

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS  
CONTINENTAIS

Ciclo de vida de *Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 (Diptera, Chironomidae)

Rita de Cássia da Silva Aloy Canteiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais para obtenção do Título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande, Maio de 2008.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS  
CONTINENTAIS



Ciclo de vida de *Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 (Diptera, Chironomidae)

Rita de Cássia da Silva Aloy Canteiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais para obtenção do Título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande, Maio de 2008.

*Dedico este trabalho ao meu pai João Pedro (in memoriam) pelo incentivo eterno. Ao meu filho Bernardo, razão da minha fé. A minha mãe Catarina e meu esposo Luciano, pela dedicação e apoio de sempre.*

## AGRADECIMENTOS

A FURG pela estrutura funcional;

A FAPERGS pela concessão da bolsa de estudo e à CAPES pelo apoio financeiro;

Aos professores do Programa em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais;

A professora Leny Célia da Silva Correia (UFSCAR) pela disponibilidade para a identificação do material biológico;

Ao professor Gilberto Rodrigues (UFRGS) pelo incentivo inicial, pelas sugestões bibliográficas e pela eterna disponibilidade em sanar dúvidas e prestar socorro;

Ao professor Marcos Callisto (UFMG) pela disponibilidade e pelas sugestões concedidas;

A professora Paraskeva Michailova (Bulgarian Academy of Sciences) pela disponibilidade de análise citogenética do material fotográfico;

A Humberto Mendes (USP), também pela disponibilidade e sugestões;

A todos os colegas de curso pela simples convivência e pelo companheirismo. E aos amigos de curso: Thasi (grande sócia e revisora, junto ao Márcio), Cláudio (em especial pelas coletas), Letícia, Thais e Alberto, que sempre se propuseram a ajudar (principalmente nas estatísticas) ou, simplesmente a ouvir meus desabafos.

A Clara, técnica do laboratório de limnologia, pela amizade, incentivo e auxílio.

Ao professor Cleber pela reconhecida capacidade administrativa como coordenador do Programa e pelos momentos de descontração aliados a comida e música de qualidade.

Deixo aqui expresso um agradecimento especial a algumas pessoas que foram decisivas para a conclusão desta etapa de minha vida:

A professora Edélti e a Edélti mulher, “psicóloga” e amiga. Agradeço pelo imenso voto de confiança concedido a mim, mesmo sabendo de minhas limitações pessoais. Não posso deixar de agradecer também a sua cobrança sempre sutil, ao imenso apoio a projetos e trabalhos paralelos e a gigantesca compreensão sempre dispensada.

Ao meu filho Bernardo, que nestes dois anos em alguns momentos, ou melhor, em vários, esteve privado de minha atenção e, mesmo com 2 anos, parecia entender perfeitamente. Ao meu marido, Luciano, que soube suprir a ele de forma perfeita esta minha “ausência”, juntamente à minha mãe Catarina (mãe duas vezes) e aos padrinhos Viviane e Márcio Moscarelli.

## RESUMO

*Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 é considerada uma espécie típica de ambientes naturais e de águas tratadas residuais domésticas, sendo caracterizada como apropriada para utilização em ensaios ecotoxicológicos, na avaliação de diferentes tipos de qualidade de água. O conhecimento do ciclo de vida permite a associação entre larva, pupa e adulto, fator que facilita a identificação em nível específico, já que a família apresenta uma alta complexidade taxonômica. O presente estudo teve como objetivo descrever o ciclo de vida de *C. calligraphus*, através do acompanhamento da duração de suas fases de desenvolvimento e descrição de características biológicas. Foram coletadas em campo massas ovíferas e larvas, as quais foram conduzidas e mantidas em laboratório para o desenvolvimento das larvas, emergência dos adultos, reprodução e oviposição. As massas ovíferas foram dispostas individualmente em bandejas plásticas com água, aeração contínua, em sala climatizada com temperatura (25°C) e fotoperíodo (12-12h). Após a eclosão, as larvas foram alimentadas *ad libitum* com ração para peixe do tipo “Alcon Basic – MEP 200 Complex” e *Spirulina* comercial desidratada. Para o acompanhamento do ciclo de vida, diariamente três larvas foram retiradas de cada bandeja, fotografadas e medidas a largura e o comprimento ventral da cápsula cefálica e o comprimento do corpo. Os resultados indicaram uma postura com comprimento médio de  $9 \pm 1$  mm e, em média,  $348 \pm 66$  ovos. Os ovos, de coloração parda amarronzada e formato elíptico, possuem tamanho médio de 160  $\mu\text{m}$ , estando dispostos em um cordão organizado de forma pseudoespiral na parte mais interna da postura. As larvas apresentaram diferentes tempos de duração entre os instares: primeiro instar (3 dias), segundo instar (4 dias), terceiro instar (4 dias) e quarto instar (8 dias). A Regra de Dyar evidenciou uma razão de crescimento constante para apenas uma das treze posturas acompanhadas, com  $r=1,6$   $\mu\text{m}$ . As diferenças intraespecíficas nas fases de desenvolvimento são comuns na família Chironomidae e normalmente estão associadas ao número de fatores que influenciaram o desenvolvimento larval da fêmea ovipositora.

## ABSTRACT

### Lifecycle of *Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

*Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 is considered a typical species of natural environments and of domestic treated wastewater, characterized as appropriated to the use in ecotoxicological assays for the evaluation of different types of water quality. The knowledge of the life cycle permits the association between larva, pupa and adult, factor that facilitates the species identification, since the family presents a high taxonomic complexity. The present study aims to describe the lifecycle of *C. calligraphus* by following the time duration of the phase's development and describing the biological characteristics of them. It was collected, in the field, ovigerous masses and larvae, which were kept in laboratory for larval development, adult emergency, reproduction and oviposition. The ovigerous masses were placed individually in plastic trays with water in continuous aeration, in a room with controlled temperature (25°C) and photoperiod (12-12h). After the eclosion the larvae were feed *ad libitum* with "Alcon Basic – MEP 200 Complex" fish food and commercial dehydrated *Spirulina*. For the accompanying of the lifecycle, three larvae were removed daily from each tray, photographed and measured the width and ventral length of the cephalic capsule, and their body length. The results indicate a posture with a mean length of  $9\pm 1$  mm with, on average,  $348\pm 66$  eggs. The eggs, brownish in colour and with elliptical format, possess an average length of 160  $\mu\text{m}$ , being arranged as an organized string in a pseudo spiral form in the innermost part of the posture. The larvae presented different time duration between the instars: first instar (3 days), second instar (4 days), third instar (4 days) and fourth instar (8 days). The Dyar's Rule showed a constant growth rate to only one of the thirteen postures followed by, with  $r = 1.6 \mu\text{m}$ . Intraespecific differences in the development phases are common in the Chironomidae family and normally are associated to the number of factors that influenced the female larval development which laid the eggs.

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Material e Métodos .....	08
3. Resultados e Discussão .....	12
4. Conclusões e Perspectivas .....	22
5. Referências Bibliográficas .....	23
6. Anexos:	
Anexo I: Análise de variância (ANOVA) com Pós Teste de Tukey, para diferença entre as médias de tamanho de ovos de <i>Chironomus calligraphus</i> .....	37
Anexo II: Gráficos da curva de crescimento larval de <i>Chironomus calligraphus</i> .....	39
Anexo III: Gráficos de diferenciação dos instares larvais de <i>Chironomus calligraphus</i> .....	41
Anexo IV: Medidas de comprimento do corpo e medidas ventrais da cápsula cefálica (em $\mu\text{m}$ ), valores mínimo e máximo, média e desvio padrão para larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> , em laboratório.....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de Chironomidae (sem escala). Fonte: Porinchi & MacDonald (2003), modificado de Brodersen & Anderson (2000).....	06
Figura 2. Massas ovíferas de <i>Chironomus calligraphus</i> . em matéria vegetal.....	08
Figura 3. Coleta do material.....	08
Figura 4. Larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> .....	08
Figura 5. Estrutura para obtenção de desovas de <i>Chironomus</i> sp. ....	09
Figura 6. A. Massa ovígera de <i>Chironomus calligraphus</i> (aumento de 10x). B. Disposição pseudoespiralada dos ovos (aumento de 20x). C. Ovo em detalhe (aumento de 60x).....	09
Figura 7. Bandejas dispostas em sala climatizada.....	10
Figura 8. Bandeja coberta, em detalhe.....	10
Figura 9. A. Medições da cápsula cefálica (comprimento e largura) de <i>Chironomus calligraphus</i> . B. Medição do comprimento do corpo de <i>Chironomus calligraphus</i> .....	11
Figura 10. Massa ovígera de <i>Chironomus calligraphus</i> .....	12
Figura 11. A. Disposição pseudoespiralada dos ovos de <i>Chironomus calligraphus</i> . B. <i>Loops</i> do cordão de ovos, em detalhe.....	13
Figura 12. A. Coloração e estrutura do ovo de <i>Chironomus calligraphus</i> . B. Observação do ovo com a larvula formada e a diferenciação de ocelos, de <i>Chironomus calligraphus</i> .....	15



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações a respeito da massa ovígera de <i>Chironomus calligraphus</i> : número de ovos por desova e medida do comprimento da mesma, em milímetros.....	13
Tabela 2. Medidas dos comprimentos dos ovos das desovas de <i>Chironomus calligraphus</i> , em $\mu\text{m}$ .....	14
Tabela 3. Comprimento médio das larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> , em condições de laboratório.....	16
Tabela 4. Equações de crescimento e valor do coeficiente de determinação para cada postura acompanhada de <i>Chironomus calligraphus</i> , em condições de laboratório.....	17
Tabela 5. Duração de cada instar (em dias), por postura acompanhada de <i>Chironomus calligraphus</i> , em condições de laboratório.....	18
Tabela 6. Razões de crescimento para a aplicação da Regra de Dyar em larvas de <i>Chironomus calligraphus</i> , em condições de laboratório.....	19
Tabela 7. Observação do primeiro adulto emergente de <i>Chironomus calligraphus</i> , de cada postura acompanhada, em condições de laboratório (em dias).....	20

# INTRODUÇÃO

## 1. Aspectos Gerais

Os ambientes aquáticos continentais, através da complexa interação entre as comunidades que os compõem, são capazes de manter uma expressiva fonte de recursos renováveis à exploração humana (Margalef, 1983; Esteves, 1998). Nestes ambientes, a comunidade zoobentônica possui grande importância no fluxo de energia e na ciclagem de nutrientes, decorrente do fato que estes organismos participam no processo de decomposição da matéria orgânica, reduzindo o tamanho das partículas e tomando parte na cadeia alimentar de vários organismos aquáticos, notadamente peixes. Em relação ao macrozoobentos, uma outra importância a ser considerada é o biorrevolvimento (em inglês “*bioturbation*”), ou seja, o revolvimento do sedimento através da ação mecânica destes organismos, com a conseqüente liberação de nutrientes (Esteves, 1998).

Os macroinvertebrados bentônicos representam um elemento importante na estrutura e no funcionamento dos ecossistemas aquáticos, justamente por ter sua distribuição influenciada pelas características do meio (Marques *et al.*, 1999; Prellvitz & Albertoni, 2004).

Os insetos aquáticos possuem destaque entre os macroinvertebrados de ecossistemas de água doce, sendo reconhecidos como membros essenciais das comunidades ecológicas (Lehmkuhl, 1979). O grupo exibe notáveis adaptações aos mais variados tipos de habitats aquáticos, notadamente com respeito a mecanismos respiratórios e estratégias de alimentação. Entre estes habitats, as macrófitas aquáticas constituem-se como um dos principais, proporcionando abrigo e alimento para a maior parte dos grupos (Oertli, 1995; Nessimian & de Lima, 1997; Albertoni *et al.*, 2001).

## 2. Chironomidae

Os insetos da família Chironomidae pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera. A origem do nome provém do grego *chir(o)*, que traduz a idéia de “mão”, devido aos seus representantes apresentarem, na fase adulta, o hábito postural de manter levantadas os apêndices anteriores, como se fossem braços estendidos (Trivinho-Strixino & Strixino, 1999).

Segundo Trivinho-Strixino & Strixino (1999), os Chironomidae constituem o grupo de larvas de inseto mais amplamente distribuído.

A família é dividida em 11 subfamílias e 22 tribos. Embora algumas espécies ocorram em num vasto leque de habitats, um total de 339 gêneros e 4.147 espécies são exclusivamente aquáticas em suas etapas imaturas (Ferrington, 2008).

Publicações a respeito da família Chironomidae na região neotropical indicam o total de 155 gêneros e 709 espécies (Spies & Reiss, 1996; Trivinho-Strixino & Strixino, 1999). No Brasil, as primeiras observações datam de 1940, com os estudos do Dr. Sebastião José de Oliveira. Após, na década de 60, com o início dos trabalhos na Amazônia pelo Dr. Ernest Joseff Fittkau e, no estado de São Paulo, pelos estudos de ecologia bêntica conduzidos a partir dos anos 70 pelo grupo do Dr. Giovanni Strixino (Roque *et al.*, 2003). Atualmente, a taxonomia de Chironomidae ainda é considerada pouco abrangente, principalmente no que diz respeito às formas imaturas (Trivinho-Strixino *et al.*, 1995). Segundo Mendes (2007), para o Brasil são registradas 278 espécies de Chironomidae, sendo 7 espécies registradas no estado do Rio Grande do Sul.

As larvas de Chironomidae constituem o grupo mais abundante dos macroinvertebrados em ambientes límnicos, ocorrendo em altas densidades e diversidade na maioria dos tipos de ecossistemas aquáticos continentais (Epler, 1992; Trivinho-Strixino *et al.*, 1995; Coffman & Ferrington Jr., 1996; Osborne *et al.* 2000; Takeda *et al.*, 2001, Brito Jr. *et al.* 2005). Seus representantes larvais são amplamente encontrados nos sedimentos e na vegetação dos ecossistemas aquáticos, considerando-se, especialmente, as variações ambientais dos mesmos (Walshe, 1950; Mundie, 1956; Rabeni & Wang, 2000; Albertoni *et al.*, 2001).

A variabilidade de condições ambientais sob as quais os Chironomidae são encontrados é mais extensa do que qualquer outro grupo de insetos aquáticos (Merritt & Cummins, 1996). Esta amplitude ecológica está relacionada com as várias adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais encontradas entre os membros desta família (Coffman & Ferrington Jr., 1996). Tais adaptações podem vir a explicar a ampla distribuição do grupo, observada e registrada a nível mundial, em todos os continentes, como observa-se abaixo:

**Europa:** Reino Unido (Kornij'ow, 1997; Osborne *et al.*, 2000); Espanha (Real *et al.*, 2000); Rússia (Petrova *et al.*, 2004; Nazarova *et al.*, 2005; Kravtsova, 2007); Itália (Lencioni & Rossaro, 2005); Eslováquia (Tátosová & Stuchlík, 2006); França (Moubayed-Breil, 2007); Finlândia (Luoto, 2007), entre outros.

**Oceania:** Austrália (Cranston, 2006; Stevens *et al.*, 2006), entre outros.

**Ásia:** Coréia do Sul (Yong *et al.*, 1999); Japão (Hirabayashi *et al.*, 2003); Mongólia (Hayford *et al.*, 2006); Mar de Aral (Nazarova *et al.*, 2006); Malásia (Al-Shami *et al.*, 2006); Índia Oriental (Majumdar, 2007), entre outros.

**América do Norte:** Pensilvânia (Botts, 1997); Groelândia (Brodersen & Anderson, 2002); Canadá (MacDonald & Taylor, 2006); Golfo Mexicano (Vinogradova, 2007), Estados Unidos (Jacobsen & Perry, 2007), entre outros.

**América do Sul:** Argentina (Marchese & Paggi, 2004); Colômbia (Nazarova *et al.*, 2004); Chile (Andersen & Saether, 2005) e Brasil.

No Brasil, vários pesquisadores registram a presença de Chironomidae em uma gama de ambientes com as mais diferentes condições ambientais e em uma ampla faixa geográfica. Entre os estados brasileiros onde há o registro da família Chironomidae, destacam-se: São Paulo (Trivinho-Strixino & Strixino, 1995; Trivinho-Strixino & Strixino, 2003; Roque *et al.*, 2003; Correia & Trivinho-Strixino, 2005 a, b; Correia *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2006; Corbi & Trivinho-Strixino, 2006; Trivinho-Strixino & Sonoda, 2006; Correia & Trivinho-Strixino, 2007; Trivinho-Strixino & Strixino, 2007), Rio de Janeiro (Nessimian & Sanseverino, 1995; Nessimian & de Lima, 1997; Sanseverino & Nessimian, 2001; Callisto *et al.*, 2002; Amorin *et al.*, 2004; Cerri-do-Nascimento *et al.*, 2004), Paraíba (Brito-Júnior *et al.*, 2005), Paraná (Rosin & Takeda, 2007), Mato Grosso do Sul (Rosin & Takeda, 2007; Aburaya & Callil, 2007), Minas Gerais (Marques *et al.*, 1999; Callisto *et al.*, 2000; Mayrink *et al.*, 2002; Moretti *et al.*, 2007; Callisto *et al.*, 2007), Rio Grande do Sul (Prellvitz & Albertoni, 2004; Albertoni & Palma-Silva, 2006; Panatta *et al.*, 2006; Piedras *et al.*, 2006; Panatta *et al.*, 2007; Albertoni *et al.*, 2007; Wiedenbrug, 2000).

A caracterização de comunidades biológicas é amplamente utilizada em estudos de avaliação ambiental, principalmente no que se refere aos ambientes aquáticos continentais, os quais mantêm uma alta biodiversidade, apresentando um elevado número de espécies (Wetzel, 1993).

Os estágios imaturos de alguns Chironomidae podem ser capazes de refletir fortemente o ambiente onde vivem, tornando-se bons indicadores ambientais e, desta forma, sendo amplamente utilizados como bioindicadores de *status* trófico e classificação de lagos (Johnson *et al.*, 1993; Brodersen & Anderson, 2002; Goulart & Callisto, 2003; Pereira & De Luca, 2003).

Várias proposições têm sido feitas para encontrar organismos indicadores dentre a fauna bentônica. Uma das mais aceitas foi proposta por Thieneman em 1913 e rediscutida por Brundin em 1958. Brundin utilizou o grupo dos dípteros (família Chironomidae) para caracterizar os lagos quanto ao estado trófico. Como característica geral da proposição destes autores destaca-se o gênero *Tanytarsus* van der Wulp, 1874 como indicador de condições oligotróficas e o gênero *Chironomus* Meigen, 1803 como indicador de condições eutróficas (Esteves, 1998).

Segundo Armitage *et al.* (1995), um leque muito vasto de condições ambientais já foram explorados por, no mínimo, uma espécie de Chironomidae e, em ambientes altamente poluídos, podem ser os únicos insetos presentes.

Registros de Chironomidae em locais poluídos são comumente encontrados na literatura científica: Rae *et al.* (1989), Marques *et al.* (1999), Correia *et al.* (2006), Piedras *et al.* (2006), entre outros. Ocasionalmente, associados a estes estudos, encontram-se evidências de deformidades morfológicas larvais, conforme observado por Callisto *et al.* (2000), Williams *et al.* (2001), Nazarova *et al.* (2004), Suriano *et al.*, (2005), MacDonald & Taylor (2006). E ainda associadas ao tema, alguns autores identificam alterações citogenéticas, conforme observado por Petrova *et al.* (2004).

Um método de interpretação ecológica para indicativos de poluição é a análise da diversidade. Através da avaliação da estrutura de biocenoses, pelo número de táxons e de indivíduos torna-se possível comparar comunidades, considerando-se a estrutura das mesmas (Schäfer, 1985). A análise do nível de espécie é considerada indispensável nos estudos de biodiversidade (Gotelli, 2004). No entanto, em tais estudos, as amostras mostram-se normalmente complexas e a identificação taxonômica raramente é executada por especialistas. Portanto, o nível taxonômico para identificações à larga escala, freqüentemente é restrito ao gênero, família ou mesmo a ordem (May, 1988).

Segundo Callisto & Gonçalves Jr. (2005), inúmeras ferramentas estatísticas têm sido utilizadas para avaliar a biodiversidade bentônica, tais como os índices de diversidade de Shannon-Wiener; *Biological Monitoring Working Party* (BMWP); *Average Score Per Taxon* (ASPT); relações entre as densidades de Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera (EPT) *versus* Chironomidae e Oligochaeta; estimativas de índices de integridade biótica, além de classificações em grupos tróficos funcionais e identificação de habitats preferenciais.

A família Chironomidae também possui importância em estudos de saúde pública. Segundo Yong *et al.* (1999), indivíduos adultos de *Chironomus kiiensis* Tokunaga, 1936 podem conter alérgenos potencialmente inalantes, os quais em contato com a pele ou mucosa humana, aumentam os índices de imunoglobulina E (IgE), causando alergias. Broza & Halpern (2001) e Halpern *et al.* (2004), evidenciaram a bactéria *Vibrio cholerae* (agente causador da cólera) associada a matriz protéica das posturas de *Chironomus* e Broza *et al.* (2005), registraram indivíduos adultos de Chironomidae como possíveis portadores da bactéria *V. cholerae*.

Uma outra importância atribuída ao grupo diz respeito a paleolimnologia, ou seja, a ciência que estuda e interpreta as condições limnológicas passadas, as mudanças e suas possíveis causas. Cápsulas cefálicas de Chironomidae dão origem a subfósseis e fósseis em diversas camadas do sedimento (Armitage *et al.*, 1995; Porinchu & MacDonalds, 2003; Brooks, 2006; Nazarova *et al.*, 2005; Brodersen & Quinlanb, 2006; Luoto, 2007).

A família Chironomidae também possui interesse agro-econômico, sendo considerada como peste quando associada a plantações de arroz (Treverrow, 1985 e Stevens *et al.*, 2006).

A riqueza de espécies, ampla distribuição e tolerância às condições adversas fazem com que o grupo freqüentemente seja registrado em estudos ecológicos, porém, dificuldades taxonômicas fazem com que a identificação fique restrita ao nível de família ou subfamília (Armitage *et al.*, 1995).

Atualmente existe uma alta demanda, por parte de biólogos e limnólogos, em estudos de identificação de insetos aquáticos nas fases larvais, enquanto que os interesses em pupas e adultos são menos aparentes. Muitos taxonomistas, no entanto, estudam somente os indivíduos adultos e, desta forma, deixam uma lacuna no conhecimento das etapas imaturas (Cranston, 2003).

Alguns trabalhos incluem caracterizações e descrições citogenéticas (Stevens & Swift, 1966; Wobus, 1975; Wieslander & Paulsson, 1992; Rovira *et al.*, 1993; Sharley *et al.*, 2004; Carew *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2006; Nowak *et al.* 2006; Martin, 2006; entre outros). Outros pesquisadores utilizam os estudos citogenéticos para dar ênfase às variações genéticas apresentadas em resposta a testes de toxicidade, fazendo com que a família receba atenção a nível global (Yordanov, 1992; Michailova *et al.*, 2003; Petrova *et al.*, 2004).

Quanto à biologia do grupo, os Chironomidae são insetos holometábolos, ou seja, realizam metamorfose completa, desenvolvendo-se em quatro etapas diferenciadas (ovo, larva, pupa e adulto) (Figura 1). O ciclo de vida dos Chironomidae começa com a oviposição, quando a fêmea coloca seus ovos envoltos em uma matriz gelatinosa, sobre a superfície da água, normalmente fixada a algum substrato. O período de desenvolvimento larval é relativo, podendo variar de acordo com a espécie e de acordo com as condições ambientais. A fase pupal é relativamente curta e, neste momento, as larvas sofrem metamorfose para a forma adulta, quando a pupa deixa a exúvia na superfície da água e o adulto emerge. Normalmente os adultos machos formam revoadas, atraindo as fêmeas (Porinchi & MacDonalds, 2003).

Apesar de muitos estudos informarem a presença de *Chironomus* em sistemas aquáticos brasileiros, a identificação da espécie normalmente não é realizada porque, além de existir uma alta variação intraespecífica nos organismos adultos, espécies diferentes possuem características morfológicas muito semelhantes (Correia *et al.*, 2005).

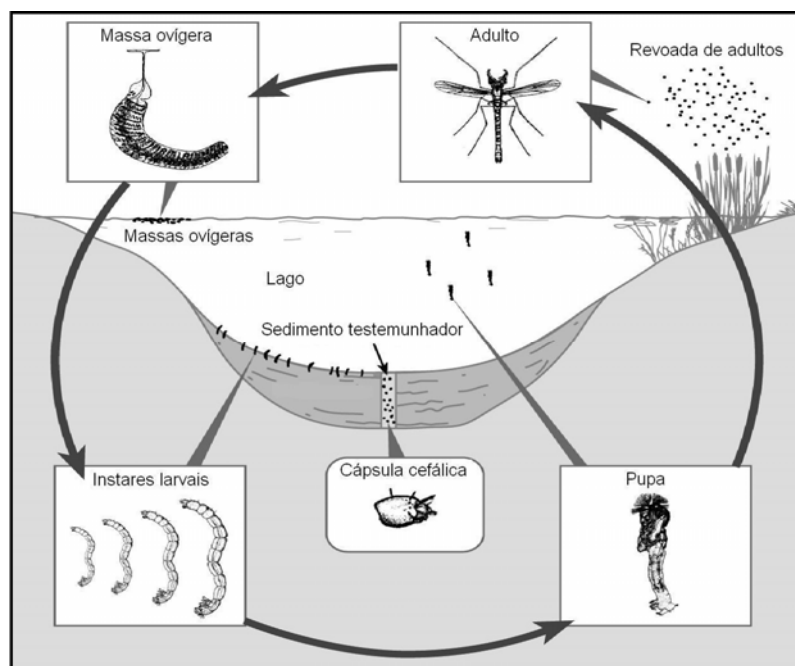


Figura 1 – Ciclo de vida de Chironomidae (sem escala).

Adaptado de Porinchi & MacDonald (2003), modificado de Brodersen & Anderson

O gênero *Chironomus* mostra-se amplamente distribuído, podendo ser encontrado em ambientes lóticos e lênticos, normalmente em águas organicamente enriquecidas (Marques *et al.*, 1999; Callisto *et al.*, 2000). O gênero compreende mais de 100 espécies conhecidas (Spies & Reiss, 1996) e, segundo Mendes & Pinho (2007),

para o Brasil são registradas 20 espécies (5 com *nomen dubium*). No Rio Grande do Sul, o registro do gênero foi realizado por Wiedenbrug (2000) e, mais recentemente por Piedras *et al.* (2006), Panatta *et al.* (2006) e Panatta *et al.* (2007).

Segundo Péry *et al.* (2005), o gênero *Chironomus* possui algumas características que os fazem valiosos em testes de toxicidade, tais como: facilidade de cultivo, sensibilidade a poluentes, tamanho suficientemente grande para fornecer massa e tecido para medidas químicas, entre outras. Atualmente são comuns estudos ecotoxicológicos que utilizam o gênero com o objetivo de avaliar os efeitos e o grau de toxicidade nos ambientes.

Hooper *et al.* (2003), avaliaram a influência de um inseticida (cipermetrina) no ciclo de vida, crescimento e densidade larval de *Chironomus riparius* Meigen, 1804. Dias *et al.* (2005), discutiram os efeitos do sedimento associado a urânio também em indivíduos de *C. riparius*. Oliver *et al.* (2003) avaliaram os efeitos do cádmio, mercúrio e chumbo em *C. calligraphus* e, os efeitos da combinação destes três metais pesados foram testados por Iannacone & Salazar (2007), em indivíduos da mesma espécie.

Devida à alta complexidade taxonômica que apresenta esta família, devemos reconhecer que uma identificação mais acurada somente é possível através do conhecimento do ciclo de vida, que possibilita uma correta associação entre larva, pupa e adulto (Trivinho-Strixino & Strixino, 1995). A descrição do ciclo de vida é essencial para um melhor entendimento aplicado e funcional do grupo, pois possibilita gerar informações adicionais que podem servir de subsídios para bioensaios, por exemplo, de toxicidade (Corbi & Trivinho-Strixino, 2006).

Todos os fatores descritos acima, aliados à relativa facilidade de criação desta espécie em laboratório, em contraste à dificuldade de obtenção destas informações na natureza, sustentam a importância de planejamento e de execução deste trabalho.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de descrever o ciclo de vida de *C. calligraphus* em laboratório, acompanhando o tempo de duração de cada fase de desenvolvimento da espécie e descrevendo as características biológicas correspondentes.



## MATERIAL E MÉTODOS

As massas ovíferas de *Chironomus calligraphus* (Figuras 2 e 3) foram obtidas através de coletas em uma piscina doméstica situada na zona urbana da Praia do Cassino, município de Rio Grande, RS, Brasil (32°10'57" S / 52°10'24" O). Indivíduos larvais (Figura 4) também foram coletados, levados a laboratório e acondicionados de forma a desenvolver-se o cultivo, a emergência dos adultos, reprodução e oviposição dos mesmos.

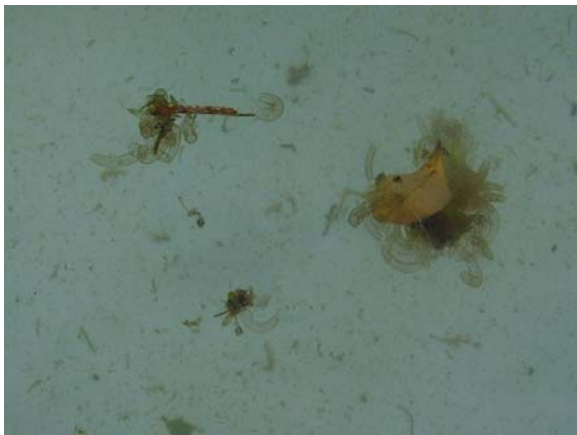


Figura 2 – Massas ovíferas de *Chironomus calligraphus* em matéria vegetal.



Figura 3 – Coleta do material.

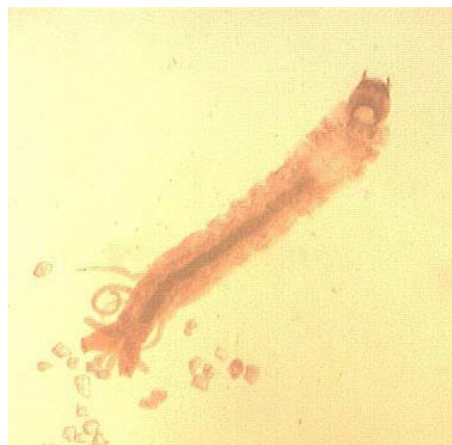


Figura 4 – Larva de *Chironomus calligraphus*.

As larvas coletadas foram dispostas em um ambiente montado com recipientes de vidro, objetivando o confinamento dos adultos para reprodução e obtenção de massas ovíferas em laboratório (Figura 5).

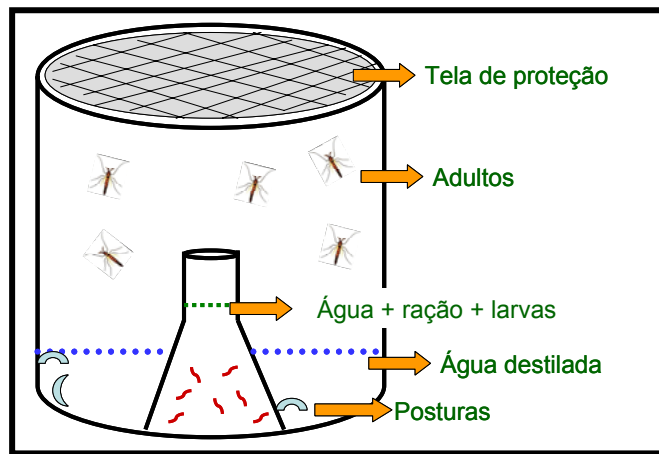


Figura. 5 – Estrutura para obtenção de desovas de *Chironomus* sp., em laboratório.

As massas ovíferas foram identificadas com base em Nolte (1993) e as larvas identificadas segundo Trivinho-Strixino & Strixino (1995) e Epler (1992). A análise e a confirmação da espécie foram realizadas pela Dra. Leny Célia da Silva Correia, pesquisadora colaboradora da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), através do envio de fotografias digitais das massas ovíferas e do material biológico (larvas, exúvias, adultos machos e fêmeas).

As massas ovíferas obtidas em ambiente natural e aquelas obtidas em laboratório foram transferidas para placas de Petri com água, para a contagem do número de ovos e obtenção do tamanho da postura e tamanho médio dos ovos (Figura 6). Estes dados foram obtidos através de fotografias em estereomicroscópio, com câmera de captura de imagens MOTIC CAM<sup>®</sup> e software correspondente.

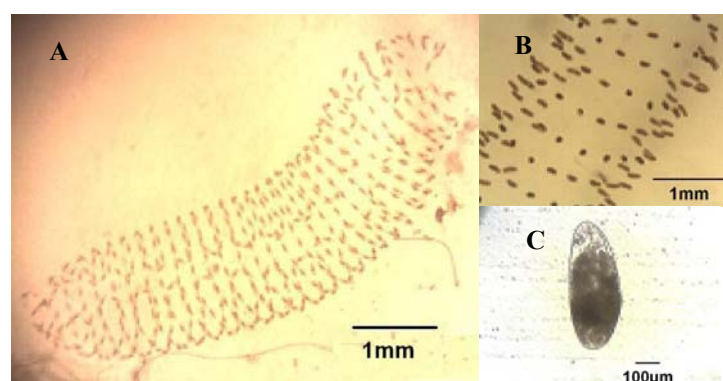


Figura 6 – A. Massa ovífera de *Chironomus calligraphus* (aumento de 10x). B. Disposição pseudoespiralada dos ovos (aumento de 20x). C. Ovo em detalhe (aumento de 60x).

As massas ovíferas foram dispostas individualmente em bandejas plásticas (27cm x 18cm x 6cm), com água (1,5 litros) em aeração contínua, em sala climatizada

com temperatura (25°C) e fotoperíodo (12/12h) controlados (Figura 7). As bandejas foram cobertas por telas que permitiram a captura dos adultos emergidos (Figura 8).

Após a eclosão dos ovos e a dispersão das larvas, as mesmas passaram a ser alimentadas *ad libitum* com ração para peixe do tipo “Alcon Basic – MEP 200 Complex” e *Spirulina* comercial desidratada, método adaptado de Almeida (2007). A escolha da Ração “Alcon Basic – MEP 200 Complex” foi realizada com o propósito de eleger a ração mais semelhante à ração para peixes “Tetramin”, amplamente utilizada para cultivos de Chironomidae, porém não encontrada disponível no mercado. *Spirulina* comercial desidratada foi escolhida pelo alto índice de proteínas que oferece, além de aminoácidos, ácidos graxos, minerais e vitaminas.



Figura 7 – Bandejas dispostas em sala climatizada.



Figura 8 – Bandeja coberta, em detalhe.

Para o acompanhamento do ciclo de vida, três larvas foram retiradas diariamente de cada bandeja, as quais foram fotografadas e medidas em estereomicroscópio. A medição diária de três larvas garantiu que, ao final do cultivo (período de emergência), ainda restassem larvas suficientes para as medidas de comprimento larval, bem como para a captura dos indivíduos adultos machos e fêmeas.

Para a determinação dos estágios larvais, foram medidos a largura e o comprimento ventral da cápsula cefálica, bem como o comprimento do corpo de cada larva retirada da bandeja (Figura 9), conforme metodologia aplicada por Corbi & Trivinho-Strixino (2006) para a determinação do ciclo de vida de duas espécies de *Goeldichironomus* Fittkau, 1965.

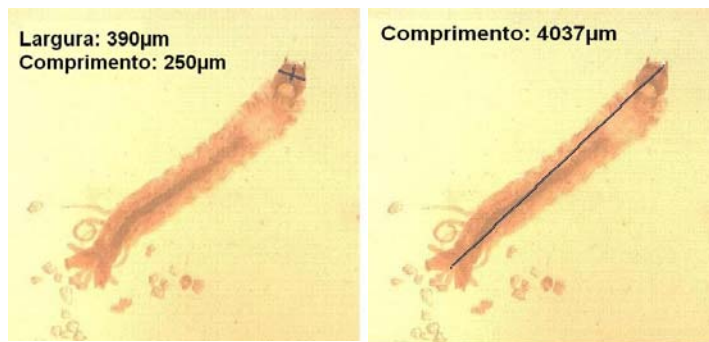


Figura 9 – A. Medições da cápsula cefálica (comprimento e largura) de *Chironomus calligraphus*. B. Medição do comprimento do corpo de *Chironomus calligraphus*.

A análise dos dados foi realizada através da elaboração de:

- Medidas do comprimento de 10 ovos para cada uma das 13 massas ovígeras coletadas. Estes dados foram submetidos a uma análise de variância one-way (ANOVA), com Pós Teste de Tukey, realizado no Software BioEstat 3.0 (Ayres *et al.*, 2003) (Anexo I).
- Análise de variância one-way (ANOVA) entre as médias de comprimento diário da cápsula cefálica, com Pós Teste de Tukey;
- Contagem do número de ovos por massa ovígera. Estes dados foram refinados através do cálculo da média e desvio padrão do número de ovos por postura;
- Medições de comprimento das massas ovígeras. Estes dados foram refinados através do cálculo da média e desvio padrão do comprimento das posturas;
- Montagem de gráficos das curvas de crescimento, os quais foram confeccionados segundo o modelo utilizado por Corbi & Trivinho-Strixino (2006), os quais utilizaram como critério as medidas de comprimento da cápsula cefálica em relação ao comprimento total do corpo para a descrição do ciclo de vida de duas espécies de *Goeldichironomus*.

A determinação do número de instares foi realizada através da aplicação da Regra de Dyar, com base na razão de crescimento ( $r$ ). Segundo esta regra,  $r_1$  é a média de crescimento do segundo instar dividida pela média de crescimento do primeiro;  $r_2$  é a média de crescimento do terceiro instar dividida pela média de crescimento do segundo e  $r_3$  é a média de crescimento do quarto instar dividida pela média de crescimento do terceiro instar.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### I - Oviposição, massas ovíferas e desenvolvimento embrionário:

Os Chironomidae são insetos holometábolos, os quais fazem metamorfose completa, seu desenvolvimento apresenta-se em quatro etapas distintas (ovo, larva, pupa e adulto). A oviposição é o início do ciclo de vida do grupo, os ovos encontram-se dispostos dentro de uma matriz gelatinosa, a qual é colocada na superfície da água, normalmente encontrando-se fixada a algum substrato (Porinchi & MacDonald, 2003).

Segundo Nolte (1993), as massas ovíferas de Chironomidae são constituídas por uma matriz gelatinosa protetora dos ovos que, em contato com a água, hidrata-se, dando à desova um aspecto morfológico que pode ser característico para determinados grupos. A tribo Chironomini, segundo a autora, apresenta massas ovíferas globulares e/ou cilíndricas (formas curtas e alongadas do mesmo tipo de massa ovífera, respectivamente), compostas por um cordão de ovos disposto de forma variada e também por fibras centrais, as quais consistem em um par de filamentos que se estendem por todo o comprimento da massa ovífera.

O gênero *Chironomus* apresenta um barbante gelatinoso arranjado de forma variada de acordo com a espécie, o qual permite a organização radial dos ovos. Esta organização é atribuída à posição vertical de como os ovos são fixados dentro deste barbante gelatinoso (Nolte, 1993).

Para a caracterização e descrição da massa ovífera de *Chironomus calligraphus*, treze desovas foram analisadas. As posturas obtidas em laboratório não apresentaram crescimento satisfatório, de forma que os dados aqui apresentados foram obtidos através das posturas coletadas em ambiente artificial já descrito.

A espécie apresentou massas ovíferas cilíndricas (Figura 10), com um comprimento médio de  $9 \pm 1$ mm.

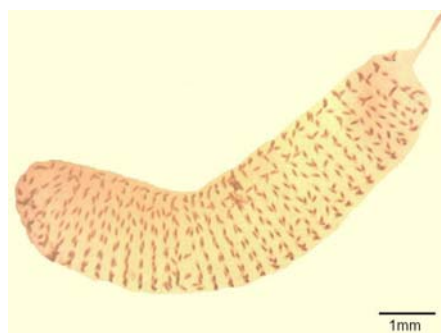


Figura 10 – Massa ovífera de *Chironomus calligraphus*.

O número médio de ovos por massa ovígera de *Chironomus calligraphus* foi de  $348 \pm 66$  ovos por postura (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de ovos por desova e medida do comprimento da massa ovígera de *Chironomus calligraphus*, em milímetros.

<b>Postura</b>	<b>Nº. Ovos</b>	<b>Postura (mm)</b>
<b>1</b>	460	10
<b>2</b>	385	8,2
<b>3</b>	345	9,0
<b>4</b>	460	8,6
<b>5</b>	390	8,2
<b>6</b>	270	9,2
<b>7</b>	350	8,4
<b>8</b>	295	10,8
<b>9</b>	300	8,5
<b>10</b>	330	8,2
<b>11</b>	385	8,8
<b>12</b>	310	9,2
<b>13</b>	250	6,8
<b>Média</b>	348	9
<b>Desvio Padrão</b>	66	1

O cordão de ovos internamente disposto na massa gelatinosa apresenta-se de forma pseudoespiralada, onde o mesmo faz voltas na parte mais interna da massa gelatinosa, dando um aspecto de falso espiral (Figura 11). Nolte (1993) apresenta este mesmo tipo de organização do cordão de ovos para uma outra espécie do gênero *Chironomus*.

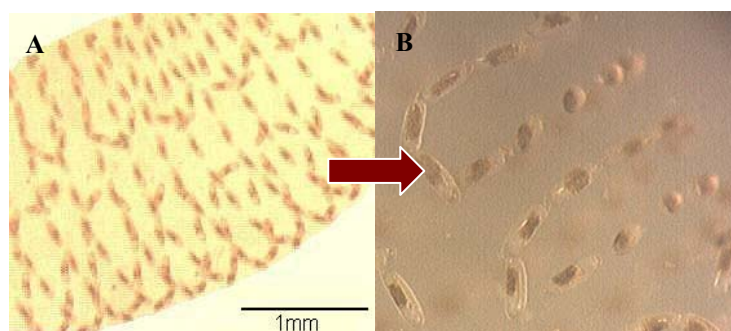


Figura 11 – A. Disposição pseudoespiralada dos ovos de *Chironomus calligraphus*. B. Loops do cordão de ovos. em detalhe.

*Chironomus calligraphus* apresentou seus ovos com um tamanho médio de 160µm, possuindo coloração parda amarronzada e formato elíptico (Figura 11-B).

As medições realizadas para o cálculo da média do comprimento do ovo encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Medidas dos comprimentos dos ovos de 13 desovas de *Chironomus calligraphus* (em µm).

<i>Posturas</i>												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
180,6	152,3	150	147,6	141,4	148,7	143,2	151,3	169,7	150	206,2	158,1	197,2
206,2	162,8	142,1	171,2	155,6	165,5	144,2	144,2	172	147,6	194,2	158,1	177,2
176,9	136	141,4	152,6	156,2	174,9	142,1	164	177,2	152,3	212,1	152,3	170
193,1	170,3	150	167,6	158,1	162,8	152,3	133,4	176,9	144,2	174,6	169,7	143,2
167,6	183,8	145,6	156,2	153	158,1	148,7	148,7	162,8	148,7	158,1	161,2	150
198	148,7	148,7	165,5	131,5	148,7	158,1	155,6	180,3	136	176,9	141,4	144,2
226,3	152,3	152,3	138,9	145,6	180,3	150	131,5	152,3	156,2	184,4	161,2	156,5
181,1	158,1	158,1	155,6	158,1	158,1	170,3	160,3	142,1	142,1	183,6	143,2	142,1
184,4	150	150	161,2	158,1	172	134,2	150	161,6	155,2	176,9	130,4	156,2
191	155,6	155,6	172	161,6	178,9	143,2	139,3	172	150	191	174,6	162,8

Os resultados da análise evidenciaram uma diferença não significativa para a comparação entre as médias de 11 posturas (posturas de número 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 13). As duas posturas que apresentaram médias com diferença significativa quando comparadas às demais (posturas de número 1 e 11) não apresentaram diferença significativa entre ambas.

Nolte (1993) aponta as variações intraespecíficas no número de ovos como um fator comum na família Chironomidae e caracteriza tais variações como conseqüências do número de fatores que influenciaram o desenvolvimento larval da fêmea ovipositora, principalmente no que diz respeito à qualidade nutricional da mesma. O autor também faz uma relação proporcional entre o tempo de desenvolvimento larval da fêmea ovipositora e o número de ovos da postura, ou seja, fêmeas que possuem maior tempo de desenvolvimento larval produzem mais ovos do que aquelas de menor tempo de desenvolvimento larval.

O tempo de desenvolvimento do ovo é um fator dependente de competição (intra e interespecífica) e também das condições proporcionadas pelo meio, como temperatura, pH, fotoperíodo, salinidade e oxigênio (Pinder, 1995). O autor apresenta um tempo de desenvolvimento embrionário de 1,5 a 2 dias para ovos de *Chironomus plumosus* Linnaeus, 1758 em temperaturas entre 22° e 25°C; ao passo que, com

temperaturas de 24°, 16°, e 9°C, os tempos de desenvolvimento foram de 3, 6,5 e 14 dias, respectivamente. Almeida (2007), informa um período de desenvolvimento embrionário de cerca de 48 horas, para ovos de *Chironomus* sp. em condições de laboratório (22°C a 25°C). Fonseca e Rocha (2004) apresentam para *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 um desenvolvimento embrionário de 3,75 dias para temperatura de 15°C, 2 dias para temperaturas de 19-22°C e de 1,25 dias para 30°C.

Como as massas ovígeras analisadas foram de origem externa, ou seja, coletadas sem o conhecimento de suas idades prévias, não foi possível realizar uma avaliação precisa do tempo de desenvolvimento embrionário da espécie. Porém, observou-se através de fotografias, duas etapas diferenciadas do desenvolvimento embrionário, onde primeiramente observam-se somente as estruturas do ovo (Figura 12-A) e, em um segundo momento, é possível observar-se a larvula formada, inclusive com a diferenciação dos ocelos (Figura 12 - B). Segundo Corbi & Trivinho-Strixino (2006), esta diferenciação é o resultado de muitas divisões nucleares, período comum à família Chironomidae.

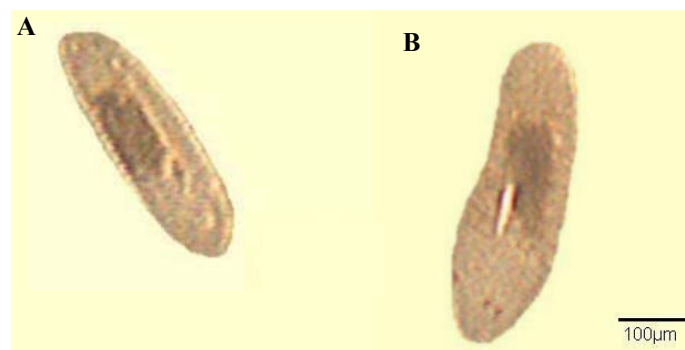


Figura 12 – A. Coloração e estrutura do ovo de *Chironomus calligraphus*. B. Observação do ovo com a larvula formada e a diferenciação de ocelos, de *Chironomus calligraphus*.

Em um período de até 24 horas após a transferência das massas ovígeras para o laboratório, as larvulas incolores do primeiro instar começam a eclodir dos ovos. Após esse período, as mesmas abandonam a massa gelatinosa que envolve os ovos passando a nadar ativamente, dispersando-se.



## II – Ciclo de vida:

As larvulas, após eclodirem dos ovos, apresentaram comprimento médio de  $792 \pm 128 \mu\text{m}$  (Tabela 3). Almeida (2007) trata o primeiro instar do gênero *Chironomus* como de hábito planctônico, período no qual as larvulas permanecem entre as partículas do substrato, alimentando-se de bactérias. Segundo o autor, as larvas começam a estruturação de tubos a partir do segundo instar.

Em um curto período após a eclosão dos ovos (aproximadamente 48 horas), foi possível a observação de pequenos tubos construídos pelas larvulas. Segundo Armitage *et al.* (1995), tais tubos são formados a partir da secreção salivar produzida pela larva em associação a detritos, algas, grãos de areia ou outros tipos de substrato. A função dos tubos é descrita pelos autores como uma estratégia de fuga a predação e de minimização dos possíveis impactos gerados pela correnteza, quando presente.

Tabela 3 – Comprimento médio das larvulas de *Chironomus calligraphus*, até 24 horas após a eclosão dos ovos, em condições de laboratório.

<b>Postura</b>	<b>Comp. médio larvulas (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1	828
2	841
3	703
4	777
5	674
6	661
7	1134
8	690
9	879
10	673
11	762
12	816
13	855
<b>Média</b>	792
<b>Desvio Padrão</b>	128

Durante os cultivos, a postura de número 4 não se desenvolveu conforme o esperado, apresentando um alto índice de mortalidade das larvas. Este problema fez com que a mesma viesse a ser descartada das análises de crescimento.

Para a construção das curvas de crescimento foram utilizados os dados de tempo total de desenvolvimento larval das demais posturas, até o momento em que todas as larvas tivessem emergido para a forma adulta.

Dyar (1890) propõe a utilização de medidas da cápsula cefálica em estudos de crescimento e caracterização de instares larvais de artrópodes. Segundo o autor, por ser uma estrutura esclerotizada, a mesma apresenta variação de tamanho somente quando a larva sofre ecdise, mantendo-se constante durante o tempo de desenvolvimento do instar em questão.

Segundo MacDonald & Taylor (2006) e Armitage *et al.* (1995), as larvas de Chironomidae passam por três ecdises durante seu desenvolvimento, ou seja, mudam seu exoesqueleto nas transições entre o 1º e o 2º instar, entre o 2º e o 3º instar e, por fim, entre o 3º e o 4º instar.

As curvas de crescimento de *Chironomus calligraphus* apresentaram uma tendência logarítmica (Anexo II), estando as equações das curvas e os valores dos coeficientes de determinação representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Equações de crescimento e valor do coeficiente de determinação para cada postura acompanhada de *Chironomus calligraphus*, em condições de laboratório.

<b>Postura</b>	<b>Equação</b>	<b>Coefficiente de Determinação</b>
1	$y = 94.369\text{Ln}(x) - 570.1$	0.783
2	$y = 114.76\text{Ln}(x) - 708.18$	0.7587
3	$y = 90.995\text{Ln}(x) - 558.16$	0.8745
5	$y = 98.643\text{Ln}(x) - 573.91$	0.7569
6	$y = 98.643\text{Ln}(x) - 573.91$	0.7569
7	$y = 104.28\text{Ln}(x) - 632.98$	0.8492
8	$y = 96.21\text{Ln}(x) - 569.17$	0.8309
9	$y = 97.775\text{Ln}(x) - 585.7$	0.8797
10	$y = 93.332\text{Ln}(x) - 558.67$	0.9107
11	$y = 95.631\text{Ln}(x) - 572.72$	0.8517
12	$y = 115.82\text{Ln}(x) - 721.98$	0.8232
13	$y = 93.3\text{Ln}(x) - 566.95$	0.8404

O ciclo de vida de *Chironomus calligraphus* apresentou quatro instares com tempo médio de duração diferenciado: o primeiro instar apresentou duração média de  $3 \pm 2$  dias; o segundo instar apresentou duração média de  $4 \pm 1$  dia; o terceiro instar apresentou duração média também de  $4 \pm 3$  dias e o quarto instar apresentou duração média de  $8 \pm 2$  dias (Tabela 5). O agrupamento visual das medidas de comprimento das

cápsulas cefálicas através de gráficos de dispersão, conforme Corbi & Trivinho-Strixino (2006) encontra-se no Anexo III.

A fase larval de maior durabilidade foi o quarto instar. Esta maior duração do quarto instar normalmente é relacionada à obtenção de energia necessária para o desenvolvimento, uma vez que os adultos não se alimentam (Fonseca & Rocha, 2004).

Tabela 5 – Duração de cada instar (em dias), por postura acompanhada de *Chironomus calligraphus*, em condições de laboratório.

<b>Postura</b>	<b>Instar 1</b>	<b>Instar 2</b>	<b>Instar 3</b>	<b>Instar 4</b>
<b>1</b>	1	2	3	6
<b>2</b>	2	6	12	12
<b>3</b>	1	2	3	3
<b>5</b>	4	4	2	6
<b>6</b>	2	4	4	7
<b>7</b>	4	4	2	8
<b>8</b>	4	4	4	8
<b>9</b>	6	4	4	6
<b>10</b>	3	2	4	10
<b>11</b>	2	4	5	7
<b>12</b>	3	4	3	10
<b>Média</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

As medidas de comprimento do corpo e medidas ventrais da cápsula cefálica (em  $\mu\text{m}$ ) encontram-se no Anexo IV. O comprimento máximo larval foi observado no quarto instar da postura 13, onde, no oitavo dia após a eclosão, foi registrada uma larva com  $9767\mu\text{m}$  de comprimento.

Dyar (1890) demonstrou que a cápsula cefálica de Lepidoptera cresce em progressão geométrica, aumentando a cada ecdise em uma razão constante (em média 1,4). A determinação do número de instares, baseando-se nesta regra, tem sido largamente utilizada, mas também tem recebido críticas por não se aplicar a certos grupos de insetos.

Apenas a postura de número 2 apresentou uma razão de crescimento constante quando submetida à Regra de Dyar, conforme observado na tabela abaixo (Tabela 6).

Tabela 6 – Razões de crescimento para a aplicação da Regra de Dyar em larvas de *Chironomus calligraphus*, em condições de laboratório.

<b>Postura</b>	<b>r 1</b>	<b>r 2</b>	<b>r 3</b>
<b>1</b>	1,5	1,8	1,4
<b>2</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>
<b>3</b>	1,6	1,0	1,9
<b>5</b>	1,6	1,6	1,5
<b>6</b>	1,6	1,3	1,7
<b>7</b>	1,5	1,7	1,5
<b>8</b>	1,8	1,4	1,2
<b>9</b>	1,8	1,2	1,6
<b>10</b>	1,8	1,4	1,6
<b>11</b>	1,4	1,6	1,7
<b>12</b>	1,5	1,7	1,9
<b>13</b>	1,6	1,4	1,8

Hutchinson *et al.* (1997), compara informações a respeito da aplicabilidade da Regra de Dyar, discutindo que existem limites fisiológicos para o crescimento. Por exemplo, quando artrópodes sofrem ecdise, o novo exoesqueleto é formado dentro do antigo exoesqueleto, desta forma, a relação de crescimento passaria a ser limitada pela extensibilidade da nova cutícula. Um outro fator a ser considerado, segundo os autores, seria a flexibilidade de dobra da epicutícula. Os autores concluíram que, ainda que existam limitações fisiológicas influenciando as relações de crescimento em algumas espécies, as variações comumente observadas sugerem que a relação é, normalmente, espontânea.

De acordo com as conclusões de Hutchinson *et al.* (1997), sugere-se que as relações de crescimento larval de *Chironomus calligraphus* podem ser de natureza espontânea, já que todos os cultivos apresentaram as mesmas condições físicas e alimentares.

Neste estudo, as posturas analisadas foram coletadas no mesmo local, concomitantemente. A eclosão dos ovos ocorreu em períodos semelhantes, assim como a empupação e o início do período de emergência dos adultos. Nas bandejas de cultivo sempre foi possível a observação de larvas de diferentes tamanhos, o que pode ser comprovado pelo longo intervalo de tempo de emergência dos adultos.

Oliver (1971) ressalta que o tempo requerido para o desenvolvimento dos Chironomidae varia de acordo com o número de fatores que os influenciam,

principalmente a temperatura. Nesta revisão, o autor cita outros fatores que podem influenciar os índices de crescimento, como exemplo, o fator sexo: foi observado em larvas de *C. nuditarsus* Keyl, 1961 no quarto instar, uma diferença na razão de crescimento entre machos larvais e fêmeas larvais, os quais apresentaram uma razão de crescimento de 1,90 e 1,98, respectivamente.

As três larvas medidas diariamente foram retiradas de forma aleatória dos cultivos, não existindo, desta forma, avaliação da diferenciação sexual das larvas. Sendo assim, não foi possível avaliar se o crescimento mostra-se diferenciado para indivíduos larvais machos e fêmeas. A temperatura pode ser considerada um fator excluído como influente no crescimento, já que todos os cultivos desenvolveram-se sob condições padrões de temperatura e fotoperíodo.

Após o quarto instar larval, o organismo passa para o estágio de pupa, a qual possui coloração escura e cefalotórax bem diferenciado, logo emergindo como adulto terrestre. Segundo Oliver (1971) a etapa pupal, exceto em estudos taxonômicos, não é muito investigada. O autor justifica que, quando comparada à etapa larval, a duração da etapa pupal é muito breve, variando de algumas horas a alguns dias. Quando a pupa está madura, move-se à superfície da água e a eclosão do adulto ocorre. A natação e ascensão da pupa são facilitadas pelo acúmulo de ar ao redor do tórax do indivíduo adulto.

A duração média até a emergência do primeiro adulto foi de  $10 \pm 1$  dia, para as 12 posturas acompanhadas. A observação do primeiro adulto emergente de cada postura variou entre o 9º e o 12º dia (Tabela 7). Almeida (2007) considera que, em condições ótimas de temperatura, a duração do ciclo de vida de *Chironomus xanthus* varia entre 12 e 15 dias.

Tabela 7 – Observação do primeiro adulto emergente de *Chironomus calligraphus*, de cada postura acompanhada, em condições de laboratório (em dias).

<b>Postura</b>	<b>Dia</b>
1	9
2	9
3	11
5	12
6	9
7	9
8	12
9	9
10	10

11	12
12	11
13	10
<b>Média</b>	<b>10</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1</b>

Almeida (2007) caracteriza os adultos machos de *Chironomus xanthus* por apresentarem as antenas plumosas, abdome delgado e com genitália visível, características que, segundo o autor, os tornam visivelmente diferente das fêmeas adultas. Estas diferenciações também puderam ser observadas para os adultos de *C. calligraphus* cultivados.

Fonseca & Rocha (2004) e Almeida (2007) discutiram a fase de reprodução de *C. xanthus* onde, com aproximadamente 2 dias de vida após a emergência, os adultos copulam e as fêmeas grávidas depositam seus ovos na água. Em nosso estudo não houve oviposição pelas fêmeas, o que se pode justificar pelo fato das bandejas serem cobertas com tela de forma a não disponibilizar espaço (altura) suficiente para as revoadas características da cópula dos adultos de Chironomidae.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base na análise dos resultados, é possível afirmar que o ciclo de vida de indivíduos de *Chironomus calligraphus* apresenta uma alta variação intraespecífica, tanto no tamanho e no número de ovos, quanto no tempo de desenvolvimento embrionário e larval até a emergência dos adultos, conforme pode ser observado nos dados obtidos neste estudo.

Na revisão bibliográfica torna-se evidente que os poucos artigos referentes ao tema “ciclo de vida” tratam, em sua maioria, do acompanhamento de uma única desova, assim provavelmente, eliminam-se as possíveis variações intraespecíficas do grupo.

O cultivo apresentou curto período de incubação dos ovos, baixo índice de mortalidade, adaptabilidade alimentar e crescimento larval rápido. Estas características, aliadas a facilidade de obtenção das posturas em campo, favorecem a criação de *Chironomus calligraphus* em laboratório.

Corbi & Trivinho-Strixino (2006) defendem que são raros os estudos sobre o ciclo de vida de Chironomidae na Região Neotropical. A importância deste tipo de trabalho, segundo os autores, está no fato do fornecimento de informações importantes para o conhecimento sobre a bionomia das espécies desta família e seus aspectos populacionais. Outro fator importante é a possibilidade de esclarecimento de modificações ambientais temporais e, ainda, a possibilidade de cultivo e utilização deste grupo em ensaios de toxicidade, utilizando as larvas como indicadoras.

A espécie utilizada nesta pesquisa foi caracterizada por Iannacone & Salazar (2007), como típica de ambientes naturais e de águas tratadas residuais domésticas, no Peru. Os autores consideram a espécie como apropriada para utilização em ensaios ecotoxicológicos e na avaliação de diferentes tipos de qualidade de água. Desta forma, ficam como intenções de perspectivas futuras, a partir dos resultados obtidos:

- 1) A caracterização citogenética da espécie (em andamento);
- 2) O cultivo para fins ecotoxicológicos; inclusive considerando-se possíveis estudos de deformidades morfológicas das larvas de *Chironomus calligraphus*.

É importante ressaltar que este trabalho é o primeiro registro de uma espécie de Chironomidae para a cidade de Rio Grande e, provavelmente, seja o primeiro registro de uma espécie de *Chironomus* para o estado do Rio Grande do Sul, o que torna evidente a necessidade de maiores incentivos e de ampliação de pesquisas nesta linha de estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURAYA, F.H. & CALLIL, C. T. Variação temporal de larvas de Chironomidae (Diptera) no Alto Rio Paraguai (Cáceres, Mato Grosso, Brasil). **Revista Brasileira de Zoologia**, 24 (3): 565-572, 2007.
- ALBERTONI, E. F. & PALMA-SILVA, C. Macroinvertebrados associados a macrófitas aquáticas flutuantes em canais urbanos de escoamento pluvial (Balneário Cassino, Rio Grande, RS). **Neotropical Biology and Conservation**, 1(2):90-100, 2006.
- ALBERTONI, E. F.; PALMA-SILVA, C.; ESTEVES, F. A. Macroinvertebrates associated with *Chara* in a tropical coastal lagoon (Imboassica lagoon, Rio de Janeiro, Brazil). **Hydrobiologia**, 457: 215-224, 2001.
- ALBERTONI, E. F.; PRELLVITZ, L. J.; SILVA, C. P. Macroinvertebrate fauna associated with *Pistia stratiotes* and *Nymphoides indica* in subtropical lakes (south Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 67: 499-507, 2007.
- ALMEIDA, C. A. Aspectos do ciclo de vida de espécies bentônicas nativas e sua utilização na avaliação da qualidade de sedimentos de lagos naturais e reservatórios. **Tese de Doutorado**. São Paulo. Universidade de São Paulo, 2007.
- AL-SHAMI, S.; RAWI, C. S. M.; NOR, S. A. M.; AHMED, A. H. Chironomids of tropical rice fields in the north Malaysian Peninsula. **Chironomus Newsletter**, 19:14-18, 2006.
- AMORIM, R. M.; HENRIQUES-OLIVEIRA, A. L.; NESSIMIAN, J. L. Distribuição espacial e temporal das larvas de Chironomidae (Insecta: Diptera) na seção ritral do rio Cascatinha, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Lundiana**, 5(2):119-127. 2004.
- ANDERSEN, T. & SÆTHER, O. A. *Onconeura*, a new Neotropical orthoclad genus (Chironomidae, Orthoclaadiinae). **Zootaxa**, 957: 1–16. 2005.



- ARMITAGE, P.D.; CRANSTON, P.S.; PINDER, L.C.V. **The Chironomidae biology and ecology of non-biting midges**, 1st ed., Chapman & Hall, London, 538pp. 1995.
- AYRES, M.; AYRES JR., M. AYRES, D. L.; DOS SANTOS, A. S. **BioEstat 3.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá. Belém. 290p. 2003.
- BOTTS, P. S. Spatial pattern, Patch dynamics and successional changes: chironomid assemblages in a Lake Erie coastal wetland. **Freshwater Biology**, 37: 277-286. 1997.
- BRITO JR. L.; ABÍLIO, F. J. P.; WATANABE, T. Insetos aquáticos do açude São José dos Cordeiros (semi-árido paraibano) com ênfase em Chironomidae. **Entomologia y Vectores**, 12 (2): 149-157, 2005.
- BRODERSEN, K. P. & QUINLANB, R. Midges as palaeoindicators of lake productivity, eutrophication and hypolimnetic oxygen. **Quaternary Science Reviews**, 25: 1995–2012. 2006.
- BRODERSEN, K.P. & ANDERSON N.J. Distribution of chironomids (Diptera) in low arctic West Greenland lakes: trophic conditions, temperature and environmental reconstruction. **Freshwater Biology**, 47: 1137–1157. 2002.
- BROOKS, S. J. Fossil midges (Diptera: Chironomidae) as palaeoclimatic indicators for the Eurasian region. **Quaternary Science Reviews**, 25: 1894–1910. 2006.
- BROZA, M.; GANCZ, H.; HALPER, M.; KASHI, Y. Adult non-biting midges: possible windborne carriers of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139. **Environmental Microbiology**, v. 7 (4): 576-585. 2005.
- BROZA, M. & HALPERN, M. Chironomid egg masses and *Vibrio cholerae* - brief communications. **Nature**. v. 412. p.40. 2001.

- CALLISTO, M. & GONÇALVES JR. Bioindicadores Bentônicos. *In*: Fabio. Roland, Dionéia Cesar e Marcelo Marinho (Eds). **Lições de Limnologia**. São Carlos: RiMa, p. 371-379. 2005.
- CALLISTO, M., MARQUES, M.M. & BARBOSA, F.A.R. Deformities in larval Chironomus (Diptera, Chironomidae) from the Piracicaba River, southeast Brazil. **Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, 27: 2699–2702. 2000.
- CALLISTO, M.; GONÇALVES JR., J. F.; GRAÇA, M. A. S. Leaf litter as a possible food source for chironomids (Diptera) in Brazilian and Portuguese headwater streams. **Revista Brasileira de Zoologia**, 24 (2): 442–448. 2007.
- CALLISTO, M.; MORENO, P.; GONÇALVES JR., J.F.; LEAL, J.J.F.; ESTEVES, F.A. Diversity and biomass of Chironomidae (Diptera) larvae in an impacted coastal lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 62(1):77-84. 2002.
- CAREW, M. E.; PETTIGROVE, V.; HOFFMANN, A. A. The Utility of DNA Markers in Classical Taxonomy: Using Cytochrome Oxidase I Markers to Differentiate Australian *Cladopelma* (Diptera: Chironomidae) Midges. **Annals of the Entomological Society of América**. p. 587-594. 2005.
- CERRI-DO-NASCIMENTO, D., MESSIAS, M. C. & RODRIGUES, J.J.L. Sobre a ocorrência de *Lopescladius minutissimus* Oliveira, 1967 (Insecta: Diptera: Chironomidae: Orthoclaadiinae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Entomologia y Vectores**, 11 (1): 179-181, 2004.
- COFFMAN, W.P. & FERRINGTON JR., L. C. Chironomidae. *In*: Merritt RW, Cummins KW (eds) **An introduction to the aquatic insects of North America**, 3rd ed. Kendall/Hunt, Iowa, pp 635–755. 1996.
- CORBI, J.J. & TRIVINHO-STRIXINO, S. Ciclo de vida de duas espécies de *Goeldichironomus* (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 50 (1):72-75. 2006.

- CORREIA, L. C. S. & TRIVINHO-STRIXINO, S. Chironomidae (Diptera) em substratos artificiais num pequeno reservatório: represa do Monjolinho, São Carlos, São Paulo, Brasil. **Entomologia y Vectores**. 12 (2): 265-274. 2005a.
- CORREIA, L. C. S. & TRIVINHO-STRIXINO, S. New records of *Chironomus* Meigen (Diptera, Chironomidae) in the State of São Paulo, Brazil. Short Communication. **Revista Brasileira de Entomologia**, 49(3): 430-433. 2005b.
- CORREIA, L. C. S. & TRIVINHO-STRIXINO, S. New species of *Chironomus* Meigen (Diptera: Chironomidae: Chironominae) from Brazil. **Zootaxa**, 1504: 53–68. 2007.
- CORREIA, L. C. S., TRIVINHO-STRIXINO, S. & MICHAILOVA P. A new species of *Chironomus* Meigen, 1803 (Diptera, Chironomidae) from the southeast of Brazil. **Studies on the Neotropical Fauna and Environment**, 40(1): 29 – 38. 2005.
- CORREIA, L. C. S.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; MICHAILOVA, P. A new species of *Chironomus* Meigen (Diptera: Chironomidae:Chironominae) from polluted streams of southeastern Brazil. **Zootaxa**, 1130: 57–68. 2006.
- CRANSTON, P. S. A new genus and species of Chironominae (Diptera: Chironomidae) with wood-mining larvae. **Australian Journal of Entomology**, 45: 227–234. 2006.
- CRANSTON, P. S. The oriental genus *shangomyia* Sæther & Wang (Chironomidae: Diptera): immature stages, biology, putative relationships and the evolution of wood mining in chironomid larvae. **The Raffles Bulletin of Zoology**, 51(2): 179-186. 2003.
- DIAS, V., KSAS, B.; CAMILLERI, V. AND BONZOM, J.M. Sublethal effects of sediment-associated uranium on *Chironomus riparius* (Diptera: *Chironomidae*) larvae. **Radioprotection**, Suppl. 1, v. 40. p. 191-197. 2005.
- DYAR, H. G. & RHINEBECK, N. Y. The number of molts of Lepidopterous larvae. **Psyche**, 5: 420-422. 1890.

- EPLER, J. H. **Identification manual for the larval Chironomidae (Diptera) of Florida.** Florida Department of Environmental Protection, 427p. 1992.
- ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia.** Rio de Janeiro. Interciência – FINEP. 602p. 1998.
- FERRINGTON JR., L. C. Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. **Hydrobiologia**, 595:447–455. 2008.
- FONSECA, A. L. & ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera, Chironomidae). **Acta Limnológica Brasiliensia**, 16 (2):153-161. 2004.
- GOTELLI, N. J. A taxonomic wish-list for community ecology. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, 359: 585–597. 2004.
- GOULART, M. D. C. & CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v. 2, n. 2, p.153-164, 2003.
- HALPERN, M., BROZA, Y.B., MITTLER, S., ARAKAWA, E.; BROZA, M. Chironomid egg masses as a natural reservoir of *Vibrio cholerae* Non-O1 and Non-O139 in Freshwater Habitats. **Microbial Ecology**, 47 (4): 341-349. 2004.
- HAYFORD, B.; BACHMANN, J.; GOTOV, M. A comparison between communities of Chironomidae (Insecta: Diptera) from lake bays and affluent streams of the Lake Hovsgol watershed, Mongolia. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 155:12-23. 2006.
- HIRABAYASHI, K., HANAZATO, T.; NAKAMOTO, N. Population dynamics of *Prosilocerus akamusi* and *Chironomus plumosus* (Diptera: Chironomidae) in Lake Suwa in relation to changes in the lake's environment. **Hydrobiologia**, 506/509: 381–388. 2003.

- HOOPER, H. L.; SIBLY, R. M., MAUND; S. J.; HUTCHINSON, T. H. The joint effects of larval density and C-cypermethrin on the life history and population growth rate of the midge *Chironomus riparius*. **Journal of Applied Ecology**, 40: 1049–1059. 2003.
- HOOPER, H. L.; SIBLY, R. M., MAUND; S. J.; HUTCHINSON, T. H.; MAUND, S. J. The influence of larval density, food availability and habitat longevity on the life history and population growth rate of the midge *Chironomus riparius*. **Oikos**, 102 (3): 515-524. 2003.
- HUTCHINSON, J. M. C.; MCNAMARA, J. M. HOUSTON, A. I. H.; VOLLRATH, F. Dyars Rule and the investment principle: optimal moulting strategies if feeding rate is size-dependent and growth is discontinuous. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, 352: 113-138. 1997.
- IANNACONE, J. & SALAZAR, N. Efecto Toxicológico de Muestras de Agua del Lago Junín, Perú, sobre *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae). **Journal of The Brazilian Society of Ecotoxicology**, 2 (3): 219-227. 2007.
- JACOBSEN, R. E. & PERRY, S. A. *Polypedilum nubifer*, a chironomid midge (Diptera: Chironomidae) new to Florida that has nuisance potential. **Florida Entomologist**, 90(1): 264-267. 2007.
- JOHNSON R.K., WIEDERHOLM T. & ROSENBERG D.M.. Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates. *In: Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates* (Eds D.M. Rosenberg & V.H. Resh), Chapman & Hall, New York. pp. 40–158. 1993.
- KORNIJÓW, R. The impact of predation by perch on the size-structure of *Chironomus* larvae – the role of vertical distribution of the prey in the bottom sediments, and habitat complexity. **Hydrobiologia** 341/343: 207–213. 1997.
- KRAVTSOVA, LYUBOV. Chironomid communities in the littoral zone on the western coast of the southern Baikal basin (structure, distribution, seasonal dynamics). **Chironomus Newsletter**, 20: 24-29. 2007.

- LEHMKUHL, D.M. 1979. **How to know the aquatic insects, the picture key nature series**. Brown company publishers, Dubuque. 168 p. 1979.
- LENCIONI, V. & ROSSARO, B. Microdistribution of chironomids (Diptera: Chironomidae) in Alpine streams: an autoecological perspective. **Hydrobiologia**, 533: 61–76. 2005.
- LUOTO, T. P. Subfossil chironomids from 18 lakes in southern and northern Finland, **Chironomus Newsletter**, 20: 16-23. 2007.
- MACDONALD, E. E. & TAYLOR, B. R. Incidence of mentum deformities in midge larvae (Diptera:Chironomidae) from Northern Nova Scotia, Canada. **Hydrobiologia**, 563: 277–287. 2006.
- MAJUMDAR, U. “Systematics and biology of the subfamily Chironominae (Diptera: Chironomidae) of eastern India”. **Chironomus Newsletter**, 20: 14. 2007.
- MARCHESE, M. & PAGGI, A. Diversidad de Oligochaeta (Annelida) y Chironomidae (Diptera) del Litoral Fluvial Argentino. Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial Argentino. En: **Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial argentino**. (Ed.coord.) F.C. Aceñolaza. INSUGEO, Tucumán, Argentina, Miscelánea 12: 380 pp. 2004.
- MARGALEF, R. **Limnologia**. Barcelona. Omega, 1010p. 1983.
- MARQUES, M. M. G. S. M., BARBOSA, F. A. R. & CALLISTO, M. Distribution and abundance of Chironomidae (Diptera, Insecta) in an impacted watershed in southeast Brazil. **Revista Brasileira Biologia**, 59 (4): 553-561. 1999.
- MARTIN, J. North American cytospecies of the genus *Chironomus* (includes *Camptochironomus*, *Chaetolabis* and *Einfeldia*). Genetics department, University of Melbourne, Victoria 3010, Australia. 2006.  
**<http://www.genetics.unimelb.edu.au/Martin/NACyfiles/NACHiron.html>**  
(Acessado em 09/03/2008).

- MAY, R. M. How many species are there on earth? **Science**, 241: 1441–1449. 1988.
- MAYRINK, N.; MORETTI, M.; GOULART, M.; MORENO, P.; FERREIRA, W.; CALLISTO, M.,. Benthic macroinvertebrate diversity in the middle Doce River: the beginning of the Brazilian Long-Term Ecological Research (LTER) program. **Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, 28:1827-1830. 2002.
- MENDES, H. F. & PINHO, L. C. Chironomidae: Lista de espécies registradas para o Brasil e alguns Estados (última atualização: 06 de dezembro de 2007): <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/chironomidae/Listatotal.htm> (Acessado em 09/03/2008).
- MERRITT, R.W. & CUMMINS, K.W. **An Introduction to the Aquatic Insects of North America**. 3<sup>a</sup>ed. Ed. Kendall/Hunt Publishing Company. Dubuque, Iowa, 1996.
- MICHAILOVA, P.; ILKOVA, J.; WHITE, K. N. Functional and structural rearrangements of salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) in response to freshly neutralized aluminium. **Environmental Pollution**, 123: 193-207. 2003.
- MORETTI, M. S., GONÇALVES JR., J. F.; LIGEIRO, R.; CALLISTO, M. Invertebrates colonization on native tree leaves in a Neotropical stream (Brazil). **International Review of Hydrobiology**, 92: 199–210. 2007.
- MOUBAYED-BREIL, JOEL. New records of Chironomidae (Diptera) from continental France. **Chironomus Newsletter**, 20: 32. 2007.
- MUNDIE, J. H.. The ecology of chironomidae in storage reservoirs. **The Royal Entomological Society of London**, 109: 149-232. 1956.
- NAZAROVA L.; KUMKE T.; PESTRJAKOVA L.; HUBBERTEN H. W. Chironomid fauna of central Yakutian lakes (Northern Russia) in palaeoenvironmental investigation. **Chironomus Newsletter**, 18: 25-27. 2005.

- NAZAROVA, L. B.; RISS, H. W.; KAHLHEBE, A. R.; WERDING, B. Some observations of buccal deformities in Chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) from the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. **Caldasia** 26(1): 275-290, 2004.
- NAZAROVA, L. Chironomids of the Aral Sea, **Chironomus Newsletter**, 19: 10-12, 2006.
- NESSIMIAN, J.L. & DE LIMA, I.H.A.G. Colonização de três espécies de macrófitas por invertebrados aquáticos em um brejo no litoral do estado do Rio de Janeiro. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 9:149-163, 1997.
- NESSIMIAN, J.L. & SANSEVERINO, A.M. Structure and dynamics of Chironomid fauna from a sand dune marsh in Rio de Janeiro State, Brazil. **Studies on the Neotropical Fauna and Environment**, 30(4): 207-219, 1995.
- NOLTE, U. Egg masses of Chironomidae (Diptera). A review including new observations and preliminary key. **Entomologica Scandinavica**, Supplement 43. 75p. 1993.
- NOWAK, C.; HANKELN, T.; SCHMIDT, E. R. & SCHWENK, K. Development and localization of microsatellite markers for the sibling species *Chironomus riparius* and *Chironomus piger* (Diptera: Chironomidae). **Molecular Ecology Notes**, 6(3): 915-917, 2006.
- OERTLI, B. Spatial and temporal distribution of the zoobenthos community in a woodland pond (Switzerland). **Hydrobiologia**, 300/301: 195-204, 1995.
- OLIVER, D. R., Life history of the Chironomidae. **Annual Reviews of Entomology**, 16: 211-230. 1971.
- OLIVER, J.A.I.; CAPCHA, N.S. & ALVARIÑO, L. Variabilidad del ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera:Chironomidae) para evaluar cadmio, mercurio y plomo. **Ecología Aplicada**, 2(1). 2003.
- OSBORNE, S.; HURREL, S.; SIMKISS, K.; LEIDI A. Factors influencing the distribution and feeding of the larvae of *Chironomus riparius*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 94:67-73. 2000.



- PANATTA, A.; STENERT, C.; FREITAS, S. M. F.; MALTCHIK, L. Diversity of chironomid larvae in palustrine wetlands of the coastal plain in the south of Brazil. **Limnology** 7: 23–30. 2006.
- PANATTA, A.; STENERT, C.; SANTOS, E. M.; MALTCHIK, L. Diversity and Distribution of Chironomid Larvae in Wetlands in Southern Brazil. **Journal of the Kansas Entomological Society**, 80(3): 229–242. 2007.
- PÉRY, A. R. R.; MONS, R. G. J. Modelling of the life cycle of *Chironomus* species using an energy-based model. **Chemosphere**, 59:247-253. 2005.
- PEREIRA & DE LUCA. Benthic macroinvertebrates and the quality of the hydric resources in Maratá Creek basin (Rio Grande do Sul, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, 15(2): 57-68. 2003.
- PETROVA, N.A.; MICHAILOVA, P.; ILKOVA, J. Comparative cytogenetic variation of the salivary gland polytene chromosomes in *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae) from two polluted biotopes of Bulgaria and Russia. **Russian Journal of Genetics**, 40 (1): 40-48. 2004.
- PIEDRAS, S. R. N.; BAGER, A.; MORAES, P. R. R.; ISOLDI, L. A.; FERREIRA, O. G. L.; HEEMANN, C. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores de qualidade de água na Barragem. Santa Bárbara, Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, 36(2): 494-500, 2006.
- PINDER L. C. V. Biology of the eggs and first-instar larvae. In: **The Chironomidae: Biology and Ecology of Nonbiting Midges**, ed. Chapman & Hall. London, 538pp 1995.
- PORINCHU, D. F. & MACDONALD, G. M. The use and application of freshwater midges (Chironomidae: Insecta: Diptera) in geographical research. **Progress in Physical Geography**, 27; 378. 2003.

- PRELLVITZ L. J. & ALBERTONI, E.F. Caracterização temporal da comunidade de macroinvertebrados associada a *Salvinia* spp (Salviniaceae) em um arroio da Planície Costeira de Rio Grande, RS. **Acta Biologica Leopoldensia**, 26(2): 213-223. 2004.
- RABENI, C. F. & WANG, N. Bioassessment of streams using macroinvertebrates: are the Chironomidae necessary? **Environmental Monitoring and Assessment** 71: 177–85. 2000.
- RAE, J. G., Chironomid midges as indicators of organic pollution in the Scioto River Basin, Ohio. **Ohio Journal of Science**, 89 (1): 5-9, 1989.
- REAL, M., RIERADEVALL, M.; PRAT, N. Chironomus species (Diptera: Chironomidae) in the profundal benthos of Spanish reservoirs and lakes: factors affecting distribution patterns. **Freshwater Biology** 43:1-18. 2000.
- ROQUE, F.O.; SILVA, L.C. CORREIA; TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G.. A review of Chironomidae studies in Lentic systems in the state of São Paulo, Brazil. **Biota Neotropica** 4(2):1-19. 2003.
- ROSIN, G. C. & TAKEDA, A. M. Larvas de Chironomidae em substratos artificiais: comparações e padrões de colonização em três rios da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil. **Dissertação do Mestrado**. Universidade Estadual de Maringá (UEM). 2007.
- ROVIRA, C.; BEERMANN, W. AND EDSTROMM, J. A repetitive DNA sequence associated with the centromeres of *Chironomus pallidivittatus*. **Nucleic Acids Research**, 21(8): 1775–1781. 1993.
- SANSEVERINO, A.M.; NESSIMIAN, J.L. Habitats de larvas de Chironomidae (Insecta, Díptera) em riachos de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 13(1): 29-38, 2001.

- SCHÄFER, A. **Fundamentos de ecologia e biogeografia das águas continentais**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. 532p. 1985.
- SHARLEY, D. J.; PETTIGROVE, V.; PARSONS, Y. M. Molecular identification of *Chironomus* spp. (Diptera) for biomonitoring of aquatic ecosystems. **Australian Journal of Entomology**, 43: 359–365. 2004.
- SPIES M, REISS F. Catalog and bibliography of Neotropical and Mexican Chironomidae (Insecta, Diptera). **Spixiana Supplement**, 22: 61–119. 1996.
- STEVENS, B.J. & SWIFT, H. RNA transport from nucleus to cytoplasm in *Chironomus* salivary glands. **The Journal of Cell Biology**, 31(1): 55–77. 1966.
- STEVENS, M.M., HELLIWELL S. & CRANSTON P.S.. Larval chironomid communities (Diptera: Chironomidae) associated with establishing rice crops in southern New South Wales Australia. **Hydrobiologia**, 556: 317–325. 2006.
- SURIANO, M.T.; CORREIA, L. C. S.; FONSECA-GESSNER, A. A.; GUERESCHI, R. M. Incidência de deformidades na cápsula cefálica de larvas de *Chironomus* sp. no Rio do Monjolinho num segmento pós-urbano da cidade de São Carlos, SP. In: **V Encontro Brasileiro sobre Chironomidae**, São Carlos, p. 11. 2005.
- TAKEDA, A. M.; KOBAYASHI, J. T.; RESENDE, D.; FUJITA, D. S.; AVELINO, G. S.; FUJITA, R. H.; PAVAN, C. B.; BUTAKKA, C. M. **A Influência do decréscimo do nível fluviométrico na comunidade de Chironomidae da Planície Aluvial do Rio Paraná**. Ed. UEM– NUPELIA, 100p. 2001.
- TÁTOSOVÁ, J. & STUHLÍK, E. Seasonal dynamics of chironomids in the profundal zone of a mountain lake (Ľadové pleso, the Tatra Mountains, Slovakia). **Biologia Bratislava**, 61(18): 203-212. 2006.

- TREVERROW, N.. Susceptibility of *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to bacillus *Thuringiensis* serovar *israelensis*. **Australian Journal of Entomology**, 24(4): 303-304. 1985.
- TRIVINHO STRIXINO, S. & SONODA, K. C. A new *Tanytarsus* species (Insecta, Diptera, Chironomidae) from São Paulo State, Brazil. **Biota Neotropica**, 6(2). 2006.
- TRIVINHO-STRIXINO, S. & STRIXINO, G. A new Neotropical species of *Tanytarsus* van der Wulp, 1874 (Diptera, Chironomidae) with an unusual anal process. **Zootaxa**, 1654: 61-67, 2007.
- TRIVINHO-STRIXINO, S. & STRIXINO, G. Insetos Dípteros: Quironomídeos. In: Joly, C.A.; Bicudo, CEM. (orgs.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX, 4º Invertebrados de água doce** / D. Ismael; W.C. Valenti; T. Matsumura-Tundisi; O. Rocha. São Paulo: FAPESP, p.141-148. 1999.
- TRIVINHO-STRIXINO, S. & STRIXINO, G. **Larvas de Chironomidae do Estado de São Paulo – Guia de identificação e diagnose dos gêneros**. UFSCAR, 229p. 1995.
- TRIVINHO-STRIXINO, S. & STRIXINO, G. The immature stages of two *Caladomyia* Sæwedall, 1981 species, from São Paulo State, Brazil (Chironomidae, Chironominae, Tanytarsini). **Revista Brasileira de Entomologia**, 47(4): 597-602. 2003.
- VINOGRADOVA, E.M. & RISS, H. W. Chironomids of the Yucatán Peninsula. **Chironomus Newsletter**, 20:32. 2007.
- WALSHE, B. M. The feeding habits of certain chironomid larvae (subfamily Tendipedinae). **Proceedings of Zoological Society of London**, 121: 63-79. 1950.
- WETZEL, R. G. **Limnologia**. 2ª ed., Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1129p. 1993.

WIEDENBRUG, S. Studie zur Chironomidenfauna aus Bergbächen von Rio Grande do Sul, Brasilien. **Tese de Doutorado**. Universität München. 2000.

WIESLANDER, L. & PAULSSON, G. Sequence organization of the Balbiani ring 2.1 gene in *Chironomus tentans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 89: 4578-4582. 1992.

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

WOBUS, U. Molecular Characterization of an Insect Genome: *Chironomus thummi*. **European Journal Biochemi**, 59: 287-293. 1975.

YONG, T.; LEE, J.; LEE, I.; PARK, S. Identification of *Chironomus kiiensis* allergens, a dominant species of non-biting midges in Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, 37(3): 171-179, 1999.

YORDANOV, R.V. Effects of gamma-radiation on the organisation of polytene chromosomes of *Glyptotendipes salinus* Michailova (Chironomidae, Diptera). **Netherlands Journal Of Aquatic Ecology**, 26(2-4): 581-585.1992.

## Anexo I

Análise de variância (ANOVA) com Pós Teste de Tukey, para diferença entre as médias de tamanho de ovos de *Chironomus calligraphus*.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	12	22.9 e+03	19.1 e+02
Erro	117	17.6 e+03	150,79

F =	12,6693
(p) =	< 0.0001
Média (Coluna 1) =	190,52
Média (Coluna 2) =	156,99
Média (Coluna 3) =	149,38
Média (Coluna 4) =	158,84
Média (Coluna 5) =	151,92
Média (Coluna 6) =	164,8
Média (Coluna 7) =	148,63
Média (Coluna 8) =	147,83
Média (Coluna 9) =	166,69
Média (Coluna 10) =	148,23
Média (Coluna 11) =	185,8
Média (Coluna 12) =	155,02
Média (Coluna 13) =	159,94

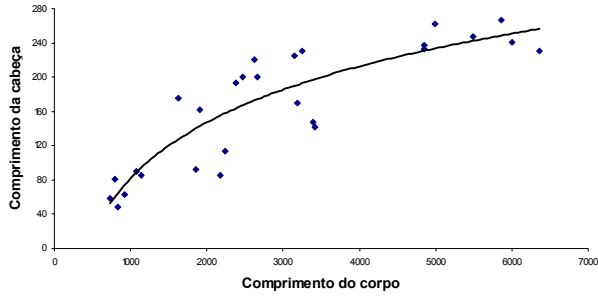
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias ( 1 a 2) =	33,53	8,6347	< 0.01
Médias ( 1 a 3) =	41,14	10,5945	< 0.01
Médias ( 1 a 4) =	31,68	8,1583	< 0.01
Médias ( 1 a 5) =	38,6	9,9404	< 0.01
Médias ( 1 a 6) =	25,72	6,6235	< 0.01
Médias ( 1 a 7) =	41,89	10,7876	< 0.01
Médias ( 1 a 8) =	42,69	10,9936	< 0.01
Médias ( 1 a 9) =	23,83	6,1368	< 0.01
Médias ( 1 a 10) =	42,29	10,8906	< 0.01
Médias ( 1 a 11) =	4,72	1,2155	ns
Médias ( 1 a 12) =	35,5	9,142	< 0.01
Médias ( 1 a 13) =	30,58	7,875	< 0.01
Médias ( 2 a 3) =	7,61	1,9597	ns
Médias ( 2 a 4) =	1,85	0,4764	ns
Médias ( 2 a 5) =	5,07	1,3056	ns
Médias ( 2 a 6) =	7,81	2,0112	ns
Médias ( 2 a 7) =	8,36	2,1529	ns
Médias ( 2 a 8) =	9,16	2,3589	ns
Médias ( 2 a 9) =	9,7	2,498	ns
Médias ( 2 a 10) =	8,76	2,2559	ns
Médias ( 2 a 11) =	28,81	7,4192	< 0.01
Médias ( 2 a 12) =	1,97	0,5073	ns
Médias ( 2 a 13) =	2,95	0,7597	ns

## Continuação

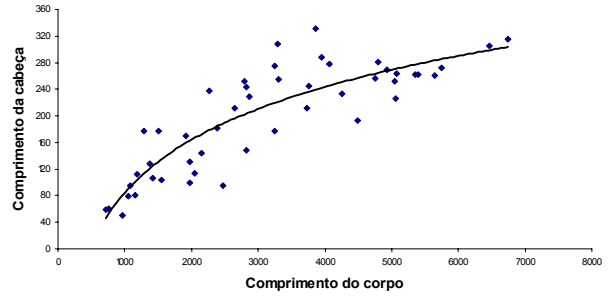
Médias ( 3 a 4) =	9,46	2,4362	ns
Médias ( 3 a 5) =	2,54	0,6541	ns
Médias ( 3 a 6) =	15,42	3,971	ns
Médias ( 3 a 7) =	0,75	0,1931	ns
Médias ( 3 a 8) =	1,55	0,3992	ns
Médias ( 3 a 9) =	17,31	4,4577	ns
Médias ( 3 a 10) =	1,15	0,2962	ns
Médias ( 3 a 11) =	36,42	9,379	< 0.01
Médias ( 3 a 12) =	5,64	1,4524	ns
Médias ( 3 a 13) =	10,56	2,7194	ns
Médias ( 4 a 5) =	6,92	1,7821	ns
Médias ( 4 a 6) =	5,96	1,5348	ns
Médias ( 4 a 7) =	10,21	2,6293	ns
Médias ( 4 a 8) =	11,01	2,8353	ns
Médias ( 4 a 9) =	7,85	2,0215	ns
Médias ( 4 a 10) =	10,61	2,7323	ns
Médias ( 4 a 11) =	26,96	6,9428	< 0.01
Médias ( 4 a 12) =	3,82	0,9837	ns
Médias ( 4 a 13) =	1,1	0,2833	ns
Médias ( 5 a 6) =	12,88	3,3169	ns
Médias ( 5 a 7) =	3,29	0,8472	ns
Médias ( 5 a 8) =	4,09	1,0533	ns
Médias ( 5 a 9) =	14,77	3,8036	ns
Médias ( 5 a 10) =	3,69	0,9503	ns
Médias ( 5 a 11) =	33,88	8,7248	< 0.01
Médias ( 5 a 12) =	3,1	0,7983	ns
Médias ( 5 a 13) =	8,02	2,0653	ns
Médias ( 6 a 7) =	16,17	4,1641	ns
Médias ( 6 a 8) =	16,97	4,3701	ns
Médias ( 6 a 9) =	1,89	0,4867	ns
Médias ( 6 a 10) =	16,57	4,2671	ns
Médias ( 6 a 11) =	21	5,408	< 0.05
Médias ( 6 a 12) =	9,78	2,5186	ns
Médias ( 6 a 13) =	4,86	1,2516	ns
Médias ( 7 a 8) =	0,8	0,206	ns
Médias ( 7 a 9) =	18,06	4,6508	ns
Médias ( 7 a 10) =	0,4	0,103	ns
Médias ( 7 a 11) =	37,17	9,5721	< 0.01
Médias ( 7 a 12) =	6,39	1,6456	ns
Médias ( 7 a 13) =	11,31	2,9126	ns
Médias ( 8 a 9) =	18,86	4,8569	< 0.05
Médias ( 8 a 10) =	0,4	0,103	ns
Médias ( 8 a 11) =	37,97	9,7781	< 0.01
Médias ( 8 a 12) =	7,19	1,8516	ns
Médias ( 8 a 13) =	12,11	3,1186	ns
Médias ( 9 a 10) =	18,46	4,7539	ns
Médias ( 9 a 11) =	19,11	4,9212	< 0.05
Médias ( 9 a 12) =	11,67	3,0053	ns
Médias ( 9 a 13) =	6,75	1,7383	ns
Médias ( 10 a 11) =	37,57	9,6751	< 0.01
Médias ( 10 a 12) =	6,79	1,7486	ns
Médias ( 10 a 13) =	11,71	3,0156	ns
Médias ( 11 a 12) =	30,78	7,9265	< 0.01
Médias ( 11 a 13) =	25,86	6,6595	< 0.01
Médias ( 12 a 13) =	4,92	1,267	ns

## Anexo II

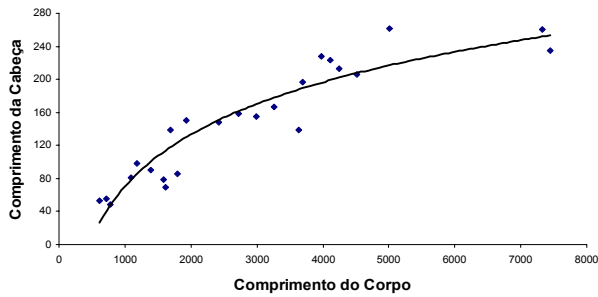
Gráficos da curva de crescimento larval de *Chironomus calligraphus*  
(comprimento do corpo e da cápsula cefálica expressos em  $\mu\text{m}$ )



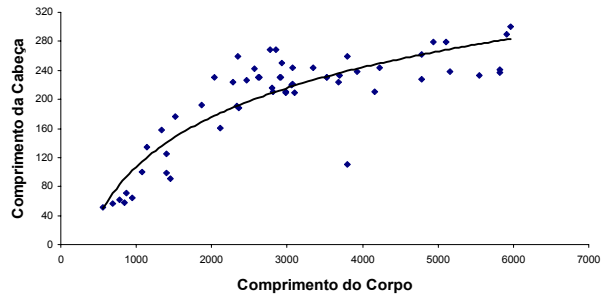
Massa ovígera 1



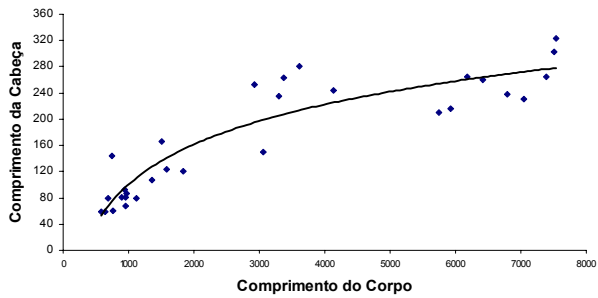
Massa ovígera 2



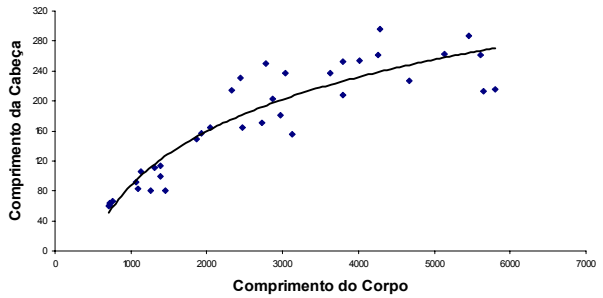
Massa ovígera 3



Massa ovígera 5

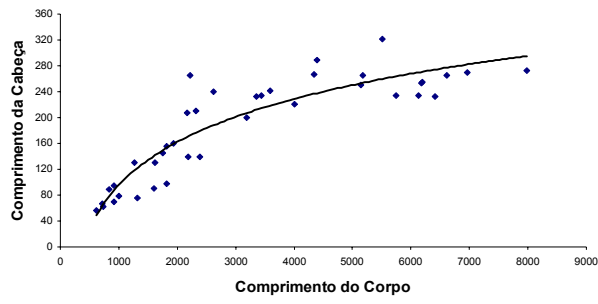


Massa ovígera 6

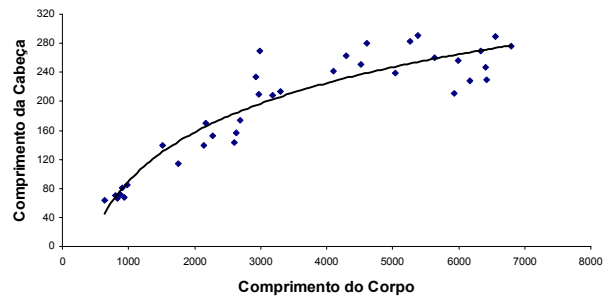


Massa ovígera 7

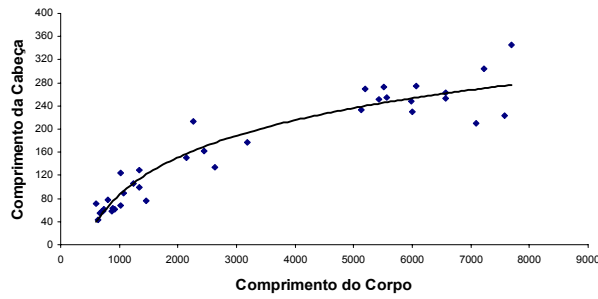




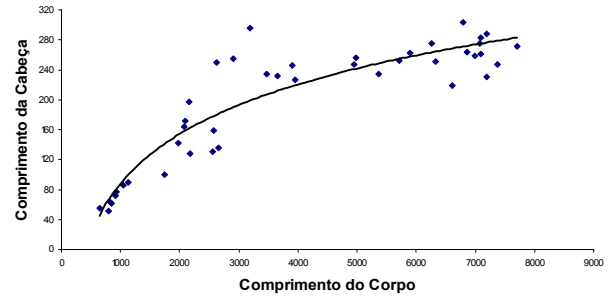
Massa ovígera 8



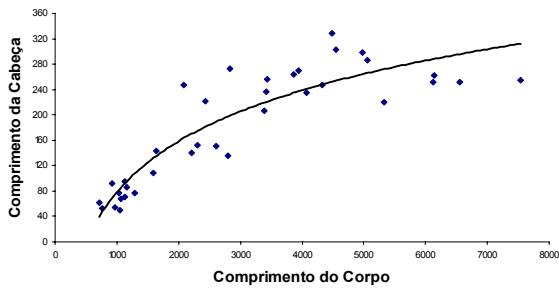
Massa ovígera 9



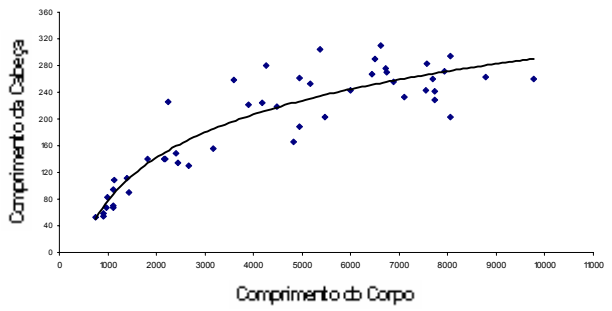
Massa ovígera 10



Massa ovígera 11



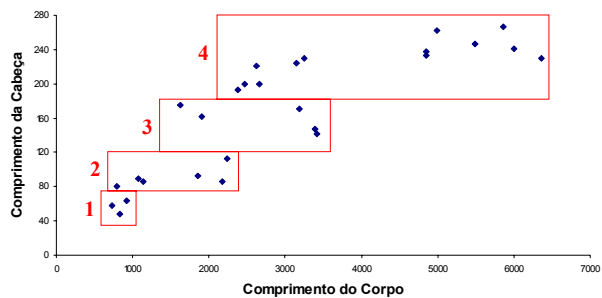
Massa ovígera 12



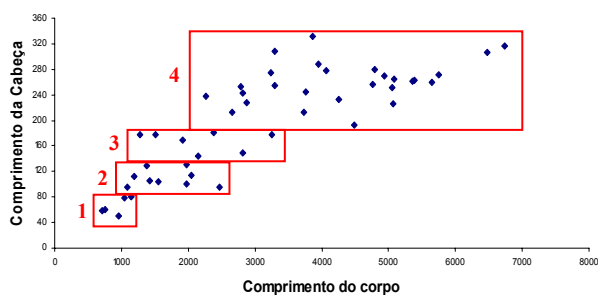
Massa ovígera 13

### Anexo III

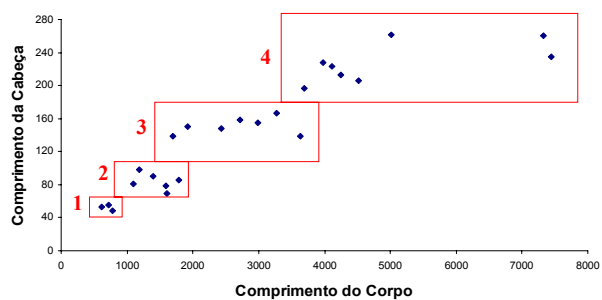
Gráficos de diferenciação dos instares larvais de *Chironomus calligraphus*  
(comprimento do corpo e da cápsula cefálica expressos em  $\mu\text{m}$ )



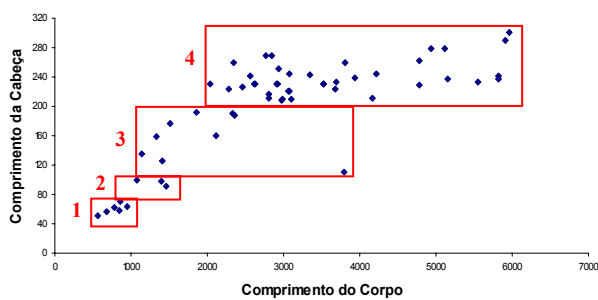
Massa ovígera 1



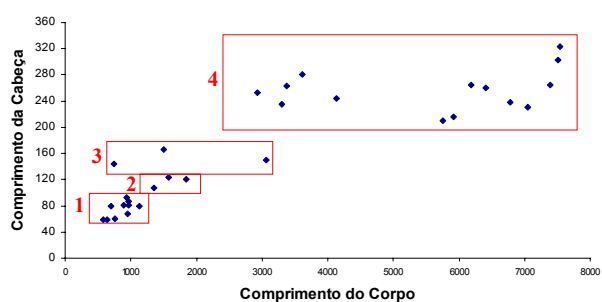
Massa ovígera 2



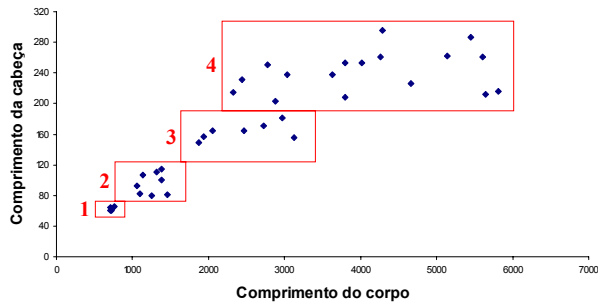
Massa ovígera 3



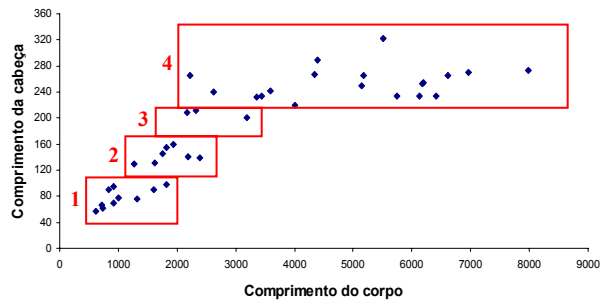
Massa ovígera 5



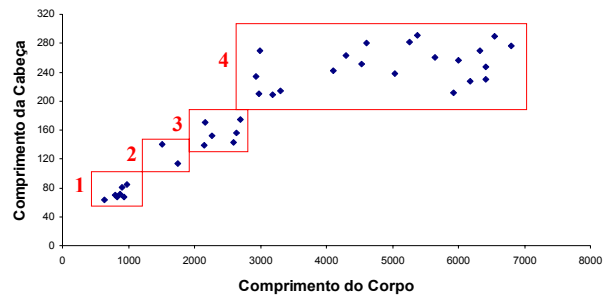
Massa ovígera 6



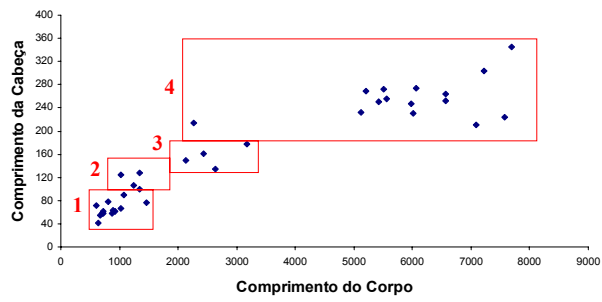
Massa ovígera 7



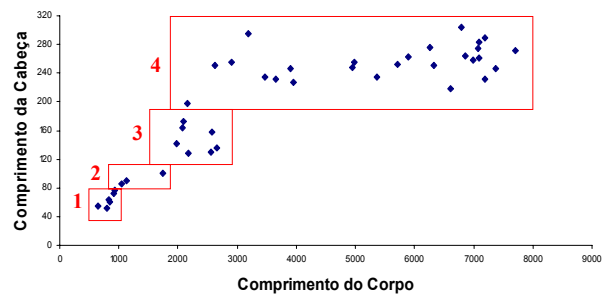
Massa ovígera 8



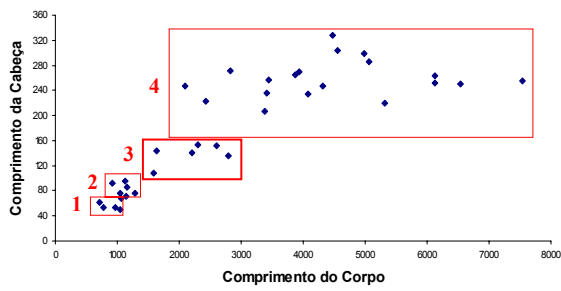
Massa ovígera 9



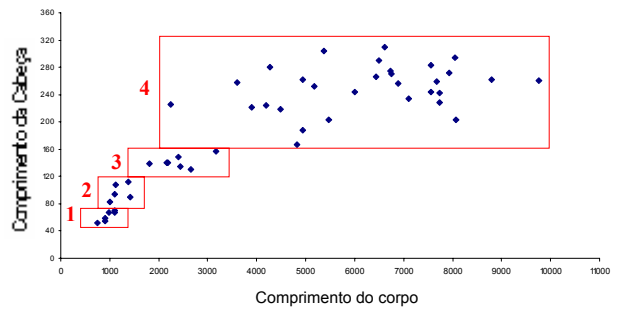
Massa ovígera 10



Massa ovígera 11



Massa ovígera 12



Massa ovígera 13

## Anexo IV

Medidas de comprimento do corpo e medidas ventrais da cápsula cefálica (em  $\mu\text{m}$ ),  
valores mínimo e máximo, média e desvio padrão para larvas de *Chironomus*  
*calligraphus*, em laboratório.

<i>Postura</i>	<i>Instar</i>	<i>Comp. do corpo</i>	<i>Média e Desv. Padrão</i>	<i>Comp. cápsula cefálica</i>	<i>Média e Desv. Padrão</i>
	1	732,5 - 926,1	828,6 $\pm$ 96,8	48,1 - 63,3	56,5 $\pm$ 7,7
	2	799,6 - 2245,5	1547,6 $\pm$ 620,7	80,6 - 113,1	91,1 $\pm$ 11,4
1	3	1622,7 - 3419,9	2704,2 $\pm$ 870,2	141,4 - 174,9	159,1 $\pm$ 14,3
	4	2383,5 - 6354,1	4224,4 $\pm$ 1497,8	193,1 - 266,3	229,6 $\pm$ 22,4
	1	715,2 - 1151,2	926,8 $\pm$ 185,5	58,4 - 80	65,5 $\pm$ 13,2
	2	1088,9 - 2465,6	1647,9 $\pm$ 493,8	94,9 - 130,4	102,1 $\pm$ 7,3
2	3	1281,4 - 4493,4	2452 $\pm$ 1050,7	144,2 - 192,4	169,2 $\pm$ 19,9
	4	2263,8 - 6743,1	4223,7 $\pm$ 1262,5	212,1 - 331,2	258,1 $\pm$ 37,5
	1	617,1 - 776,9	703,8 $\pm$ 80,7	48,7 - 56	52,8 $\pm$ 3,7
	2	1090,8 - 1788,4	1440,8 $\pm$ 269,9	70 - 98,5	83,7 $\pm$ 9,9
3	3	1689,8 - 3626,6	2664,2 $\pm$ 700,7	139,3 - 166,4	150,8 $\pm$ 10
	4	3693,3 - 7443,7	5040,7 $\pm$ 1496,8	196,5 - 261,7	227,7 $\pm$ 19,5
	1	560,3 - 952,7	780,2 $\pm$ 140,3	50,7 - 70,7	60,2 $\pm$ 6,8
	2	1075 - 1456,1	1309,5 $\pm$ 204,5	90,6 - 100	96,3 $\pm$ 5
5	3	1134,8 - 3800	1984,1 $\pm$ 813	110,5 - 192,4	159,5 $\pm$ 30,2
	4	2040,6 - 5963,3	3665 $\pm$ 1151,6	210,2 - 300,8	239,3 $\pm$ 22,7
	1	583,8 - 1126,8	852 $\pm$ 173,7	58,3 - 92,2	74,3 $\pm$ 12,1
	2	1356,8 - 1840,7	1591,6 $\pm$ 242,2	107,7 - 123,7	117,2 $\pm$ 8,4
6	3	746,7 - 3056	1770,5 $\pm$ 1176,6	144,2 - 165,5	153,2 $\pm$ 11
	4	2925,2 - 7543	5564,4 $\pm$ 1724,9	210,2 - 322,8	255,9 $\pm$ 31,2
	1	724,9 - 759,3	727,6 $\pm$ 21,9	60,8 - 64	62,7 $\pm$ 2,7
	2	1062,9 - 1458,4	1262,4 $\pm$ 148,4	80 - 114	95,7 $\pm$ 13,8
7	3	1869,4 - 3120,8	2448,1 $\pm$ 510,2	148,7 - 181,1	163 $\pm$ 10,8
	4	2323,3 - 5807,1	4092,2 $\pm$ 1159,6	202,5 - 296,1	241,7 $\pm$ 21,1
	1	621 - 1812	1049 $\pm$ 399,9	56,7 - 98,5	78,3 $\pm$ 14,4
	2	1275 - 2385,9	1856,3 $\pm$ 366	130 - 160	142,9 $\pm$ 11,5
8	3	2168,2 - 3182,9	2559,5 $\pm$ 545,7	200 - 211	206,3 $\pm$ 5,7
	4	2213,1 - 7981,2	5054,1 $\pm$ 1573	220 - 321,4	254,9 $\pm$ 24,1
	1	635,4 - 980	852 $\pm$ 113,1	63,2 - 84,4	72,1 $\pm$ 7,6
	2	1518,3 - 2146,9	1805,7 $\pm$ 317,7	114 - 140	130,9 $\pm$ 14,7
9	3	2169,7 - 2691,3	2473,1 $\pm$ 235,3	143,2 - 174,6	159,3 $\pm$ 12,8
	4	2927,5 - 6796,2	4993 $\pm$ 1333,2	208,8 - 291,2	250,1 $\pm$ 26,9
	1	608,5 - 1461,6	855,4 $\pm$ 233,7	42,2 - 90	64,5 $\pm$ 12
10	2	1021,1 - 1340,7	1237,7 $\pm$ 152,6	99 - 128,1	114,2 $\pm$ 13,8

<b>10</b>	<b>3</b>	2140 - 3177	2598 ± 436,3	134,2 - 177,2	155,7 ± 18,1
	<b>4</b>	2258,4 - 7694,1	5990,4 ± 1331,6	210,2 - 344,8	256,2 ± 36,4
	<b>1</b>	641 - 924,8	826,4 ± 104,5	55 - 76,2	63 ± 9,7
	<b>2</b>	1053 - 1739,6	1307,4 ± 376,2	85,4 - 100	91,8 ± 7,4
<b>11</b>	<b>3</b>	1979,2 - 2662,5	2303 ± 285,9	128,1 - 172	147,1 ± 17,4
	<b>4</b>	2159,6 - 7701,7	5512,1 ± 1727,9	197 - 303,6	254,4 ± 24,3
	<b>1</b>	713,3 - 1050	874 ± 159,1	50 - 61,5	54,6 ± 4,8
	<b>2</b>	920,6 - 1287,2	1106,5 ± 113,6	67,1 - 94,9	80,3 ± 10,6
<b>12</b>	<b>3</b>	1584,8 - 2792,4	2188,1 ± 493,6	107,7 - 152,6	138,5 ± 16,3
	<b>4</b>	2087,9 - 7545,1	4449,9 ± 1439,8	206,2 - 328	258,4 ± 30,2
	<b>1</b>	741,1 - 1100,3	957,2 ± 135,6	52,3 - 70,7	61,7 ± 7,5
	<b>2</b>	994,2 - 1423,7	1206,5 ± 188,3	82,5 - 111,8	97,2 ± 12,4
<b>13</b>	<b>3</b>	1818,7 - 3177,7	2406,4 ± 432,3	130,4 - 156,2	141,4 ± 8,6
	<b>4</b>	2237 - 9767,5	6241,9 ± 1741,2	166,4 - 310,2	249,8 ± 34,1