

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Campus UFRJ-Macaé Prof. Aloísio Teixeira
Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade - NUPEM

SIMULIOFAUNA (SIMULIIDAE: DIPTERA) DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL
ATALAIA (RIO DE JANEIRO): IDENTIFICAÇÃO, ECOLOGIA E BIOLOGIA DO
DESENVOLVIMENTO

Willian Rodrigues da Costa Marinho

Macaé

2019

Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ
Campus UFRJ-Macaé Prof. Aloísio Teixeira
Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade - NUPEM

SIMULIOFAUNA (SIMULIIDAE: DIPTERA) DO PARQUE NATURAL
MUNICIPAL ATALAIA (RIO DE JANEIRO): IDENTIFICAÇÃO, ECOLOGIA E
BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

Willian Rodrigues da Costa Marinho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Figueiró Portella Pereira

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Natália Martins Feitosa

Macaé

2019

SIMULIOFAUNA (SIMULIIDAE: DIPTERA) DO PARQUE NATURAL
MUNICIPAL ATALAIA (RIO DE JANEIRO): IDENTIFICAÇÃO, ECOLOGIA E
BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

Willian Rodrigues da Costa Marinho

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Figueiró Portella Pereira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Natália Martins Feitosa

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovado por:

Presidente, Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca (UFRJ-Macaé)

Titular interno, Prof. Dr. Francisco de Assis Esteves (UFRJ-Macaé)

Titular externo, Prof^a. Dr^a. Tatiana Nascimento Docile (Fiocruz)

Macaé

2019

Dedico esta dissertação aos meus pais, Artur e Lédia, por serem meus exemplos de amor, fortaleza, trabalho e bondade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, de forma especial, ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca, que me abraçou desde o início, quando trouxe uma proposta de projeto; e desde então se mostrou um excelente orientador e um grande amigo. Agradeço também aos meus coorientadores, Prof^a. Dr^a. Natália Martins Feitosa e Prof. Dr. Ronaldo Figueiró Portella Pereira, pela amizade e por todos os ensinamentos durante estes dois anos de mestrado, que foram muito além do âmbito acadêmico, uma vez que foram ensinamentos de vida.

A minha família LICM: Prof. Dr. Jackson de Souza Menezes, Lupis Ribeiro, Renata Coutinho, Paula Veronesi, Rodrigo Alves, Ian Pena, Giovanni Torres e Juliana Marques, por todos os ensinamentos científicos e de vida durante esses dois anos. Gostaria também de agradecer, de forma especial, aos meus dois amigos, Alessandra Alvarenga e Leonardo Oliveira, pelos inúmeros momentos de risadas, partilha científica e de vida, além dos puxões de orelha ao longo dessa jornada. Obrigado pelo enorme cuidado, amizade e carinho que tiveram comigo, desde o momento que cheguei ao laboratório até hoje, quando me tornarei um mestre.

Gratidão é a palavra que direciono aos meus amigos e coorientandos de iniciação científica: Lucas Santos, Ruan Guimarães, Rodrigo Silva e a princesa do grupo, Isabelle Chagas, por toda alegria, empenho e determinação de vocês durante o trabalho. Vocês não fazem ideia de como a alegria de vocês, muitas vezes, foi o combustível para eu seguir com a pesquisa de dissertação e não desanimar.

Agradeço também a todos os professores e funcionários do NUPEM/ UFRJ que, de forma significativa, contribuíram para a minha formação acadêmica e que me impulsionam sempre a querer crescer como profissional. Gostaria de destacar os professores: Tatiana Konno, Ana Cristina Petry, Vinícius Albano, Pablo Rodrigues, José Roberto e Emiliano Calderon, que foram marcantes nessa caminhada, pois, com muito amor e carinho à profissão, sempre contribuíram de forma significativa com o meu crescimento e com o meu projeto de pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos as minhas amigas e companheiras de caminhada da turma de Mestrado e Doutorado do PPGCIAC de 2017: Thaís Pimenta, Juliane Félix

e Geani Oliveira, pelo companheirismo, amizade, alegrias, conquistas e por tudo que vivenciamos dentro e fora do espaço acadêmico. É certo que sem vocês esse sonho não seria possível. Vocês foram grandes presentes que a UFRJ/Macaé e Deus me concederam nessa jornada.

Meu agradecimento sincero a toda equipe dos laboratórios de Ecologia Aquática e Bioquímica Hatsabura Massuda, por todo apoio e ensinamentos que me proporcionaram durante o tempo de desenvolvimento da minha pesquisa de dissertação.

Quero agradecer, de forma especial, à equipe do laboratório de insetos aquáticos do Museu Nacional da UFRJ: Prof. Dr. Leonardo Henrique Gil Azevedo, Óscar Sanchez, Caio Dias, Durval Santos e, principalmente, à grande amiga que fiz nas semanas em que passei pelo museu, Ivyn Karla (Minha esposa). Obrigado a todos vocês pelas risadas e todo conhecimento que transmitiram a mim sobre a taxonomia de simulídeos.

Agradeço também aos meus amigos do Centro de Controle de Zoonoses de Macaé, que de forma significativa sempre colaboraram para o meu crescimento acadêmico e profissional. Em especial, agradeço ao coordenador do setor Flávio Paschoal e ao meu supervisor geral e de campo Marcelino Rocha, além de toda Equipe Turbo (Thiago Peixoto, Sílvio Nerys, Leandro Velasco, Flávio Fortes, Wanderson Teixeira, Crodoaldo Ventura, Bruno dos Santos e Lessandro Diniz).

Com muito carinho também, quero agradecer à Prefeitura Municipal de Macaé por todo auxílio, em especial ao Prof. Magini e toda sua equipe, pois sempre demonstraram muita atenção e carinho comigo. E meus sinceros agradecimentos a toda equipe do Parque Natural Municipal Atalaia, que sempre nos recebeu de braços abertos. Com muita atenção e carinho ao trabalho, contribuíram para a realização desse projeto. Destaco aqui o coordenador do Parque Alexandre Bezerra, a bióloga que o auxilia Liz e todos os Guardas Ambientais que lá trabalham.

Gostaria de agradecer a Deus, Senhor de tudo, que, com seu amor e misericórdia, concedeu-me o dom da vida e que, em todos os momentos da minha existência, segura-me pela mão e demonstra, de várias maneiras, que me ama e está comigo.

Minha eterna gratidão a minha mãe Lédia Maria Rodrigues da Costa e ao meu pai Artur Luís Rodrigues Marinho, pelo amor e educação. Por tudo que fizeram e fazem por mim. E a toda a minha família, que sempre esteve me incentivando a não desistir desse sonho.

Aos meus amigos Mayara Mattos, Marcos Vinícius Viana, Glorinha Arruda, João Paulo Reis, Débora Toledo, Lys Oliveira, Raiana Silva, Viviane Gonçalves, Lucila Melo, Mary Helen, Jonatha Egídio, Lyana Carvalho, Dênis Almeida e Ana Carla, meu muito obrigado, pelas palavras, apoio, paciência, amizade e companheirismo.

“Entregar meus sonhos nas mãos de Deus não é garantia de que terei sucesso, mas a certeza de que eles serão fecundos.” (Santos, Abner)

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

R837s Rodrigues da Costa Marinho, Willian
SIMULIOFAUNA (SIMULIIDAE: DIPTERA) DO PARQUE
NATURAL MUNICIPAL ATALAIA (RIO DE JANEIRO):
IDENTIFICAÇÃO, ECOLOGIA, E BIOLOGIA DO
DESENVOLVIMENTO / Willian Rodrigues da Costa
Marinho. -- Rio de Janeiro, 2019.
92 f.

Orientador: Rodrigo Nunes da Fonseca.
Coorientador: Ronaldo Figueiró.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Campus Macaé, Programa de Pós
Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, 2019.

1. Diptera. 2. Simuliidae. 3. Ecologia. 4. Evo
Devo. I. Nunes da Fonseca, Rodrigo, orient. II.
Figueiró, Ronaldo, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

RESUMO

SIMULIOFAUNA (SIMULIIDAE: DIPTERA) DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL ATALAIA (RIO DE JANEIRO): IDENTIFICAÇÃO, ECOLOGIA, E BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

Willian Rodrigues da Costa Marinho

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Figueiró

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Natália Feitosa

Resumo de dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Campus UFRJ- Macaé Professor Aloísio Teixeira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Estudos de Biologia da Conservação e de Biodiversidade focam na identificação de organismos vertebrados, como mamíferos, aves, répteis. Artrópodes constituem um filo que corresponde a cerca de 75% das espécies do planeta, todavia são pouco estudados em estudos de avaliação de fauna. Assim, o Parque Atalaia corresponde a uma área de mais de 1000 hectares de Mata Atlântica preservada e foi escolhido como sítio para um levantamento da entomofauna da família simuliidae. Filogeneticamente, os simulídeos são um importante grupo na base dos Diptera (mosquitos e moscas). Os estudos de desenvolvimento embrionário dos Diptera se restringem à mosca *Drosophila melanogaster*. O presente trabalho buscou avaliar: 1) A importância dos fatores abióticos na ocorrência de espécies de simulídeos no Parque Natural Municipal Atalaia; 2) Analisar preliminarmente o desenvolvimento embrionário de Simuliidae a partir de coletas *in loco* e de um sistema de criação dessa família em laboratório. Desta forma, no presente trabalho foram encontradas e catalogadas sete espécies, dentre elas: *Simulium*(*Psaroniocompsa*) *anamariae*, *Simulium* (*Psilopelmia*) *perflavum*, *Simulium*(*Chirostilbia*) *pertinax*, *Simulium* (*Chirostilbia*) *subpallidum*, *Simulium* (*Inaequalium*) *inaequale*, *Simulium* (*Psaroniocompsa*) *auripellitum* e *Simulium* (*Inaequalium*) *subclavibrachium*. Além disso, notou-se que os fatores abióticos que influenciaram positivamente na proliferação e dispersão dessas espécies foram pH e condutividade elétrica da água. Ainda nessa pesquisa, obteve-se a criação de simulídeos durante dezesseis dias e a possível identificação de estruturas do embrião de Simuliidae, como: leque cefálico, região anterior e posterior do embrião, disco anal e segmentos torácicos. Em conclusão, nossos resultados mostram a importância de levantamentos da entomofauna de Simuliidae da região, bem como estudos de Biologia do Desenvolvimento para compreensão do desenvolvimento desses dipteros.

Palavras-chave: Entomofauna; Mosquitos; Evo-Devo, Entomologia.

ABSTRACT

SIMULIOFAUNA (SIMULIIDAE: DIPTERA) DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL ATALAIA (RIO DE JANEIRO): IDENTIFICAÇÃO, ECOLOGIA, E BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

Willian Rodrigues da Costa Marinho

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Figueiró

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Natália Feitosa

Resumo de dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Campus UFRJ- Macaé Professor Aloísio Teixeira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Studies of Conservation Biology and Biodiversity focus on the identification of vertebrate organisms such as animals, birds, and reptiles. Arthropods consisting of a field that corresponds to about 75% of the species of the planet however are studied in studies of fauna evaluation. Thus, the Atalaia Park corresponds to an area of more than 1,000 hectares of preserved Atlantic Forest and was idealized as a site for the survey of the entomofauna of the Simuliidae family. Phylogenetic ally the simmers are an important group at the base of dipterans (mosquitoes and flies). Embryonic development studies of the ducts are restricted to the *Drosophila melanogaster* fly. The present work aimed to evaluate: 1) The importance of factors in the proliferation of Simuliidae species in the Atalaia Park; 2) Preliminary analysis of the embryonic development of Simuliidae from in situ collections and a laboratory capture system. Keywords: *Simulium anamariae*, *Simulium perflavum*, *Simulium pertinax*, *Simulium subpallidum*, *Simulium inaequale*, *Simulium auripellitum* and *Simulium subclavibrachium*. In addition, we noted that the abiotic factors that influenced the proliferation and dispersion of the species for pH and conductivity of the water. Also in this work, simulators were created for ten days and a possible identification of structures of the Simuliidae embryo as: cephalic fan, anterior and posterior region of the embryo, anal discotheque and thorax segments. In conclusion, the results of the studies show an importance of the surveys of the Simuliidae entomofauna of the region, as well as the developmental biology studies for the understanding of Diptera.

Keywords: Entomofauna, Mosquitoes, Evo-Devo.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- IDENTIFICAÇÃO, RIQUEZA, DISTRIBUIÇÃO E ECOLOGIA DA FAMÍLIA SIMULIIDAE NO PARQUE NATURAL MUNICIPAL ATALAIA

INTRODUÇÃO _____	1
OBJETIVOS _____	6
METODOLOGIA _____	6
RESULTADOS _____	13
DISCUSSÃO _____	33
CONCLUSÕES _____	40

CAPÍTULO 2- “CRIAÇÃO EM LABORATÓRIO E ESTUDOS DE BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DA FAMÍLIA SIMULIIDAE DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL ATALAIA”

INTRODUÇÃO _____	41
OBJETIVOS _____	43
METODOLOGIA _____	43
RESULTADOS _____	48
DISCUSSÃO _____	52
CONCLUSÕES _____	56

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	57
---	-----------

ANEXOS _____	67
---------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

APA – Área de Proteção Ambiental

CCA- Análise de correspondência canônica

CEDAE- Companhia Estadual de Águas e Esgoto

COI- *Citocromo Oxidase I*

DAPI- 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DNA- Ácido desoxirribonucleico

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz

NMDS- Escalonamento Multidimensional Não-métrico

NUPEM - Instituto Especializado de Biodiversidade e Sustentabilidade

pH- potencial hidrogênico

PNMA - Parque Natural Municipal Atalaia

TDS- Total de Sólidos Dissolvidos

UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estudos com insetos em unidades de conservação, particularmente em destaque o estudo com a família Simuliidae. **A-** Parque Natural Municipal Atalaia localizado no município de Macaé. Imagem obtida: www.odebateon.com.br. **B-** Distribuição dos organismos, classe Insecta como a ordem mais abundante da terra. Imagem Obtida de Grimaldi & Engel, 2005. **C-** Adulto da família Simuliidae realizando repasto sanguíneo. Imagem obtida de: www.studio.fm.br. **D-** Pesquisa realizada pela Fiocruz- Fundação Oswaldo Cruz com borrachudos. Imagem obtida de: <https://www.youtube.com/watch?v=8YntzpbwZ0A>.

Figura 2: Localização dos pontos delimitados no Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, RJ. Os pontos que se encontram na linha vermelha representam aqueles localizados no córrego do Mirante e os pontos marcados sobre a linha azul representam aqueles localizados no córrego Atalaia.

Figura 3: Investigação de folhiços, pedras e pedaços de tronco atrás de ovos e fases imaturas de simulídeos. Imagem obtida por: Alessandra da Silva de Alvarenga.

Figura 4: Instalação das armadilhas de Malaise para captura de adultos de simulídeos, no ponto de coleta ATA 02, localizado no córrego do Mirante no Parque Natural Municipal Atalaia. Imagem obtida por: Lucas Santos da Cruz.

Figura 5: Aparelhos utilizados para fazer a medição dos fatores abióticos. Em **A-** oxímetro da marca YSI, modelo 550A e em **B-** condutivímetro da marca EcoSence e modelo EC330A.

Figura 6: Ponto de coleta ATA 01, localizado no Parque Natural Municipal Atalaia, está inserido no córrego do Mirante. Esse ponto se encontra na sede do Parque, perto dos dormitórios e nele há um cano formando um pequeno lago, onde os visitantes utilizam para lazer.

Figura 7: Ponto de coleta ATA 02, localizado no Parque Natural Municipal Atalaia, está inserido no córrego do Mirante. Esse ponto se encontra perto da ponte de corda, nele há um cano formando uma cascata, onde os visitantes podem utilizar para banho. Essa também é uma área bem aberta e que se encontra no meio de uma das trilhas do Parque.

Figura 8: Ponto de coleta ATA 03, localizado no Parque Natural Municipal Atalaia, está inserido na trilha do córrego do Atalaia. Esse é o primeiro ponto de coleta dessa trilha. É uma área com pequenas clareiras localizadas ao longo do curso do riacho, mas em sua maior parte o riacho é sombreado com muitas áreas escuras.

Figura 9: Ponto de coleta ATA 04, localizado no Parque Natural Municipal Atalaia, está inserido na trilha do córrego do Atalaia. Esse é o segundo ponto de coleta dessa trilha. É uma área bem aberta, com clareiras. O riacho, nesse ponto, é cortado por uma ponte que passa no meio da trilha.

Figura 10: Ponto de coleta ATA 05, localizado no Parque Natural Municipal Atalaia, está inserido na trilha do córrego do Atalaia. Esse é o terceiro e último ponto de coleta dessa trilha. É uma área com a mata fechada, com poucas áreas de clareiras. Há nesse ponto uma interferência da CEDAE, em que a empresa possui uma caixa d' água e periodicamente realiza a manutenção e inspeção da água nesse ponto.

Figura 11: Estágio de pupa de simúlideo. Em **A-** Pupa de *S. inaequale* com tricomas cefálicos com 2 a 4 ramos indicadas pela seta vermelha. Em **A'**- Tricomas cefálicos visto em aumento maior de 60x **B-** pupa de *S. subclavibrachium* de filamentos branquiais com porção final suavemente espessadas ou ápice “mamiforme” como indicado pela seta em vermelho. Em **B'**- Ápice do filamento branquial com aspecto mamiforme em aumento de 60x.

Figura 12: Estágio de pupa de simúlideos. Em **A-** Pupa de *S. auripellitum* com ramificação secundária do ramo primário ventral mais próximo da base como indicado pela seta em Vermelho. Em **B-** A região circular destacada em vermelho mostra o casulo da pupa de *S. anamariae*, com duas projeções na base **C-** Pupa de *S. anamariae* com oito filamentos branquiais como indicado pela seta vermelha.

Figura 13: Análise taxonômica do estágio larval e estágio de pupa de simúlideos. Em **A-** A região circulada em vermelho mostra os dentes do hipostômio de *S. perflavum*, **B-** A região circular em vermelho mostra a mancha da cápsula cefálica com uma mancha longitudinal e duas manchas laterais. Em **C-** Casulo da pupa de *S. perflavum*, com uma constrição na abertura do casulo e em **D-** pupa composta de oito filamentos branquiais como mostrado pelas setas em vermelho.

Figura 14: Análise taxonômica do estágio larval e estágio de pupa de simuliídeos. Em **A-** A região circulada em vermelho mostra os dentes do hipostômio de *S. pertinax*, **B-** A região circular em vermelho mostra a mancha da cápsula cefálica com uma forma pentagonal. Em **C-** Casulo da pupa de *S.pertinax*, com tramas compactas e em **D-** pupa composta de oito filamentos branquiais arqueados como indicado pelas setas em vermelho.

Figura 15: Análise taxonômica do estágio larval e estágio de pupa de simuliídeos. Em **A-** A região circulada em vermelho mostra os dentes do hipostômio de *S.subpallidum*, **B-** A região circular em vermelho mostra a mancha da cápsula cefálica com uma forma de seta. Em **C-** Casulo da pupa de *S.subpallidum*, com tramas não compactas e em **D-** filamentos branquiais ramificando-se próximos da base indicados pelas setas em vermelho.

Figura 16: Riqueza de espécies por campanhas de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia. Gráfico obtido pelo programa Microsoft Excel 2010, a partir dos dados tabelados. Na Estação Chuvosa foram realizadas três coletas e na estação seca, duas coletas.

Figura 17: Riqueza de espécies por pontos de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia. Gráfico obtido pelo programa Microsoft Excel 2010, a partir dos dados tabelados. Foram realizadas cinco coletas em cada um dos pontos.

Figura 18: Análise de correspondência canônica (CCA) para a distribuição de espécies na fase de larva em relação às variáveis ambientais nos córregos estudados do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro. *Onde se lê:* *S.inaequale* = *Simulium inaequale*; *S.subpa*= *Simulium subpallidum*; *S.perti*= *Simulium pertinax*, *S.perfl*= *Simulium perflavum*; Condutiv= Condutividade (μS); Salinida= Salinidade (μS); pH= pH; Vaz.o (m = Vazão (m/s^2); Temperat= Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$); $^1\text{O}_2$ disso= O_2 dissolvido (%); $^2\text{O}_2$ disso= O_2 dissolvido (mg/L). Destaque no circulo azul para a variável significativa condutividade ($p\text{-valor} \leq 0,05$).

Figura 19: Análise de correspondência canônica (CCA) para a distribuição de espécies na fase de pupa em relação às variáveis ambientais nos córregos estudados do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro. *Onde se lê:* *S. anamr*= *S.*

anamariae; *S. subcl*= *S. subclavibrachium*; *S. inaequale* = *Simulium inaequale*; *S. subpa*= *Simulium subpallidum*; *S. perti*= *Simulium pertinax*, *S. perfl*= *Simulium perflavum*; Condutiv= Condutividade (μS); Salinida= Salinidade (μS); pH= pH; Vaz.o (m = Vazão (m/s^2); Temperat= Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$); $^1\text{O}_2$ disso= O_2 dissolvido (%); $^2\text{O}_2$ disso= O_2 dissolvido (mg/L). Destaque no círculo azul para a variável significativa pH ($p\text{-valor} \leq 0,05$).

Figura 20: Fatores abióticos que influenciam diferencialmente a ocorrência de diferentes pontos do PNMA. Diagrama de ordenação do tipo Escalonamento Multidimensional Não métrico (NMDS) construído a partir do índice de dissimilaridade de Bray-Curtis para coletas de larvas nas duas campanhas de coletas: estação chuvosa e estação seca para os cinco pontos de coleta do Parque Natural Municipal Atalaia correlacionando com os fatores abióticos analisados. Onde se lê: 1= ATA01, 2=ATA02, 3=ATA03, 4=ATA04 e 5=ATA05.

Figura 21: Fatores abióticos influenciam diferencialmente a ocorrência de diferentes pontos do PNMA. Diagrama de ordenação do tipo Escalonamento Multidimensional Não métrico (NMDS) construído a partir do índice de dissimilaridade de Bray-Curtis para coletas de pupas nas duas campanhas de coletas: estação chuvosa e estação seca para os cinco pontos de coleta do Parque Natural Municipal Atalaia, correlacionando com os fatores abióticos analisados. Onde se lê: 1= ATA01, 2=ATA02, 3=ATA03, 4=ATA04 e 5=ATA05.

Figura 22: Árvore obtida com auxílio do programa Mega-X Molecular Evolutionary Genetics Analysis, a partir do método Neighbor- Joining, em que o mesmo modelo mostra a árvore mais parcimoniosa de relações filogenéticas entre as quatro espécies cujo sequenciamento foi feito: *S. anamariae*, *S. perflavum*, *S. pertinax* e *S. subpallidum*. As espécies destacadas em vermelho são encontradas no Parque Natural Municipal Atalaia.

Figura 23: Aquário número 1 com 50 cm de comprimento, 25 cm de largura, 30 cm de altura e volume calculado de 37,5 litros, para a criação de larvas de simuliídeos. Em **A-** observa-se o aquário de cima, em que **1:** Cascata de água; **2:** bomba filtro da marca Sarlo Better e com vazão de 60/170 L/h; **3:** bomba de água marca Sarlo Better mini e com vazão de 400/1000 L/h; **4:** rocha; **5:** vegetação artificial. Em **B-** Temos a vista

lateral do aquário, devidamente identificado com nome do discente, laboratório e nome do orientador.

Figura 24: Aquário número 2 apresenta 35 cm de comprimento, 40 cm de altura, 30 cm de largura, com volume calculado de 42 litros, destinado à criação de pupas e adultos de simulídeos. Em **A-** observa-se o aquário lateralmente. Em **B-** Temos a vista dos equipamentos internos do aquário, onde em **6:** bomba de aeração que garante o movimento da água; **7:** recipiente de vidro para simular um corpo d' água; **8:** placa de petri com papel filtro onde as pupas permanecerão até a eclosão.

Figura 25: As imagens a seguir representam em **A-** gaiola feita com potes plásticos de tamanho 20x 30 cm e tampadas com Tulling, onde os simulídeos foram mantidos e em **B-** BOD de marca TecNal e modelo TE- 371.

Figura 26: Em **A-** Fítilhos de polietileno nas cores: **1-** Branco, **2-** amarelo-claro e **3-** azul-claro utilizado para obtenção de ovos de simulídeos em ambiente natural. Em **B-** Fítilhos sendo colocados em ambiente natural. **C-** Massa de ovos coletados na fita de cor amarela- claro.

Figura 27: Ovo de simulídeo separado da massa de ovos e fotografado em Estereoscópio Leica M205.

Figura 28: Preferência de coloração em fítilhos de polietileno por fêmeas de simulídeos do Parque Natural Municipal Atalaia.

Figura 29: Embriões de Simulídeos corados com DAPI. Em **(A/A')**- Região anterior do embrião, **A1** - cabeça e **A2** – ocelos. Em **(B/B')**- **B1-** Região da pro-leg e região posterior em **B2**. Em **(C/C')**- Região anterior do embrião, com possível região do leque cefálico em **C1** e em **(D/D')**- as setas **D1** - Possíveis segmentos do embrião e **D2-** possível região do disco anal. Barra de escala: 1 mm.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localização, latitude, longitude e caracterização dos córregos amostrados no Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro.

Tabela 2: Distribuição simplificada da ocorrência das sete espécies catalogadas de Simuliidae por pontos e campanhas de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia. Os pontos onde os organismos foram encontrados estão pintados na cor azul.

Tabela 3: Abundância de indivíduos por espécies para cada campanha realizada no Parque Natural Municipal Atalaia.

Tabela 4: Resultado do Índice de Simpson, Equitabilidade e Dominância para as duas campanhas de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia.

Tabela 5: Abundância de indivíduos por espécies para cada ponto de coleta do Parque Natural Municipal Atalaia.

Tabela 6: Resultado do Índice de Simpson, Equitabilidade e Dominância para os pontos de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia.

Tabela 7: Dados referentes ao tipo de substrato onde os imaturos de simulídeos foram encontrados nas campanhas realizadas. Os símbolos **X-** presença de imaturos nos substratos e **0-** ausência de imaturos nos substratos.

Tabela 8: Variáveis ambientais utilizadas para Análise de Correspondência Canônica e sua significância na abundância de espécies da distribuição de espécies para a fase de larva capturadas nos córregos do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro.

Tabela 9: Variáveis ambientais utilizadas para Análise de Correspondência Canônica e sua significância na abundância de espécies da distribuição de espécies na fase de pupa capturadas nos córregos do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro.

Tabela 10: Desenvolvimento e sobrevivências de simulídeos do Parque Natural Municipal Atalaia em condições laboratoriais.

Tabela 11: Valores dos fatores abióticos medidos em condições laboratoriais de acordo com as tentativas de criação de simulídeos em laboratório.

Tabela 12: Dados dos Fatores abióticos coletados em campo no Parque Natural Municipal Atalaia.

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação apresentada está dividida e organizada da seguinte forma: O primeiro capítulo, intitulado: **“Identificação, riqueza, distribuição e Ecologia da família Simuliidae no Parque Natural Municipal Atalaia”**, apresenta a importância do Bioma Mata Atlântica, bem como os estudos com a família Simuliidae nesse tipo de bioma, a relação da sua distribuição, riqueza e abundância no Parque Natural Municipal Atalaia correlacionados com os fatores abióticos medidos na própria área do Parque, além das relações filogenéticas do grupo na evolução dos dípteros. No segundo capítulo, denominado: **“Criação em laboratório e estudos de Biologia do Desenvolvimento da família Simuliidae do Parque Natural Municipal Atalaia”**, será abordada a Família Simuliidae como um possível modelo de estudo de Biologia Evolutiva do Desenvolvimento (EVO-DEVO), desde sua criação até sua manutenção em ambiente laboratorial, bem como as características embrionárias observadas pelo nosso grupo de pesquisa ao longo do presente estudo.

Capítulo 1

Identificação, riqueza, distribuição e Ecologia da família
Simuliidae no Parque Natural Municipal Atalaia

INTRODUÇÃO

As áreas consideradas especiais por suas características naturais precisam de constante proteção, uma vez que são alvo de atividades antrópicas de impacto. Visando a proteção dessas áreas, o poder público criou as unidades de conservação (Parques, Reservas e Áreas de Proteção Ambiental- APA's). As APA's são áreas onde a proteção se concentra em uma gestão participativa e no trabalho pelo uso dos recursos naturais de forma sustentável (Jacintho 2003).

As áreas Naturais protegidas por meio de unidades de conservação garantem mínimas perturbações e intervenções do ser humano nos recursos naturais. Essas unidades garantem a preservação e proteção do patrimônio natural existente (de Castro et al. 2008). Dessa forma, por ser um bioma ameaçado, devido a sua elevada diversidade biológica, a Mata Atlântica tornou-se um importante hotspot de biodiversidade do mundo (Mittermeier et al. 2005).

A Mata Atlântica foi uma das florestas tropicais das Américas com maior número de hectares, cerca de 150 milhões, apresentando condições ambientais heterogêneas, desde florestas muito úmidas, localizadas próximas à costa litorânea, até florestas mais secas, localizadas no interior do continente. Distribui-se por 17 estados brasileiros, desde o Rio Grande do Sul até o Rio Grande do Norte (Ribeiro et al. 2009; Moura 2006; DaSilva et al. 2011). A grande heterogeneidade topográfica e climática desse bioma lhe confere uma alta diversidade e endemismo de espécies, já que, em termos de amostragem de espécies por Km², os biomas de Mata Atlântica e Caatinga são os que apresentam uma amostragem maior, com mais coletas realizadas para grupos taxonômicos como aves, reptéis e mamíferos, quando relacionados com a Amazônia, Cerrado, Pampa e Pantanal (Leal and de Gusmão Câmara 2003, Oliveira et al. 2017).

Devido a sua heterogeneidade, a Mata Atlântica apresenta fitofisionomias diferentes entre suas porções. Além disso, diversas formações encontram-se associadas a esse bioma, como: brejos, mangues, restingas e formações campestres de altitude (Tabarelli et al. 2005).

A partir da colonização europeia há 500 anos, o bioma Mata Atlântica passou a sofrer processos de alteração de sua condição original, com concomitante perda de habitat, caça e extração de recursos vegetais de importância econômica. Esses fenômenos têm levado à extermínio de espécies raras e endêmicas, além de acarretar em diversos exemplos de espécies que passaram a figurar na lista de espécies ameaçadas de extinção, sendo que

algumas, muitas vezes, ainda nem foram estudadas (Silva 2015; Borém and Oliveira-Filho 2002).

Dentre os vários grupos ainda pouco estudados, no bioma Mata Atlântica e em áreas de proteção ambiental desse bioma, encontram-se os artrópodes. A falta de estudos com esse grupo é relacionada, principalmente, ao seu padrão de distribuição geográfica por diferentes habitats, o que leva a problemas de amostragem por pesquisadores e também a carência de especialistas para diversos grupos (Oliveira et al. 2017). O filo Artrophoda é o mais numeroso em relação à quantidade de organismos na Terra, mais de 1 milhão de espécies conhecidas e que, ao longo do tempo, desenvolveram características que permitiram a conquista de inúmeros ambientes (Lester and Roubal 1995).

Dentro do filo Artrophoda estão inclusos os insetos, um grupo animal abundante na Terra, compreendendo, pelo menos, 75% das espécies de animais, com as mais recentes estimativas atingindo mais de cinco milhões de espécies. Esses organismos vivem na Terra há pelo menos 480 milhões de anos e, durante o tempo de existência dos mesmos, evoluíram em diversas formas, diversificaram-se em diferentes ordens e ocupam quase todos os habitat do planeta (Grimaldi et al. 2005; Moura 2006).

Os insetos são dotados das mais diversas formas, ocupam diversos ecossistemas do planeta e apresentam diferentes nichos ecológicos (Gullan et al. 2007). Dentre os insetos, os Dipteras apresentam uma riqueza de espécies elevadas, com aproximadamente 152.000 espécies descritas (revisito por Schmidt-Ott and Lynch 2016). Esses organismos se diferenciam dos demais pela presença de um segundo par de asas reduzidas, chamadas de halteres, que, segundo hipóteses evolutivas, apresentam a função de equilíbrio para os insetos dessa Ordem (Balbierato 2016).

Além disso, sua importância ecológica, econômica, médica ou veterinária são características marcantes do grupo. Nessa ordem, encontra-se a família Simuliidae, Dipteras com distribuição mundial, encontrados em todas as regiões do planeta, exceto nos polos (Coppo and Lopes 2010). Os borrachudos (Diptera: Simuliidae) são uma família de insetos hematófagos com distribuição global, desde os trópicos até o círculo ártico, e com cerca de 2.351 espécies descritas (Adler and Crosskey 2018). Eles apresentam desenvolvimento holometábolo, suas larvas são encontradas em sistemas lóticos, associados a substratos rochosos, plantas aquáticas ou a folhiços represados (Maia et al. 2014).

Os ovos, larvas e pupas são fases aquáticas e os adultos alados se desenvolvem em ambientes terrestres, apresentando uma longevidade que pode atingir até quatro semanas

(Coscarón and Arias 2007). Os adultos de simulídeos são pequenos (2,2 mm – 6 mm), com uma coloração variada: negra, amarronzada, avermelhada ou amarelada. As fêmeas adultas apresentam dependência por sangue, uma vez que este serve de alimento e participa do processo do desenvolvimento e maturação dos ovários, visando à produção de ovos férteis que garantam a perpetuação da espécie (Maia-Herzog 1999).

Após alimentarem-se com sangue do hospedeiro, as fêmeas buscam os mais diversos substratos (galhos, pedras e folhas) que se encontram cobertos ou parcialmente cobertos por água em movimento, com níveis de agitação de intensa a moderada, já os machos se alimentam de açúcares de flores e frutos. Dessa forma, ambientes como cachoeiras, rios e córregos são locais de criação desses organismos, onde ocorre uma postura média de 200 a 300 ovos por fêmea (Baba and Takaoka 1991).

Cinco a seis dias após a postura, os ovos podem eclodir de acordo com a temperatura da água e a espécie avaliada. Outros fatores abióticos como pH, condutividade elétrica e nutrientes contidos na água são importantes para eclosão dos imaturos (Landeiro et al. 2009, Figueiró et al. 2012). Fatores como altitude e a velocidade da correnteza também podem agir sobre o desenvolvimento desses organismos (Grillet and Barrera 1997, Hamada et al. 2002, McCreadie et al. 2006).

Após a eclosão da larva a partir do ovo, as larvas se fixam ao substrato, deslocando-se sempre em direção à correnteza. As larvas permanecem presas ao substrato, com o auxílio de um líquido viscoso produzido por suas glândulas salivares. O desenvolvimento larvar ocorre em um período de aproximadamente 15 dias, com posterior formação do casulo e exúvia, dando origem à forma de pupa. No período de quatro dias forma-se a pupa, que então rompe o casulo e libera o adulto alado para a superfície dentro de uma bolha de ar (Coscarón 1981).

Tanto as formas imaturas quanto adultas são sensíveis a alterações ambientais, o que pode acarretar a proliferação ou extinção desses organismos. Embora a proliferação excessiva possa causar inúmeras perturbações para o ser humano, os simulídeos são organismos importantes para estudos ecológicos e ambientais de ambientes lóticos (Branco Junior 1991; Coppo and Lopes 2010).

Os insetos aquáticos são frequentemente utilizados como ferramentas de estudo na busca pela compreensão e avaliação de alterações ambientais em ambientes lóticos (Takeda et al. 1997, Fonseca-Gessner and Guerreschi 2000). O estudo de invertebrados aquáticos permite compreender as mudanças ecológicas oriundas de variações hidrológicas. Portanto, o estudo

desses seres proporciona valiosa informação para o estudo de ambientes límnicos (Moulton 1998).

A flutuação temporal da população de organismos, como os simulídeos em ambientes lóticos, é influenciada por fatores físico-químicos. Essa alteração pode afetar o ciclo de vida e até o domínio de espécies. Fatores físicos, como as alterações antrópicas, podem proporcionar o aumento da população, levando, conseqüentemente, a ataques em seres humanos, podendo também afetar sistemas agrícolas e o setor de turismo (Dellome Filho 1991, Dellome Filho 1992).

O despejo de matéria orgânica nos cursos d'água, causado pelo ser humano, é consequência de um tratamento inadequado de dejetos oriundos de criações de animais domésticos. Esse é um problema ambiental que causa o desequilíbrio populacional de simulídeos nos corpos d'água. A poluição contribui para o enriquecimento do ambiente, aumentando a quantidade de alimento que favorece a proliferação desses insetos ou até mesmo sua extinção do ambiente natural. Assim, a quantidade de alimento disponível em um ambiente pode levar a prevalência e abundância desses organismos no ambiente (Castex et al. 1988).

Outro fator que proporciona o aumento de simulídeos em uma região são as mudanças ocasionadas no fluxo de rios e riachos que podem causar modificações na oxigenação, temperatura ou composição química da água. Logo, alterando-se a qualidade da água também se altera o desenvolvimento dos simulídeos, uma vez que esse é um fator essencial para o seu desenvolvimento (Santos et al. 2010). Assim, simulídeos apresentam uma capacidade de responder às modificações no ambiente de forma notável, já que são organismos sensíveis a qualquer modificação de caráter biótico ou abiótico em seu habitat (Oliver et al. 1998). Sendo assim, simulídeos apresentam uma resposta demográfica e dispersiva bem rápida, a partir de intervenções antrópicas, se comparado a organismos que apresentam um ciclo de vida longo (Lewinsohn et al. 2005).

Uma explosão populacional de simulídeos em um determinado local pode se tornar um problema preocupante, uma vez que esses organismos podem ser vetores de doenças, como a Oncocercose, constituindo uma importante causa de morbidade no mundo (Tauil 2002). Em continentes, como as Américas, os simulídeos são designados como os principais vetores da Oncocercose, que apresenta como agente etiológico a *Onchocerca volvulus* (Leuckart) (Sá and Maia-Herzog 2003). Devido ao incômodo que as reações e lesões secundárias de suas

picadas causam nos seres humanos, os simúlídeos são mosquitos bem conhecidos pelas pessoas (Maia et al. 2014; Strieder et al. 2006).

Dentre todas as espécies de Simúlídeos já registradas, estima-se que 10% delas atacam o homem e os animais domésticos, e destas, 40 são de interesse médico ou veterinário como vetores de doenças, além de suas picadas serem muito incômodas (Py-Daniel 2003). Por possuírem um hábito hematófago voraz, as fêmeas afetam e podem limitar atividades rotineiras das pessoas, além de afetar negativamente o desenvolvimento econômico de algumas regiões com vocação turística e econômica (de Arruda Buffolo et al. 2016).

Dessa forma, o conhecimento das espécies que compõe uma localidade, subsidia informações para o manejo da biodiversidade local, o conhecimento das espécies que ali ocorrem, o descobrimento de novas espécies para Ciência e ainda permite identificar espécies que são bioindicadoras ambientais, além de possíveis espécies vetores (Mikkelsen and Cracraft 2001). Portanto, os primeiros passos para a conservação de áreas ambientais e da biodiversidade é identificar, descrever, mapear e quantificar as espécies (Gondim et al. 2011).

Assim, essa pesquisa, que foi desenvolvida no PNMA pelo NUPEM/UFRJ, proporcionou o conhecimento sobre as espécies presentes no Parque, possibilitando a sua catalogação nesse fragmento de Mata Atlântica, por meio de análises morfológicas. Além, de ter gerado dados iniciais sobre espécies encontradas no Brasil, acerca da filogenia deste grupo.

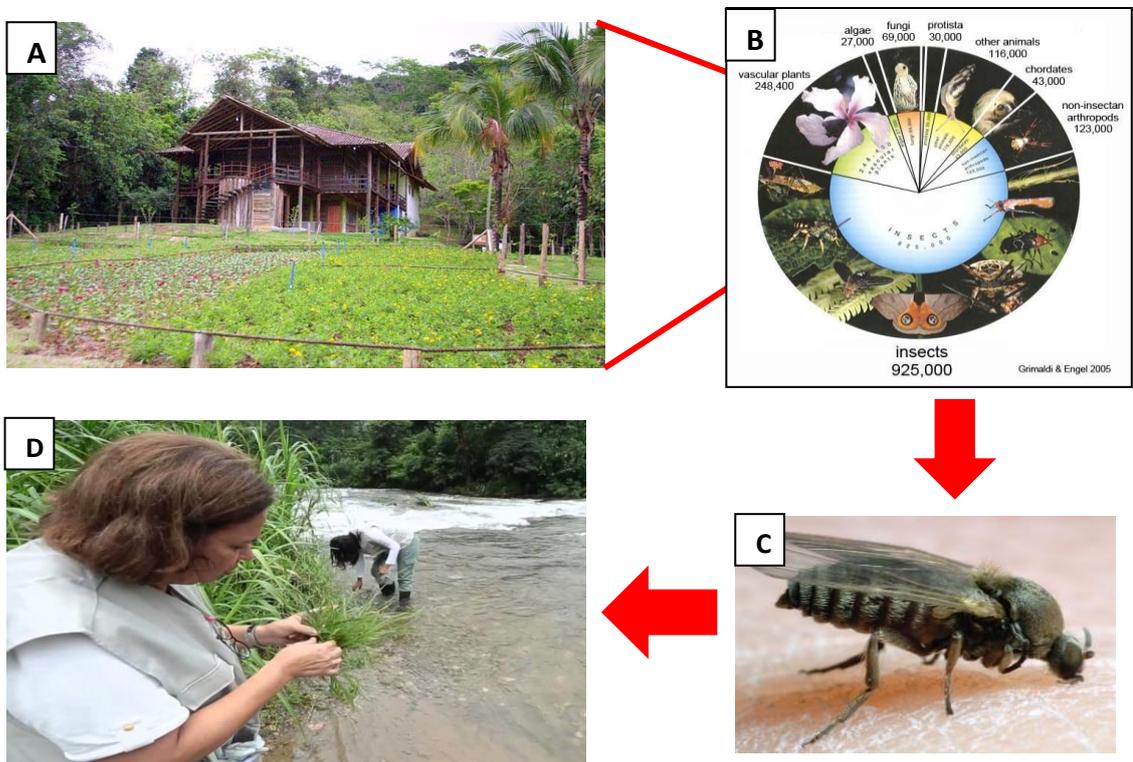


Figura 1: Estudos com insetos em unidades de conservação, particularmente em destaque o estudo com a família Simuliidae. **A-** Parque Natural Municipal Atalaia localizado no município de Macaé. Imagem obtida: www.odebateon.com.br. **B-** Distribuição dos organismos, classe Insecta como a ordem mais abundante da terra. Imagem Obtida de Grimaldi & Engel, 2005. **C-** Adulto da família simuliidae realizando repasto sanguíneo. Imagem obtida de: www.studio.fm.br. **D-** Pesquisa realizada pela Fiocruz- Fundação Oswaldo Cruz com borrachudos. Imagem obtida de: <https://www.youtube.com/watch?v=8YntzpbwZ0A>.

OBJETIVOS

Identificar a fauna de Dipteros da família: Simuliidae, encontradas no Parque Natural Municipal Atalaia; verificar a diversidade, dominância e equitabilidade dessa família e avaliar a influência de fatores abióticos na distribuição, riqueza e abundância desses organismos.

METODOLOGIA

Área de estudo e pontos de coleta

O presente estudo foi realizado em riachos que compõem um remanescente de bioma de Mata Atlântica na cidade de Macaé, no estado do Rio de Janeiro (Figura 1). Foram amostrados dois córregos: o córrego Atalaia, que é composto de três pontos de coleta (ATA 03, ATA 04 e ATA 05) e o córrego do Mirante, com dois pontos de coleta (ATA 01 e ATA 02), sendo o ponto ATA 01 localizado perto da sede do Parque. Esses córregos encontram-se localizados na Bacia Hidrográfica do Rio Macaé e inseridos no perímetro do PNMA. No Parque, a estação chuvosa em nosso estudo foi delimitada de dezembro a maio e a estação seca de junho a novembro.

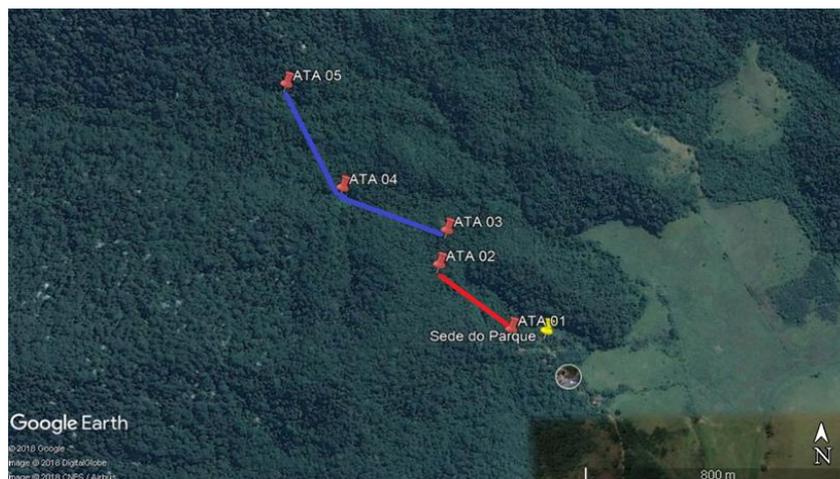


Figura 2: Localização dos pontos delimitados no Parque Natural Municipal Atalaia. Macaé, RJ. Os pontos que se encontram na linha vermelha representam aqueles localizados no córrego do Mirante e os pontos marcados sobre a linha azul representam aqueles localizados no córrego Atalaia.

Levantamento de Fauna Simuliidae:

Foram realizadas duas campanhas piloto nos meses de agosto e setembro de 2017, antes das campanhas oficiais. Após as coletas piloto, no ano de 2018, iniciaram-se as campanhas oficiais de coleta no Parque. As campanhas foram separadas em dois blocos: campanha de estação chuvosa, que correspondeu à transição entre as estações de verão e outono; e campanha de estação seca, que correspondeu à transição entre inverno e primavera. Com isso, foram feitas três coletas na campanha chuvosa, correspondente aos meses de: fevereiro, março e abril, e duas coletas na campanha de estação seca, que correspondeu aos meses de: agosto e setembro. As coletas foram realizadas uma vez por mês, dentro dos meses citados.

Os imaturos foram coletados a partir da investigação de folhas, pedras, galhos e plantas aquáticas. Em cada ponto de coleta os substratos foram investigados por um tempo de uma hora. Os exemplares obtidos foram acondicionados em tubos falcon de 15 ml, etiquetados com papel vegetal escrito à caneta Nankin, contendo álcool etílico a 70%. No papel vegetal foram discriminados os dados de coleta, como data de coleta, localização, nome do (os) coletor, marcação em GPS e ponto de coleta.



Figura 3: Investigação de folhiços, pedras e pedaços de troco atrás de ovos e fases imaturas de simulídeos. Imagem obtida por: Alessandra da Silva de Alvarenga.

Para captura de indivíduos adultos, foram instaladas armadilhas de Malaise nos cinco pontos de coletas. As armadilhas permaneceram nos pontos durante uma semana. Após esse período, as redes foram retiradas e os organismos capturados foram acondicionados nos frascos de plástico da própria armadilha, preenchidos com álcool 70%. Os exemplares foram levados para o Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais, localizado no NUPEM/UFRJ, onde foi feita a triagem do material, separando os insetos da família simuliidae dos demais, pertencentes a outras Ordens e Famílias. Ressalta-se que indivíduos adultos não foram encontrados nas armadilhas.



Figura 4: Instalação das armadilhas de Malaise para captura de adultos de simulídeos, no ponto de coleta ATA 02, localizado no córrego do Mirante, no Parque Natural Municipal Atalaia. Imagem obtida por: Lucas Santos da Cruz.

Medição dos fatores abióticos:

Em cada ponto de coleta foram medidos os valores de temperatura da água (°C), temperatura do ar (°C), pH, oxigênio dissolvido O₂ (mg/L⁻¹) e (%), vazão (m/s²), salinidade (μS), TDS (μS), condutividade (μS). Esses fatores abióticos foram medidos com o auxílio de um condutivímetro e um oxímetro das marcas YSI modelo 550A e EcoSence modelo EC300A, gentilmente cedidos pelo laboratório de Ecologia Aquática do NUPEM/UFRJ.

Os padrões, espacial e temporal, de distribuição das espécies encontradas nas coletas foram analisados através de técnicas de ordenação multivariada para extrair estes padrões, como CCA (Análise de Correspondência Canônica) e NMDS (Escalonamento Multidimensional Não Métrico). Para isso, utilizamos os programas estatísticos: Past 3.14 e Canoco 4.5.

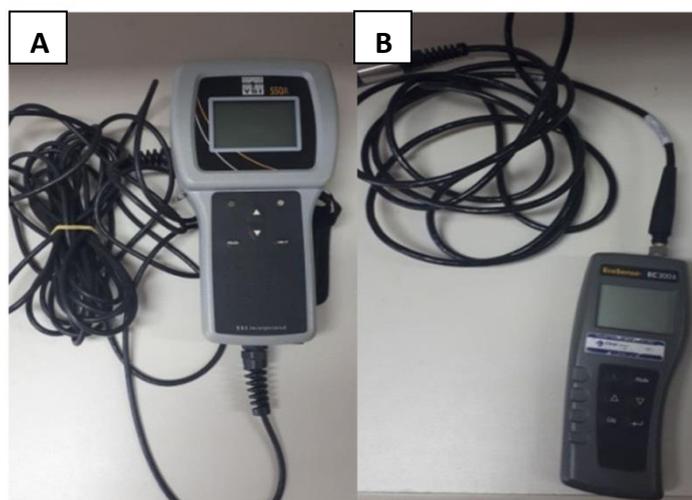


Figura 5: Aparelhos utilizados para fazer a medição dos fatores abióticos. Em **A**- oxímetro da marca YSI, modelo 550A e m **B**- condutivímetro da marca EcoSence e modelo EC330A.

Identificação morfológica da família Simuliidae do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro, Brasil.

A identificação morfológica dos simuliídeos capturados foi realizada em laboratório e inicia-se com a aplicação de um protocolo proposto por Maia-Herzog (2003), que consiste em uma fase química de degradação das partes moles, fixação das partes rígidas, com posterior separação dessas partes e montagem entre lâmina e lamínula. Quando necessário, os caracteres das larvas são fotografados para auxiliar na identificação.

As pupas são identificadas com base em características externas aparentes. Para a identificação taxonômica de larva e pupa, utilizou-se bibliografia especializada, como (Hamada et al. 2014; Hamada et al. 2002; Hamada et al. 2006; Gil-Azevedo et al. 2005;), além de outros trabalhos originais de descrição de espécies, uma vez que, para essa família, não há chaves de identificação bem estabelecidas. A identificação foi realizada no Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais da UFRJ/ NUPEM, com auxílio de microscópio óptico Nikon model 80i e Lupa Olympus Phillipines modelo LZ2-LGCL. Posteriormente, os organismos são fotografados e catalogados. As fotografias são obtidas na lupa Leica M205 presente no NUPEM.

Análise molecular e filogenética da família Simuliidae do Parque Natural Municipal Atalaia

No presente estudo foram utilizados organismos previamente identificados morfológicamente por chaves dicotômicas e literatura especializada. Foi utilizado um indivíduo na fase de pupa de quatro das espécies encontradas nas coletas de campo: *S. perflavum*, *S. subpallidum*, *S. pertinax* e *S. anamariae*. Com isso, realizamos a identificação molecular pois esta diminui possíveis erros de identificação, uma vez que a plasticidade fenotípica e a variabilidade genética nos caracteres empregados para o reconhecimento de espécies podem, levar a uma identificação incorreta, essa abordagem omite taxas morfológicamente crípticas, que são comuns em vários grupos, chaves morfológicas freqüentemente são eficientes somente para um estágio do ciclo de vida e assim muitos indivíduos não podem ser identificados e embora versões interativas e modernas representem o principal avanço, o uso de chaves de identificação muitas vezes demanda a necessidade de recorrer a um especialista para não comprometer a identificação. Para realizar a extração, utilizamos Kit Extração Mini Spin Plus, da empresa BIOPUR, para extração de DNA genômico de simulídeos. O DNA genômico total dos simulídeos foi isolado a partir da maceração dos indivíduos previamente armazenados e fixados em solução de etanol 95%. Esse processo foi realizado para cada um dos indivíduos separadamente.

Os organismos foram separados em microtubos eppendorfs de 1,5 mililitros e permaneceram em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos ou até secar completamente o álcool. Em seguida, foram adicionados 200 µL de Solução para Lise do Núcleo à amostra de

tecido muscular no eppendorf procedeu-se com a maceração do tecido, utilizando um bastão plástico (pistilo) esterilizado. Após a maceração, foram colocados 20 μ L de Proteinase K, após esse processo as amostras foram homogeneizadas, realizando uma rápida centrifugação de 5 segundos, seguido de homogeneização, utilizando equipamento do tipo vórtex. As amostras seguiram então para incubação em banho seco a 56°C por 1 hora. Após esse processo, foram adicionados 200 μ L de tampão B6 de ligação, ocorrendo novamente uma homogeneização utilizando o vórtex e os microtubos foram identificados. Após pipetar o tampão de ligação, foi realizada uma rápida centrifugação novamente (spin), coletou-se todo sobrenadante, sendo este último colocado em um tubo contendo uma “coluna”, tomando cuidado sempre para não coletar fragmentos da amostra. Logo após, centrifugamos por 2 min a 13.000g. Descartou-se o líquido no tubo abaixo da coluna e partimos para a etapa de lavagem. Nessa etapa, adicionou-se 500 microlitros de tampão I de lavagem, centrifugou-se por 1 min a 13.000g, descartou-se o líquido filtrado e adicionou-se 8000 μ L de tampão II de lavagem. Novamente, centrifugou-se por 1min a 13.000g, descartou-se o filtrado com pipeta, centrifugou-se novamente por 4 min a 13.000g para eliminar todo etanol e colocou-se 80 μ L de tampão de eluição. Após essa etapa, colocou-se para incubar a temperatura ambiente por 1 min, depois se colocou na centrífuga a 800g por 1 min e então se usou o Nanodrop para quantificar o DNA. Em um equipamento denominado Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) utilizando as razões de (260nm/280nm e 260nm/230 n/m). Colocou-se um microlitro das amostras para realizar a quantificação. Realizou-se a higienização do Nanodrop com H₂O de injeção, clicar em Blank no programa para zerar e após Measure para quantificar (DO: 10-50ng/ mL).

Amplificação do DNA pela técnica de PCR

A reação em cadeia pela polimerase (PCR), do inglês *Polymerase Chain Reaction* é uma técnica utilizada na biologia molecular para produzir cópias em grande quantidade de uma determinada sequência de DNA específica de um genoma Saiki et al. 1988. A PCR compreende três etapas: desnaturação, anelamento dos primers (emparelhamento de iniciadores) e extensão do iniciador (Mullis et al. 1989). Cada um desses passos corresponde a eventos distintos e requer a incubação da mistura da reação a diferentes temperaturas ótimas de funcionamento (Porta and Enners 2012). No presente estudo, o fragmento de DNA alvo foi o Gene da Subunidade I de Citocromo c Oxidase (COI) do genoma mitocondrial que foi

amplificado, utilizando o par de iniciadores "universal" LCO 1490 e HCO 2198 e *Taq* DNA Polymerase (Promega) (Rivera and Currie 2009). Esse gene foi utilizado por ser bem conservado em diferentes organismos. Foi incluído um controle negativo na amplificação contendo todos os reagentes, incluindo o par de iniciadores, sem o DNA molde dos simulídeos, com a finalidade de verificar possíveis contaminações. A reação de PCR foi realizada a um volume total de 25ul. O protocolo utilizado na PCR, programado no termociclador, incluiu uma temperatura de desnaturação inicial de 98°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 1 min, uma temperatura de anelamento de 40 °C durante 1 min e extensão com a *Taq* DNA polimerase a 72 °C durante 1,5 min, com uma extensão final de 7 min a 72 °C (Rivera, Martins et al. 2012).

Eletroforese em gel

A eletroforese em gel é uma técnica muito utilizada em análises de macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. A eletroforese em gel de agarose é a técnica mais difundida para separação de moléculas de DNA com relação ao tamanho (Magalhães et al. 2005). A eletroforese de DNA é normalmente realizada em gel de agarose. A eletroforese em gel pela ação de um campo elétrico é uma técnica utilizada para separar e estimar o tamanho de fragmentos de macromoléculas (Rivera et al. 2012). Os fragmentos de DNA, ao serem expostos a um campo elétrico, migram em direção ao polo positivo, uma vez que apresentam carga negativa. Os produtos de PCR amplificados, nesse estudo, foram verificados quanto à amplificação e ao tamanho dos fragmentos de agarose a 2% corados com 1,5µL Brometo de Etídeo (1µg/µL) a 100 v por 25 minutos, seguida de visualização sob trans-iluminação de luz ultravioleta (UV). A solução tampão utilizada para a eletroforese foi o TBE (Tris/Borato/EDTA) a concentração de 0,5X. Os géis foram fotografados e os arquivos fotográficos armazenados em formato digital.

Sequenciamento

As extrações, amplificações e purificação dos produtos do PCR foram realizadas no Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais (LICM) do Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NUPEM, Macaé, Brasil),

enquanto o sequenciamento foi submetido à empresa Macrogen na Coréia, acompanhado dos mesmos primers usados na amplificação (Weiss 2010).

Análise de Dados do sequenciamento

Os dados da sequência de DNA foram editados e alinhados usando parâmetros padrões com Clustal, um programa usado para o alinhamento múltiplo de sequências de DNA ou proteínas (Higgins and Sharp 1989). No Bioedit sequence Alignment Editor, a sequência analisada foi ajustada manualmente e verificada a qualidade do sequenciamento. Após todas as sequências terem sido editadas, analisamos a distribuição e o agrupamento das sequências a partir do modelo de evolução Tamura 3- parameter model (TP2) presentes no programa Mega-X Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Esse programa utiliza métodos estatísticos de amostragem por boot strap, em que são realizadas 1000 replicatas, visando estimar a frequência e a confiabilidade das bifurcações. Árvores filogenéticas entre as espécies encontradas nas coletas de campo e sequências já presentes no banco de dados National Center of Biotechnological Information (NCBI).

RESULTADOS

Mapeamento e identificação dos pontos de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia

Os pontos de coleta foram previamente selecionados e marcados com o auxílio de um GPS. Além disso, os mesmos foram registrados por fotografia, como mostrado na tabela 1 e figuras 6,7,8,9 e 10 a seguir:

Tabela 1: Localização, latitude, longitude e caracterização dos córregos amostrados no Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro.

Ponto	Altitude (m)	Latitude	Longitude	Localização
ATA01	25	S 22°18' 41.3''	O 95° 59'41.5''	Córrego Mirante
ATA02	52	S 22°18' 46.2''	O 95° 59'51.8''	Córrego Mirante
ATA03	37	S 22°18' 25.2''	O 95° 59'50.8''	Córrego Atalaia
ATA04	65	S 22°18' 21.9''	O 90° 0'25.8''	Córrego do Atalaia



Figura 6: Ponto de coleta ATA 01, localizado no Parque Natural Municipal Atalaia, está inserido no córrego do Mirante. Esse ponto se encontra na sede do Parque, perto dos dormitórios e nele há um cano formando um pequeno lago, onde os visitantes utilizam para lazer.



Figura 7: Ponto de coleta ATA 02, localizado no Parque Natural Municipal Atalaia, está inserido no córrego do Mirante. Esse ponto se encontra perto da ponte de corda, nele há um cano formando uma cascata, onde os visitantes podem utilizar para banho. Essa também é uma área bem aberta e que se encontra no meio de uma das trilhas do Parque.



Figura 8: Ponto de coleta ATA 03, localizado no Parque Natural Municipal Atalaia, está inserido na trilha do córrego do Atalaia. Esse é o primeiro ponto de coleta dessa trilha. É uma área com pequenas clareiras localizadas ao longo do curso do riacho, mas em sua maior parte o riacho é sombreado com muitas áreas escuras.



Figura 9: Ponto de coleta ATA 04, localizado no Parque Natural Municipal Atalaia, está inserido na trilha do córrego do Atalaia. Esse é o segundo ponto de coleta dessa trilha. É uma área bem aberta, com muitas clareiras. O riacho nesse ponto é cortado por uma ponte que passa no meio da trilha.



Figura 10: Ponto de coleta ATA 05, localizado no Parque Natural Municipal Atalaia, está inserido na trilha do córrego do Atalaia. Esse é o terceiro e último ponto de coleta dessa trilha. É uma área com a mata fechada, com poucas áreas de clareiras. Há, nesse ponto, uma interferência da CEDAE, onde a empresa possui uma caixa d' água e periodicamente realiza a manutenção e inspeção da água nesse ponto.

Identificação de espécies de simulídeos do Parque Natural Municipal do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro

Ao longo de todas as coletas, foram coletadas 1.253 larvas e 218 pupas de simulídeos, em que estas foram utilizadas para a identificação das espécies. Contudo, dos indivíduos encontrados na fase larval, somente 721 larvas foram analisadas, pois encontravam-se em estágio de último instar que permite uma análise taxonômica mais adequada. A partir dessas larvas, foram analisadas partes, como o dente do hipostômio e a mancha da cápsula cefálica, estruturas de importância taxonômica. As pupas foram triadas e analisadas também a partir de estruturas taxonômicas externas, como os filamentos branquiais, tricomas presentes, projeções e tramas do casulo. A partir dessa triagem, foram identificadas sete espécies de simulídeos: *Simulium anamariae*, *Simulium perflavum*, *Simulium pertinax*, *Simulium subpallidum*, *Simulium inaequale*, *Simulium auripellitum* e *Simulium subclavibrachium*.

I) *Simulium inaequale*/ *Simulium subclavibrachium*

As espécies *Simulium inaequale* e *Simulium subclavibrachium* pertencem ao subgênero *Inaequalium*. Esse grupo apresenta uma difícil caracterização para larvas e adultos, sendo a identificação de seus indivíduos feita, na maioria das vezes, por meio das pupas coletadas.

Foram coletadas 6 pupas de *S. inaequale* e 4 pupas de *S. subclavibrachium*. Ressalta-se que a ocorrência dessas duas espécies só foi verificada na campanha de estação seca. Na figura 11, podemos observar as pupas das duas espécies, classificadas a partir de caracteres presentes na região dorsal de *S. inaequale* e a ponta do filamento branquial suavemente espessada e seus ápices com constrictão do tipo “mamiliforme”.

No ponto de coleta ATA 03, obtivemos uma pupa e cinco larvas de *S. inaequale* analisadas. Já a espécie *S. subclavibrachium* foi registrada nos pontos ATA 01 e ATA 05, com uma pupa encontrada no ponto ATA 01 e outras três pupas no ponto ATA 05. Ressalta-se que apenas os pontos ATA 03 e ATA 05 estão localizados no córrego do Atalaia. A ocorrência dessas espécies pode ser observada na tabela 2.

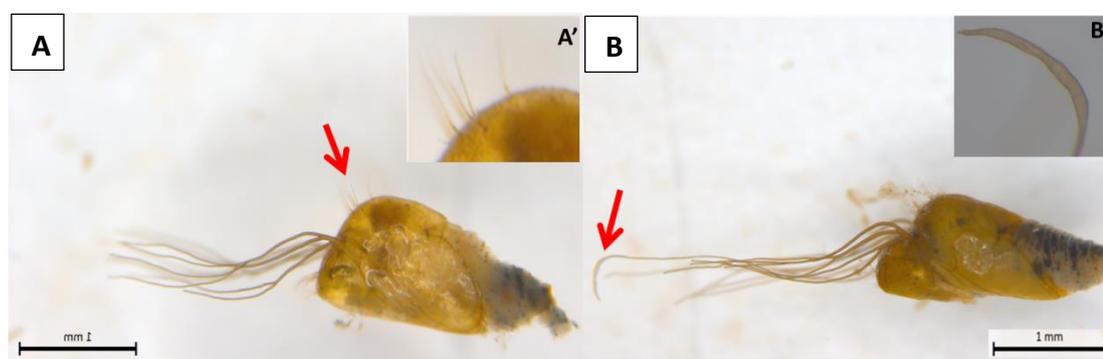


Figura 11: Estágio de pupa de simulídeos. Em **A**- Pupa de *S. inaequale* com tricomas cefálicos com 2 a 4 ramos indicadas pela seta vermelha. Em **A'**- Tricomas cefálicos visto em aumento maior de 60x **B**- pupa de *S. subclavibrachium* com filamentos branquiais com porção final dos filamentos branquiais suavemente espessadas ou ápice “mamiliforme” como indicado pela seta em vermelho. Em **B'**- Ápice do filamento branquial com aspecto mamiliforme em aumento de 60x.

II) *Simulium auripellitum*/ *Simulium anamariae*

Simulium auripellitum e *Simulium anamariae* estão agrupados no subgênero *Psaronicompsa*. Desse complexo de espécies, foi verificada a ocorrência de quatro pupas para *S. auripellitum* e 38 pupas de *S. anamariae*. Esse foi um complexo de espécies identificadas somente através de morfologia das pupas, como mostrado na figura 12.

Verificou-se que *S. anamariae* foi uma espécie com uma abundância em todos os sítios de coleta e que apareceu em todas as campanhas de coleta seca ou chuvosa. Contudo, na campanha chuvosa essa espécie prevaleceu em todos os sítios de coleta. Diferentemente, na campanha de coleta da estação seca, nota-se o desaparecimento dessa espécie nos sítios de coleta ATA 01, ATA 03 e ATA 04, como mostrado na tabela 2. Essa pupa apresentava uma característica peculiar que a diferenciava das outras espécies, pois era a única que apresentava um casulo com duas projeções.

A espécie *S. auripellitum* já apresentou uma baixa, com apenas quatro indivíduos identificados e aparecendo em apenas dois sítios de coleta: ATA 02 e ATA 05, como descrito na tabela 2. Essa mesma espécie só foi identificada durante a campanha de estação seca e foi identificada devido a uma ramificação secundária do ramo primário ventral localizado próximo da base, como podemos observar na figura 12.

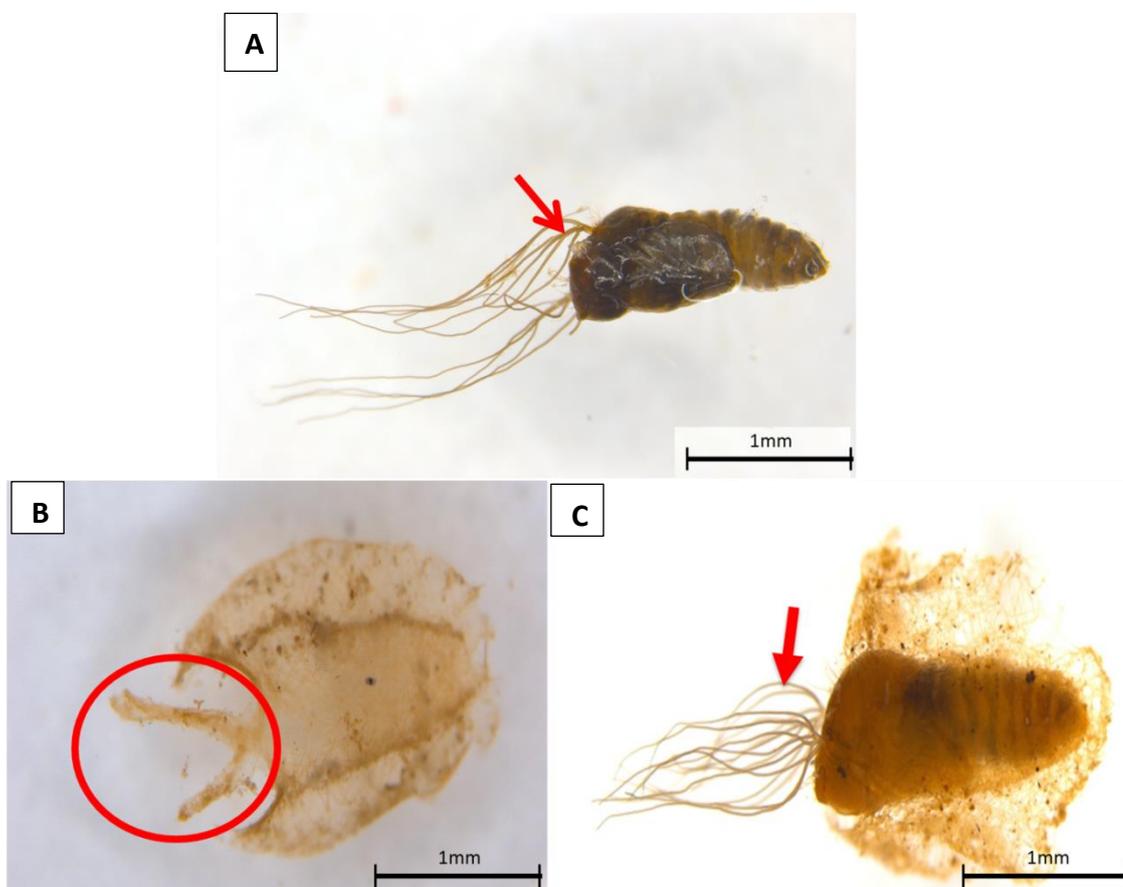


Figura 12: Estágio de pupa de simuliídeos. Em **A**- Pupa de *S. auripellitum* com ramificação secundária do ramo primário ventral mais próximo da base, como indicado pela seta em vermelho. Em **B**- A região circular destacada em vermelho mostra o casulo da pupa de *S. anamariae*, com duas projeções na base **C**- Pupa de *S. anamariae* com oito filamentos

branquiais, como indicado pela seta vermelha.

III) *Simulium perflavum*

Simulium perflavum foi a única espécie encontrada nas coletas que pertence ao subgênero *Psilopelmia*. Foram coletadas e analisadas 422 larvas e 113 pupas dessa espécie. Foram identificados organismos na fase de larva e pupa, em que na fase larval utilizaram-se caracteres, como os dentes do hipostômio e mancha da cápsula cefálica, e na fase de pupa, caracteres como o casulo e a quantidade de filamentos, como observado na figura 13. Essa foi uma das espécies que, junto com *S. anamariae* e *S. subpallidum*, apareceu nas duas campanhas de coleta. Além disso, foi a espécie mais abundante, se comparada com as outras encontradas.

S. perflavum foi registrada em todos os sítios de coleta. No entanto, nas campanhas de estação chuvosa, verifica-se a ausência dessa espécie nos sítios ATA 03 e ATA 04. Já na campanha de estação seca, ela aparece nos pontos ausentes na campanha anterior e desaparece no sítio ATA 01. Podemos observar a ocorrência dessa espécie na tabela 2.

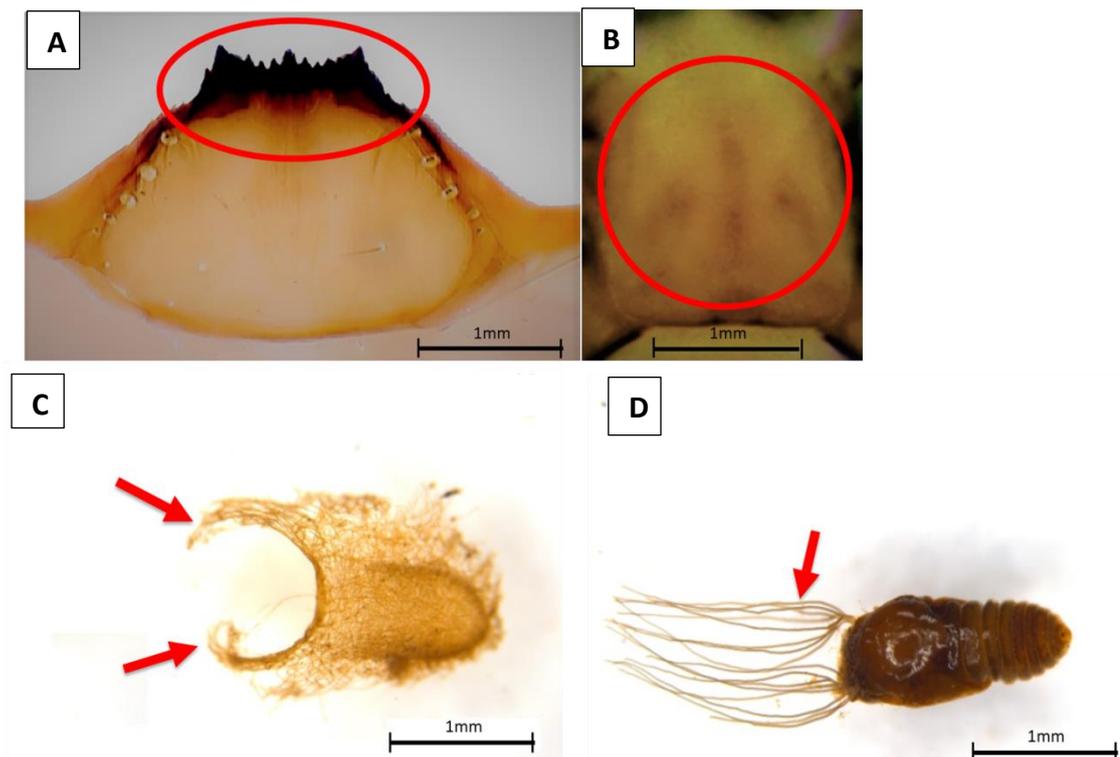


Figura 13: Análise taxonômica do estágio larval e estágio de pupa de simulídeos. Em **A**- A região circulado em vermelho mostra os dentes do hipostômio de *S. perflavum*, **B**- A região

circular em vermelho mostra a mancha da cápsula cefálica com uma mancha longitudinal e duas manchas laterais. Em **C**- Casulo da pupa de *S. perflavum*, com uma constrição na abertura do casulo e em **D**- pupa composta de oito filamentos branquiais, como mostrado pelas setas em vermelho.

IV) *Simulium pertinax/ Simulium subpallidum*

Foram coletadas 210 larvas e 36 pupas de *S. pertinax* e 84 larvas e 22 pupas de *S. subpallidum*. Essas espécies estão agrupadas no subgênero *Psilopelmia*. Desse complexo de espécies, somente *S. subpallidum* foi obtida nas duas campanhas de coleta nas duas formas, larval e de pupa, como mostrado na figura 14. Notou-se o desaparecimento de *S. pertinax* na campanha de estação seca.

Embora encontrada em apenas uma campanha de coleta, *S. pertinax* aparece apenas em dois sítios de coleta: ATA 02 e ATA 04. *S. subpallidum* é encontrada na campanha de estação chuvosa em apenas um sítio de coleta: ATA 04. Porém, analisando a campanha de estação seca, essa espécie segue sendo catalogada no mesmo sítio e também mostra outro comportamento. Ela é passível de ser encontrada em outros sítios, como: ATA 02 e ATA 05. Todas as ocorrências descritas podem ser observadas na tabela 2.

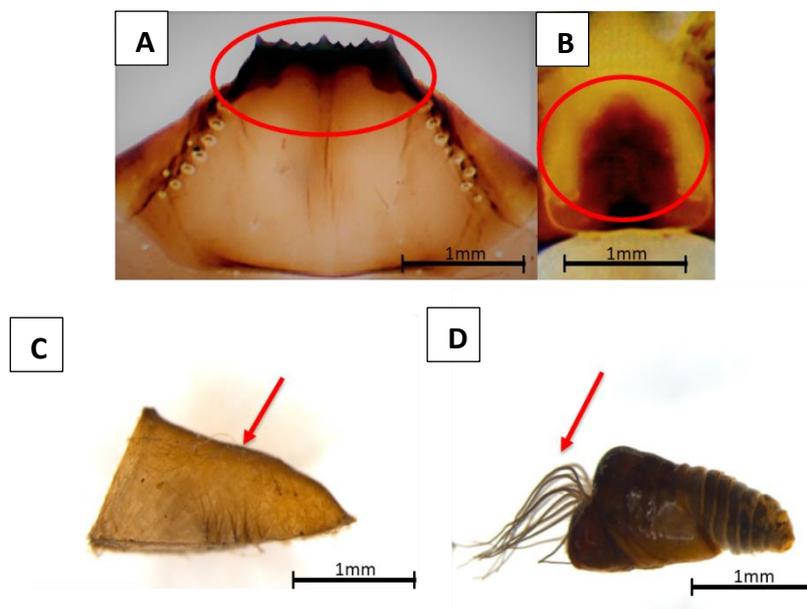


Figura 14: Análise taxonômica do estágio larval e estágio de pupa de simulídeos. Em **A**- A região circulada em vermelho mostra os dentes do hipostômio de *S. pertinax*, **B**- A região circular em vermelho mostra a mancha da cápsula cefálica com uma forma pentagonal. Em **C**-

Estação	Ponto	S.						
---------	-------	----	----	----	----	----	----	----

Casulo da pupa de *S.pertinax*, com tramas compactas e em **D**- pupa composta de oito filamentos branquiais arqueados, como indicado pelas setas em vermelho.

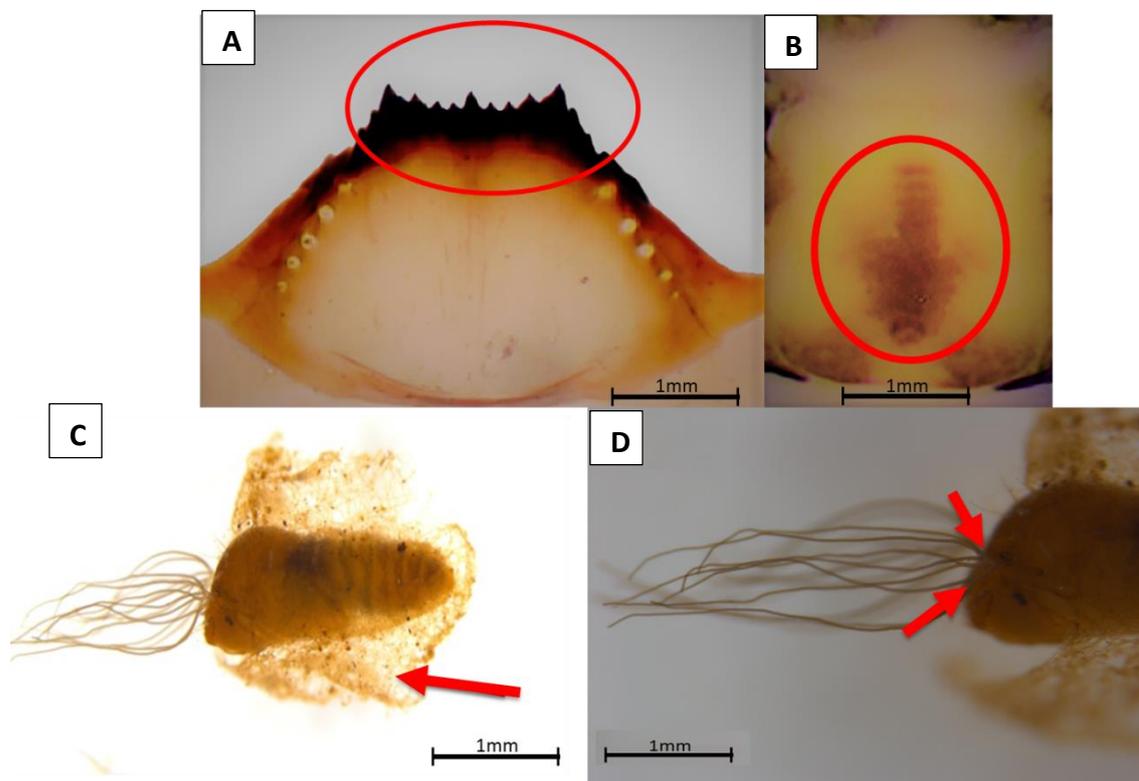


Figura 15: Análise taxonômica do estágio larval e estágio de pupa de simuliídeos. Em **A**- A região circulada em vermelho mostra os dentes do hipostômio de *S.subpallidum*, **B**- A região circular em vermelho mostra a mancha da cápsula cefálica com uma forma de seta. Em **C**- Casulo da pupa de *S.subpallidum*, com tramas não compactas e em **D**- filamentos branquiais ramificando-se próximo a base indicados pelas setas em vermelho.

Tabela 2: Distribuição simplificada da ocorrência das sete espécies catalogadas de Simuliidae por pontos e campanhas de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia. Os pontos onde os organismos foram encontrados estão pintados na cor azul.

	de Coleta	<i>anamriae</i>	<i>perflavum</i>	<i>pertinax</i>	<i>subpallidum</i>	<i>subclavibrachium</i>	<i>inaequale</i>	<i>aurepellitum</i>
Chuvosa	ATA01							
	ATA02							
	ATA 03							
	ATA 04							
	ATA 05							
Seca	ATA 01							
	ATA 02							
	ATA 03							
	ATA 04							
	ATA 05							

Riqueza, Diversidade e Equitabilidade de espécies do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro

A riqueza de espécies no Parque Natural Municipal Atalaia, encontrada neste trabalho, foi de sete espécies, ao total. Contudo, verificou-se uma riqueza distinta entre as duas campanhas de coleta desenvolvidas. A campanha de estação chuvosa apresentou quatro espécies encontradas durante os meses de coleta e a campanha de estação seca seis espécies durante os meses de realização dessa campanha, como mostrado na figura 16.

Na tabela 3, nota-se que *S. pertinax* e *S.perflavum* apresentam um maior número de indivíduos coletados para campanha de estação chuvosa. Contudo, houve o desaparecimento de *S. pertinax* na campanha de estação seca e o aparecimento de *S. subclavibrachium*, *S. inaequale* e *S. auripellitum* na mesma campanha.

Após a quantificação das espécies, foi empregado o índice de Simpson para cada campanha de coleta, para estimar a diversidade de espécies encontradas neste estudo. Os resultados nos mostram que na estação seca há uma diversidade maior de espécies, Índice de Simpson = 0,74. O contrário ocorre na campanha de estação chuvosa, na qual temos uma baixa diversidade, com o Índice de Simpson = 0,56. Quanto à dominância calculada pelo índice de Berger- Parker, verifica-se que a estação seca é a que apresenta um índice maior de dominância de espécies (Índice de Dominância= 0,38) se comparada com a outra campanha, como observado na tabela 4. *S. perflavum* é a espécie dominante para as duas campanhas de coleta, como mostrado na Tabela 3. Ainda assim, a tabela 3 nos mostra a Equitabilidade, ou seja, o quanto as espécies estão distribuídas pelas campanhas, e notou-se que as espécies estão mais homogeneamente distribuídas na campanha de estação seca.

Foi estimada também a riqueza de espécies por pontos de coleta. Os pontos que

apresentaram uma riqueza maior, com cinco espécies catalogadas, foram os pontos ATA 02 e ATA 05. Os pontos ATA03 e ATA 04 ficaram com um nível intermediário de espécies em relação aos demais pontos, sendo quatro espécies encontradas; e o ponto que apresentou a menor riqueza foi o ATA 01, com três espécies registradas. Esses dados podem ser observados na figura 17.

Na Tabela 5, observa-se que *S. perflavum*, *S. pertinax* e *S. subpallidum* foram as três espécies que apresentaram maior abundância de indivíduos entre os sítios de coleta estudados, sendo os pontos ATA 01 e ATA 05 os que apresentaram maior quantidade de indivíduos coletados, sendo esses da espécie *S. perflavum*.

Aplicando-se o índice de Simpson para todos os pontos de coleta, nota-se que há uma diversidade maior no ponto de coleta ATA 03 (Índice de Simpson = 0,73). Os pontos ATA 01 e ATA 05 apresentaram a diversidade de espécies baixa, respectivamente, (Índice de Simpson= 0,04 e 0,27), devido, particularmente, à dominância da espécie *S. perflavum* nesses dois pontos. A Equitabilidade calculada nos mostra que as espécies estão melhor distribuídas nos pontos ATA 02 E ATA 03 e pouco distribuídas nos pontos ATA 01 e ATA 05, como mostrado na tabela 6.

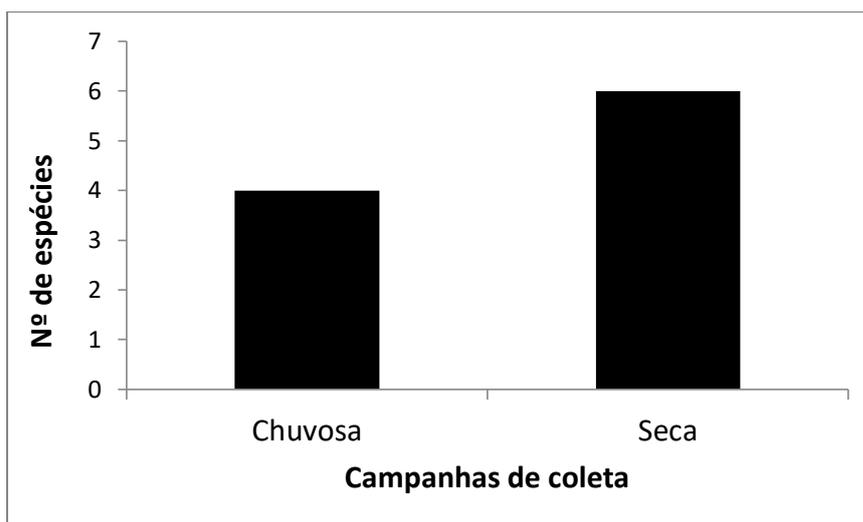


Figura 16: Riqueza de espécies por campanhas de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia. Gráfico obtido pelo programa Microsoft Excel 2010, a partir dos dados tabelados. Na Estação Chuvosa foram realizadas três coletas e na estação seca duas coletas.

Tabela 3: Abundância de indivíduos por espécies para cada campanha realizada no Parque Natural Municipal Atalaia.

Espécies	Nº de Indivíduos na campanha de estação chuvosa	Nº de Indivíduos na campanha de estação seca
<i>S. anamariae</i>	20	21
<i>S.perflavum</i>	499	36
<i>S. pertinax</i>	246	0
<i>S. subpallidum</i>	83	23
<i>S. subclavibrachium</i>	0	4
<i>S. inaequale</i>	0	6
<i>S. auripellitum</i>	0	4

Tabela 4: Resultado do Índice de Simpson ,Equitabilidade e Dominância para as duas campanhas de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia.

Campanha	Índice de Simpson	Equitabilidade (%)	Dominância
Estação Chuvosa	0,56	71,1	0,29
Estação Seca	0,74	83,2	0,38

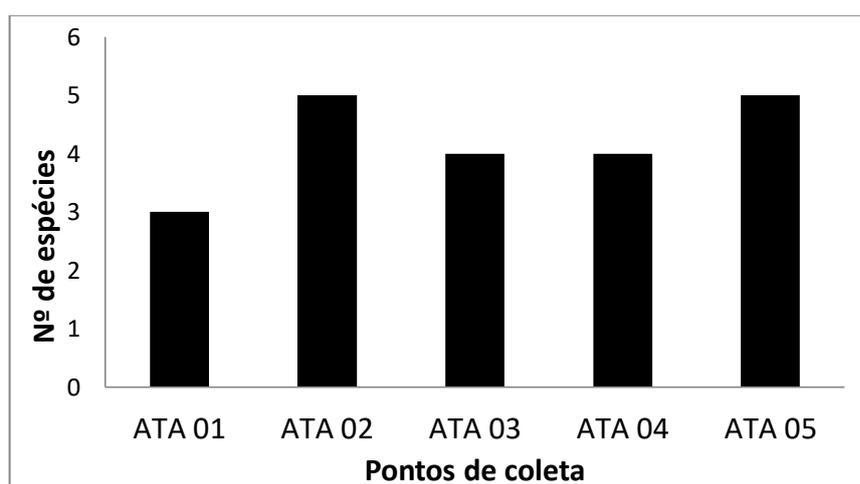


Figura 17: Riqueza de espécies por pontos de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia. Gráfico obtido pelo programa Microsoft Excel 2010, a partir dos dados tabelados. Foram realizadas cinco coletas em cada um dos pontos.

Tabela 5: Abundância de indivíduos por espécies para cada ponto de coleta do Parque Natural Municipal Atalaia.

Espécies	Nº de indivíduos no ponto ATA 01	Nº de indivíduos no ponto ATA 02	Nº de indivíduos no ponto ATA 03	Nº de indivíduos no ponto ATA 04	Nº de indivíduos no ponto ATA 05
<i>S. anamariae</i>	4	6	4	4	23
<i>S. perflavum</i>	227	91	11	4	202
<i>S. pertinax</i>	0	104	0	142	0
<i>S. subpallidum</i>	0	10	5	83	8
<i>S. subclavibrachium</i>	1	0	0	0	3
<i>S. inaequale</i>	0	0	6	0	0
<i>S. auripellitum</i>	0	1	0	0	3

Tabela 6: Resultado do Índice de Simpson, Equitabilidade e Dominância para os pontos de coleta no Parque Natural Municipal Atalaia.

Campanha	Índice de Simpson	Equitabilidade (%)	Dominância
ATA 01	0,04	10,4	0,97
ATA 02	0,57	61,1	0,49
ATA 03	0,73	94,3	0,42
ATA 04	0,50	58,3	0,60
ATA 05	0,27	36,7	0,84

Composição e preferência de substratos nos sítios estudados no Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro

Observando a Tabela 7, nota-se que há uma preferência geral das fases imaturas de simulídeos encontrados no Parque Natural Municipal Atalaia por substratos do tipo folhiços. No substrato rocha foram encontrados apenas indivíduos nos pontos ATA 03, ATA 04 e ATA 05 na campanha de estação chuvosa. Já na campanha de estação seca, notam-se indivíduos mais presentes nos pontos ATA 03 e ATA 04 nos dois meses de coleta.

Ainda assim, percebe-se que nenhum indivíduo foi encontrado em substratos, como lixo, isso ocorreu pela ausência desse substrato nos pontos amostrados. A ausência desse substrato mostra que existe um cuidado com a preservação dos recursos ambientais do

Parque.

Tabela 7: Dados referentes ao tipo de substrato onde os imaturos de simulídeos foram encontrados nas campanhas realizadas. O símbolo **X**- presença de imaturos nos substratos e **0**- ausência de imaturos nos substratos.

Estação de Coleta	Mês de coleta	Tipo de substrato	ATA01	ATA02	ATA03	ATA04	ATA05
Estação Chuvosa	Fevereiro	Folha	X	X	X	X	X
		Rocha	X	X	X	X	X
		Lixo	0	0	0	0	0
	Março	Folha	X	X	X	X	X
		Rocha	0	X	X	X	X
		Lixo	0	0	0	0	0
	Abril	Folha	X	X	X	X	X
		Rocha	0	X	X	X	X
		Lixo	0	0	0	0	0
Estação Seca	Agosto	Folha	X	X	X	X	X
		Rocha	0	X	X	X	X
		Lixo	0	0	0	0	0
	Setembro	Folha	X	X	X	X	X
		Rocha	0	X	X	X	0
		Lixo	0	0	0	0	0

Distribuição das espécies de simulídeos e sua relação com as variáveis ambientais

Para realizar as análises das variáveis abióticas, os dados obtidos em todas as coletas foram separados por pontos e analisados, a fim de se visualizar a distribuição das espécies de acordo com as variáveis ambientais. Além disso, também se verificou as variáveis que mais influenciaram a distribuição das espécies de simulídeos por pontos de coleta de acordo com a sazonalidade das campanhas de estação seca e chuvosa.

Os dados obtidos nesta pesquisa foram baseados nos indivíduos imaturos encontrados nos estágios de larva e pupa. A análise de correspondência canônica (CCA) mostrou que dentre as sete variáveis ambientais (condutividade (μS), temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$), salinidade (μS), O_2 dissolvido (%), O_2 dissolvido (mg/L), pH e vazão (m^3/s), apenas duas das variáveis ambientais, condutividade e pH, respectivamente, implicaram na distribuição de simulídeos nas fases de larva e pupa, apresentaram significância para o desenvolvimento e sobrevivência de simulídeos na fase larval e de pupa, como mostrado nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8: Variáveis ambientais e sua significância na abundância de espécies utilizadas para análise de correspondência canônica para distribuição de espécies para a fase de pupa capturadas nos córregos do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro.

Variáveis	p-valor
Condutividade (μS)	*0,0239
Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$)	0,6217
Salinidade (μS)	0,3337
O ₂ dissolvido (%)	0,2247
O ₂ dissolvido (mg/L)	0,2207
pH	0,0660
Vazão (m/s^2)	0,1052

*Variáveis significativas ($p\text{-valor} \leq 0,05$)

Tabela 9: Variáveis ambientais utilizadas e sua significância na abundância de espécies para análise de correspondência canônica para distribuição de espécies na fase de larva capturadas nos córregos do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro.

Variáveis	p-valor
Condutividade (μS)	0,4375
Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$)	0,6256
Salinidade (μS)	0,2325
O ₂ dissolvido (%)	0,2451
O ₂ dissolvido (mg/L)	0,2345
pH	*0,0343
Vazão (m/s^2)	0,0654

*Variáveis significativas ($p\text{-valor} \leq 0,05$)

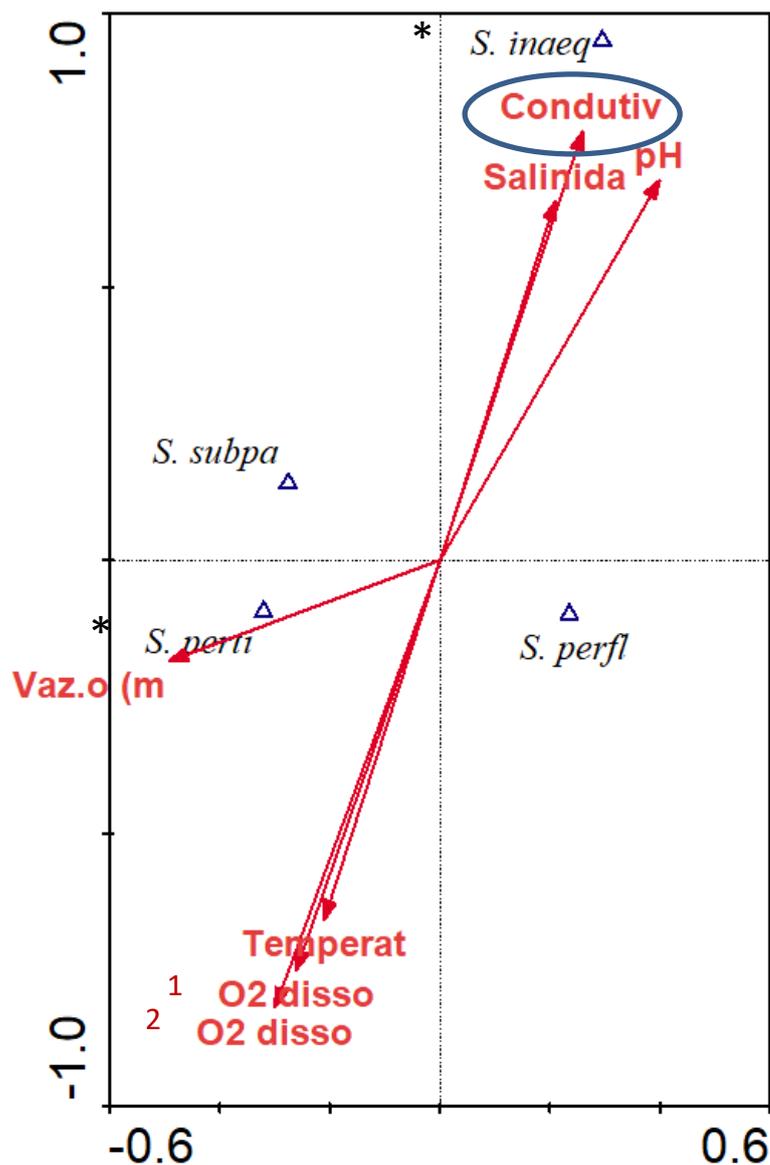


Figura 18: Análise de correspondência canônica (CCA) para a distribuição de espécies na fase de pupa em relação às variáveis ambientais nos córregos estudados do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro. Onde se lê: *S.inaequale* = *Simulium inaequale*; *S.subpa*= *Simulium subpallidum*; *S.perti*= *Simulium pertinax*, *S.perfl*= *Simulium perflavum*; Conduktiv= Condutividade (μS); Salinida= Salinidade (μS); pH= pH; Vaz.o (m = Vazão (m/s^2); Temperat= Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$); ¹O2 disso= O2 dissolvido (%); ²O2 disso= O2 dissolvido(mg/L). Destaque no círculo azul para a variável significativa condutividade (p-valor $\leq 0,05$).

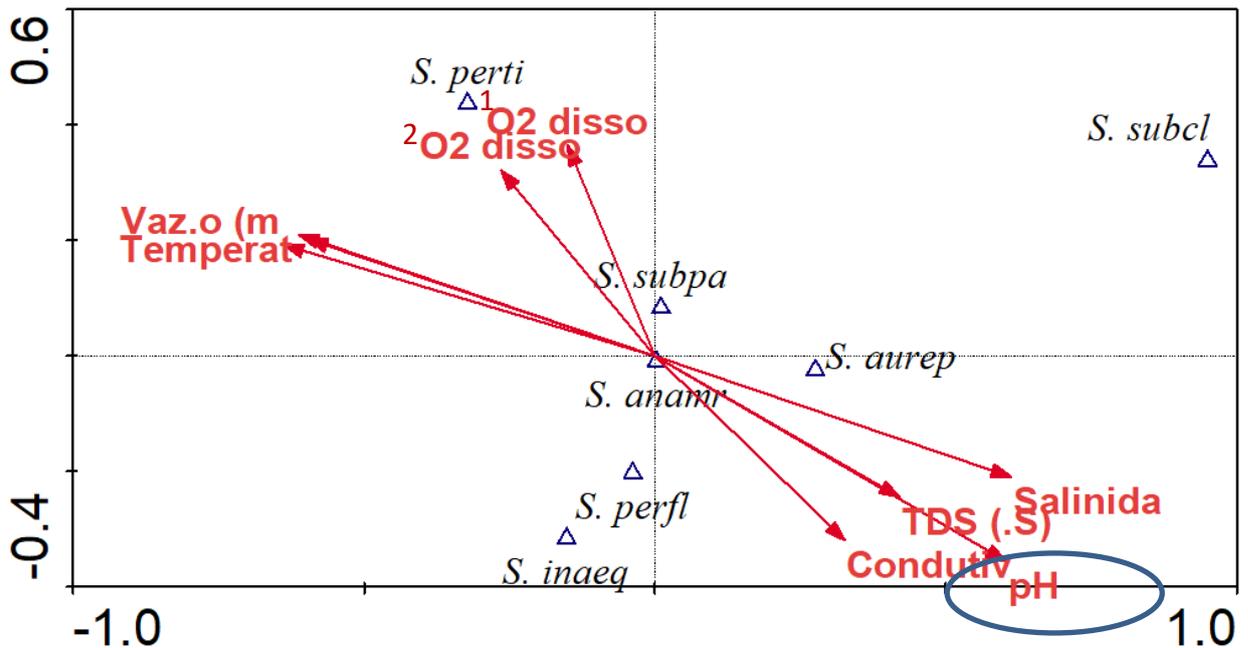


Figura 19: Análise de correspondência canônica (CCA) para a distribuição de espécies na fase de larva em relação às variáveis ambientais nos córregos estudados do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro. Onde se lê: *S. anamr*= *S. anamariae*; *S. subcl*= *S. subclavibrachium*; *S. inaequale* = *Simulium inaequale*; *S. subpa*= *Simulium subpallidum*; *S. perti*= *Simulium pertinax*, *S. perfl*= *Simulium perflavum*; Condutiv= Condutividade (μS); Salinida= Salinidade (μS); pH= pH; Vaz.o (m = Vazão (m^3/s); Temperat= Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$); $^1\text{O}_2$ disso= O_2 dissolvido (%); $^2\text{O}_2$ disso= O_2 dissolvido(mg/L). Destaque no círculo azul para a variável significativa pH (p-valor $\leq 0,05$).

As variáveis ambientais que influenciaram na abundância e a distribuição direta de espécies de simuliídeos na fase larval durante este estudo foram: Condutividade elétrica da água, e pH como mostrados na Análise de correspondência canônica (CCA) evidenciadas nas figuras 18 e 19. Nota-se que *S. inaequale* é uma espécie que está presente principalmente em sítios onde a condutividade do riacho é alta, além de outros fatores, como a salinidade e o pH. Essa espécie foi catalogada apenas na campanha de estação seca, em que grande parte dos sítios estavam praticamente secos ou com pouca água, logo a quantidade de partículas na água que eram dissolvidas era bem elevada, se observarmos que a salinidade que essa mesma espécie respondeu significativamente para salinidades elevadas, embora essa não tenha sido uma variável significativa.

Para as demais variáveis, notou-se que *S. pertinax* se desenvolve em sítios onde a

vazão, temperatura da água e O₂ dissolvidos são mais baixas. Contudo, essa espécie desaparece na estação seca, em que principalmente os níveis de vazão foram mais baixos em alguns sítios de coleta.

No estágio de pupa, a espécie *S. anamariae* mostra-se tolerante a ambientes intermediários, onde as variáveis ambientais mostradas na figura 19 estão em níveis moderados, nem baixos demais, nem altos demais. Outra coisa que chama atenção é que, diferentemente do estágio de larva, as pupas de *S. pertinax* apresentam um comportamento diferente, sobrevivendo em ambientes onde a vazão, temperatura da água e O₂ dissolvidos são mais elevadas. Ressalta-se que grande quantidade desses indivíduos encontrados na estação chuvosa foram em condições de vazão e O₂ dissolvidos, em fatores mais elevados. Contudo, espécies como *S. auripellitum* são mais tolerantes neste estágio em que há sítios com pH mais baixo.

Diferenças estruturais das comunidades de simuliídeos nos períodos de estação chuvosa e seca

Os dados obtidos nessa análise, nas duas fases de coleta (campanha de estação seca e campanha de estação chuvosa), foram analisados a fim de investigar, para as duas fases imaturas, quais fatores abióticos influenciaram na sua distribuição por pontos de coleta.

Com o objetivo de se estudar as amostras pertencentes aos diferentes períodos de coleta em campo, foi utilizado um Escalonamento Multidimensional Não Métrico com o índice de Bray- Curtis (stress= 0,3825), demonstrando diferenças na influência dos fatores abióticos por pontos de coleta.

Nota-se, pela figura 20, que na fase de larva a campanha realizada na estação seca teve uma influência maior de fatores como pH, condutividade, salinidade e TDS e os pontos de coleta mais influenciados por esses fatores foram ATA 02, ATA 05 e ATA 04. Nesse caso, como o volume de chuvas é menor, espera-se que essas variáveis predominem, uma vez que muitas partículas não são carreadas e, com isso, ocorra o aumento das variáveis já mencionadas.

Já para a estação chuvosa, como mostrado na figura 20, os pontos ATA 01, ATA 02, ATA 04 e ATA 05 tiveram influência maior para a proliferação desse estágio, em que temperatura da água e do ar, vazão e O₂ dissolvidos foram os fatores preponderantes e que influenciaram na proliferação desses organismos nesse ponto. Esses fatores são bem

relacionados com a estação, uma vez que na estação chuvosa a vazão dos córregos foi maior e, com isso, pode ter ocorrido o aumento de O₂ dissolvido.

Para a fase de pupa, como visto na figura 21, fatores como condutividade, salinidade, pH e TDS tiveram maior influência na proliferação dos simuliídeos nos pontos de coleta ATA 02, e ATA 03 para a campanha de estação seca. No entanto, para a campanha de estação chuvosa, os pontos de coleta ATA 04 e ATA 02 foram os mais influenciados por fatores como vazão, temperatura do ar e da água e oxigenação. Esses fatores apresentaram maior influência na proliferação desses organismos.

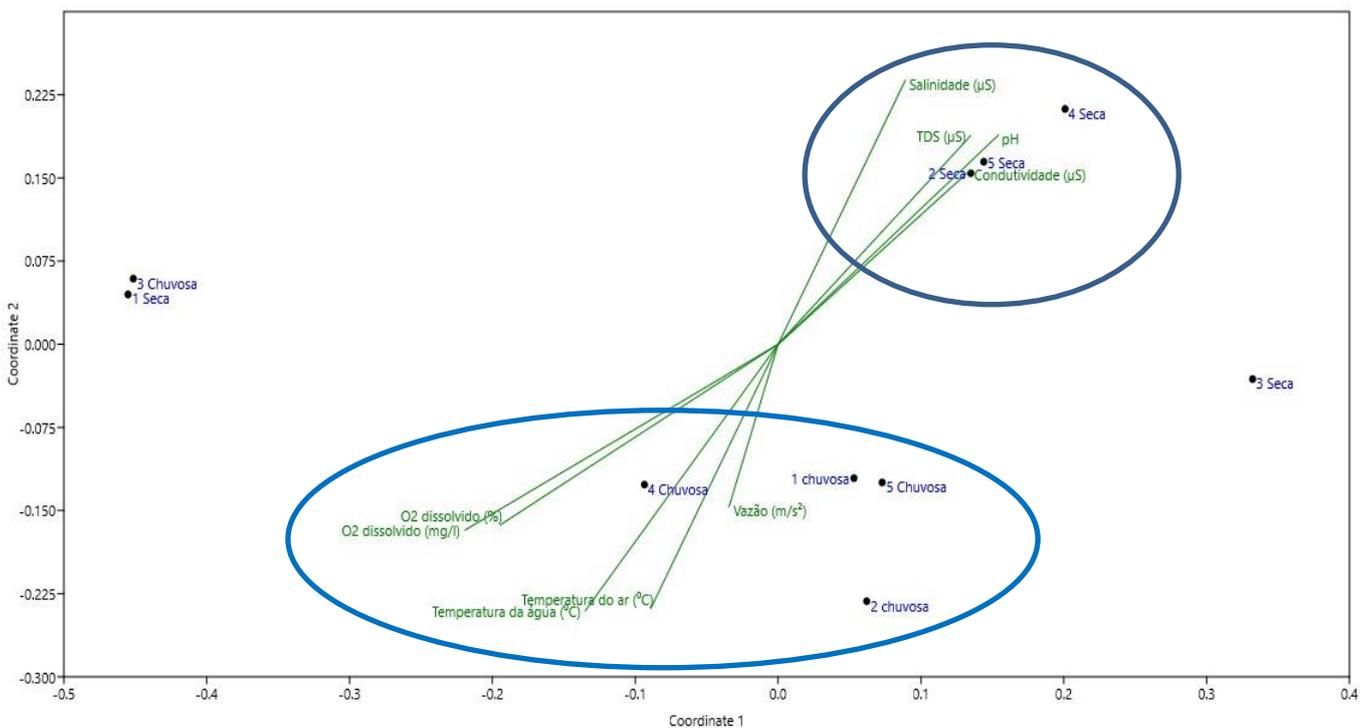


Figura 20: Fatores abióticos que influenciam diferencialmente a ocorrência de diferentes pontos do PNMA. Diagrama de ordenação do tipo Escalonamento Multidimensional Não métrico (NMDS), construído a partir do índice de dissimilaridade de Bray-Curtis para coletas de larvas, nas duas campanhas de coletas: estação chuvosa e estação seca, para os cinco pontos de coleta do Parque Natural Municipal Atalaia, correlacionando com os fatores abióticos analisados. Onde se lê: 1= ATA 01, 2=ATA 02, 3=ATA 03, 4=ATA 04 e 5=ATA05.

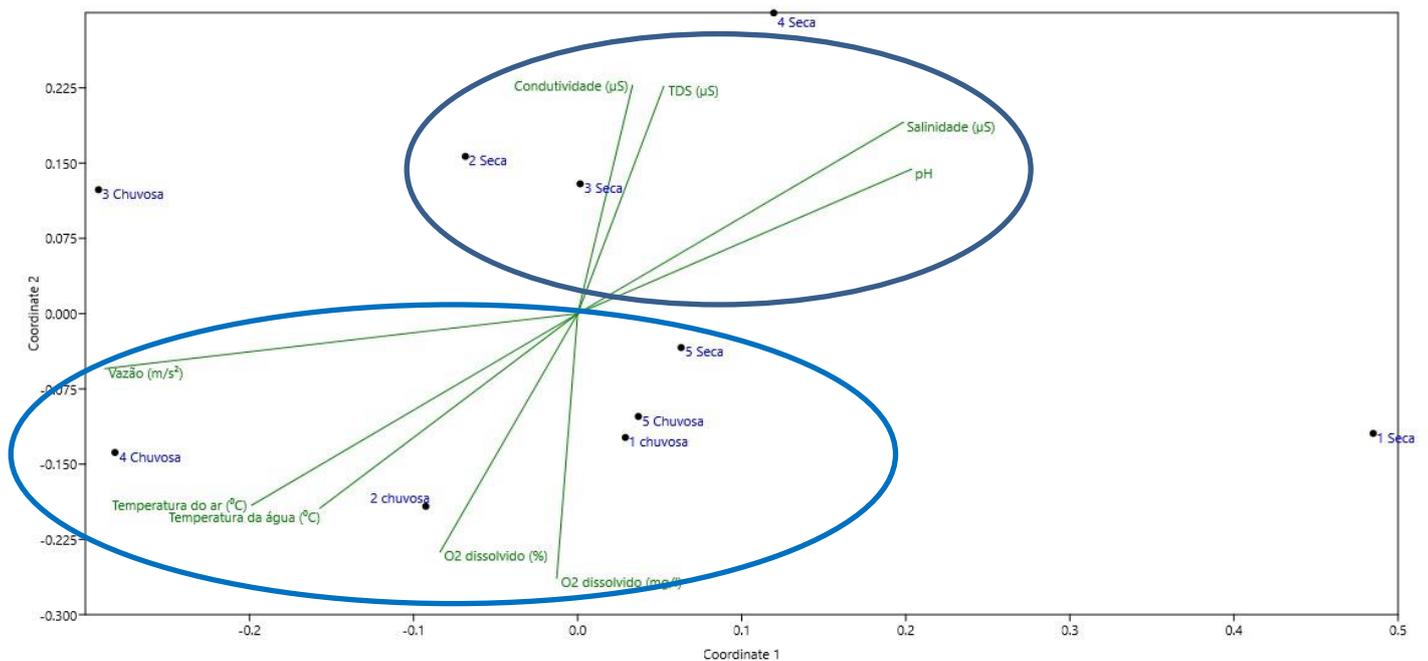


Figura 21: Fatores abióticos que influenciam diferencialmente a ocorrência de diferentes pontos do PNMA. Diagrama de ordenação do tipo Escalonamento Multidimensional Não métrico (NMDS), construído a partir do índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, para coletas de pupas nas duas campanhas de coletas: estação chuvosa e estação seca, para os cinco pontos de coleta do Parque Natural Municipal Atalaia, correlacionando com os fatores abióticos analisados. Onde se lê: 1= ATA 01, 2=ATA 02, 3=ATA 03, 4=ATA 04 e 5=ATA05.

Análises filogenéticas da Simuliofauna do Parque Natural Municipal Atalaia, Macaé, Rio de Janeiro, Brasil

Análises filogenéticas foram feitas a partir da extração de DNA realizada em quatro das sete espécies encontradas nas coletas de campo e PCR para um fragmento do gene Citocromo Oxidase I (COI). Nota-se que *S. perflavum* e *S. subpallidum*, dentre as quatro espécies analisadas, são as que apresentam maior proximidade filogenética. Os resultados obtidos podem ser considerados como preliminares, uma vez que apenas um indivíduo por espécie foi utilizado. Assim, a partir da árvore filogenética é possível observar que as espécies *S.perflavum* e *S. subpallidum*, que são similares morfológicamente, aparecem agrupadas no mesmo ramo. Juntamente a elas, notamos a presença de *S. anamariae* formando um grupo monofilético. Já *S. pertinax* foi a espécie mais divergente aparecendo em outro ramo e não se

agrupando as outras três espécies. Morfologicamente essa é a espécie mais diferente dentre as outras quatro registradas.

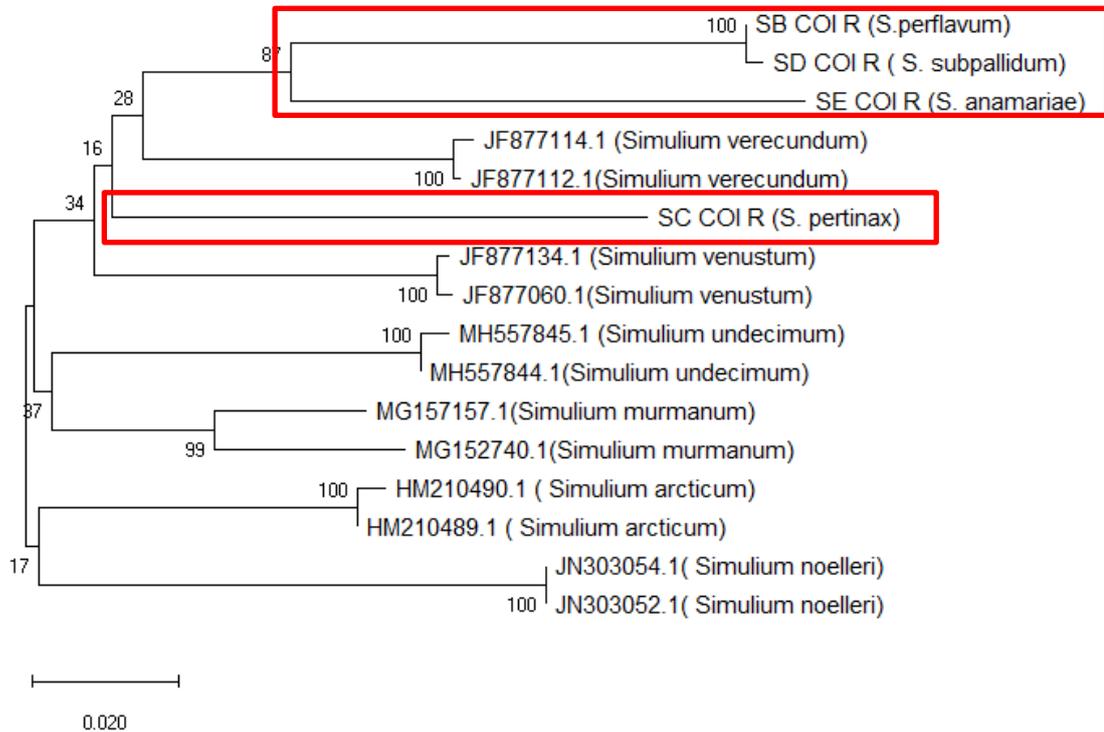


Figura 22: Árvore obtida com auxílio do programa Mega-X Molecular Evolutionary Genetics Analysis, a partir do método Neighbor- Joining, em que o mesmo modelo mostra a árvore mais parcimoniosa de relações filogenéticas entre as quatro espécies cujo sequenciamento foi feito: *S. anamariae*, *S. perflavum*, *S. pertinax* e *S. subpallidum*. As espécies destacadas em vermelho foram as encontradas no Parque Natural Municipal Atalaia.

DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado visando obter informações acerca da riqueza, equitabilidade, preferência por substratos e distribuição de simuliídeos correlacionadas com as variáveis ambientais encontradas nas coletas de campo. Além disso, foi analisada, preliminarmente, a relação filogenética entre quatro espécies das sete encontradas no Parque Natural Municipal Atalaia.

Em nosso trabalho, foram identificadas sete espécies para o Parque Natural Municipal Atalaia, havendo sítios com, no mínimo, uma e, no máximo, cinco espécies. Nos estudos realizados no Rio Grande do sul, por Couceiro et al. (2014), foram encontradas, no mínimo, uma e, no máximo, nove espécies. Landeiro et al. (2009), em seu trabalho, mostra que em

seus sítios foram encontradas, no mínimo, uma e, no máximo, treze espécies, para apenas um sítio dos quatorze analisados. Esses valores são bem altos se compararmos com outros trabalhos já descritos na literatura (Hamada et al. 2002; Pepinelli et al. 2005).

Comparando-se a ocorrência de simulídeos entre os cinco pontos de coleta e nas duas campanhas, nota-se que, no Parque Natural Municipal Atalaia, dos 1.253 indivíduos, houve uma abundância de indivíduos maior na campanha de estação chuvosa. Contudo, a riqueza de espécies foi maior na campanha de estação seca, já que, nessa estação, há uma estabilidade ambiental maior. Em seus trabalhos com macroinvertebrados, Kikuchi and Uieda (2005) retratam que a menor ocorrência desses organismos está relacionada com estação chuvosa, devido ao aumento da pluviosidade e carreamento dos organismos. Huamantínco and Nessimian (1999) também demonstraram, em sua pesquisa, que há uma quantidade menor de larvas maior no período seco. Segundo Bispo and Oliveira (1998), durante a estação chuvosa, com o aumento do fluxo de água, pode ocorrer o carreamento dos organismos, o que explica o menor número de espécies no ambiente.

De acordo com Moreira et al. (1994), a densidade de *Simulium nogueirai* encontrados no córrego Tromn (Joinville, SC) apresentou uma abundância elevada no período chuvoso. Outros trabalhos, como os estudos realizados na Amazônia Central por Hamada (1993), verificando a abundância de larvas de *Coscaroniellun goeldii*, Coscarón & Coscarón- Arias (1999) analisando a população de larvas e pupas de simulídeos no Rio Paraná, e por Pepinelli et al. (2005) estudando as espécies presentes nos córregos do Parque Estadual Intervales (SP), obtiveram os mesmos resultados, com maiores quantidades de indivíduos encontradas no período chuvoso.

Os autores Hauer and Benke (1987) relatam que elevações nas densidades populacionais em períodos chuvosos podem ser reflexo de uma disponibilidade de alimento maior para as larvas nesse período. Para Kiel et al. (1998), os simulídeos são organismos que apresentam um grande potencial colonizador. Há espécies que são capazes de colonizar novos substratos em poucas horas e, assim, alcançar uma densidade populacional em poucos dias. Todavia, as populações de simulídeos podem apresentar flutuações, podendo variar desde uma explosão de indivíduos, seguidos por uma diminuição de sua população em poucos dias (Kiel, 1996; Matthaei et al., 1996).

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, os pontos ATA 02 e ATA 05 foram os pontos onde a riqueza de espécies foi maior, isso pode estar atrelado ao fato de que nesses dois pontos foram encontrados imaturos de simulídeos em mais de um tipo de

substrato. Os imaturos foram encontrados tanto em folhiços como rochas, aumentando assim a possibilidade de encontrarmos um número de espécies maior.

De acordo com Coppo e Lopes (2010), substratos como rochas e folhas são os principais substratos para se encontrar simulídeos e foram os que apresentaram maior abundância de indivíduos. Isso contribuiu em seu trabalho para uma maior riqueza de espécies.

Observou-se ainda que, de todos os imaturos analisados, a espécie que apresentou a maior quantidade de indivíduos, distribuindo-se por todos os pontos de coleta foi *S.perflavum*. Contudo, nota-se que essa espécie apresentou uma restrição durante a campanha chuvosa para pontos como ATA 01, ATA 02 e ATA 05.

Nesses pontos descritos, onde foram encontrados simulídeos da espécie *S. perflavum*, podemos perceber que estes recebem mais ações antrópicas. O ATA 01, por ser a sede do Parque, possui muitas atividades de visitação, apresenta acomodações para os visitantes e construções perto do riacho. O ATA 02, por haver um cano que passa no meio do riacho, serve para captação de água, e o ponto ATA 05, por receber a vistoria da CEDAE com frequência e haver o tratamento das caixas d' água pela empresa. Logo, a ocorrência desses organismos, nesses pontos, pode estar ligada a esse fato, para essa estação chuvosa. Além disso, há nesses pontos os substratos preferenciais, onde esses organismos se desenvolvem: folhiços e rochas . Nesses pontos, a floresta sofreu processos de remoção da vegetação por interesses já mencionados e pela passagem de trilha para ecoturismo.

Segundo Coscarón et al. (1991), *S. perflavum* prefere sistemas que possam estar impactados, com elevada turbidez e com áreas desflorestadas. Hamada & McCreadie (1999) também relatam que *S. perflavum* é uma espécie comum de cerrado, encontrada também em matas e indicadora de floresta impactada. Apresenta abundância em substratos como folhas e rochas presas no curso da água.

Segundo Lozovei et al. (2004), serapilheiras, algas, plantas aquáticas e rochas são importantes substratos, já que são locais para fixação de imaturos de simulídeos da espécie *S. perflavum* que sobrevivem em córregos lentos, propiciando, assim, seu desenvolvimento. Ressalta-se ainda que seja possível que esses organismos possuam adaptações para sobreviver nesse tipo de ambiente.

Figueiró et al. (2012) relata que a maior parte dos simulídeos encontrados em rios e riachos associa-se a folhiços de correnteza, ou substratos rochosos presos a correntezas, o que corrobora os resultados encontrados. A espécie *S. perflavum* é encontrada principalmente

aderida a folhiços. Esse comportamento foi relatado por Shelley et al. (2002) e Figueiró et al. (2006).

Na estação chuvosa, notou-se que *S. anamariae* está presente em todos os pontos de coleta, e vai desaparecendo em pontos como o ATA 03 e ATA 04 na estação seca. Esse fato pode estar atrelado a baixo nível do córrego e à baixa disponibilidade de substratos para colonização.

Embora pouco se conheça sobre os hábitos dessa espécie, como relatado por Peppinelli (2003), pode-se sugerir que essa espécie tenha preferência tanto por substratos rochosos como folhiços. Todavia, folhiços e substratos rochosos foram os locais mais abundantes onde foi encontrado o imaturo, o que pode ter favorecido a ocorrência dessa espécie em todos os pontos. Coppo e Loppes (2010) já demonstram, em seus trabalhos, que essa espécie foi encontrada apenas em ambientes rochosos, podendo isso indicar uma preferência por esse tipo de habitat.

Nos pontos ATA 02 e ATA 04, durante a campanha de estação chuvosa, foram encontrados indivíduos da espécie *S. pertinax*. Esses pontos apresentam diversos tipos de substratos onde esses organismos são capazes de colonizar e se proliferar. Mais uma vez, ressalto que o ATA 04 foi um dos pontos onde o córrego esteve praticamente seco na campanha de estação seca, o que pode ter influenciado no desaparecimento dessa espécie nessa campanha, levando-no a notar que *S. pertinax* pode sofrer influência da baixa do córrego e não se desenvolver.

A ocorrência de diferentes substratos atrelada às características do entorno do riacho, como local mais aberto, caracterizado por clareiras, pode culminar na presença dessa espécie. Apesar de *S. pertinax* também ser uma espécie que responde fortemente a ações antrópicas e ser uma espécie de hábitos antropofílicos, não tem sido verificado ataques de simúlideos a seres humanos no Parque, segundo relatos da equipe técnica do Parque. Esses pontos sofrem diversas interferências antrópicas e são também passagens de trilhas.

De acordo com os trabalhos de Peppinelli (2003), *S. pertinax* é uma espécie que se encontra aderida em diferentes substratos, como: plantas aquáticas, folhas, galhos, troncos e substratos rochosos de rios com uma elevada velocidade de água. Ainda assim, ele relata a ocorrência dessa espécie em corpos d'água de áreas abertas. Viviani et al. (2012) relata também, em seu trabalho, que em águas onde ocorre ação por parte do ser humano pode haver proliferação de *S. pertinax*, quando há excessivas quantidades de matéria orgânica despejada no ambiente.

Diferentemente de outras espécies relatadas, *S. subpallidum* aparece somente no ponto ATA 04 na campanha chuvosa, permanecendo nesse mesmo ponto na campanha seca, mesmo sendo esse um ponto onde os recursos permaneceram limitados, já que o córrego encontrava-se praticamente seco. Contudo, esse ponto é bem caracterizado pela sua cobertura vegetal escassa, havendo uma grande área de clareira e muitas rochas ao longo do riacho, o que pode contribuir para a proliferação dessa espécie. Um fato curioso foi que essa espécie aparece nos pontos ATA 02 e ATA 05 na estação seca, além do ponto ATA 04. Uma vez que esses pontos são distintos em relação ao ATA 04, essa espécie pode ter migrado para esses pontos a procura de recursos que favoreça sua proliferação nessa estação.

De acordo com Azevedo & Herzorg (2004), *S. subpallidum* é uma espécie que apresenta uma ampla distribuição no Brasil Central e que está ligada a áreas com pouca cobertura vegetal, sendo encontrada distribuída por todo estado. Shelley et al (2004), em seu trabalho nas Guianas, encontrou pupas de *S. subpallidum* associadas a leitos rochosos de pequenos rios.

As espécies com menor número de indivíduos coletados foram *S. subclavibrachium*, *S. auripellitum* e *S. inaequale*. Encontradas apenas na campanha de estação seca, notou-se que essa espécie não necessita de um aporte de nutrientes, oxigenação e vazão dos riachos elevados. Em nosso trabalho, *S. inaequale* foi encontrado apenas em um ponto de coleta, com apenas seis indivíduos. Nesse mesmo ponto, na campanha de estação seca, só foi encontrado além do *S. inaequale*, o *S. perflavum*.

Segundo trabalhos de Wainfas (2015), *S. inaequale* e *S. perflavum* são espécies influenciadas por condições ambientais parecidas, o que levou à presença das duas espécies no mesmo criadouro. De acordo com Santos et al. (2010), além de a influência ambiental ser um ponto comum entre as duas espécies, estas são capazes de coexistir no mesmo criadouro, principalmente nos rasos, estreitos e com exposição à luz (Coscarón 1991; Strieder and Py-Daniel 1999; Hamada and McCreadie 1999).

Estudos de distribuição de simúlidos na Alemanha demonstraram que a riqueza e abundância desses organismos estão relacionadas com alterações em seus habitat (Lautenschläger and Kiel 2005; Pramual and Kuvangkadilok (2009). Ainda assim, essa heterogeneidade na distribuição de espécies pode contribuir para a avaliação da qualidade dos ambientes e da água (Kazanci and Ertunc 2010).

Como mostrado em nossos resultados para as fases imaturas, as variáveis ambientais que mais influenciaram a distribuição dos organismos foram a condutividade e pH.

Possivelmente, os níveis de vazão elevadas contribuíram para maior aporte de oxigênio na água, mais materiais carreados, o que contribui para o aumento do pH e da salinidade. O aumento e diminuição desses fatores podem contribuir para a proliferação de simúlídeos no ambiente.

Diversos trabalhos mostram que características abióticas influenciam a composição de simúlídeos nos diferentes sítios de coleta, possibilitando determinar as espécies encontradas com relação às variáveis ambientais (Grillet and Barrera 1997; Hamada et al. 2002; McCreadie and Adler 1998; McCreadie et al. 2006). Segundo trabalhos de Hamada and McCreadie (1999), pH e condutividade elétrica da água são variáveis abióticas que estão relacionadas à distribuição de simúlídeos no Brasil (Hamada and McCreadie 1999; Hamada et al. 2002; Figueiró et al. 2012). Em nossos estudos, podemos observar, pela Análise de Correspondência Canônica, que o pH foi uma variável que influenciou principalmente os simúlídeos na fase de pupa. Nota-se ainda que *S.anamariae* foi a mais influenciada por essa variável (pH < 7) em nosso estudo.

Em trabalhos realizados na Amazônia, Hamada and McCreadie (1999) mostram a influência de pH com valores baixos na espécie *S. perflavum*. De forma contrária, Viviani et al. (2012) mostra, em seu trabalho, que ambientes com pH básico também podem ser influentes na distribuição e composição de simúlídeos em sítios analisados.

Couceiro et al. (2014), em seus trabalhos, também mostra a predileção de espécies de simúlídeos, como *S.pertinax*, por ambientes com pH básico. Entretanto, esse fator não foi preponderante para a distribuição e abundância dessa mesma espécie em nossos sítios de coleta.

Os resultados da análise de correspondência Canônica para larvas mostram a correlação dos fatores: Condutividade, pH e Salinidade com a distribuição de simúlídeos pelos pontos de coleta; dessa forma, houve uma relação positiva entre menores valores de vazão, temperatura e O₂ dissolvido e das demais variáveis, mostrando que a espécie *S. inaequale* prefere ambientes com níveis maiores de condutividade, salinidade e pH em estágios larvais.

Em estudos realizados no município de Manaus, por Gorayeb (1981), os imaturos de *S. fluviotum* foram encontrados em sítios com condutividade elevada de 10,8 (µS/cm). Em seus trabalhos, Menzel (2016) associa também a distribuição de *Simulium orbitale* com sítios de condutividade elevados. Contudo, Santos et al. (2010) demonstra que *Simulium travassossi* se desenvolve em ambientes cujos níveis de condutividade são baixos.

Nossos resultados de escalonamento Multidimensional Não-Métrico, como apresentados nas figuras 20 e 21, mostra-nos que as variáveis abióticas que mais influenciaram os organismos foram a salinidade, TDS (Total de sólidos dissolvidos), pH e condutividade. Por ser um período seco, a quantidade de sólidos dissolvidos pode ter sido alta, aumentando os níveis das demais variáveis. Segundo Zhang et al. (1998), os ambientes onde se evidencia uma alta abundância e riqueza de espécies podem estar correlacionados ao elevado número de pequenas partículas de alimento suspensas e que, em grandes mudanças no fluxo d'água, podem atuar sobre a comunidade de simúlideos a predação e a competição.

Há mais de 30 anos as análises moleculares utilizando DNA mitocondrial têm sido aplicadas em estudos evolutivos (Brown et al. 1979; Avise and Walker 1999). Os estudos com DNA *barcoding* têm sido aprimorados nos últimos anos (Nelson et al. 2007; Smith et al. 2007; Hebert et al. 2003). Os estudos com o gene COI mostram sua eficácia na identificação e separação de espécies de muitos grupos já estudados, entre eles, aves, borboletas e até parasitas (Smith et al. 2006, Kerr et al. 2007; Hebert et al. 2004; Hajibabaei et al. 2007).

Quando se pensa em identificação biológica, baseada em apenas um gene para desvendar toda a complexidade da vida, logo, pensa-se nos inúmeros eventos ofuscados que podem ocorrer entre as espécies (Hebert et al. 2003). Contudo, o gene COI apresenta elevada conservação nos mais diversos grupos animais e pouca divergência intraespecífica (raramente maiores que 2%), se comparado com as interespecíficas (maiores que 3%) (Avise 2000).

Através da técnica de DNA *barcoding* foi possível realizar as primeiras identificações moleculares das quatro espécies trabalhadas e através de técnicas de sistemática filogenética inferir as primeiras relações filogenéticas entre quatro das sete espécies encontradas nas coletas, mostrando que *S. perflavum* e *S. subpallidum* são espécies bem mais próximas do que as demais espécies comparadas. Esses resultados mostram concordância com as análises taxonômicas realizadas por morfologia, em que essas duas são muito parecidas em sua morfologia e diferenciam-se das outras duas. Além disso, *S. perflavum*, *S. subpallidum* e *S. anamariae* formam um grupo monofilético e *S. pertinax* se diferencia das demais espécies ficando agrupado em outro ramo da árvore. Vale ressaltar ainda que esses dados são ainda preliminares, visto que essas análises foram realizadas uma única vez, mas que geraram dados iniciais e inéditos da relação filogenética da Simuliofauna. Além disso, os dados moleculares obtidos, depois de mais testes, poderão contribuir com plataformas, como o GENBANK e NCBI, já que não há registro desses dados para as inúmeras espécies brasileiras.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que, nos córregos estudados, o Parque Natural Municipal Atalaia apresenta:

- Uma riqueza de sete espécies de Simulídeos, que foi catalogada por taxonomia morfológica;
- Dessas sete, *S. perflavum* foi a espécie mais abundante, com maior número de indivíduos;
- Na estação seca foi detectada uma riqueza maior de espécies. Porém obtivemos maior número de indivíduos durante a estação chuvosa;
- Os diferentes substratos são correlacionados com essa diversidade, onde sítios com diferentes substratos, apresentaram diferentes espécies;
- Os estudos com DNA *barcoding* foram capazes de corroborar as análises morfológicas da família simuliidae e podem colaborar com os estudos dessa família que possui ainda poucos especialistas.

Capítulo 2

Criação em laboratório e estudos sobre Biologia do
Desenvolvimento da família Simuliidae do Parque Natural
Municipal Atalaia

INTRODUÇÃO

A diversidade de animais existente no mundo tem indagado diversos pesquisadores através do tempo. Esse fascínio tem motivado inúmeras pesquisas a tentar estimar a biodiversidade do planeta. Estima-se que, pelo menos, 5 milhões de espécies de insetos existam, e que desses, um milhão são descritos atualmente (Grimaldi et al. 2005).

As explicações propostas por Darwin (1809-1882) e Wallace (1823- 1913) mostram que a diversidade se originou pelo processo de evolução, a partir de um ancestral comum. Os estudos com biologia comparada e genética de populações, firmados nos séculos XIX e XX, reforçam as teorias propostas por Darwin e Wallace, favorecendo então o aceite de suas teorias (Ridley 2009).

Outros estudos, como os de Ernest Haeckel (1834-1919) e Fritz Muller, tiveram a relevância na área de embriologia comparada. Em seus trabalhos, foram comparados os processos embrionários de vertebrados e invertebrados, mostrando haver similaridade entre os dois grupos (Marcellini et al. 2017).

Os estudos de Haeckel, Mueller e outros pesquisadores da época revelaram que alguns grupos de animais possuem histórias evolutivas comuns, mostrando assim que, em algum momento histórico, os organismos possuem um ancestral em comum. É a partir do conceito de ancestral comum e das relações filogenéticas entre grupos de organismos que a embriologia e a Biologia Evolutiva passam a caminhar juntas e explicando os processos de evolução (Alvarenga et al. 2016).

Os avanços nas áreas de genética, biologia celular e molecular possibilitaram a conexão entre a Embriologia e a Biologia Evolutiva, unindo-as e criando uma nova área: a “Biologia Evolutiva do Desenvolvimento ou Evolutionary Development (Evo-Devo)” (Marques-Souza et al. 2012).

Os estudos em Evo-Devo apresentaram grandes progressos nos últimos anos. Esse avanço possibilitou a resolução de muitas questões evolutivas que ainda estavam sem respostas como o surgimento de novos táxons, os planos corporais e a macroevolução. As pesquisas na área de Evolução e desenvolvimento permitem, através da investigação, compreender o desenvolvimento de grupos taxonômicos diferentes a nível genético (Ridley 2009).

Dentre os estudos de Evo-Devo, destacam-se aqueles voltados para compreensão da embriologia comparada de artrópodes (Nunes da Fonseca;R; Gomes 2012). Contudo, o conhecimento de genética do desenvolvimento de insetos é quase restrito à mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, uma vez que esta espécie vem sendo estudada por mais de um século. A *D. melanogaster* possui sua embriologia bem descrita e com diversas características consideradas derivadas entre os insetos, inclusive os dípteros. Dentre essas características, destaca-se a presença de poucas células e de uma membrana extra-embrionária reduzida quando comparado com dípteros representantes de grupos mais basais, como o mosquito culicídeo *Aedes aegypti* (Schmidt-Ott and Lynch 2016).

Os estudos em Evo-Devo necessitam de comparação dos caracteres ao longo de uma filogenia. Dessa forma, há a possibilidade de julgar se um determinado caractere estudado é primitivo ou derivado entre os grupos analisados. Esse tipo de estudo pode ser realizado com espécies próximas, ou mesmo com espécies distantes (Arnoult et al. 2013, Koshikawa et al. 2015).

Os estudos com organismos considerados “não modelos” têm revelado muitos pontos em comum no desenvolvimento de artrópodes. Contudo, há estudos que mostram divergências na forma e funcionamento de artrópodes, ressaltando-se os estágios de ovo e adulto. Essas similaridades e divergências caracterizam a enorme diversificação genética entre os artrópodes. Dessa forma, estudos de Biologia do Desenvolvimento com esses organismos “não modelos” podem inferir novos padrões morfológicos e o estabelecimento de novos modelos experimentais (Marques-Souza et al. 2012).

Organismos considerados “não modelos”, como, por exemplo, os simulídeos, podem ser estudados tendo em vista sua importância como vetores de doenças, influenciando em diversas atividades humanas, como: agricultura, pecuária e turismo, acarretando prejuízos econômicos todos os anos. A compreensão da biologia evolutiva do desenvolvimento desses organismos contribuirá para o planejamento de medidas de controle dos mesmos, além de auxiliar em questões ambientais e estratégicas do país (Nunes da Fonseca;R; Gomes 2012).

Assim, estudos de biologia do desenvolvimento de simulídeos são extremamente interessantes, do ponto de vista da filogenia dos Diptera, mas também para a resolução de problemas de saúde, bem como de questões ambientais.

OBJETIVOS

Os objetivos do segundo capítulo foram:

1. Estabelecer, em condições laboratoriais, um possível modelo de artrópode (*Simulium sp.*) para estudos de Biologia do Desenvolvimento;
2. Estudar os aspectos morfológicos básicos da formação do ovo (Biologia do Desenvolvimento) dos indivíduos encontrados nas coletas de campo.

METODOLOGIA

Criação de simulídeos em laboratório:

Para a criação, foram simuladas em laboratório as condições ambientais e físicas para o desenvolvimento de simulídeos. Utilizando como base os estudos e tentativas anteriores, realizadas por outros pesquisadores, montou-se um sistema de aquários, composto por dois aquários, como mostrado nas figuras 23 e 24 (Rutschke and Grunewald 1984, Edman and Simmons 1985, Figueiró et al. 2006). Os aquários foram mantidos no Biotério Aquático do NUPEM/UFRJ.

O primeiro aquário mostrado, na figura 23, apresentou tamanho de 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 30 cm de altura, volume calculado em 37,5 litros. Esse aquário foi destinado à criação dos imaturos em fases larvais. Nesse aquário colocou-se uma cortina de ar da marca Boyu TN, de comprimento 45 cm, com microfuros permitindo a liberação de bolhas que ajudam a manter a oxigenação da água. Um filtro biológico ligado à bomba da cascata, da marca Sarlo Better mini, com vazão de 400/1000 L/h e uma bomba filtro também da mesma marca. Pedras e plantas também foram adicionadas para que o ambiente artificial fosse o mais próximo do natural.

Além disso, tentou-se estabelecer um fluxo contínuo de água o mais próximo ao dos ambientes lóticos. O aquário foi mantido com o nível da água até um ponto marcado na metade do aquário, que corresponde ao volume de 18,75 litros. O aquário foi observado todos os dias e acompanhado para verificar se a água estava evaporando e diminuindo. Quando observado que o nível de água estava abaixo da marcação, preenchia-se com água oriunda do próprio riacho do parque, trazida em um galão fechado de 50 litros de água, cedido pelo Laboratório de Limnologia. O aquário

permaneceu dentro de uma das salas do Biotério Aquático à temperatura de 21°C. Esse projeto tomou como base o descrito por (Figueiró et al 2006).

O segundo aquário mostrado, na figura 24, é mais rudimentar, apresenta 35 cm de comprimento, 40 cm de altura e 30 cm de largura, com capacidade de 42 litros, sendo destinado para a fase intermediária (pupa) e alada dos Simulídeos. Dentro dele é colocado um recipiente de vidro com água do próprio riacho e que fica em movimento, simulando a condição natural de onde os organismos foram retirados. Dentro da água, colocou-se uma placa de petri com papel filtro, onde seriam depositadas as pupas perto da coluna de água. O papel filtro umedecido serviu como substrato para as pupas, proporcionando a elas o ambiente úmido necessário para se desenvolverem em adulto.

Após eclodirem, os adultos foram retirados do aquário e transportados para gaiolas feitas de potes plásticos de tamanho 20 x 30 tampados com tela (Tulling) e mantidas em BOD da marca Tecnal e modelo TE-371 a 27/28°C, como mostrado na figura 25. Os adultos foram alimentados com uma solução de sacarose a 10% (5g de açúcar para 50 ml de água). Como foram poucos os adultos que eclodiram, foi utilizado apenas um pote de 50 mililitros de palito de dente como armazenador da solução. Na abertura foi colocada uma tira de papel filtro que suga a solução, mantendo-se úmido e facilitando a alimentação dos simulídeos na fase adulta.

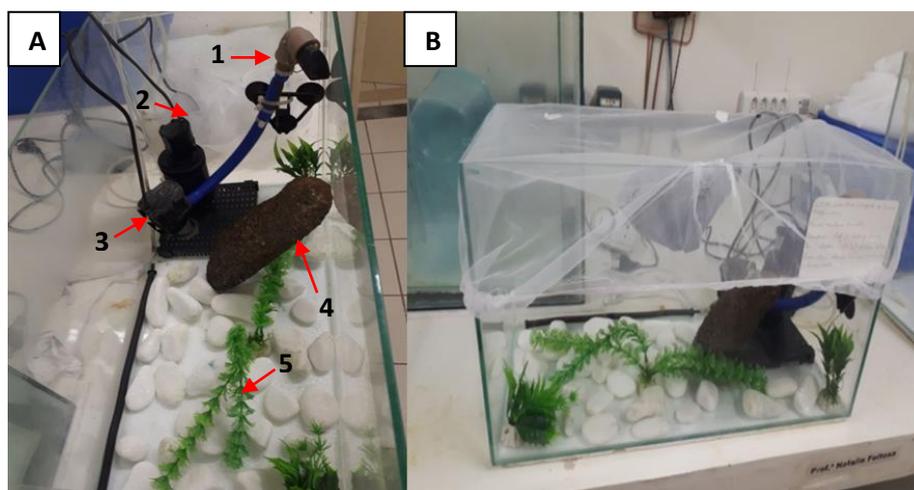


Figura 23: Aquário número 1, com 50 cm de comprimento, 25 cm de largura, 30 cm de altura e volume calculado de 37,5 litros, para a criação de larvas de simulídeos. Em **A**- observa-se o aquário de cima, onde **1:** Cascata de água; **2:** bomba filtro da marca Sarlo Better e com vazão de 60/170 L/h; **3:** bomba de água marca Sarlo Better mini e com vazão de 400/1000 L/h; **4:** rocha; **5:** vegetação artificial. Em **B**- Temos a vista lateral do

aquário, devidamente identificado com nome do discente, laboratório e nome do orientador.

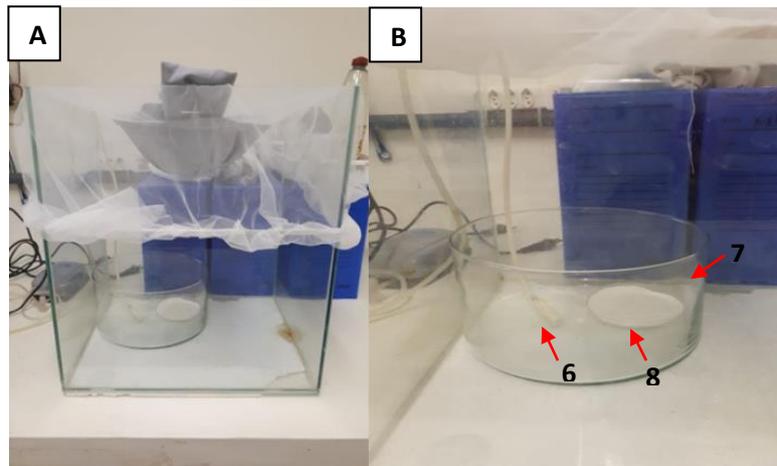


Figura 24: Aquário número 2 apresenta 35 cm de comprimento, 40 cm de altura, 30 cm de largura, com volume calculado de 42 litros, destinado à criação de pupas e adultos de simuliídeos. Em **A-** observa-se o aquário lateralmente. Em **B-** Temos a vista dos equipamentos internos do aquário, onde em **6:** bomba de aerção que garante o movimento da água; **7:** recipiente de vidro para simular um corpo d' água; **8:** placa de petri com papel filtro onde as pupas permanecerão até a eclosão.



Figura 25: As imagens a seguir representam em **A-** gaiola feita com potes plásticos de tamanho 20x 30 cm e tampadas com Tulling, em que os simuliídeos foram mantidos e em **B-** BOD de marca TecNal e modelo TE- 371.

Coleta de ovos de simúlídeos de dois córregos do Parque Natural Municipal Atalaia

A fim de se obter a postura de ovos de simúlídeos em ambiente natural, foram introduzidos, nos riachos, três grupos de fitilhos de polietileno, em três locais distintos dos riachos, nas cores amarelo-claro, branco e azul-claro, presos por palitos de churrasco de uma margem a outra. O tamanho da fita variou de acordo com a largura do ponto no riacho onde as fitas foram colocadas, mas a largura das fitas era constante, 4 mm aproximadamente. A escolha dessas cores foi feita para facilitar a visualização das posturas realizadas pela fêmea.

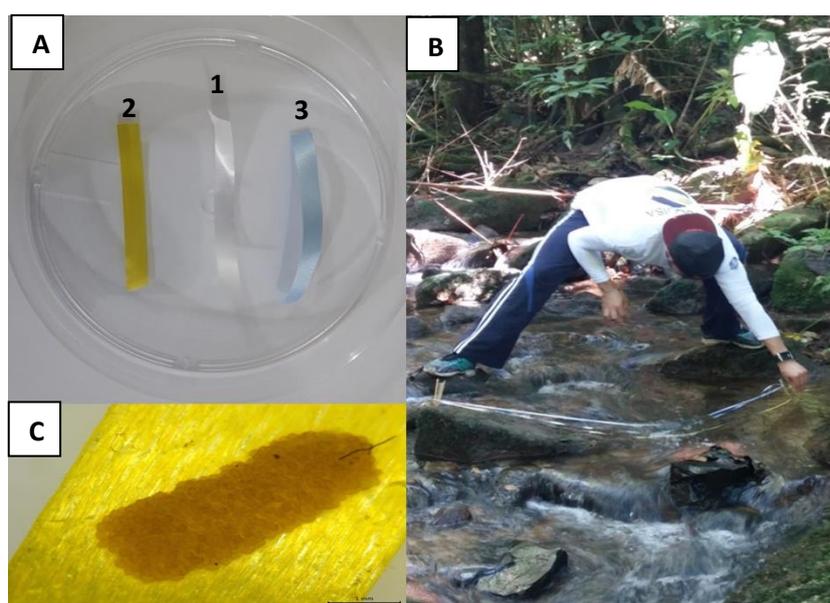


Figura 26: Em A- Fitolhos de polietileno nas cores: 1- Branco, 2- amarelo-claro e 3- azul-claro, utilizados para obtenção de ovos de simúlídeos em ambiente natural. Em B- Fitolhos sendo colocados em ambiente natural. C- Massa de ovos coletados na fita de cor amarela-claro.

Experimentação com ovos de simúlídeos em Laboratório

Fixação dos ovos de simúlídeos em laboratório

Após retornar do campo para o laboratório dentro de sacos com água do riacho, mantidos em isopor, os ovos foram fixados em uma solução contendo 5 ml de heptano e 5 ml de PFA. Após retirar o PFA da solução, os ovos que ainda estavam nas fitas foram colocados em 5 ml de metanol com 5 ml de heptano. O heptano em excesso foi retirado

e realizada uma breve centrifugação (700 g por 5 segundos) visando uma precipitação dos ovos para o fundo do tubo, evitando a perda dos mesmos. O metanol foi trocado por duas vezes, visando à liberação dos ovos do fitilho e da camada gelatinosa que os recobria. Quando os ovos soltavam, os mesmos eram recolhidos da placa de petri com o auxílio de uma pipeta pasteur de plástico. Os ovos que permaneceram aderidos ao fitilho foram retirados com o auxílio de uma mini espátula. Assim que todos os ovos foram desgrudados, os ovos foram recolhidos da solução de metanol e colocados em tubos ependorfs de 1,5 ml e então congelados (-20°C) para análises posteriores.

Descorionamento dos ovos de simulídeos e remoção dos embriões

Os ovos de simulídeos fixados e armazenados em metanol a - 20 °C foram transferidos gradualmente para um tampão fosfato salino contendo 0,2% de tween 20 PBS (Phosphate Buffer Solution), para evitar um choque osmótico. Após este processo, esses foram transferidos com o auxílio de um pincel para uma fita dupla face (3M VHD™ Scotch) que foi previamente fixada em uma placa de Petri 90x15 cm. Na sequência, passava-se o pincel contendo os ovos levemente sobre a fita dupla face, com o objetivo de depositá-los na mesma. Uma vez que os ovos foram depositados na fita, foi adicionada uma solução de PBS 1X até cobri-los, com o intuito de manter a integridade destes. Logo após, a placa de Petri foi encaminhada para o estereoscópio (Olympus modelo SZ2-LGCL), no qual, com o auxílio de uma pinça ou agulha de insulina, foram descorionados realizando leves toques nas regiões laterais dos ovos, com o intuito de realizar o rompimento e remoção do ovo e de sua casca. Após o processo manual de descorionamento, os ovos foram transferidos com o auxílio de uma micropipeta de 200 uL com a ponteira cortada na extremidade, para evitar danos à estrutura do mesmo, para um microtubo de 1,5 mL contendo uma solução de PBS 1x. Logo após esse processo, os ovos foram transferidos gradualmente para metanol e armazenados em metanol a - 20 °C para serem posteriormente utilizados em experimentos de marcação com o intercalante de DNA DAPI.

Marcação de ovos de simulídeos com DAPI

Para realizar a marcação nuclear com DAPI, foram utilizados 1 microlitro de DAPI e 500 microlitros de PBS 1x. O DAPI foi retirado do freezer, centrifugado e antes

de usar foi dado um spin. A solução foi preparada em um tubo envolto por um papel laminado e colocada no gelo.

A solução foi bem homogeneizada e, logo após, os embriões que estavam armazenados em metanol no freezer foram transferidos para o PBS 1x de forma gradual. Após esse processo, os embriões foram transferidos para o DAPI e deixados por 10 min na solução. Em seguida, os embriões foram lavados 2x com PBS 1x e colocados na rodinha para homogeneização. Depois desse processo, visualizaram-se os embriões no Estereoscópio Leica M205, onde foram retiradas as fotos dos mesmos.

RESULTADOS

Coleta de ovos de simúlídeos nos córregos do Parque Natural Municipal Atalaia

Na busca de ovos de simúlídeos para estudos de Biologia do Desenvolvimento, foi observado que quando colocadas as fitas das três cores, descritas no tópico metodologia, observou-se que houve todavia uma grande prevalência de posturas das fêmeas de simúlídeos especificamente pela fita de cor amarela. Em todas as fitas dessa coloração foram encontradas posturas de massas de ovos. Na cor branca foram encontradas dez posturas de massas de ovos, já na fita de cor azul encontramos um número de posturas menor, apenas duas posturas para todas as fitas encontradas dessa cor. A figura 28 mostra os resultados obtidos para a preferência das fêmeas em realizar a postura de ovos.

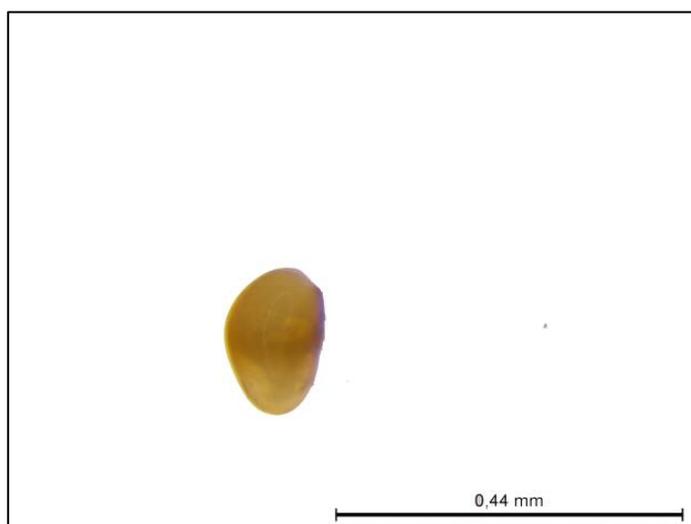


Figura 27: Ovo de simuliídeos separados da massa de ovos e fotografado em Estereoscópio Leica M205.

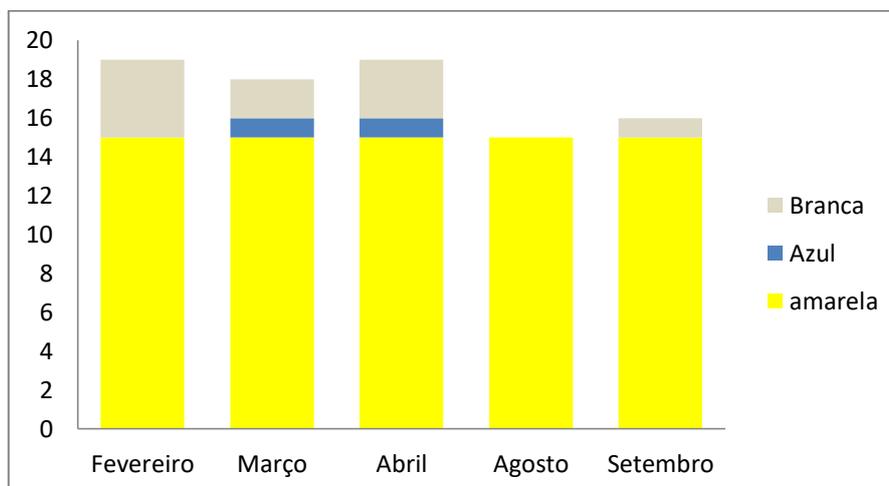


Figura 28: Preferência de coloração em filhotes de polietileno por fêmeas de simuliídeos do Parque Natural Municipal Atalaia.

Desenvolvimento da família Simuliidae em laboratório

Após seis tentativas de criar os simuliídeos capturados no Parque Natural Municipal Atalaia, conseguimos obter uma sobrevivência desses organismos em condições laboratoriais por até 16 dias, como descrito na tabela 10. No primeiro experimento, foram adicionadas 50 larvas no aquário e essas sobreviveram por quatro dias. Contudo, ressalta-se que este era um aquário bem rudimentar, com pouca aeração e ainda sem equipamentos de filtragem da água. Foi utilizado ração de peixe para alimentar as larvas, mas essa era grande demais, além de embolorarem e contaminarem o aquário. Além disso, a água utilizada foi uma mistura de água destilada com água da bica do biotério aquático.

Na segunda tentativa, o aquário foi melhor equipado com mais bombas de aeração, porém ainda não tínhamos filtros biológicos e permanecemos utilizando a mistura de água destilada e água da torneira do biotério aquático. Nesse segundo experimento já conseguimos que pelo menos um indivíduo chegasse à fase adulta. A partir da terceira tentativa em diante aumentamos o número de larvas no aquário e substituímos a água descrita para os experimentos anteriores por água do próprio riacho,

trazida em um galão de 50 litros e sempre renovada no aquário. Do terceiro experimento em diante já conseguimos aumentar o dia de sobrevivência dos organismos em laboratório, chegando esses a sobreviver por 16 dias em condições controladas. Além disso, continuamos conseguindo que as fases larvais continuassem conseguindo chegar até a fase adulta, porém estes morriam após vinte e quatro horas após a eclosão. Observando esse evento, no quarto experimento passamos a retirar os adultos que eclodiam no biotério aquático e começamos a colocá-los em gaiolas de potes plásticos, como descrito na sessão metodologia, e levá-los para uma BOD no Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais, onde a temperatura ficava na faixa entre os 27/28 °C, e estes adultos conseguiram então sobreviver até dois ou três dias.

Tabela 10: Desenvolvimento e sobrevivência de simuliídeos do Parque Natural Municipal Atalaia em condições laboratoriais.

Mês	Ano	Nº da tentativa	Nº larvas	Nº pupas	Nº Adultos	Dias de Sobrevivência
*Agosto	2017	1º	50	0	0	4
*Setembro	2017	2º	50	4	1	12
Fevereiro	2018	3º	100	5	3	16
Março	2018	4º	100	7	4	16
Abril	2018	5º	100	9	5	14
Agosto	2018	6º	100	4	3	16
Setembro	2018	7º	100	2	0	14

As tentativas que estão marcadas com um * são as tentativas pilotos de criação em laboratório.

Observação morfológica dos embriões da família Simuliidae a partir de campo claro e marcação com DAPI

O desenvolvimento dos embriões dos insetos passa por diversos estágios de divisão inicial, gastrulação, segmentação e organogênese. Em nossos experimentos, observamos a maior parte dos ovos em um estágio já avançado de desenvolvimento, com segmentação completa nesses embriões.

Após aplicar o protocolo de fixação dos ovos de simulídeos, similar ao aplicado por nosso grupo com o mosquito *Aedes*. Realizou-se o descarte manual dos mesmos, e então foi aplicada, pela primeira vez, uma técnica de marcação nuclear (DAPI) utilizando ovos de simulídeos. Ressalta-se ainda que esses protocolos sofreram pequenas adaptações, já que esses ovos apresentam diferenças se comparados com os do mosquito *Aedes aegypti*. Os ovos de simulídeos apresentaram-se muito menos estáveis do que os ovos de *Aedes aegypti*, mas alterações no protocolo para de descarte manual para que conseguíssemos realizar a marcação com DAPI. Com o auxílio dessa técnica, conseguimos visualizar o embrião de simulídeos e inferir possíveis estruturas do mesmo, como: região anterior do embrião, onde ficam localizados a cabeça e os ocelos do organismo, região da pro-leg, que é uma dita como uma falsa perna e que auxilia na locomoção mede-palmo da larva e região posterior desse inseto, onde ficam inúmeros órgãos digestórios e excretórios, assim como a região do disco anal, importante estrutura que permite que as larvas desse inseto se fixem em substratos, como folhas e pedras, e não sejam carregadas pela correnteza. Na figura 29, podemos ver as diversas estruturas identificadas e coradas com o DAPI.

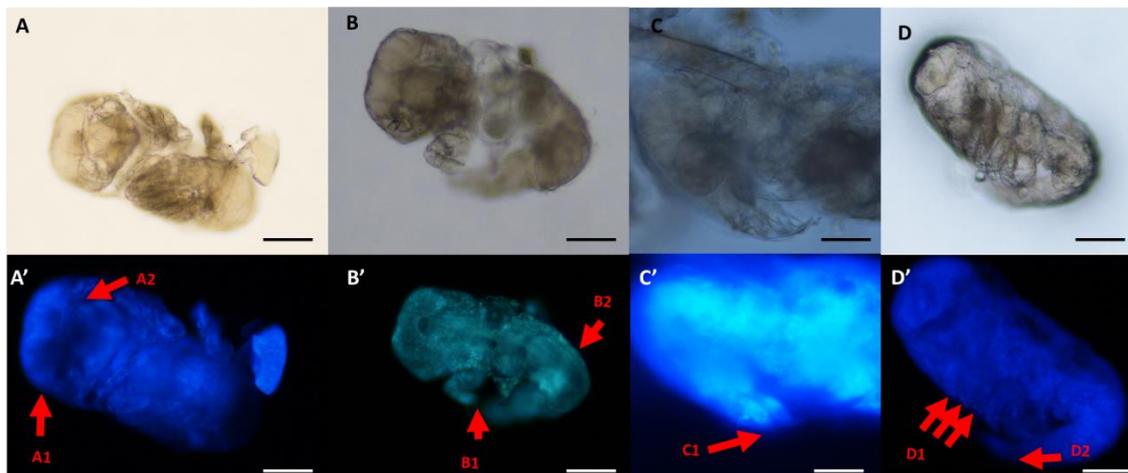


Figura 29: Embriões de Simulídeos corados com DAPI. Em (A/A')- Região anterior do embrião, **A1** - cabeça e **A2** – ocelos. Em (B/B')- **B1**- Região da pro-leg e região posterior em **B2**. Em (C/C')- Região anterior do embrião, com possível região do leque cefálico em **C1** e em (D/D')- as setas **D1** - Possíveis segmentos do embrião e **D2**- possível região do disco anal. Barra de escala: 1 mm.

DISCUSSÃO

Os simulídeos são insetos capazes de colonizar os mais diversos tipos de substratos. Entre os substratos mais comuns estão os vegetais suspensos na água ou imersos parcialmente, gravetos de madeira, paredes de cimento de tanques, rochas e folhiços, como mostrado no capítulo 1. Contudo, substratos artificiais também configuram locais para oviposição de fêmeas de simulídeos, como, por exemplo, fitilho de polietileno.

Notou-se, em nossos experimentos, que houve uma preferência de fêmeas para realizar a oviposição em fitilhos. Essa predileção foi notada preferencialmente por essas fêmeas no que diz respeito ao fitilho de coloração amarela. A preferência por essa cor pode estar relacionada à coloração dos substratos naturais, em que é feita a oviposição pelos simulídeos.

No trabalho de Guajará et al. (2004), eles mostram a preferência de *Euphalerus clitoriae* (Hemiptera: Psyllidae) por armadilhas que emitem o comprimento de onda na coloração amarela, fazendo com que indivíduos dessa espécie sejam mais atraídos do que pelas demais cores. Essa atração estaria ligada aos comprimentos de onda emitidos por essa cor em folhas de plantas que ficam na faixa entre 500 e 600 nm.

Estudos realizados por Petry (2005) mostraram que o uso de fitilhos para a oviposição de simulídeos foi bem sucedida. Ainda nesse mesmo estudo, foi realizada a comparação de diferentes cores para mostrar o comportamento de oviposição de fêmeas de simulídeos. Em seus resultados, os fitilhos de coloração amarela e branca foram os que receberam maior quantidade de posturas e nas mais variadas formas. Logo, nossos resultados corroboram esses achados prévios.

Na primeira tentativa de mimetizar em laboratório as condições ideais para a criação de simulídeos, que ocorreu no mês de agosto de 2017, foram colocadas 50 larvas dentro de um aquário. Os imaturos que foram colocados no aquário sobreviveram apenas quatro dias, no quinto dia, quando observado, não havia mais nenhum imaturo vivo.

As larvas foram mantidas no Biotério Aquático sob uma temperatura constante do ar de 21° C e temperatura média da água de 22.8° C. O pH médio foi 6.1, representando um meio mais básico na primeira tentativa. A oxigenação foi mantida por

uma única bomba de aeração, isso acarretou em níveis médios de oxigenação bem baixos (6.2mg/L e 58.9%), o que pode ter contribuído para o baixo sucesso do experimento, já que simulídeos necessitam de grandes quantidades de oxigênio para se desenvolverem. Não havia nenhuma espécie de filtro e não foi medida quantidade de amônia presente na água. Além disso, a água utilizada na primeira tentativa foi composta por 50% de água destilada e 50% de água da torneira. Essa combinação de água destilada e da torneira pode não ter sido eficaz, uma vez que a água destilada é uma água pobre em nutrientes e a água da torneira é tratada com cloro, o que pode prejudicar o desenvolvimento dos simulídeos.

Na segunda tentativa, que ocorreu no mês de Setembro, foram colocadas novamente 50 larvas de simulídeos no aquário. Desta vez, o aquário foi preenchido com água do próprio riacho do Parque Natural Municipal Atalaia e as larvas alimentadas com spirulina da marca meissen, composta pela alga *Spirulina máxima*, uma vez por semana. Além disso, o aquário estava mais aerado, com filtros biológicos e controlou-se a amônia também. Como observado na tabela 10, houve um aumento no número de dias (12 dias) em que os organismos sobreviveram e estes, então, conseguiram chegar às fases de pupa e aladas. A maior concentração de oxigênio dissolvido na água promovida ao aquário pode ter contribuído para que a colônia de simulídeos, introduzida nesse habitat artificial, tenha obtido uma maior resistência e sobrevivido por mais dias.

Após essas duas tentativas, manteve-se a metodologia, porém o número de indivíduos nas tentativas posteriores foi dobrado de 50 para 100 indivíduos. Nas tentativas dos meses de fevereiro, março, abril, agosto e setembro de 2018, o número de dias em laboratório também aumentou de doze até dezesseis dias de sobrevivência. Novamente houve indivíduos que chegaram às fases de pupa e adulto no aquário, como mostrado na tabela 10. Contudo, a taxa de indivíduos que conseguiu chegar à fase adulta ainda é muito baixa, não atingindo nem 50% dos indivíduos.

Esse projeto tomou como base o descrito por Figueiró et al. (2006). Nele, o autor citado realizou um trabalho similar, porém realizando bioensaios com larvicidas. Nesse estudo, o mesmo utilizou um aquário de comprimento 0,45 m, largura 0,24 m e 0,36 m, com um reservatório localizado em seu topo. A água foi constantemente bombeada do fundo para esse reservatório e seguida para outros dois canais de diferentes inclinações, resultando em três correntes de velocidades diferentes. O aquário descrito não possuía nenhum tipo de oxigenação ou filtro. Segundo o autor, a taxa de sobrevivência era de

47% a 60%, com 4% a 6% dos indivíduos chegando à fase de pupa, sem nenhum indivíduo chegando à fase adulta.

Vários estudos relatam a influência de fatores abióticos e bióticos sobre a vida dos insetos (Weigert et al. 2002; Jahnke et al. 2007; Almeida and Gonçalves 2007). Em dípteros, sua variação e abundância podem estar correlacionadas a fatores, como: variação de temperatura, umidade relativa do ar, precipitação, entre outros fatores ambientais (da Silva Santos et al. 2011; Chen and Ye 2007; Gomes et al. 2000; Mello et al. 2007; Lopes et al. 2008). Esses fatores ambientais apresentam uma importância eminente para esses organismos, uma vez que influenciam seu desenvolvimento, reprodução e comportamento (Silveira 1976).

Observando os dados do fator temperatura da água, podemos analisar que esses organismos, quando nas fases imaturas, foram capazes de se desenvolver em águas com temperaturas que variam entre 21.8 e 23.9 °C. De acordo com Pegaroro and Stuker (1993), esses valores estão praticamente dentro dos valores estimados e referenciados, que foram entre 20 e 25°C. De acordo com Souza 1984), a temperatura é um fator importante para o desenvolvimento dos simulídeos como mostrado em anexo.

Nas primeiras tentativas, como o sistema que mantinha o aquário era bem simples, com poucas bombas ainda, havia pouca circulação de oxigênio dentro do microssistema. Essa carência de oxigênio no sistema pode ter contribuído para que os imaturos de simulídeos não tenham se desenvolvido e sobrevivido, uma vez que esses organismos necessitam de uma quantidade grande de oxigênio dissolvido na água.

Elevadas concentrações de oxigênio, propiciam condições ideais para o desenvolvimento de larvas de borrachudo, por consequência de sua necessidade metabólica (Strieder et al. 2002; Strieder et al. 2006). Compreender essa dinâmica é importante, uma vez que muitos invertebrados aquáticos necessitam de águas bem aeradas para sobreviver (Hynes 1968).

Outro fator que pode ter contribuído para o aumento da sobrevivência dos imaturos em laboratório é a alimentação. Inicialmente, nas coletas de agosto de 2017, os imaturos foram alimentados com ração para peixe, resultando em uma sobrevivência de quatro dias. Contudo, a ração de peixe, mesmo quando macerada, apresentava um tamanho muito grande em relação aos imaturos, além também de fungarem, se deixadas por muitos dias na água. Após essas observações, trocou-se a alimentação pela spirulina, que é um composto feito de algas. Após trocar o método de alimentação, observou-se que, já na coleta de Setembro, os imaturos sobreviveram por mais dias.

As larvas devem ser alimentadas com fitoplâncton e rações. Outros autores relatam que a alimentação em sistemas fechados pode ser feita utilizando ração para peixe como suplemento alimentar (Zhang 2006; Vojvoddic et al. 2006) ou até levedura (Hart et al. 1991; Fredeen 1959). Em seus trabalhos, Dellome Filho 1991), Puri 1925) e Cunha et al. 2011) colocaram suas larvas em aquários contendo água do rio e suplementação com microalgas cultivadas e leveduras, além de haver também, em seu aquário, bombas para realizar a aeração. Esses resultados mostraram que as larvas tiveram uma sobrevivência maior de até 43, quando em sua suplementação alimentar houve uma combinação principalmente de algas e levedura, mas nenhum indivíduo chegou às fases de pupa ou adulta.

Nos estudos realizados para investigar a Biologia do Desenvolvimento dos simuliídeos dos córregos do Parque Natural Municipal Atalaia, pudemos, através da marcação com DAPI, observar e mostrar possíveis estruturas, como apresentado na sessão dos resultados. Algumas dessas estruturas, como pro-leg e disco anal, são de importância para esses organismos, uma vez que possibilitam sua locomoção e fixação dentro do meio aquático, impedindo que estes sejam levados pela correnteza. Ainda destaca-se o leque cefálico, importante para a alimentação desses organismos. Esses resultados representam uma grande conquista para estudos de Biologia do Desenvolvimento, já que a Família Simuliidae é um grupo de interesse para compreensão da filogenia de dípteros e também como vetores de doenças e agentes molestantes.

Embora não haja muitas pesquisas sobre a Biologia do Desenvolvimento de Simuliidae, os estudos de Gambrell and Jahn 1933) mostram que o desenvolvimento inicial de Simuliídeos dentro do ovo é similar ao desenvolvimento de outros dípteros, como principalmente os Quironomídeos em que a maior diferença entre os dois grupos seria que as membranas extraembrionárias se formam mais rapidamente no primeiro grupo do que no segundo, a cauda do embrião é mais imersa na gema em Quironomídeos do que em Simuliídeos, as glândulas de seda são invaginações ectodérmicas precoces. Dessa forma, com os avanços das técnicas, conseguimos acompanhar melhor o desenvolvimento de *Simulium*.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que:

- O uso de fitilho de polietileno como local de oviposição de simulídeos é uma boa estratégia e que houve uma predileção pelas fêmeas para a coloração amarela, onde estas realizaram a oviposição;
- Na tentativa de criar espécies de simulídeos em um ambiente controlado, como laboratório, os mesmos sobreviveram durante dezesseis dias, com indivíduos chegando às fases de pupa e adulto alado;
- Os primeiros estudos sobre Biologia do Desenvolvimento utilizando marcação com DAPI permitiram-nos identificar estruturas características da família, possibilitando-nos inferir possíveis estruturas dos embriões de *Simulium sp.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, P. H. and R. W. Crosskey (2018). "World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. 2016." Acessado em: www.clemson.edu/cafls/departments/esps/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf.

Almeida, F. S. and L. Gonçalves (2007). "Effects of temperature and food on the development of *Dysdercus maurus* Distant (Hemiptera, Pyrrhocoridae)." Revista Brasileira de Entomologia **51**(4): 506-511.

Alvarenga, A. S., et al. (2016). "Biologia Evolutiva do Desenvolvimento de artrópodes: uma visão brasileira." Acta Scientiae & Technicae **4**: 15.

Arnoult, L., et al. (2013). "Emergence and diversification of fly pigmentation through evolution of a gene regulatory module." Science **339**(6126): 1423-1426.

Avise, J. C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species, Harvard university press.

Avise, J. C. and D. Walker (1999). "Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(3): 992-995.

Baba, M. and H. Takaoka (1991). "Oviposition habits of a univoltine blackfly, *Prosimulium kotoense* (Diptera: Simuliidae), in Kyushu, Japan." Medical and veterinary entomology **5**(3): 351-358.

Balbierato, L. M. S., M. M. M.; Prévide, M. A. (2016). "Dípteros e Coleópteros presentes na decomposição de carcaça

suína semicarbonizada em Jardinópolis/SP." Natureza online **15** (1): 070-077.

Bispo, P. and L. Oliveira (1998). "Distribuição espacial de insetos aquáticos (Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera) em córregos de cerrado do Parque Ecológico de Goiânia, Estado de Goiás." Oecologia Brasiliensis **5**(1): 12.

Borém, R. A. T. and a. d. Oliveira-Filho (2002). "Fitossociologia do estrato arbóreo em uma topossequência alterada de Mata Atlântica, no município de Silva Jardim-RJ, Brasil." Revista Árvore **26**(6): 727-742.

Branco Junior, A. C. (1991). "Estudos ecologicos e patologicos da infecção por *Polidispyrenia simulu* (Microspora: Pleistophoridae) em uma comunidade de Simuliideos."

Brown, W. M., et al. (1979). "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences **76**(4): 1967-1971.

Castex, M., et al. (1988). "Breeding places of *Simulium quadrivittatum* Loew, 1862 (Diptera: Simuliidae) in Isla de la Juventud." Revista cubana de medicina tropical **40**(3): 60-67.

Chen, P. and H. Ye (2007). "Population dynamics of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) and analysis of factors influencing populations in Baoshanba, Yunnan, China." Entomological science **10**(2): 141-147.

Coppo, T. L. and J. Lopes (2010). "Diversidade de Simuliidae (Diptera: Nematocera) de três cursos d'água no parque ecológico da Klabin SA–Telêmaco Borba, Estado do Paraná." Semina: Ciências Biológicas e da Saúde **31**(1): 03-14.

Coscarón, S. (1981). "Fauna de agua dulce de la República Argentina: Insecta Díptera: Simuliidae."

Coscarón, S. (1991). "Fauna de agua dulce de la República Argentina: Insecta Díptera: Simuliidae."

Coscarón, S. and C. L. C. Arias (2007). Aquatic Biodiversity in Latin America Volume 3: Neotropical Simuliidae (Diptera: Insecta), Pensoft publishers.

Couceiro, M. E., et al. (2014). "Distribución del bajo peso para la edad gestacional en el municipio capital de la provincia de Salta. República Argentina." Antropo **32**: 55-67.

Cunha, A. d. B. P. V., et al. (2011). "Desenvolvimento larval de *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax* (Diptera: Simuliidae) em criadouro artificial." Neotropical Biology & Conservation **6**(2).

da Silva Santos, M., et al. (2011). "Análise faunística e flutuação populacional de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em Belmonte, Bahia." Revista Caatinga **24**(4): 86-93.

DaSilva, M. B., et al. (2011). "História biogeográfica da Mata Atlântica: opiliões (Arachnida) como modelo para sua inferência." Biogeografia da América do Sul. Padrões & Processos.(Eds CJB Carvalho and EAB Almeida.) pp: 221-238.

de Arruda Buffolo, I. R., et al. (2016). "Desvendando os padrões de preferência de habitat de larvas de simuliidae (diptera) neotropicais e suas implicações para o controle do vetor." Acta Biomedica Brasiliensia **7**(1): 109-123.

de Castro, E. B. V., et al. (2008). "Ampliando a escala de conservação: avaliação de áreas potenciais e proposta de ampliação do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ." Revista Espaço e Geografia **11**(1).

Dellome Filho, J. (1991). "Simuliofauna do rio Marumbi (Morretes, PR, Brasil). I. Coleta e criação; dados meteorológicos e físico-químicos do criadouro; adultos (Diptera, Simuliidae)." Acta Biológica Paranaense **20**.

Dellome Filho, J. (1992). "Simuliofauna do rio Marumbi, Morretes, Paraná, Brasil. II. Substratos naturais e artificiais dos imaturos e fauna associada (Diptera, Simuliidae)." Acta Biológica Paranaense **21**.

Edman, J. and K. Simmons (1985). "Rearing and colonization of black flies (Diptera: Simuliidae)." Journal of medical entomology **22**(1): 1-17.

Figueiró, R., et al. (2006). "An Artificial Breeding Site for Larvicide Bioassays and Interaction Studies with Diptera: Simuliidae and Other Macroinvertebrates from Lotic Systems." BioAssay **1**.

Figueiró, R., et al. (2012). "Diversity and microdistribution of black fly (Diptera: Simuliidae) assemblages in the tropical savanna streams of the Brazilian cerrado." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **107**(3): 362-369.

Fonseca-Gessner, A. and R. Guerreschi (2000). "Macroinvertebrados bentônicos na avaliação da qualidade da água de três córregos na Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antonio, SP, Brasil." Estudos integrados em ecossistemas: Estação Ecológica de Jataí. São Carlos: Rima **2**: 707-731.

Fredeen, F. (1959). "Rearing black flies in the laboratory (Diptera: Simuliidae)." The Canadian Entomologist **91**(2): 73-83.

Gambrell, F. and L. A. Jahn (1933). "The embryology of the black fly, *Simulium pictipes* Hagen." Annals of the Entomological Society of America **26**(4): 641-671.

Gil-Azevedo, L. H., et al. (2005). "Chave de identificação de pupas de Simuliidae (Diptera) do sudeste do Brasil Identification key to pupae of Simuliidae (Diptera) from Southeastern of Brazil." Revista Brasileira de Zoologia **22**(3): 742-752.

Gomes, A., et al. (2000). "Sazonalidade da mosca-varejeira, *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), na região dos Cerrados, Campo Grande, MS." Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária **9**(2): 125-128.

Gondim, A. I., et al. (2011). "Macrofauna bêntica do Parque Estadual Marinho de Areia Vermelha, Cabedelo, Paraíba, Brasil." *Biota Neotropica* **11**(2): 1-12.

Gorayeb, I. (1981). "Comportamento de ovoposi o e ciclo evolutivo de *Simillium fulvotum* Cerq. e Melo 1968 (Diptera, Nematocera)." *Acta Amazonica* **11**(3): 595-604.

Grillet, M. E. and R. Barrera (1997). "Spatial and temporal abundance, substrate partitioning and species co-occurrence in a guild of Neotropical blackflies (Diptera: Simuliidae)." *Hydrobiologia* **345**(2-3): 197-208.

Grimaldi, D., et al. (2005). *Evolution of the Insects*, Cambridge University Press.

Guajará, M., et al. (2004). "Resposta de *Euphalerus clitoriae* (Hemiptera: Psyllidae) a armadilhas adesivas de diferentes cores." *Revista  rvore* **28**(1).

Gullan, P., et al. (2007). *Os insetos: um resumo de entomologia*, Roca.

Hajibabaei, M., et al. (2007). "Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring." *BMC biology* **5**(1): 24.

Hamada, N. and J. W. McCreddie (1999). "Environmental factors associated with the distribution of *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) among streams in Brazilian Amazonia." *Hydrobiologia* **397**: 71-78.

Hamada, N., et al. (2002). "Species richness and spatial distribution of blackflies (Diptera: Simuliidae) in streams of Central Amazonia, Brazil." *Freshwater Biology* **47**(1): 31-40.

Hamada, N., et al. (2014). *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*, Manaus: Editora do INPA, 2014.

Hamada, N., et al. (2006). "Simulídeos: Programa Estadual do Rio Grande do Sul, Brasil: chave de identifica o de pupas da família Simuliidae (Diptera, Nematocera) para apoio às equipes regionais e municipais na determina o das espécies." *Secretaria Estadual da Saúde, Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 40p.*

Hart, D., et al. (1991). "Feeding postures of suspension-feeding larval black flies: the conflicting demands of drag and food acquisition." *Oecologia* **85**(4): 457-463.

Hauer, F. R. and A. C. Benke (1987). "Influence of temperature and river hydrograph on black fly growth rates in a subtropical blackwater river." *Journal of the North American Benthological Society* **6**(4): 251-261.

Hebert, P. D., et al. (2003). "Biological identifications through DNA barcodes." Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **270**(1512): 313-321.

Hebert, P. D., et al. (2004). "Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(41): 14812-14817.

Higgins, D. G. and P. M. Sharp (1989). "Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer." Bioinformatics **5**(2): 151-153.

Huamantínco, A. and J. Nessimian (1999). "Estrutura e distribuição espacial da comunidade de larvas de Trichoptera (Insecta) em um tributário de primeira ordem do Rio Paquequer, Teresópolis, RJ." Acta Limnológica Brasiliensia **11**(2): 1-16.

Hynes, H. (1968). "FURTHER STUDIES ON INVERTEBRATE FAUNA OF A WELSH MOUNTAIN STREAM." Archiv für Hydrobiologie **65**(3): 360-&.

Jacinto, L. R. d. C. (2003). Geoprocessamento e sensoriamento remoto como ferramentas na gestão ambiental de Unidades de Conservação: o caso da Área de Proteção Ambiental (APA) do Capivari-Monos, São Paulo-SP, Universidade de São Paulo.

Jahnke, S. M., et al. (2007). "Structure and composition of the assemblage of parasitoids associated to *Phyllocnistis citrella* Pupae Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) in citrus orchards in Southern Brazil." Neotropical entomology **36**(5): 746-751.

Kazancı, N. and O. Ertunc (2010). "Use of Simuliidae (Insecta, Diptera) species as indicators of aquatic habitat quality of Yeşilirmak River Basin (Turkey)." Review of Hydrobiology **3**(1): 27-36.

Kerr, K. C., et al. (2007). "Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds." Molecular ecology notes **7**(4): 535-543.

Kikuchi, R. M. and V. S. Uieda (2005). "Composição e distribuição dos macroinvertebrados em diferentes substratos de fundo de um riacho no município de Itatinga, São Paulo, Brasil." Entomologia y Vectores **12**(2): 193-231.

Koshikawa, S., et al. (2015). "Gain of cis-regulatory activities underlies novel domains of wingless gene expression in *Drosophila*." Proceedings of the National Academy of Sciences: 201509022.

Landeiro, V. L., et al. (2009). "Species richness and distribution of blackflies (Diptera: Simuliidae) in the Chapada Diamantina region, Bahia, Brazil." Neotropical entomology **38**(3): 332-339.

Lautenschläger, M. and E. Kiel (2005). "Assessing morphological degradation in running waters using Blackfly communities (Diptera, Simuliidae): Can habitat quality be predicted from land use?" Limnologica **35**(4): 262-273.

Leal, C. G. and I. de Gusmão Câmara (2003). The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook, Island Press.

Lester, R. and F. Roubal (1995). "Phylum Arthropoda." Phylum Arthropoda: 475-598.

Lewinsohn, T. M., et al. (2005). "Conservação de invertebrados terrestres e seus habitats no Brasil." Megadiversidade **1**(1): 62-69.

Lopes, W. D. Z., et al. (2008). "Abundância e sazonalidade de dípteros (Insecta) em granja aviária da região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil." Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária **17**(1): 21-27.

Magalhães, V. D., et al. (2005). "Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia-uma revisão técnica." Revista do Instituto Adolfo Lutz **64**(2): 155-161.

Maia-Herzog, M. (1999). "A Oncocercose Humana no Brasil e sua dispersão." Rio de Janeiro: Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz.

Maia-Herzog, M. (2003). "Modificação na técnica para montagem de simulídeos (Insecta, Diptera) em lâmina/lamínula." Revista Brasileira de Zoologia **20**(4): 773-774.

Maia, A., et al. (2014). "Controle biológico de simulídeos (Diptera: Simuliidae): panorama e perspectivas." Cadernos UniFOA **9**(25): 89-104.

Marcellini, S., et al. (2017). "Evolutionary Developmental Biology (Evo-Devo) Research in Latin America." Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution **328**(1-2): 5-40.

Marques-Souza, H., et al. (2012). "Evo-Devo verde-amarela: biologia evolutiva do desenvolvimento ganha espaço no Brasil." Ciência Hoje, São Paulo **298**: 39-42.

McCreadie, J. W. and P. H. Adler (1998). "Scale, time, space, and predictability: species distributions of preimaginal black flies (Diptera: Simuliidae)." Oecologia **114**(1): 79-92.

McCreadie, J. W., et al. (2006). "Sampling statistics in understanding distributions of black fly larvae (Diptera: Simuliidae)." Acta entomologica serbica **11**: 89-96.

Mello, R. d. S., et al. (2007). "Population fluctuations of calliphorid species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil." Iheringia. Série Zoologia **97**(4): 481-485.

Menzel, T. C. (2016). "Diversidade e distribuição espacial de espécies de borrachudos (Diptera: simuliidae) na bacia hidrográfica do Rio Ijuí, RS, Brasil."

Mikkelsen, P. M. and J. Cracraft (2001). "Marine biodiversity and the need for systematic inventories." Bulletin of Marine Science **69**(2): 525-534.

Mittermeier, R. A., et al. (2005). "Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil." Megadiversidade **1**(1): 14-21.

Moulton, T. P. (1998). "Saúde e integridade do ecossistema eo papel dos insetos aquáticos." Oecologia Brasiliensis **5**(1): 19.

Moura, F. d. B. P. (2006). A Mata Atlântica em Alagoas, EDUFAL Maceió.

Mullis, K. B., et al. (1989). Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences, Google Patents.

Nelson, L., et al. (2007). "Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies." Medical and veterinary entomology **21**(1): 44-52.

Nunes da Fonseca;R; Gomes, H. F. A., H. (2012). Aspectos Morfofuncionais da Embriologia dos Artrópodes.

Oliveira, U., et al. (2017). "Biodiversity conservation gaps in the Brazilian protected areas." Scientific reports **7**(1): 9141.

Oliver, I., et al. (1998). "Spatial fidelity of plant, vertebrate, and invertebrate assemblages in multiple-use forest in eastern Australia." Conservation Biology **12**(4): 822-835.

Pepinelli, M., et al. (2005). "Immature stages of Simuliidae (Diptera, Nematocera) and characterization of its habitats in the Parque Estadual Intervalles, SP, Brazil." Revista Brasileira de Entomologia **49**(4): 527-530.

Petry, F. (2005). 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, Tese (mestrado em Ciências Biológicas)–Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Porta, A. R. and E. Enners (2012). "Determining annealing temperatures for polymerase chain reaction." The American Biology Teacher **74**(4): 256-260.

Pramual, P. and C. Kuvangkadilok (2009). "Agricultural land use and black fly (Diptera, Simuliidae) species richness and species assemblages in tropical streams, Northeastern Thailand." Hydrobiologia **625**(1): 173-184.

Puri, I. (1925). "On the life-history and structure of the early stages of Simuliidae (Diptera, Nematocera). Part I." Parasitology **17**(3): 295-334.

Py-Daniel, V. (2003). "sobre simúlideos (Diptera-Simuliidae) e filarioses (Oncocercose e." Revista Científica da FACEX.

Ribeiro, M. C., et al. (2009). "The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation." Biological Conservation **142**(6): 1141-1153.

Ridley, M. (2009). Evolução, Artmed Editora.

Rivera, J. and D. C. Currie (2009). "Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae)." Molecular Ecology Resources **9**: 224-236.

Rivera, L. M. R., et al. (2012). "Variabilidade genética de espécies de Culicidae e Simuliidae usando marcador mitocondrial." Universitas: Ciências da Saúde **10**(1): 23-31.

Rutschke, J. and J. Grunewald (1984). "A simple apparatus for maintaining black fly adults (Simuliidae) in the laboratory." Mosquito News **44**: 461-465.

Sá, M. R. and M. Maia-Herzog (2003). "Doença de além-mar; estudos comparativos da oncocercose na América Latina e África Overseas disease; comparative studies of oncocercosis in Latin America and Africa." História **10**(1): 251-258.

Saiki, R. K., et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.

Santos, R. B., et al. (2010). "Distribuição espacial e variação temporal da composição de espécies de borrachudos (Diptera: Simuliidae) em uma microbacia situada no norte do Paraná." Neotrop Entomol **39**(2): 289-298.

Schmidt-Ott, U. and J. A. Lynch (2016). "Emerging developmental genetic model systems in holometabolous insects." Current opinion in genetics & development **39**: 116-128.

Silva, C. A. O. (2015). "Roedores, Marsupiais e Quirópteros silvestres do Parque Natural Municipal Fazenda Atalaia, MACAÉ, RJ: Taxonomia e Níveis de endemismo como subsídios à conservação."

Silveira, N. (1976). "S., O. NAKANO, D. BARBIN & N. VILLA NOVA. Manual de ecologia dos insetos. São Paulo." Agronômica Ceres, 419p.

Smith, M. A., et al. (2007). "DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(12): 4967-4972.

Smith, M. A., et al. (2006). "DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae)." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(10): 3657-3662.

Souza, M. (1984). "Atendimento médico por picadas de simuliídeos." Boletim da saúde **11**(2): 8-11.

Strieder, M. and V. Py-Daniel (1999). "Espécies de Inaequalium (Diptera, Simuliidae): dados bionômicos e chaves para sua identificação." Biociências **7**(2): 43-72.

Strieder, M., et al. (2002). "Diversidade e distribuição de Simuliidae (Diptera, Nematocera) no gradiente longitudinal da bacia do rio dos Sinos, no Rio Grande do Sul, Brasil." Entomologia y Vectores **9**(4): 527-540.

Strieder, M. N., et al. (2006). "Distribuição, abundância e diversidade de Simuliidae (Diptera) em uma bacia hidrográfica impactada no sul do Brasil." Revista Brasileira de Entomologia **50**(1): 119-124.

Tabarelli, M., et al. (2005). "Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira." Megadiversidade **1**(1): 132-138.

Takeda, A. M., et al. (1997). "Variações espaço-temporais da comunidade zoobêntica." Planície de inundação do Alto Rio Paraná. Maringá: EDUEM: 157-177.

Tauil, P. L. (2002). "Controle de doenças transmitidas por vetores no sistema único de saúde." Informe Epidemiológico do SUS **11**(2): 59-60.

Viviani, A. d. B., et al. (2012). "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: 48-56.

Vojvoddic, S., et al. (2006). "Influence of fixation of the blackfly *Simulium vittatum* on morphological characters of the trichomycete *Smittium culisetae*." Acta entomologica serbica **125**: 130.

Wainfas, R. L. (2015). Distribuição espacial e temporal de Simuliidae (Diptera) em córregos sob a influência de fatores abióticos e antrópicos da área da UHE peixeangical, Tocantins, Brasil.

Weigert, S. C., et al. (2002). "Influência da temperatura e do tipo de substrato na produção de larvas de *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera, Muscidae)." Revista Brasileira de Zootecnia **5**: 1886-1889.

Weiss, V. A. (2010). "Estratégias de finalização da montagem do genoma da Bactéria Diazotrófica Endofítica *Herbaspirillum Seropedicae* SmR1."

Zhang, Y. (2006). "Balancing food availability and hydrodynamic constraint: phenotypic plasticity and growth in *Simulium noelleri* blackfly larvae." Oecologia **147**(1): 39-46.

Zhang, Y., et al. (1998). "Ecological processes affecting community structure of blackfly larvae in regulated and unregulated rivers: a regional study." Journal of Applied Ecology **35**(5): 673-686.

ANEXOS

Tabela 11: Valores dos fatores abióticos medidos em condições laboratoriais de acordo com as tentativas de criação de simúldeos em laboratório.

Tentativa	Mês	Condutividade (μS)	Temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$)	Salinidade (μS)	TDS (μS)	O2 dissolvido (%)	O2 dissolvido (mg/l)	pH
1º	Agosto/2017	35.7	21.0	22.8	0.1	24.0	58.9	6.2	6.1
2º	Setembro/2017	174.25	21.0	21.8	0.1	125.2	92.3	9.5	7.5
3º	Fevereiro/2018	171.6	21.0	23.5	0.1	114.2	82.9	8.7	7.5
4º	Março/2018	171.8	21.0	23.9	0.1	116.8	86.7	8.9	7.5
5º	Abril/2018	163.1	21.0	23.7	0.1	9.60	84.9	7.7	7.5
6º	Agosto/2018	162.9	21.0	23.5	0.1	9.85	93.8	8.0	7.5
7º	Setembro/2018	162.5	21.0	23.6	0.1	9.77	92.6	8.3	7.5

Tabela 12: Dados dos Fatores abióticos coletados em campo no Parque Natural Municipal Atalaia.

Meses de coleta	Estação	Córrego	Ponto de Coleta	Condutividade (μS)	Temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$)	Salinidade (μS)	TDS (μS)	O2 dissolvido (%)	O2 dissolvido (mg/l)	pH	Vazão (m^3/s^2)
Fevereiro	Chuvas	Mirante	P1	39.2	40	24.6	0	25.8	77.2	6.52	6.50	0,045
Fevereiro	Chuvas	Mirante	P2	38.2	40	24.2	0	25.2	79.6	6.49	6.43	0,041

Fevereiro	Chuvas	Atalaia	P3	43.2	40	24.2	0	28.5	82.1	6.72	6.25	0,065
Fevereiro	Chuvas	Atalaia	P4	40.7	40	23.9	0	27.1	79.0	6.91	6.38	0,063
Fevereiro	Chuvas	Atalaia	P5	41.9	40	23.4	0	28.1	74.3	6.51	6.35	0,058
Março	Chuvas	Mirante	P1	37.4	36	22.7	0	25.5	61.7	5.25	6.40	0,04
Março	Chuvas	Mirante	P2	36.9	36	22.5	0	25.4	61.8	5.34	6.45	0,043
Março	Chuvas	Atalaia	P3	41.8	36	22.2	0	29.0	62.0	5.31	6.39	0,051
Março	Chuvas	Atalaia	P4	41.2	36	22.5	0	28.1	62.1	5.41	6.43	0,055
Março	Chuvas	Atalaia	P5	43.3	36	22.6	0	28.5	63.4	5.54	6.55	0,05
Abril	Chuvas	Mirante	P1	37.8	31	23.8	0	23.5	80.3	6.78	6.65	0,038
Abril	Chuvas	Mirante	P2	37.3	31	23.5	0	25.0	74.3	6.50	6.44	0,043
Abril	Chuvas	Atalaia	P3	42.1	31	23.9	0	28.0	77.0	6.70	6.54	0,054
Abril	Chuvas	Atalaia	P4	40.8	31	23.6	0	26.9	78.8	6.36	6.56	0,052
Abril	Chuvas	Atalaia	P5	42.1	31	22.7	0	27.8	84.5	6.63	6.58	0,048
Agosto	Seca	Mirante	P1	39.1	23	20.9	0	27.4	66.4	6.22	6.32	0,014
Agosto	Seca	Mirante	P2	37.8	23	20.5	0	26.7	69.5	4.57	6.41	0,033
Agosto	Seca	Atalaia	P3	45.4	23	20.3	0	32.4	51.6	4.70	6.53	0,052

Agosto	Seca	Atalaia	P4	43.8	23	20.1	0	31.4	52.7	4.88	6.45	0,014
Agosto	Seca	Atalaia	P5	43.1	23	20.0	0	31.3	64.1	5.71	6.50	0,029
Setembro	Seca	Mirante	P1	41.5	33	23.5	0.1	27.8	75.0	6.37	6.94	0,023
Setembro	Seca	Mirante	P2	41.7	33	23.3	0.1	28.0	66.0	5.63	6.85	0,064
Setembro	Seca	Atalaia	P3	53.8	33	23.1	0.1	35.9	60.3	5.19	6.89	0,021
Setembro	Seca	Atalaia	P4	51.7	33	22.7	0.1	35.1	64.2	5.52	6.83	0,032
Setembro	Seca	Atalaia	P5	47.8	33	22.1	0.1	34.1	66.2	5.80	6.89	0,022

