de focos existentes na Venezuela (MORAES 1991), jisto porque originariamente, a oncocercose humana apareceu primeiramente em países tropicais da África sub-saariana e só depois apareceu na América Central e na América do Sul (LANE & CROSSKEY 1993). Em exames oftalmológicos realizados, nos índios Yanomami obteve-se como principal manifestação clínica ceratite punctata (PASSOS & COELHO 1998). Além do agente *Onchocerca volvulus*

veiculado por simulídeos, existe o *Leucocytozoon* Ziemann, 1898 (Apicomplexa, Plasmodidae), que são parasitas de aves (PETRY, 2005).

Vários métodos são utilizados para o controle de simulídeos como por exemplo os físicos, químicos e biológicos, onde este último apresenta-se como uma alternativa importante, pois trata-se de um método eficiente e com baixo impacto ambiental.

Na década de 70, do século XX, haviam preocupações com populações de simulídeos resistentes a inseticidas químicos, especificamente nos países do continente africano onde a oncocercose é um problema de saúde pública. Voltou-se, então, a atenção para o controle biológico, culminando com o isolamento do *Bacillus thuringiensis israelensis* (B.t.i.). Este bacilo produz uma característica inclusão protéica, a qual é o principal ingrediente ativo de bioinseticidas, hoje largamente utilizados no controle de Culicidae e Simuliidae. O agente larvicida de B. t. i. é altamente específico e esta especificidade, em partes, deve-se às condições necessárias à solubilização do cristal protéico.

Os simulídeos são encontrados com maior frequência perto dos cursos de água, onde se desenvolvem suas formas imaturas, mas podem ocorrer a distâncias consideráveis dos rios. São os únicos insetos hematófagos cujas formas imaturas se criam em ambientes aquáticos com correnteza. Para o controle de simulídeos no campo, é necessário conhecer a vazão do ribeirão e em seguida determinar, através de fórmula matemática, a dosagem e o carreamento, ou seja a distância que o produto será transportado ao longo do ribeirão, determinando assim os pontos de aplicação do produto. Esta é uma dificuldade operacional e o principal diferenciador desfavorável em relação aos produtos químicos. Para um químico, faz-se o receituário e entrega-se ao responsável pelas aplicações de campo. Para o controle biológico, faz-se necessário um estudo detalhado da topografia do ribeirão. Este só será preciso se o avaliador percorrer toda a extensão do ribeirão a ser tratado. Em cada ponto de aplicação deve-se calcular a vazão, e afluentes ou águas de minas que correm pelo barranco devem ser analisadas quanto à presença de larvas e considerados no mapeamento de aplicação. Barragens naturais ou artificiais, formam condições de represamento e influenciam no carreamento do produto.

Cada ribeirão tem sua característica e, portanto, os modelos que são construídos baseados em águas correntes de forma contínua, podem não ser viáveis

de aplicação para todas as situações. Cada ambiente precisa ser mapeado e ter receituário próprio. Esta influência topográfica do ribeirão no carreamento do produto e a conseqüente determinação das distâncias do ponto de aplicação tem sido pouco estudadas. A estratégia de aplicação é portanto, o principal fator que garante o sucesso do programa de controle destes insetos, já que o *B. thuringiensis israelensis* está comprovado como bioinseticida eficiente nessa situação.

Diante da necessidade do controle de simúlideos em ambientes com características topográficas que interferem no carreamento dos biolarvicidas, pretendeu-se, neste trabalho, estabelecer uma nova metodologia de aplicação de acordo com a topografia do ribeirão, constatar a eficiência do produto e realizar a identificação das espécies.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os simúlídeos, também conhecidos popularmente como borrachudos, são pequenos dípteros de cor escura, pernas curtas, asas largas e aspecto corcunda (BORROR & DELONG, 1969) cujo comprimento corporal varia de 1,2 a 6,0 mm (CUNHA, 2001). Ambos os sexos alimentam-se de substâncias açucaradas (néctar), mas somente as fêmeas apresentam hábito hematófago fazendo com que as mesmas, ocasionalmente, desloquem-se vários quilômetros em busca de sangue (PALMER, *et al.*, 1996). O sangue é utilizado para a obtenção de algumas proteínas importantes na maturação dos ovos, porém, podem produzir seus ovos sem alimentação sanguínea prévia através da autogenia (CUNHA, 2001).

Atualmente são conhecidas 1.787 espécies de simúlídeos no mundo, sendo encontrados no Brasil somente moscas pertencentes à duas tribos, Prosimuliini e Simuliini, onde 90% das espécies são do gênero *Simulium*, (CUNHA, 2001).

Estes insetos são holometábolos, sendo que as larvas ocorrem em águas correntes, presas a pedras e outros objetos por um disco de fixação situado na extremidade posterior do corpo. As pupas são envolvidas por casulo cônico, presos a objetos na água (BORROR & DELONG, 1969). O número de instares larvais variam de 4 a 9, dependendo da espécie, e este período dura cerca de 18 dias (DUDAS, 1984). As larvas são filtradoras e se alimentam de pequenos detritos orgânicos (CUNHA, 2001).

Algumas espécies de simúlídeos estão envolvidas na transmissão de oncocercose humana principalmente na região norte do Brasil (GERAIS & RIBEIRO, 1986; MAIA-HERZOG *et al.*, 1999; apud CAVADOS *et al.*, 2001). No sudeste do Brasil a principal importância volta-se para as questões sócioeconômicas, podendo afetar drasticamente o turismo (CAVADOS *et al.*, 2001) e também a produção animal, causando perda de peso e produção de leite em bovinos, podendo também causar a morte de aves (CUNHA, 2001). Os borrachudos adultos são extremamente agressivos, tendo sido registradas 565 picadas por hora em um índio amazônico (CUNHA, 2001).

No Parque Nacional da Amazônia brasileira, várias espécies antropofílicas de *Simulium* provocam reações alérgicas em pessoas recémchegadas

e não ambientadas. Entre as espécies desta região destaca-se *Simulium sanguineum* Knab, 1915 e *Simulium guianense* Wise, 1911, ambas ativas durante o ano todo (LACEY & LACEY, 1981). No sul, existem várias espécies hematófagas. A antropofílica *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832, amplamente dispersa no litoral norte de São Paulo e nos três estados da região Sul, é considerada a mais incômoda (RUAS NETO *et al.*, 1984; RUAS NETO *et al.*, 1985; RUAS NETO & MATIAS, 1985; ARAÚJO-COUTINHO *et al.*, 1988; CASTELLO BRANCO JR., 1994). Na região sudeste do Brasil, em Itatiba, São Paulo, *Simulium rubrithorax* Lutz, 1910 tem causado problemas em rebanhos (ANDRADE, 1989).

De acordo com LOZOVEI *et al.* (2004), em um trabalho de levantamento de simúlideos realizado na cidade de Almirante Tamandaré, região metropolitana de Curitiba, situada a cerca de 17 Km da capital do estado do Paraná, as espécies encontradas com maior frequência foram: *Simulium (Inaequalium) inaequale* Peterson & Shannon, 1927 (55,24%), *Simulium (Ectemnaspis) perflavum* Rouband, 1906 (16,81%), *Simulium (Chirostilbia) pertinax* (13,93%), *Simulium (Thyrsopelma) orbitale* Lutz, 1910 (8,03%), *Simulium (Inaequalium) subnigrum* Lutz, 1910 (4,92%), *Simulium (Chirostilbia) distinctum* Lutz, 1910 (1,03%) e *Simulium (Psaroniocompsa) incrustatum* Lutz, 1910 (0,04%).

O controle de borrachudos já vem sendo feito em vários países há muito tempo. Os tipos básicos de controle são divididos em três: físico, químico e biológico. Dentre os físicos, DUDAS (1984) preconiza a limpeza dos cursos de água, retirando-se materiais que possam servir de substratos para as larvas, como pedras, madeiras etc. Todavia esta técnica só é possível de aplicação em locais apropriados, geralmente pequenos cursos d'água, e há alterações ambientais. Outra técnica indicada é o interrompimento no fluxo de água em alguns trechos com larvas, fazendo com que as formas imaturas fiquem exposta ao sol e ressequem. Esta técnica foi empregada com sucesso na União Soviética e com pouco sucesso na África, devido a um aumento no fluxo de água. O problema desta técnica é que a mesma afeta diversas espécies não alvos (PALMER *et al.*, 1996). No Brasil, os programas de controle de simúlideos tiveram início no Rio Grande do Sul e depois no litoral norte de São Paulo (REGIS *et al.*, 2000).

Com relação ao controle químico, a elaboração de inseticidas químicos de efeito residual prolongado durante o período de 1940 a 1950, proporcionou um método único de controle anti-vetorial com uma relação custo

benefício extremamente elevada (O.M.S., 1983 apud GEBARA, 1987). O produtos como Carbaril, organofosforados como Fenitrothion e Temephos, e o organoclorado Methoxychlor, são os principais produtos químicos utilizados no controle de borrachudos. Estes produtos provocam efeitos drásticos sobre a fauna não alvo, podendo causar desequilíbrio ambiental, por não serem seletivos. No Brasil o mais utilizado é o Temephos (Abate), que se mostra eficiente no controle das larvas, mas afeta espécies não alvo (CUNHA, 2001). Alguns autores como REGIS *et al.* (2000), MARDINI *et al.* (2000), CAMPOS & ANDRADE (2002) e ARAÚJO-COUTINHO *et al.* (2003) relataram que devido ao grande uso de Temephós durante algumas décadas, várias espécies de simúlideos mostram-se resistentes a este larvicida, fazendo com que a sua eficiência no controle de larvas diminuisse.

Em consequência da poluição dos ecossistemas e a resistência que os insetos apresentam a estes produtos, pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de encontrar novos inseticidas biológicos a partir de bactérias, fungos, vírus e outros organismos alternativos ao controle químico (CONSOLI *et al.*, 1997; REGIS *et al.*, 2001; ARANTES *et al.*, 2002; TAUIL, 2002). Esta é uma alternativa promissora no controle de borrachudos, devido a alta eficiência e ao baixo impacto ambiental provocado pelo bioinseticida.

Para a utilização do controle biológico é preciso conhecer os inimigos naturais, preservá-los e eventualmente criá-los e introduzi-los no criadouro dos simúlideos. Uma das técnicas consiste no controle através de parasitas que infectam as larvas, como alguns protozoários e nematóides. Outra seria a introdução de predadores, tanto de adultos como de imaturos e ovos. Os principais predadores de adultos consistem em pássaros insetívoros e rãs (CUNHA, 2001), enquanto que as larvas são principalmente predadas por insetos das seguintes ordens: Plecoptera, Odonata, Trichoptera, Neuroptera, Ephemeroptera e espécies pertencentes à cerca de doze famílias de Diptera como Chironomidae, Asilidae e Empididae (WERNER, PONT, 2003). Embora esses predadores possam alimentar-se de larvas de borrachudos, a sua utilização isolada para o controle, pode não ser suficiente já que as exigências de hábitat entre as espécies de presa e de predador podem não ser as mesmas. Então a predação acaba sendo mínima ou ocasional.

Dentre os métodos de controle biológico, destaca-se o uso de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus*, no qual as espécies são geralmente saprófagas, frequentemente associadas com folhas, solos ou insetos

(LACEY & LACEY, 1981; BECKER *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1998; 1999; 2000; RODRIGUES *et al.*, 1998; NAYAR *et al.*, 1999; POLLON, 2003). Essas bactérias apresentam alto grau de especificidade ao inseto-alvo e segurança ambiental, o que as torna particularmente adequadas e ecologicamente corretas para uso no controle de insetos pragas (RABINOVITCH *et al.*, 2000; CAPALBO *et al.*, 2005).

O *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 foi isolado de larvas mortas de *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (bicho-da-seda), em 1901, pelo bacteriologista japonês Ishiwata. É uma bactéria Gram-positiva, catalase positiva, aeróbia facultativa e quimioheterotrófica, cuja temperatura ideal de crescimento é 30°C. Quando em condições desfavoráveis, esporula, liberando, após a lise da célula, um esporo e um cristal protéico (formado de proteínas Cry), de localização justaposta ao esporo. O cristal é chamado de corpo para-esporal e tem ação entomopatogênica a larvas de insetos das ordens Diptera, Coleoptera, Lepidoptera e, ainda, a nematóides e ácaros. As proteínas do corpo para-esporal são codificadas por diferentes genes e, numa mesma célula, se pode encontrar um ou vários tipos de polipeptídeo (CRICKMORE *et al.*, 1998; RABINOVITCH *et al.*, 1999; REGIS *et al.*, 2001; CAPALBO *et al.*, 2005).

As proteínas Cry são produzidas na forma de protoxina que, quando ingeridas, são solubilizadas pelo pH alcalino do trato intestinal do inseto-alvo e clivadas pelas proteases intestinais em peptídeos de menor tamanho; estes ligam-se a receptores específicos, encontrados no epitélio intestinal, e iniciam um processo de destruição tecidual do aparelho digestivo do inseto, provocando a abertura de poros e a consequente perda do equilíbrio osmótico, além de colaborar para a paralisação muscular, levando inseto à morte.

Em 1976 foi identificada uma nova linhagem, o *B. thuringiensis*, o sorovar *israelensis* (B.t.i.) (GOLDBERG e MARGALIT, 1977), classificado como serotipo H-14, de alta atividade larvicida para vários gêneros de Culicídeos e Simulídeos. Nele podem ser encontrados até cinco diferentes proteínas, todas com atividade contra larvas de mosquitos. A alta atividade larvicida e a alta especificidade fizeram com que o B.t.i. viesse a ser utilizado como biolarvicida já em 1978 (MARGALIT, *et al.*, 1994; RABINOVITCH *et al.*, 1998; SCHNEPF *et al.*, 1998; ARANTES *et al.*, 2002; POLANCZYK *et al.*, 2003). A ingestão não-seletiva de partículas, por partes dos insetos-alvos, facilita a utilização de larvicidas por ação digestiva (FORATTINI, 1962).

Em relação à persistência ambiental do B.t.i., nada se constatou até o momento, não ocorrendo multiplicação e acumulação na cadeia alimentar. Os cristais, até provável degradação pelo meio, são pró toxinas inertes, ativando-se apenas nos hospedeiros específicos (RABINOVITCH, *et al.*, 2000). A segurança para mamíferos foi comprovada através de administração de doses massivas de células e cristais por várias vias (RUAS NETO & OLIVEIRA, 1985). COUTCH (1995) *apud* VILARINHOS *et al.* (1998) salienta que, durante 25 anos de testes com lotes de B.t.i. em camundongos, nunca foi observada mortalidade.

A utilização de larvicidas a base de B.t.i. para o controle de simúlideos, vem sendo um dos métodos mais difundidos atualmente (CAVADOS *et al.*, 2001). O B.t.i. tem sido promissor tanto no combate de mosquitos, como *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeu, 1762, transmissor da dengue (FILLINGER *et al.*, 2003) como no combate de borrachudos.

Embora os produtos a base de B.t. sejam utilizados em vários países, o seu mercado, em nível mundial, ainda é pequeno e não ameaça os inseticidas convencionais não-bacterianos (RABINOVITCH *et al.*, 1998). Hoje, cerca de 98% do controle de insetos no mundo é feito utilizando-se produtos químicos, e apenas cerca de 2% é feito com controle biológico, sendo que, destes 2%, em torno de 80% dos produtos utilizados são à base de B.t., o que representa aproximadamente 3.000 toneladas de produtos com esse princípio ativo lançados ao ambiente (AZEVEDO, 1998). Segundo De Nardo e Capalbo (1998), o maior mercado para produtos à base de B.t. para o controle de insetos é o norteamericano, no qual sua comercialização supera a dos pesticidas convencionais.

Segundo MARGALIT *et al.* (1994), a segurança ambiental em relação ao B.t.i. tem sido confirmada em numerosos testes. Em todos os continentes, mais de 200 milhões de toneladas de bioinseticidas com esse princípio ativo vêm sendo usados por ano (WIRTH & GEORGHIOU, 1997 *apud* RABINOVITCH *et al.*, 2000), e, de acordo com FORATTINI (2002), ao longo de mais de 20 anos de utilização do B.t.i. não foi registrada resistência em populações naturais sob seu controle.

No controle de simúlideos, MOLLOY (1992) encontrou uma mortalidade entre 91 e 100% no estado de New York, E.U.A. O B.t.i. mostrou-se eficiente também em grandes rios como o Oranger river, localizado na África, controlando 97% da população de larvas (PALMER *et al.*, 1996). A nível mundial o

principal programa de controle de simulídeos com utilização de B.t.i. fez parte do programa de controle da oncocercose, realizado em onze países da África Ocidental, abrangendo 1.300.000 Km onde o nematóide é endêmico e de alta incidência (VILARINHOS *et al.*, 1998). No Brasil, ARAÚJO-COUTINHO *et al.* (2003) encontraram uma alta eficiência do larvicida em *S. pertinax*, em Paraty, RJ. .

Diversos estudos tem sido realizados para testar a suscetibilidade de diferentes espécies de simulídeos a produtos à base de *B. thuringiensis*. Assim estudo de suscetibilidade de larvas ao B.t.i. MOLLOY *et al.* (1981) verificaram que *Simulium verecundum* Stone and Jamnback, 1955 foi significativamente mais suscetível que *Simulium vittatum*. RUAS-NETO (1984), em testes de campo nas concentrações de 12 ppm/min. de Vectobac® e 15ppm/min. de Teknar® obteve-se resultados semelhantes de mortalidade entre os biolarvicidas utilizados. ANDRADE (1989), obteve resultados semelhantes de mortalidade entre os larvicidas Teknar® e Vectobac® com aplicação a campo AWRENCE *et al.* (1984) e ARAÚJO-COUTINHO & LACEY (1990) em condições naturais não encontraram diferenças significativas entre os biolarvicidas Vectobac® e Teknar®. ANDRADE & CASTELO BRANCO JR (1991) em experimento com Vectobac® perceberam que larvas de *S. pertinax* foram altamente suscetíveis.

Em um experimento realizado com bioensaios de laboratório, PETRY (2005), obteve diferenças de mortalidade utilizando tratamentos com Teknar®, Aquabac® e Vectobac®. Somente o tratamento com Teknar®, difere-se estatisticamente dos demais, não tendo sido observado diferença significativa entre Aquabac® e Vectobac®. As larvas utilizadas neste trabalho foram das espécies *S. perflavum*, *S. inaequale*, *S. pertinax*, *S. subnigrum* e *S. orbitale*, não constatando nenhuma diferença significativa de suscetibilidade entre elas. Este resultado difere do que ocorreu no trabalho de LACEY & LACEY (1981) que ao investigarem a susceptibilidade de seis espécies de *Simulium*, coletadas no campo, concluíram que, dentre outras, *S. vittatum* Zetterstedt, 1838 e *S. argus* foram consideravelmente mais sensíveis aos efeitos do B.t.i.

O B.t.i. vem sendo utilizado no Brasil há algum tempo como alternativa para substituição do Temephós, que vem perdendo eficiência. Começou em 1982 no Rio Grande do Sul (MARDINI *et al.*, 2000) depois em São Paulo, em 1986 (REGIS *et al.*, 2000) e hoje é utilizado de forma pontual em vários estados.

Em alguns trabalhos de controle com B.t.i. sob larvas de Culicídeos têm se estudado a influência dos fatores bióticos e abióticos sob a eficiência destes formulados (AWRENCE *et al.*,1984; MOLLOY, 1990). Tais fatores podem ser divididos em três principais categorias: ambiental, idade do inseto e formulação (AWRENCE *et al.*,1984). A formulação exerce uma influência considerável sobre a eficácia do *Bacillus thuringiensis israelensis*, por pelo menos três mecanismos: o efeito do tamanho da partícula sobre a alimentação por filtração do simúlideo, características físicas da partícula e efeito de diluentes sobre a potência da toxina (AWRENCE *et al.*,1984). Dentre as influências ambientais pode-se destacar a temperatura, como observado por NAYAR *et al.* (1999), onde registraram melhores índices de mortalidade nas temperaturas em torno de 32-35 °C, quando comparados com temperaturas de 15-20 °C. No mesmo trabalho observou-se uma maior susceptibilidade ao B.t.i. sobre larvas de instares iniciais de culicídeos em relação ao finais.

Por outro lado não se encontra com facilidade informações sobre a influência ou importância da topografia e características do ribeirão sobre a eficiência e eficácia do controle usando-se biolarvicidas.

3 ARTIGO**NOVA METODOLOGIA PARA APLICAÇÃO DE BIOINSETICIDAS NO
CONTROLE DE BORRACHUDOS EM RIBEIRÕES COM FLUXO DE
ÁGUA IRREGULAR**

Nova metodologia para a aplicação de bioinseticidas no controle de borrachudos em ribeirões com fluxo de água irregular

RESUMO

Os simulídeos, conhecidos popularmente como borrachudos, desempenham um papel importante como vetores de agentes etiológicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nova metodologia para aplicação de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* em ribeirões com fluxo de água irregular, visando o controle desse díptero e identificar as espécies coletadas. O experimento foi realizado em três ribeirões – Alto ribeirão Cambé, Tamapuã e Cafezal, todos localizados na região norte do estado do Paraná, Brasil. Dentre estes, os dois primeiros apresentam as condições geomorfológicas desejadas, ou seja fluxo irregular, e o terceiro, ao contrário, apresenta fluxo regular. O produto biológico utilizado foi o Teknar® 3.000 AAU/mg, lote 13700-3381 – 04-4849/R2. A proposta da nova metodologia foi comparada com a metodologia tradicional já existente. Na metodologia tradicional os volumes de produto utilizado para controlar todo o trecho do ribeirão estudado, e a mortalidade correspondente (%), foram respectivamente: Alto ribeirão Cambé: 493 mL/ 43,33% de mortalidade; Cafezal: 150 mL/ 99,16% de mortalidade; Tamapuã: 170 mL/ 13,88%. Já na Nova metodologia, os volumes e suas respectivas taxas de mortalidades (%), foram respectivamente: Alto ribeirão Cambé: 297 mL/ 99,56%; Cafezal: não foi necessário aplicação pois sua característica geomorfológica é considerada ideal, com ausência de remansos de grandes dimensões; Tamapuã: 444 mL/ 99,36%. Foram coletadas 214.400 imaturos durante todo o experimento, sendo as espécies *Grenieriella pruinosum* Lutz, 1910 e *Chirostilbia pertinax* Kollar, 1832, as mais abundantes nesta região. Pode-se concluir que a nova metodologia apresenta eficiência e eficácia no controle de simulídeos em locais com leito irregular, sendo no entanto, necessários estudos adicionais para minimizar mão-de-obra com a possibilidade de economia de produto a ser aplicado.

Palavras-chaves: Controle biológico, Simuliidae, *B. thuringiensis israelensis*, Utilização.

New methodology for the bioinsecticide application in the black fly control in ribeirões with flow of irregular water

ABSTRACT

The simuliids, known popularly as borrachudos, play an important part as vectors of agents pathogenic. The objective of this work was to develop a new methodology for application of biological products to the base of *Bacillus thuringiensis israelensis* in streams with flow of irregular water, seeking the control of that dipter and to identify the collected species. The experiment was accomplished in three ribeirões - Streams Cambé, Tamapuã and Cafezal, everybody located in the north area of the state of Paraná, Brazil. Between these, the two first they present the conditions wanted geomorphological, that is to say irregular flow, and the third, to the opposite, present regular flow. The used biological product was Teknar® 3.000 AAU/mg, lot 13700-3381 - 04-4849/R2. The proposal of the new methodology was already compared with the traditional methodology existent. In the traditional methodology the product volumes used to control the whole space of the studied ribeirão, and the corresponding mortality (%), they were respectively: High ribeirão Cambé: 493 mL /43,33% of mortality; Cafezal: 150 mL /99,16% of mortality; Tamapuã: 170 mL /13,88%. Already in the New methodology, the volumes and its respective rates of mortalities (%), they were respectively: High ribeirão Cambé: 297 mL /99,56%; Coffee plantation: it was not necessary application because its characteristic geomorphological is considered ideal, with absence of immobilities of great dimensions; Tamapuã: 444 mL /99,36%. 214.400 were collected immature during whole the experiment, being the species *Gnemiella pruinosum* Lutz, 1910 and *Chirostilbia pertinax* Kollar, 1832, the most abundant in this area. It can be concluded that the new methodology presents efficiency and effectiveness in the simuliids control in places with irregular bed, being however, necessary additional studies to minimize labor with the possibility of product economy to be applied.

Word-keys: Control biological, Simuliidae, *B. thuringiensis israelensis*, Use.

INTRODUÇÃO

A família Simuliidae, tem como representantes os borrachudos, que são pequenos dípteros de cor escura, pernas curtas, asas largas e aspecto corcunda (BORROR & DELONG, 1969) e o comprimento corporal varia de 1,2mm a 6,0mm (CUNHA, 2001).

Estes insetos são holometábolos, sendo que as larvas ficam presas em rochas, vegetação e outros objetos próximos a cursos d'água lóticos. Após o estágio de larva, este imaturo passa para o estágio de pupa, onde esta é envolvida por casulo cônico, presos a objetos na água (BORROR & DELONG, 1969). O número de instares larvais variam de 4 a 9 dependendo da espécie.

Espécies de simulídeos estão envolvidas na transmissão de oncocercose humana principalmente na região norte do Brasil (MAIA-HERZOG *et al.*, 1999; CAVADOS *et al.*, 2001). No sudeste do Brasil a principal importância volta-se para as questões sócio-econômica, podendo afetar drasticamente o turismo e a qualidade de vida da população local (CAVADOS *et al.*, 2001) e também a produção animal, causando perda de peso, produção de leite, e podendo causar a morte de aves (CUNHA, 2001).

Para o controle desse vetor, o método mais adequado é o biológico, utilizando-se bactérias do gênero *Bacillus*. *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* (B.t.i.), tem sido utilizada como princípio ativo de bioinseticida por sua patogenicidade e especificidade sobre larvas de borrachudos (LACEY & LACEY, 1981; BECKER *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1998; 1999; 2000; RODRIGUES *et al.*, 1998; NAYAR *et al.*, 1999; CHUNG *et al.*, 2001; FILINGER *et al.*, 2003; POLLOM, 2003).

Cada ribeirão tem sua característica geomorfológica, portanto os modelos que são construídos baseados em águas correntes de forma contínua, podem não ser viáveis para aplicação de *B. thuringiensis israelensis* em todas as situações. A estratégia de aplicação corresponde ao principal fator que garante o sucesso do programa, já que o B.T.i. está comprovado como bioinseticida eficiente.

Este trabalho teve como objetivo elaborar uma nova metodologia para aplicação de bioinseticida a base de *B. thuringiensis israelensis* no controle de simulídeos, em ribeirões com características geomorfológicas acentuadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em três ribeirões, Cambé, Cafezal e Tamapuã, o primeiro localizado no município de Londrina, PR, Brasil ($23^{\circ}17'15''\text{S}$; $51^{\circ}13'58''\text{W}$). A bacia deste ribeirão encontra-se quase toda urbanizada e os problemas ambientais associados com a urbanização são especialmente críticos nos trechos do seu alto curso. As margens das nascentes e os cursos dos pequenos afluentes encontra-se degradadas. De modo geral não há cobertura vegetal remanescente de floresta nativa na região. Por estar na área urbana, a ocupação que consiste em tipos diversos de construção e impermeabilização do solo, mostra-se intensa na bacia ali existente. Vários locais apresentam moradias irregulares que, em geral, estão associadas com a criação de animais. Este córrego é influenciado por material particulado proveniente da auto estrada e de esgotos clandestinos industriais e domésticos.

A área estudada do ribeirão Cafezal está localizada no município de Rolândia-PR ($23^{\circ}22'30''\text{S}$; $51^{\circ}23'30''\text{W}$), e a bacia deste é caracterizada por possuir uma insuficiente cobertura vegetal, com mata ciliar reduzida e em algumas regiões com gramíneas atingindo suas margens. Algumas propriedades rurais utilizam suas águas para a instalação de rodas d'águas, pois é um ribeirão com considerável vazão. Este, recebem águas oriundas da auto estrada, aumentando consideravelmente seu volume conforme a intensidade das chuvas.

O ribeirão Tamapuã está localizado no município de Arapongas-Pr ($23^{\circ}27'45''\text{S}$; $51^{\circ}34'25''\text{W}$) ele é caracterizado por apresentar uma topografia irregular, com a presença de piscinas naturais de dimensões consideráveis. Neste ribeirão, por estar localizado no perímetro urbano, encontra-se sob os efeitos antrópicos, apresentando ao longo de seu leito entulhos e lixo doméstico. Este também é utilizado para a irrigação de lavouras e hortas. Em suas margens apresenta mata ciliar reduzida.

Foram realizados cálculos de vazão dos córregos, tomando-se como base uma extensão de 10m. Neste trecho a largura foi determinada de metro a metro, perfazendo dez tomadas de medidas. Em cada uma destas seções a profundidade foi medida tendo como base a cada 20 cm e da margem. Este procedimento forneceu em torno de 50 medidas de profundidade. Tomadas as medidas, calculou-se a velocidade da água, utilizando-se uma bola de tênis de mesa, previamente

preenchida com 25mL de água. A bola foi solta no marco zero e o tempo que ela gastou para alcançar o ponto final (10 m) foi cronometrado utilizando um cronômetro da marca Technos® - Cronus. O número de repetições dependeu da largura do ribeirão, já que, a bola foi solta de 20 em 20 cm em relação à margem do curso d'água. De posse destas medidas, calculou-se a vazão pela seguinte fórmula:

$$Q = \frac{Lm \times Pm \times C}{Tm} \times 0,85$$

Tm

Onde: Q = vazão; C = comprimento; Lm = largura média; Pm = profundidade média; Tm = tempo médio; 0,85 é uma constante que serve para corrigir o atrito da água com o fundo.

De posse do resultado, foi consultada a tabela abaixo produzida pela Divisão de Zoonoses da Secretaria de Saúde e Meio Ambiente do estado do Rio Grande do Sul (Tab. 1) para conhecer a concentração do produto a ser aplicado e seu carreamento, isto é, a distância que o produto deverá atingir, ainda com potencial de controle. Para saber a quantidade, em mL, de produto a ser aplicado, foi multiplicado o valor da vazão pela concentração correspondente na tabela.

Tabela 1: Cálculo de dosagem de aplicação e carreamento de produtos biológicos, através dos valores de vazão.

Q (m ³ /min)	Concentração (ppm)	Carreamento (m)
0,01 a 0,16	Não aplicar	-
0,17 a 0,312	50	50
0,313 a 0,625	50	60
0,626 a 1,25	45	75
1,26 a 2,5	40	125
2,51 a 5,0	30	250
5,01 a 10,0	20	500
10,01 a 15,0	15	750
Acima de 15,00	12	1000

Fonte: Divisão de Zoonoses e Vetores da Secretaria da Saúde e Meio Ambiente do Rio Grande do Sul.

No alto Ribeirão Cambé, para cada trecho a ser aplicado, foram colocados três pontos de coleta de imaturos de borrachudos; ponto controle (testemunha – ponto isento da influência do larvicida) localizado 12 metros acima do ponto inicial de aplicação; ponto de aplicação (dois metros a baixo da liberação do produto) e um ponto no final do valor do carreamento. Em todos os pontos, inclusive o ponto controle, instalou-se uma corda de nylon no sentido transversal de margem a

margem, e nesta foram amarradas seis fitas (fitilhos) de polietileno e polipropileno de cor verdes, cor escolhida de acordo com testes preliminares de preferência pelos imaturos, com 2,1cm de largura e 100 cm de comprimento, que serviram como local de fixação para as formas imaturas de simulídeos. As fitas, após instaladas ficaram 15 dias expostas para colonização por borrachudos. Transcorrido este tempo, iniciou-se o experimento.

Para a coleta das amostras foram retiradas três fitas alternadas momentos antes da aplicação do biolarvicida em cada situação, e as três fitas restantes no dia seguinte, 24 horas após a aplicação do produto.

As aplicações foram feitas quinzenalmente, utilizando-se um regador. No qual foi colocado o produto na quantidade determinada pelos cálculos acima e em seguida completado com água até que se completasse cinco litros, volume estabelecido pela metodologia tradicional. Esta solução foi agitada e depois aplicada no leito do córrego por toda a largura do ponto estipulado. O tempo usado para aplicação foi de um minuto a um minuto e meio. Tempo descrito por LACEY e UNDEEN (1984) como o mais eficiente.

O produto utilizado para controle em todos os três ribeirões foi o biolarvicida Teknar® 3.000 AAU/mg, lote 13700-3381 – 04-4849/R2, onde seu princípio ativo é a bactéria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

No ribeirão Cambé o trabalho foi dividido em duas etapas. Em um primeiro momento, no período de Janeiro de 2006 a Março de 2006, a aplicação do produto foi realizada seguindo a metodologia já existente, segundo a Divisão de Zoonoses e Vetores da Secretaria da Saúde e Meio Ambiente do Rio Grande do Sul, de acordo com os valores de carregamento indicados na Tabela 1, ou seja, a aplicação, foi realizada independente das irregularidades do ribeirão (Fig. 1). Neste foram aplicados 239,00mL (47.800 ppm – diluição do produto no regador) no ponto 1 e 254,00mL (50.800 ppm – diluição no regador) no ponto 2, trecho 1 e trecho 2, respectivamente, valores obtidos pela determinação da vazão e calculada com base no valor estipulado na tabela.

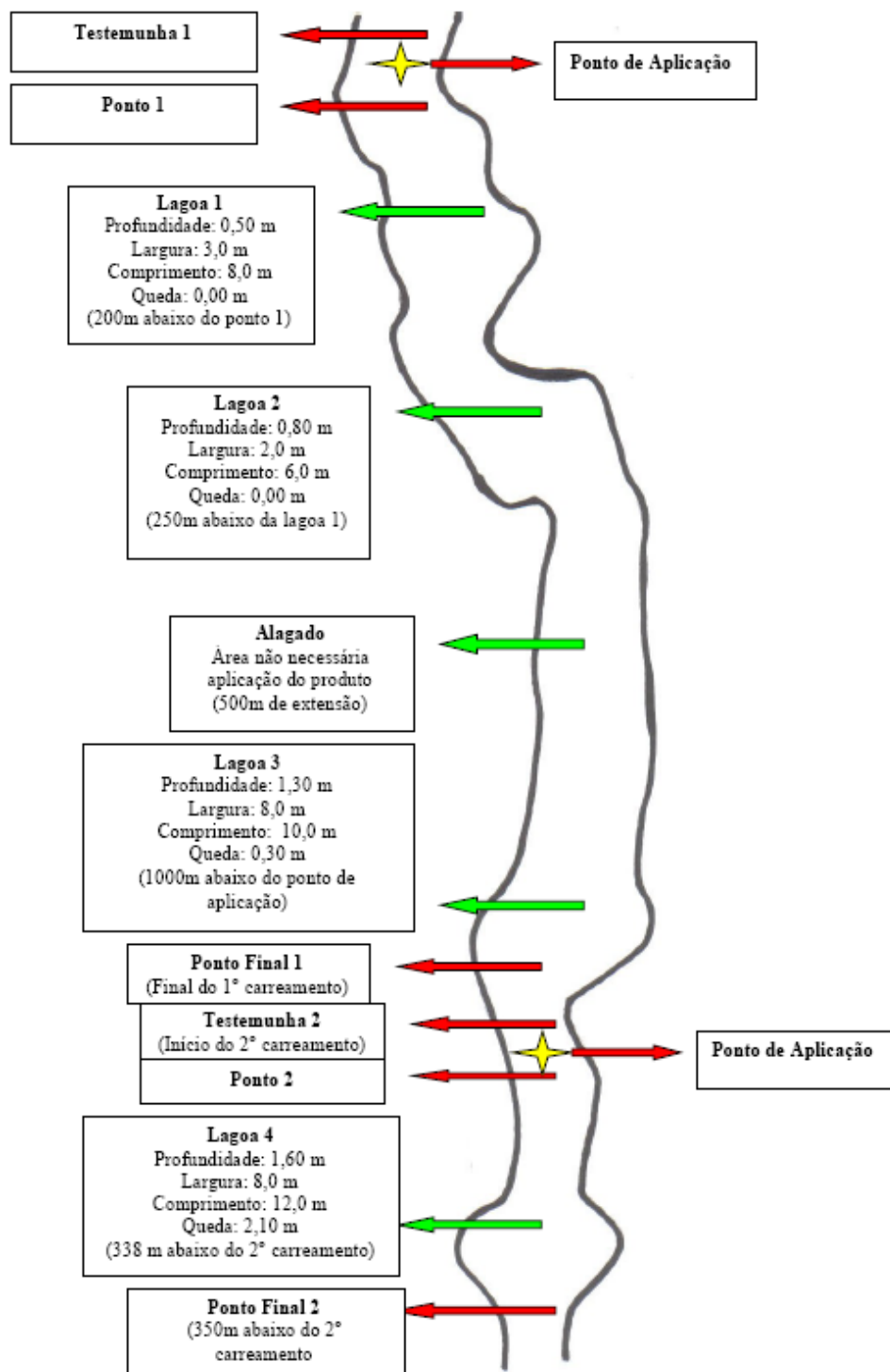


Fig. 1: Geomorfologia do ribeirão Cambé, indicando as variações no seu leito e os pontos de aplicação do *B. thuringiensis israelensis* na metodologia tradicional

Na segunda fase do experimento (abril e maio de 2006) foi estabelecido e testada uma nova proposta de metodologia para aplicação, onde foram levadas em consideração as quedas d'águas com a formação de piscinas naturais, o que diminui significativamente a velocidade da água e a profundidade do leito do curso d'água (Fig. 2). Esta nova proposta de metodologia, consiste em divisão de dose baseando-se na dose obtida pela metodologia tradicional.

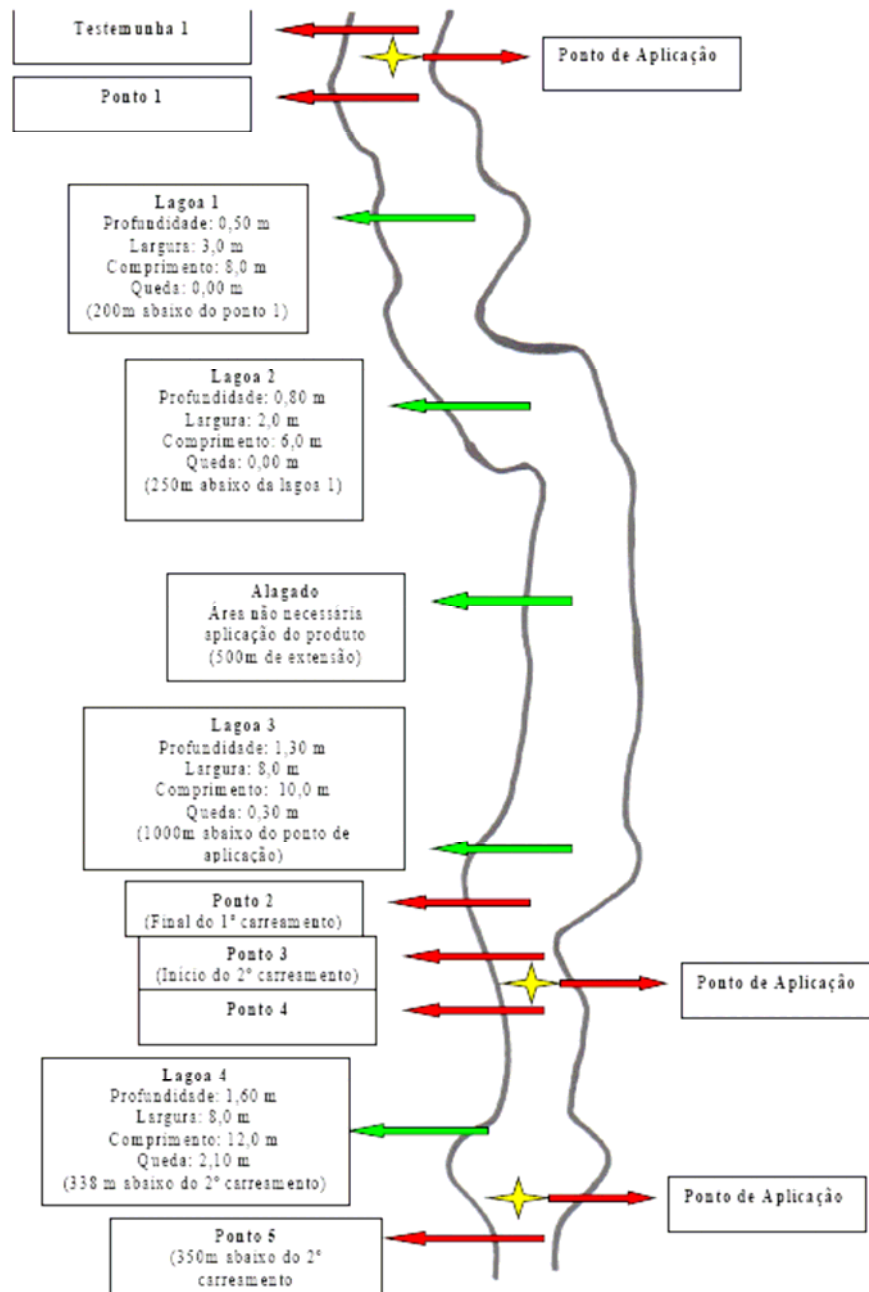


Fig. 2: Geomorfologia do ribeirão Cambé, indicando as variações no seu leito e os pontos de aplicação do *B. thuringiensis israelensis* na nova metodologia

Por esta nova proposta ficou estabelecido três pontos de aplicação e os valores de dose foram os seguintes: Ponto 1: 57,6mL (11.520 ppm – no regador) de produto para um carreamento de 40 metros até o remanso; Ponto 2: 165,0mL (33.000 ppm – no regador) para um carreamento de 115 metros; Ponto 3: 75mL (15.000 ppm – no regador) para um carreamento de 52 metros.

O experimento no ribeirão Tamapuã foi semelhante ao do Alto Ribeirão Cambé, ou seja, foi dividido em duas etapas: em um primeiro momento que compreendeu de 13 de outubro de 2006 a 04 de novembro do mesmo ano, e em um segundo momento que foi de 10 a 25 de novembro de 2006. Este ribeirão foi utilizado como uma repetição do experimento realizado no ribeirão Cambé para validação da nova proposta de metodologia.

Para o primeiro momento foram feitas as medidas de vazão, obtendo-se um valor de 750 metros de carreamento para 170,00mL (34.000 ppm – no regador) de produto a ser aplicado (Fig. 3). Instalou-se 6 pontos ao longo do ribeirão, onde a testemunha (ponto isento de ação do larvicida) foi considerada como ponto zero. Após 10 metros da testemunha instalou-se o ponto 1 (entre este ponto e a testemunha, foi aplicado o biolarvicida), o ponto 2 foi localizado a 250 metros do ponto zero, o ponto 3 a 500 metros, o ponto 4 a 600 metros, o ponto 5 a 750 metros e o ponto 6 a 850 metros. Este último ponto (ponto 6) foi instalado com o objetivo de verificar o possível aumento no carreamento do produto.

Desta forma seguindo os cálculos da nova proposta de metodologia o trecho do ribeirão Tamapuã foi subdividido em 5 pontos de aplicação com as seguintes doses: ponto1: 131mL (26.200 ppm – no regador); ponto 2: 26mL (5.200 ppm – no regador); ponto 3: 112mL (22.400 ppm – no regador); ponto 4: 83mL (16.600 ppm – no regador) e ponto 5: 92mL (18.400 ppm –no regador) (Fig. 4)

O ribeirão Cafezal apresenta uma característica topográfica típica de criadouros naturais de borrachudos, ou seja, pouca profundidade, irregularidades, e substratos disponíveis para oviposição. Baseando-se nestas características, o experimento, que realizou-se no período de maio a junho de 2006, foi direcionado a utilizá-lo como um ribeirão comparativo aos experimentos descritos anteriormente.

Foram realizados medidas de vazão, obtendo-se uma carreamento de 250 metros (Fig. 5). Instalou-se o ponto testemunha para coletas de larvas, logo no início do trecho, e a dois metros abaixo deste, foi localizado o ponto de aplicação do bioinseticida. Após dois metros deste fixou-se o segundo ponto de coleta de larvas. No final do carreamento (250 metros após a testemunha) foi instalado o ponto 2,

utilizado para verificar a eficiência do cálculo de vazão. Instalou-se também um terceiro ponto, 100 metros abaixo do ponto, para verificação de um possível aumento no carreamento do produto. O volume de biolarvicida aplicado foi de 150 ml (30.000 ppm – no regador), valor obtido pela tabela sugerida pela Divisão de Zoonoses e Vetores da Secretaria da Saúde e Meio Ambiente do Rio Grande do Sul.

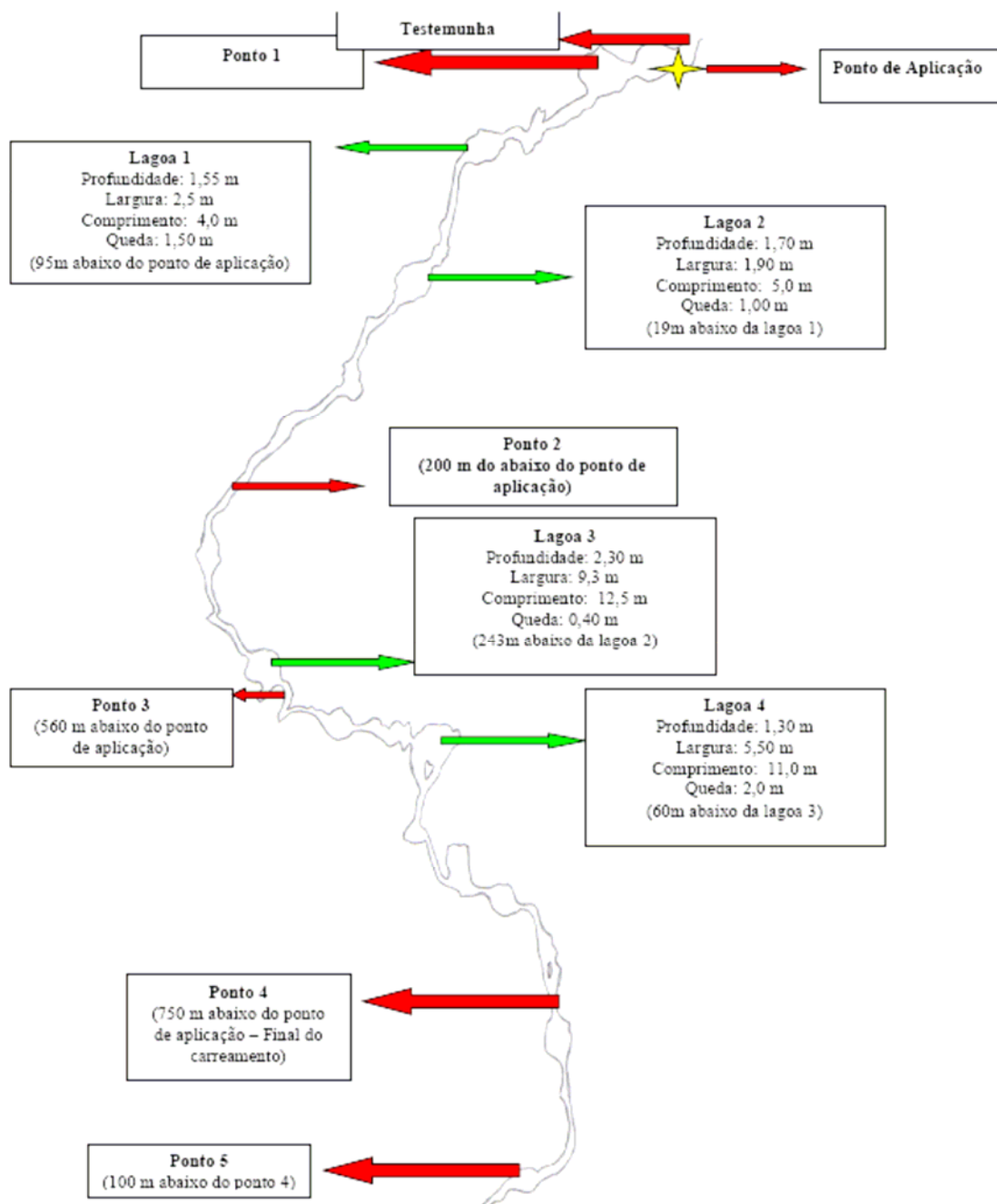


Fig. 3: Geomorfologia do ribeirão Tamapuã, indicando as variações no seu leito e os pontos de aplicação do *B. thuringiensis israelensis* na metodologia tradicional

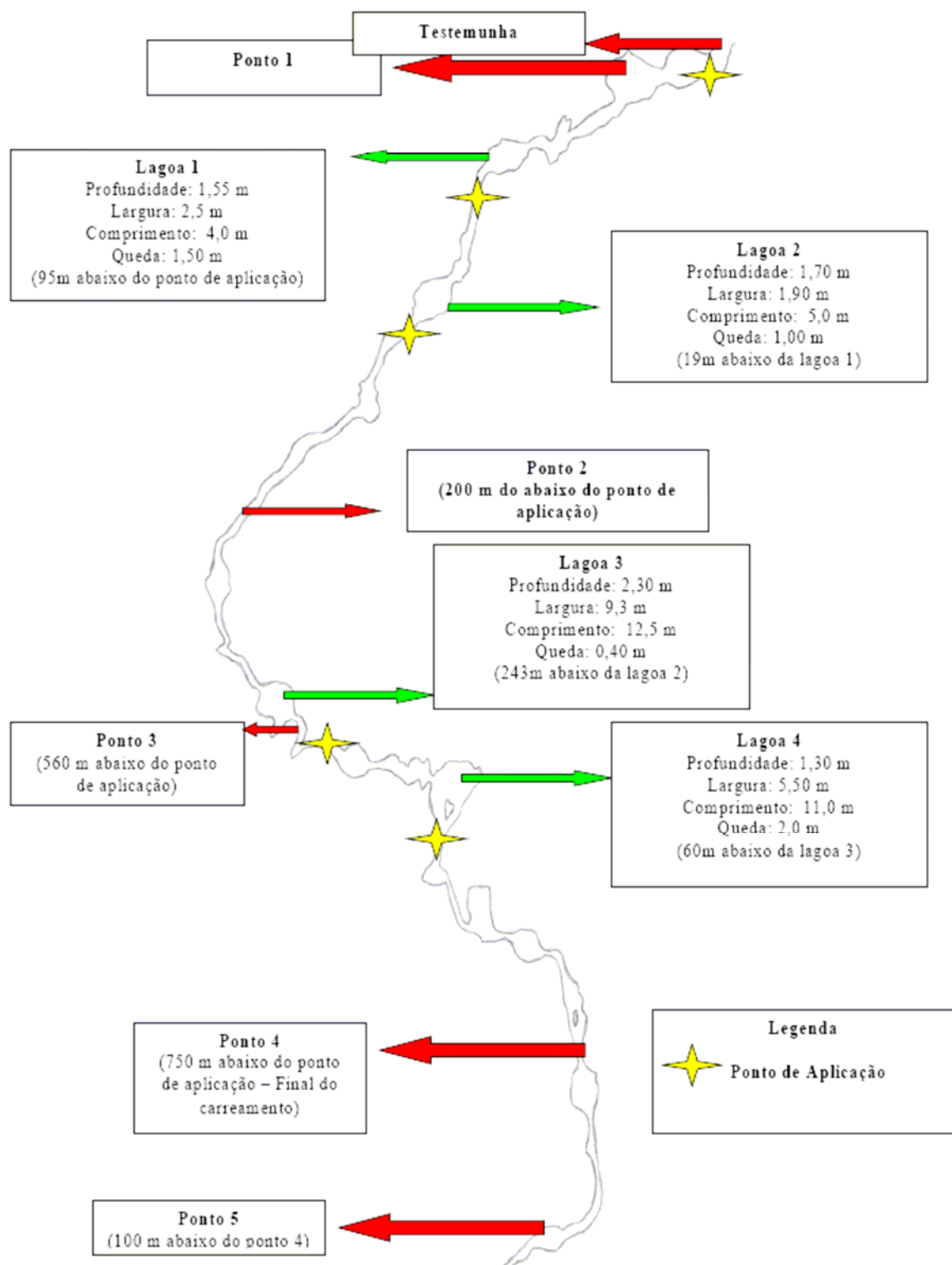


Fig. 4: Goeomorfologia do ribeirão Tamapuã, indicando as variações no seu leito e os pontos de aplicação do *B. thuringiensis israelensis*, na nova metodologia

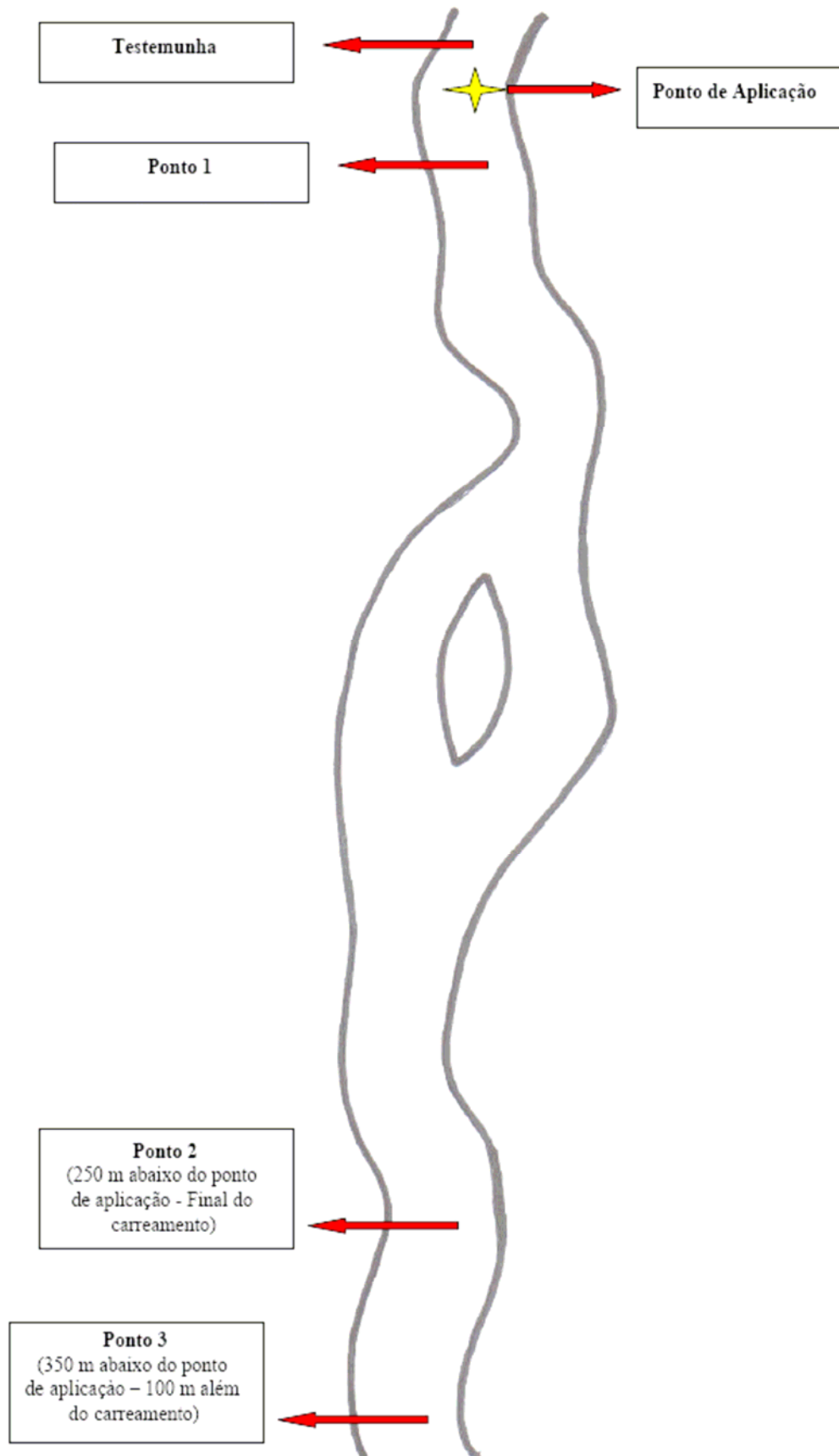


Fig. 5: Geomorfologia do ribeirão Cafezal, indicando as variações no seu leito e os pontos de aplicação do *B. thuringiensis israelensis*, na metodologia tradicional

As amostras de larvas coletadas em todos os experimentos e acondicionadas em potes plásticos, com capacidade de 500ml, devidamente identificados e preenchidos com álcool 80%. No laboratório de Entomologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), as larvas e pupas foram contadas com o auxílio de uma lupa Olympus®, e posteriormente armazenadas. Em cada procedimento de coleta cerca de 10% (dez) das larvas e pupas eram montadas em lâminas para identificação específica dos imaturos, utilizando-se chaves dicotômicas de COSCARÓN & WYGODZINSKY (1984), COSCARÓN (1991) E STRIEDER *et al.* (1992).

Os dados obtidos, foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey no nível 5% de significância como forma de comparar as duas metodologias de controle. A diversidade e abundância das espécies existentes também foram apresentadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se estudar a ação do bioinseticida a ser utilizado no controle de insetos, faz-se necessário conhecer as espécies alvo. Foram coletados 214.400 imaturos de Simuliidae, dos quais 188.822 (88,07%) de larvas e 25.578 (11,93%) de pupas. Foram identificados cerca de 10% (21.440 imaturos) do total coletado (Tab. 2).

Tabela 2: Espécies de imaturos de simuliídeos coletados em três ribeirões localizados no norte do estado do Paraná em diferentes período de 2005 a 2006.

Ribeirão	Tratamento	Espécies coletadas					
		<i>C. pertinax</i>	<i>G. pruinosa</i>	<i>I. inaequale</i>	<i>C. subpallida</i>	<i>P. incrustata</i>	<i>H. rubritorax</i>
Alto Ribeirão Cambé	Tradicional	1351	7642	117	2200	5	13
	Nova	642	2129	0	1076	45	0
	Total	1993	9771	117	3276	50	13
Cafezal	Tradicional	3717	35	374	343	79	0
	Nova	*	*	*	*	*	*
	Total	3717	35	374	343	79	0
Tamapuã	Tradicional	2152	954	0	124	37	24
	Nova	1423	652	36	325	22	13
	Total	3575	1606	36	449	59	37

As espécies predominantes foram *Grenieriella pruinosa* Lutz, 1910 no ribeirão Cambé, com 64,20% e *Chirostilbia pertinax* Kollar, 1832 no ribeirão Cafezal com 81,72% e no ribeirão Tamapuã com 83,77%. (Tabela 2). Esta distribuição está de acordo com COSCARÓN (1991), pois a espécie *G. pruinosa* é comumente encontrada em cursos d'água com pouca profundidade, águas cristalinas e fortes correntezas, características encontradas no ribeirão Cambé. *C. pertinax* coloniza

ribeirões com fortes correntezas e águas limpas, onde geralmente preferem plantas aquáticas ou vegetação sob as águas com substratos para ovipositar. Esta espécie é fortemente antropofílica e é incriminada como a mais importante espécie de importância médica sanitária na região sul do país (STRIEDER *et al.*, 2006)

As espécies encontradas nesta região de estudo são semelhantes as coletadas no estado do Rio Grande do Sul (STRIEDER *et al.*, 2006) e de Curitiba - Paraná (PETRY *et al.*, 2004; LOZOVEI, 2004).

A nova proposta de metodologia, consistiu em calcular os valores de vazão e carregamento da mesma forma como para o método anterior. Obtendo-se o valor do carregamento e conseqüentemente o valor da dose a ser aplicada. Em seguida subdividiu-se esta dose pelos trechos entre duas piscinas naturais, utilizando-se da seguinte fórmula:

$$D/M = \frac{\text{Dose do produto}}{\text{Carreamento}}$$

$$\Rightarrow D/M = \text{mL/m}$$

Onde: D/M= Dose de produto por metro de ribeirão

A dose do produto e o carregamento são valores encontrados segundo a metodologia padrão

Uma vez obtido a quantidade do produto para aquele trecho delimitado, multiplica-se por uma constante seis quando a distância do ponto de aplicação à irregularidade do leito do córrego (piscina natural) for inferior ou igual a 200m. Quando a distância for superior a esta multiplica-se pela constante 2. Estas constantes foram obtidas através de testes preliminares para a obtenção de uma dose letal significativa, partindo-se do valor de dose encontrado na relação D/M, visto anteriormente.

A aplicação foi realizada da seguinte forma: marcou-se o ponto inicial do córrego (ponto de aplicação) e a distância deste até a primeira irregularidade (remanso – dentro do carregamento). O valor desta distância (X) foi multiplicado pelo D/M, obtendo-se a dose a ser aplicada neste trecho, seguindo-se este procedimento até o final do carregamento. Quando o valor do carregamento alterar, realiza-se novo cálculo de dose seguindo o mesmo procedimento.

Para os testes de carregamento do bioinseticida e controle das larvas, no ribeirão Cambé, na utilização da metodologia tradicional, o ribeirão foi dividido em dois trechos (Fig. 1), com carregamento calculado para 1000 metros. Utilizou-se de 239,00mL (47.800 ppm) e 254,00mL (50.800 ppm) nos trecho 1 e trecho 2,

respectivamente, já que a vazão foi diferente para os dois trechos. Obteve-se 43,33% de diminuição da quantidade de larvas de simuliídeos após 24 horas da aplicação (Tab. 3).

Tabela 3: Controle de imaturos de Simuliidae no ribeirão Cambé, Londrina-Pr pelo produto Teknar® utilizando-se da metodologia de aplicação tradicional.

Pontos de Coleta	Datas de coleta											
	10/Jan – 0 hr		11/Jan – 24 hr		24/Jan – 0 hr		25/Jan – 24 hr		06/Mar – 0 h		07/Mar – 24 hr	
	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa
Testemunha1	603	77	856	103	524	31	241	334	418	0	433	15
Ponto 1	675	117	25	62	420	302	11	70	416	0	0	0
Ponto Final 1	3653	857	3475	1010	3942	1103	3722	989	2847	632	2612	744
Testemunha 2	326	57	410	37	257	94	288	89	226	0	245	0
Ponto 2	1897	448	16	120	2526	541	28	70	2987	181	13	0
Ponto Final 2	735	346	412	317	820	280	569	88	527	0	341	16
Total	6960	1768	3928	1509	7708	2226	4330	1217	6777	813	2966	760

Observação: O total não inclui o ponto testemunha.

Na segunda fase do experimento a aplicação seguiu a nova proposta de metodologia, já que o leito do ribeirão apresentava-se irregular com áreas alagadas muita vegetação e pequenas quedas de água, formando piscinas naturais de água lânticas e mais profundas. Os trechos 1 e 2 foram subdivididos em 3 segmentos (Fig. 2), sendo aplicado 57,6mL (11.520 ppm), 165,0 mL (33.000 ppm) e 75 mL (15.000 ppm), nos trecho 1, trecho 2 e trecho 3, respectivamente. Nesta, foi obtida um controle de 99,56% quando analisada 24 horas após a aplicação do produto (Tab. 4).

Tabela 4: Controle de imaturos de Simuliidae no ribeirão Cambé, Londrina-Pr, pelo produto Teknar® utilizando-se da nova metodologia

Pontos de coleta	Datas de Coleta											
	03/Abr – 0 hr		04/Abr – 24 hr		17/Abr – 0 hr		18/Abr – 24 hr		24/Abr – 0 hr		25/Abr – 24 hr	
	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa
Testemunha1	588	0	603	0	538	0	522	4	371	2	394	0
Ponto 1	541	3	0	0	308	0	0	0	413	0	0	0
Ponto 2	2981	23	12	0	933	3	0	0	1123	4	3	0
Ponto 3	428	2	4	0	261	12	0	0	284	0	0	0
Ponto 4	2314	35	19	11	1189	15	4	0	1048	15	16	2
Ponto 5	412	13	0	0	39	21	0	0	277	5	0	0
TOTAL	6676	76	35	11	2730	51	4	6	3145	24	19	2

Observação: O total não inclui o ponto testemunha.

No segundo ribeirão em estudo, ribeirão Tamapuã, também utilizou-se das duas metodologias de aplicação do bioinseticida (Fig. 3 e 4). Na tradicional foi aplicado 170mL (34.000 ppm) para um trecho de 750 metros de carreamento. Obtendo-se uma mortalidade de 13.88%, com a aplicação da metodologia tradicional e 99.36% com a nova (Tab. 5 e 6).

Tabela 5: Controle de imaturos de Simuliidae no ribeirão Tamapuã, Arapongas – Pr, pelo produto Teknar® utilizando-se da metodologia tradicional

Pontos de Coleta	Datas de coleta											
	13/Out – 0 hr		14/Out – 24 hr		20/Out – 0 hr		21/Out – 24 hr		03/Nov – 0 hr		04/Nov – 24 hr	
	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa
Testemunha	781	114	855	90	874	43	779	285	997	76	936	19
Ponto 1	1896	113	11	225	2066	366	8	476	1993	741	7	666
Ponto 2	3258	956	3121	1232	3109	1118	3277	391	3275	632	3387	744
Ponto 3	2633	36	2523	836	2937	744	2716	357	3101	265	3222	312
Ponto 4	1896	126	1965	169	2523	639	2498	183	2723	395	2659	652
Ponto 5	2399	632	2684	657	3742	339	3888	116	3758	552	3611	681
Total	12082	1863	10304	3119	14377	3206	12387	1523	14850	2585	12886	3055

Observação: O total não inclui o ponto testemunha.

Tabela 6: Controle de imaturos de Simuliidae no ribeirão Tamapuã, Arapongas – Pr, pelo produto Teknar® utilizando-se da nova metodologia

Pontos de Coleta	Datas de Coleta											
	10/Nov – 0 hr		11/Nov – 24 hr		17/Nov – 0 hr		18/Nov – 24 hr		24/Nov – 0 hr		25/Nov – 24 hr	
	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa
Testemunha	882	119	971	94	973	112	927	288	1392	175	1005	161
Ponto 1	2741	227	11	211	2074	378	17	628	3776	147	12	98
Ponto 2	4963	915	16	920	3726	1085	10	476	3296	236	8	268
Ponto 3	3985	360	21	342	3993	752	27	244	3568	562	18	426
Ponto 4	4375	285	20	216	4190	666	30	195	3722	409	16	335
Ponto 5	3175	658	13	657	3265	319	31	168	3785	724	10	744
Total	19239	2445	81	2346	17248	3200	115	1711	18147	2078	64	1871

Observação: O total não inclui o ponto testemunha.

No ribeirão Cafezal, considerado mais uniforme, obteve-se mortalidade de 99,16% quando aplicado 150 mL (30.000 ppm) de produto Teknar® com análise 24 horas após a aplicação, para um carreamento de 250 metros (Tab. 7). Neste Ribeirão pode-se observar que o carreamento estabelecido pela metodologia tradicional foi eficiente, havendo mortalidade por todo o trecho estabelecido pela fórmula de cálculo de carreamento, mas não controlou no ponto estabelecido além da distância calculada. (que consistia em um ponto localizado 100 m abaixo do carreamento determinado) (Tab. 7).

Analisando os ribeirões Cambé e o Tamapuã, que apresentavam variações geomorfológicas capazes de influenciar na velocidade e quantidade de transporte de partículas pela água, foi possível verificar que a metodologia tradicional não foi eficiente no controle dos imaturos de simuliídeos em toda a distância proposta. Nestas condições, produtos a serem aplicados devem sofrer o efeito de decantação depositando-se no fundo do leito, dificultando o carreamento do mesmo. Já no ribeirão Cafezal esta metodologia foi eficiente, pois o mesmo apresenta característica topográfica mais uniforme isenta de barragens e piscinas naturais. Este resultado demonstra que a metodologia tradicional foi estabelecida sem a

preocupação de levar em consideração as condições geomorfológicas do ribeirão. Todavia, para as condições de fluxo contínuo de água do ribeirão o resultado de controle foi ideal, podendo ser utilizada com sucesso.

Tabela 7: Controle de imaturos de simuliidae no ribeirão Cafezal, Rolândia-Pr, pelo produto Teknar® utilizando-se somente da metodologia tradicional

Pontos de coleta	Datas de Coleta											
	15/Mai – 0 hr		16/Mai – 24 hr		29/Mai – 0 hr		30/Mai – 24 hr		12/Jun – 0 hr		13/Jun – 24 hr	
	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa
Testemunha1	1184	30	1098	33	984	0	979	0	514	119	503	131
Ponto 1	2670	0	3	0	1804	1	13	0	878	51	9	33
Ponto 2	1198	3	15	1	838	0	19	2	522	16	8	9
Ponto 3	1077	0	894	0	871	19	766	0	411	39	377	55
Total	3868	3	18	1	2642	1	32	2	1400	67	17	42

Observação: o ponto 3 está localizado 100m além do carreamento. O total não inclui os pontos: testemunha e ponto 3.

A nova proposta de metodologia mostrou resultados satisfatórios de eficiência, controlando em média 99,46% das larvas de simuliídeos para o ribeirão Cambé mesmo com a redução de 39,57% na quantidade de produto aplicado. Esta redução ocorreu por ter sido levado em consideração as condições geomorfológicas do ribeirão, o qual apresenta cerca de 50% de sua extensão com área alagada, para qual não se fez necessário o controle. Para o ribeirão Tamapuã houve aumento de 61,71% na quantidade de produto a ser aplicado, devido a presença de piscinas naturais. Portanto o consumo de produto, quando utilizado a nova metodologia, pode aumentar ou diminuir dependendo das características de cada ribeirão, pois se apresentar um alto número de fragmentações de doses, o consumo pode aumentar significativamente.

A mortalidade obtida com esta última metodologia foi semelhante a encontrada por PETRY *et al.* (2004), em riacho localizado na cidade de Almirante Tamandaré no estado do Paraná, onde conseguiram, utilizando controle integrado, uma redução de até 99,97% das larvas de simuliídeos. RUAS-NETO *et al.* (1985) trabalho de controle de simuliídeos a campo, obteve-se uma mortalidade inferior a 90% quando a vazão do ribeirão foi superior a 5m³/min, e mortalidades irregulares quando a vazão foi inferior a 5m³/min. Estes resultados foram inferiores aos obtidos por esta pesquisa, pois as vazões nos três ribeirões estudados foram superiores a 15m³/min porém as mortalidade obtidas foram maiores que os 90% do que as encontrados por RUAS-NETO *et al.* (1985).

Os testes foram realizados durante a primavera, verão, outono e inverno, onde a temperatura mínima obtida esteve próxima a 16°C e a máxima de 37°C. A colonização pelas larvas de simúlideos, foi aproximadamente uniforme, durante o período de estudo, podendo significar que a variação da temperatura da água não interferiu na colonização do ambiente, na atividade alimentar e na ação do produto. Entre diversos fatores ecológicos que influenciam a vida e as atividades de insetos, o mais importante é a temperatura (SILVEIRA-NETO *et al.*, 1976). A temperatura influencia diretamente no desenvolvimento e no comportamento e indiretamente sobre o regime alimentar. Existe correlação positiva entre a graduação da temperatura e a mortalidade. PALMER *et al.* (1996) e COLBO & O'BRIEN (1984) registraram altos níveis de mortalidade em baixas temperaturas em torno de 11°C e 7°C, respectivamente. LACEY *et al.* (1978) não registraram diferenças significativas de mortalidade entre as temperaturas de 19°C e 24°C. LACEY *et al.* (1978) suspeitavam que a queda da mortalidade em temperaturas baixas fosse consequência de queda no pH intestinal ou atividade alimentar. Entretanto, os experimentos laboratoriais não confirmaram estas hipóteses. Houve influência na taxa de alimento ingerido, mas sem diferenças significativas. Afirmaram ainda que a mortalidade diferenciada entre temperaturas baixa e elevada seja atribuída provavelmente à cinética de ataque enzimático sobre a δ -endotoxina com subsequentes lesões do epitélio entérico.

O controle verificado para as diferentes espécies coletadas durante o trabalho foi praticamente de forma semelhante. Este resultado coincide com o encontrado por PETRY (2005), onde em um estudo de suscetibilidade das espécies de simúlideos a diferentes formulados a base de B.t.i., verificou-se que as espécies *E. perflavum*, *I. inaequale*, *C. pertinax*, *I. subnigrum* e *T. orbitale* responderam de forma semelhante quanto a mortalidade aos produtos. Resultados divergentes, como os de LACEY *et al.* (1978), que ao investigarem a suscetibilidade de seis espécies de *Simulium*, coletadas no campo, concluíram que, dentre outras, *Simulium vittatum* Zetterstedt, 1838 e *S. argus* foram consideravelmente mais sensíveis aos efeitos do B.t.i.

As eficiências obtidas na utilização das duas metodologias em estudo apresentaram diferenças significativas através do teste de Tukey a nível de 5% de significância (Tabela 9). O ponto Testemunha (pontos isento de ação do larvicida) não foi utilizado para as análises estatísticas e as diferenças entre o coletado em

dias diferentes foi, em média inferior a 5 %, o que pode ser considerado variação natural influenciada pelo próprio comportamento do animal.

Tabela 8: Controle de larvas de simulídeos obtido pelo produto Teknar® comparando-se duas metodologias: Metodologia Tradicional e Nova Metodologia com a subdivisão de dose.

Metodologia	Ribeirões Estudados											
	Cambé				Tamapuã				Cafezal			
	Pontos		Testemunha		Pontos		Testemunha		Pontos		Testemunha	
	Aplicação	24 hr após	0 hr	24 hr	Aplicação	24 hr após	0 hr	24 hr	Aplicação	24 hr após	0 hr	24 hr
Tradicional	22254 A a	12167Bb	1545Cc	1530Cc	41309 Dd	35577Ef	2652LI	2570LI	7910 M	67 N	2682P	2580P
Nova	12551Bb	58 Aa	1497Cc	1519Cc	54634 Gh	260 Ij	3247LI	2903LI	*	*		
CV %	5.11				1.02				1.89			
DMS	1.2115429				0.1598702				0			

Número de larvas seguidos pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de significância.

Os filhotes utilizados foi na cor verde escuro, pois em testes preliminares verificou-se uma maior postura de ovos nesta cor, resultados que diferem de PETRY (2005), onde verificou-se uma preferência por filhotes de cores claras, tais como amarelos e brancos. A divergência entre os resultados obtidos pelo autor acima citado, pode estar relacionado ao comportamento de diferentes espécies de cada região de estudo.

Uma barragem natural feita nos pequenos ribeirões, principalmente para represamento visando a retirada de água para irrigação ou mesmo abastecimento diverso, pode bloquear totalmente o carreamento. As piscinas naturais podem ser formadas por queda de água com alturas consideráveis. Esta situação leva a formação de “remansos” com maior profundidade e provoca uma circulação da água no sentido horizontal e vertical, e a saída é feita pela borda superior da “piscina”. Outros são quedas menores com formação de piscinas mais rasas e com fluxo mais rápido da água. Existem ainda a formação de remansos naturais caracterizando-se por uma área mais profunda normalmente sem pedras no fundo, com águas lânticas que se segue logo após a um trecho de corredeira. Todas essas situações devem ser levadas em consideração para a determinação do carreamento de produto bioinseticida, utilizado no controle de borrachudos. Desta forma uma vez detectada estas influências, trabalhos minuciosos de mapeamento do ribeirão devem ser realizados.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a nova proposta de metodologia de aplicação de bioinseticida é uma alternativa importante para o controle de simuliídeos em ribeirões com características topográficas acentuadas. A metodologia tradicional não é recomendada para ribeirões semelhantes aos citados anteriormente, mas é uma importante ferramenta de controle em ribeirões com leito regular.

Mais estudos são necessários para minimizar a mão-de-obra na aplicação da nova proposta de metodologia e para estabelecer qual é a amplitude da influência no carreamento em razão do tamanho, profundidade e característica da "piscina natural".

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. F. S. Manejo integrado de borrachudos. In: Seminários sobre Insetos e Ácaros. Anais 3 da Sociedade Entomológica do Brasil do **XI Congresso Brasileiro de Entomologia de 1987**, Campinas, Fundação Cargill, p. 141-157, 1989.
- AWRENCE, J.; LACEY, A.; UNDEEN, H. Effect of Formulation, Concentration, and Application Time on the Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (H-14) Against Black Fly (Diptera: Simuliidae) Larvae Under Natural Conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 77, n. 2, p. 412-418, 1984.
- BECKER, N.; ZGOMBA, M.; LUDWIG, M.; PETRIC, D. e RETTICH, F. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 8, n. 3, p. 285-289, 1992.
- BORROR, D. J.; DELONG, D. M. Ordem Diptera: Moscas, Mosquitos. In **Introdução ao Estudo dos Insetos**. São Paulo. Edgard Blucher LTDA, 1969 p. 383.
- BROWN, M. D.; DARRAN, T.; TONYA, M. W. e BRIAN, H. K. Laboratory and field evaluation of the efficacy of Vectobac 12 AS against *Culex sitiens* (Diptera: Culicidae) larvae. **Journal of the American Control Association**, v. 14, n. 2, p. 183-185, 1998.
- BROWN, M. D.; DARRAN, T.; PAUL, M.; JACK, G. G. e BRIAN, H. K. Laboratory and field evaluation of the efficacy of four insecticides for *Aedes vigilax* (Diptera: Culicidae) and toxicity to the nontarget shrimp *Leander tenuicornis* (Decapoda: Palaemonidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 5, p. 1045-1051, 1999.
- BROWN, M. D.; TONYA, M. W.; SUSANNAH, G.; JACK, G. G. DAVID, P. e BRIAN, H. K. Toxicity of insecticides for control of freshwater *Culex annulirostris* (Diptera: Culicidae) to the nontarget shrimp, *Caradina indistincta* (Decapoda: Atyidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, p. 667-671, 2000.

- CAVADOS, C. F. G.; FONSCECA, R. N.; CHAVES, J. Q.; RABINOVITCH, L.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera: Simuliidae) larvae and adults. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 1017-1021, 2001.
- CHUNG, Y.K.; PHUA-LAM, S.G.; CHUA, Y.T.; YATIMAN, R. Evaluation of biological and chemical insecticide mixture against *Aedes aegypti* larvae and adults by thermal fogging in Singapore. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, p. 321-327, 2001.
- COLBO, M. H. & MOORHOUSE, D. E. The survival eggs of *Austrosimulium pestilens* Marck & Marck (Diptera: Simuliidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 64, p. 629-632, 1974.
- COSCARÓN, S. **Fauna de Agua Dulce de La Republica Argentina**. Fasciculo 2. Printed in Argentina, Buenos Aires, República Argentina, 1991, 297 p.
- COSCARÓN, S. & WYGODZINSKY, P. Notas sobre Simulidos neotropicales. VII. Sobre los subgeneros *Psaroniocompsa* Enderlein y *Inaequalim* subgen. nov. **Arquivos de Zoologia**, v.31, n. 2, p. 37-103, 1984.
- CUNHA, M. C. I. Simulídeos (Borrachudos). In MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo. Atheneu, 2001, p. 31-47.
- FILLINGER, U.; KNOLS, B. G. J.; BECKER, N. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n.1, p. 37-47, 2003.
- LACEY, L. A. e LACEY, J. M. The larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-4) against mosquitoes on the Central Amazon Basin. **Mosquito News**, v.41, n. 2, p. 266-270, 1981.
- LACEY, L. A. & UNDEEN, A.H. The effect of formulation, concentration, and application time on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* (H14) against black fly larvae under natural conditions. **J. Econ. Entomol.**, v.77, p. 412-418, 1984.
- LOZOVEI, A. L.; PETRY, F.; SANTOS NETO, L. G. Survey of the *Simulium* species (Diptera, Simuliidae), Riacho dos Padres, almirante Tamandaré municipality, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**. Curitiba, v. 48, n 1, p. 91-94, 2004.
- NAYAR, J. K.; KNIGHT, J. W.; ALI, A.; CARLSON, D. B. e O'BRYAN, P. D. Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* against two Florida mosquito species. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 15, n. 1, p. 32-42, 1999.

- PALMER, R. W.; EDUARDES, M.; NEVILL, E. M. Control of pest blackflies (Diptera: Simuliidae) along the Orange River, South Africa: 1990-1995. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 289-304, 1996.
- PETRY, F.; LOZOVEI, A.L.; FERRAZ, M.E. & SANTOS NETO, L.G. Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanque de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. **Rev. Brasil. De Entomologia**, v.48, n. 1, p. 127-132, 2004.
- PETRY, F. **Aspectos biológicos de fertilidade e ciclo evolutivo de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) e susceptibilidade de suas larvas em bioensaios laboratoriais com formulados de *Bacillus thuringiensis israelensis* em aparato elaborado.** 2005, 93 p. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- POLLOM, T. E. V. **Desenvolvimento de bioprocessadores para produção de biomassa de delta-endotoxina com cepa BR01 de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner, 1915, visando o controle biológico de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae).** 2003, 92 p. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- RODRIGUES, I. B.; WANDERLI, P. T. e JOSÉ, M. C. S. D. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n.4, p. 441-444, 1998.
- RUAS NETO, A. L. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como alternativa no controle de simuliídeos no Rio Grande do Sul. 1- Susceptibilidade a campo. **Boletim de Saúde**. Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 21-26, 1984.
- RUAS NETO, A. L.; CALDAS, E. P. & SOUZA, M. A. T. Programa Estadual de controle de Borrachudos: controle dos simuliídeos no Rio Grande do Sul, aspectos gerais. **Boletim de Saúde**. Porto Alegre, v.11, n.2, p. 4-7, 1984.
- RUAS NETO, A. L.; SOUZA, M. A. T.; SEVERINO, S.; MELO, J. L. B.; SILVEIRA, S. M. & de FORTES, N. D. F. Controle integrado de *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax* Kollar, 1832. 1. Utilização de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em três municípios do Rio Grande do sul. **Boletim de Saúde**, Porto Alegre, v.12, p.17-20, 1985.
- RUAS NETO, A. L. & MATIAS, R. S. Controle integrado de *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax* Kollar, 1832. 2. A competição interespecífica como possível método de controle natural. **Boletim de Saúde**, Porto Alegre, v.12, p. 21-24, 1985.
- RUAS NETO, A. L. e OLIVEIRA, C. M. Controle biológico de culicídeos e simuliídeos: inseticidas bacterianos. **Rev. Brasil. Malariol.**, v.37, p. 61-75, 1985.
- SILVEIRA-NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D. & VILLA-NOVA, N.A. **Manual de Ecologia dos Insetos**. Piracicaba, São Paulo, ed. Agronômica Ceres Ltda, 479 p., 1976.

- STRIEDER, M.N.; SANTOS, J. E. DOS & VIEIRA, E. M. Distribuição, abundância e diversidade de Simuliidae (Diptera) em uma bacia hidrográfica impactada no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.50, n. 1, p.119-124, 2006.
- STRIEDER, M.N.; CORSEUIL, E. & PY-DANYEL. V. Espécies do gênero *Simulium* (Diptera: Simuliidae) ocorrentes no Rio Grande do Sul-Brasil, com chaves para sua identificação. **Acta Biológica Leopoldensia**, v.14, n. 2, p. 53-74, 1992.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. F. S. Manejo integrado de borrachudos. In: Seminários sobre Insetos e Ácaros. Anais 3 da Sociedade Entomológica do Brasil do **XI Congresso Brasileiro de Entomologia de 1987**, Campinas, Fundação Cargill, p. 141-157, 1989.
- ANDRADE, C. F. S.; CASTELO BRANCO JR. Susceptibilidade de populações de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (Culicomorpha, Simuliidae) ao temephos e a um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 141-157, 1991.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS BOAS, L. A. e VILAS BOAS, G. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria**, org. L. A. SERAFINI; N. M. BARROS e J. L. AZEVEDO. EDUCS, Caxias do Sul, v. 2, p. 269- 293, 2002.
- ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C.; MAIA-HERZOG, M. & SOUZA, B. C. Levantamento das espécies do gênero *Simulium* Latreille (Diptera, Simuliidae) no litoral norte do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 32, n.1, p. 11-17, 1988.
- ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C.; LACEY, L. A. Controle de simulídeos com concentrado emulsionável de *Bacillus thuringiensis*. **Boletim of Sanitária Panamericana**, v. 108, n. 3, p. 213-219, 1990.
- ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C.; CUNHA, A. B. P. V.; FREIRE, N. M. S.; MELLO R. P. Evaluation of the impact of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* and Temephos, used for the control of *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (Diptera: Simuliidae) on the associated entomofauna, Paraty, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 697-702, 2003.
- AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In- **Controle Biológico**. Ed. MELO, I. S. e AZEVEDO, J. L. Embrapa, Jaguariúna, v. 1, p. 69-96, 1998.
- AWRENCE, J.; LACEY, A.; UNDEEN, H. Effect of Formulation, Concentration, and Application Time on the Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (H-14) Against Black Fly (Diptera: Simuliidae) Larvae Under Natural Conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 77, n. 2, p. 412-418, 1984.

BECKER, N.; ZGOMBA, M.; LUDWIG, M.; PETRIC, D. e RETTICH, F. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 8, n. 3, p. 285-289, 1992.

BORROR, D. J.; DELONG, D. M. Ordem Diptera: Moscas, Mosquitos. In **Introdução ao Estudo dos Insetos**. São Paulo. Edgard Blucher LTDA, 1969 p. 383.

BROWN, M. D.; DARRAN, T.; TONYA, M. W. e BRIAN, H. K. Laboratory and field evaluation of the efficacy of Vectobac 12 AS against *Culex sitiens* (Diptera: Culicidae) larvae. **Journal of the American Control Association**, v. 14, n. 2, p.183-185, 1998.

BROWN, M. D.; DARRAN, T.; PAUL, M.; JACK, G. G. e BRIAN, H. K. Laboratory and field evaluation of the efficacy of four insecticides for *Aedes vigilax* (Diptera: Culicidae) and toxicity to the nontarget shrimp *Leander tenuicornis* (Decapoda: Palaemonidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 5, p. 1045-1051, 1999.

BROWN, M. D.; TONYA, M. W.; SUSANNAH, G.; JACK, G. G. DAVID, P. e BRIAN, H. K. Toxicity of insecticides for control of freshwater *Culex annulirostris* (Diptera: Culicidae) to the nontarget shrimp, *Caradina indistincta* (Decapoda: Atyidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, p. 667-671, 2000.

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

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

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

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

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

CONSOLI, R. A. G. B.; SANTOS, B. de S.; LAMOUNIER, M. A.; SECUNDINO, M. F. C.; RABINOVITCH, L.; SILVA, C. M. B.; ALVES, R. S. A. e CARNEIRO, N. F. F. Efficacy of a new formulation of *Bacillus sapharicus* 2362 against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 571-573, 1997.

COSCARÓN, S. **Fauna de Agua Dulce de La Republica Argentina**. Fasciculo 2. Printed in Argentina, Buenos Aires, República Argentina, 1991, 297 p.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J. SCHNEPF, E.; VEM RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. e DEAN, D. H. Revision os the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n.3, p. 807-813, 1998.

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

CUNHA, M. C. I. Simulídeos (Borrachudos). In MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo. Atheneu, 2001, p. 31-47.

De NARDO, E. A. B. e CAPALBO, D. N. F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. In-**Controle Microbiano de Insetos**. Ed. ALVES, S. B. A. 2 ed. FEALQ, Piracicaba, 1998 , p. 231-262.

DUDAS, L. **Nós e os Borrachudos**. Curitiba. SUREHMA, 1984, p. 01-23.

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

FILLINGER, U.; KNOLS, B. G. J.; BECKER, N. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n.1, p. 37-47, 2003.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. Faculdade de Higiene e Saúde Pública, São Paulo, 1: 1962, 662p.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. Edusp, São Paulo, v. 2, 2002, 890p.
 GEBARA, A.B. Controle Integrado de Mosquitos – Alguns conceitos. **Revista Brasileira de Entomologia**. São Paulo v. 31, n.3, p. 435-437, 1987.

GOLDBERG, I. F. e MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles segentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, v. 37, n. 3, p. 355-358, 1977.

LACEY, L. A. e LACEY, J. M. The larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-4) against mosquitoes on the Central Amazon Basin. **Mosquito New**, v.41, n. 2, p. 266-270, 1981.

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

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

LOZOVEI, A. L.; PETRY, F.; SANTOS NETO, L. G. Survey of the *Simulium* species (Diptera, Simuliidae), Riacho dos Padres, almirante Tamandaré municipality, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**. Curitiba, v. 48, n 1, p. 91-94, 2004.

MARDINI, L. B. L. F.; TORRES, M. A. N.; SILVEIRA, G. L.; ATZ, A. M. V. *Simulium* spp. Control programa in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, p. 211-214, 2000.

MARGALIT, J.; BECKER, N.; BACK, C. e ZARITSKY, A. *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* as a biological control agent of mosquitoes and black flies. *In*- **Bacillus thuringiensis Biotechnology and Environmental Benefits**. Academia Sinica, Taipei, v. 1, p. 512-556, 1994.

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

MOLLOY, D. P. Progress in the Biological Control of Black Flies with *Bacillus thuringiensis israelensis*, with Emphasis on Temperate Climates. In BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. **Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies**. New Brunswick: Rutgers University Press, p. 161-186, 1990.

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

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

NAYAR, J. K.; KNIGHT, J. W.; ALI, A.; CARLSON, D. B. e O'BRYAN, P. D. Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* against two Florida mosquito species. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 15, n. 1, p. 32-42, 1999.

PALMER, R. W.; EDWARDES, M.; NEVILL, E. M. Control of pest blackflies (Diptera: Simuliidae) along the Orange River, South Africa: 1990-1995. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 289-304, 1996.

PASSOS, A. D. C. & COELHO, G. E. Oncocercose: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p.107-111, 1998.

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

PETRY, F. **Aspectos biológicos de fertilidade e ciclo evolutivo de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) e susceptibilidade de suas larvas em bioensaios laboratoriais com formulados de *Bacillus thuringiensis israelensis* em aparato elaborado**. 2005, 93 p. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

POLANCZYK, R. A., GARCIA, M. O. e ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Rev. Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 813-816, 2003.

POLLON, T. E. V. **Desenvolvimento de bioprocessadores para produção de biomassa de delta-endotoxina com cepa BR01 de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner, 1915, visando o controle biológico de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae).** 2003, 92 p. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

RABINOVITCH, L.; CAVADOS, C. F. G. e LIMA, M. M. *Bacillus* entomopatogênicos. O que se espera? **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 6, p. 40-41, 1998.

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

RABINOVITCH, L.; CAVADOS, C. F. G.; LIMA, M. M. *Bacillus* Entomopatogênicos: o que se espera? **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2000.

REGIS, L.; SILVA, S. B.; SANTOS, M. A. V. M. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, p. 207-210, 2000.

REGIS, L.; SILVA-FILHA, M. H.; NIELSEN-LEROUX, C. e CHARLES, J. F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *TRENDS in Parasitology*, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

RODRIGUES, I. B.; WANDERLI, P. T. e JOSÉ, M. C. S. D. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n.4, p. 441-444, 1998.

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

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

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

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

RUAS NETO, A. L. e OLIVEIRA, C. M. Controle biológico de culicídeos e simuliídeos: inseticidas bacterianos. **Rev. Brasil. Malariol.**, v.37, p. 61-75, 1985.

SCHNEPF, E; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J. LERECLUS, D.; BAUM, J. FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R. e DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, p. 775-806, 1998.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.18 n.3, p. 867-871, 2002.

VILARINHOS, P. T. R.; DIAS, J. M. C. S.; ANDRADE, C. F. S.; ARAÚJOCOUTINHO, A. J. P. C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simuliídeos, In ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. v. 4. Piracicaba, SP.: FEALQ, 1998, p. 447-480.

WERNER, D.; PONT, A. C. Dipteran predators of simuliid blackflies: a worldwild review. **Medical and Veterinary Entomology**, v.17, p.115-132, 2003.