



ISSN 1676 - 1340

Junho, 2003

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 39

**Persistência larvicida de
formulações de *Bacillus
thuringiensis* subsp. *israelensis*
para o controle de larvas de
*Aedes aegypti***

Paulo de T. R. Vilarinhos
Daniel Geherin Souza Dias
Rose Gomes Monnerat

Brasília, DF
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem
 Marcos Rodrigues de Faria
 Marta Aguiar Sabo Mendes
 Sueli Correa Marques de Mello
 Vera Tavares Campos Carneiro
Suplentes: Edson Junqueira Leite
 José Roberto de Alencar Moreira
Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual
Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva
Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Vilarinhos, Paulo de T. R.

Persistência larvícida de formulações de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti* / Paulo de T. R. Vilarinhos, Daniel Geherin Souza Dias, Rose Gomes Monnerat - Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

18 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; n. 39)

1. *Bacillus thuringiensis* - Controle biológico - *Aedes aegypti*
2. *Bacillus thuringiensis* - Larvícida. I. Dias, Daniel Geherin II. Monnerat, Rose Gomes. III. Título. IV. Série.

632.96 CDD - Ed. 21

© Embrapa 2003

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	9
Resultados	13
Discussão	16
Conclusão	17
Referências Bibliográficas	17

Persistência larvicida de formulações de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti*

*Paulo de T. R. Vilarinhos*¹

*Daniel Geherin Souza Dias*²

*Rose Gomes Monnerat*³

Resumo

Dentre as atividades desenvolvidas em programas para o controle de dengue, há situações em que é necessário o uso de larvicidas nos criadouros de mosquitos para reduzir a população de *Aedes aegypti*. Neste sentido, o organofosforado temefós, tem sido amplamente empregado. Entretanto, recentemente, em doze estados brasileiros, foi detectada resistência de populações de mosquitos a este princípio ativo. Assim, produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) foram introduzidos pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) na rotina de tratamentos. Este trabalho teve como objetivo comparar a eficácia de três diferentes formulações comerciais de Bti e uma de temefós em condições de campo simuladas realizadas em caixas d'água com e sem exposição direta a luz solar. Os tratamentos foram realizados em triplicata e o no controle não foi adicionado nenhum produto. Duas vezes por semana as caixas foram povoadas com 20 larvas jovens de terceiro instar de *A. aegypti*. Diariamente as caixas d'água foram inspecionadas e as pupas contadas e removidas. A porcentagem semanal de produção de pupas foi utilizada para avaliar a atividade larvicida e persistência das formulações. Quando esta porcentagem atingia o nível de 10%, o tratamento era finalizado. O produto temefós controlou 100% das larvas nas caixas expostas e não expostas a luz solar durante todo o experimento. O tipo

¹ Médico Veterinário, M.Sc, Diretoria de Vigilância Ambiental, SAIN Estrada Contorno do Bosque lote 04, 70620 Brasília, DF, Brasil. E-mail: vilapaul@zipmail.com.br

² Eng. Agr., B.Sc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: rose@cenargen.embrapa.br

de formulação e exposição a luz solar parece ter influenciado muito a atividade dos larvicidas. Sob exposição direta a luz solar, a formulação CG, utilizada pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) controlou 100% das larvas durante 1 semana. Já as formulações em tabletes e WDG controlaram respectivamente durante 2 e 3 semanas. Nas caixas d'água não expostas diretamente a luz solar, a formulação CG controlou 9 semanas, o tablete 5 e o WDG 11 semanas.

Palavras-chave: bioinseticida, bacilo e mosquito.

Larvicidal persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations to control *Aedes aegypti* larvae

Abstract

After the detection of resistance to the organophosphate temephos in *Aedes aegypti* populations in Brazil, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) formulations as corncob (CG) and water dispersible granules (WDG) were introduced in routine focal treatments. Larvicidal persistence and the influence of exposure to sunlight of VectoBac formulations of Bti and Fersol 1G of temephos sand granule was compared in 250 l fiberglass water reservoirs. Larvae of a susceptible strain of *Aedes aegypti* were added to each box twice a week, to look for pupal production. The temephos formulation maintained 100% control throughout the 12 week period in all situations. Under sunlight exposure, VectoBac CG control dropped below the 90% level in the second week after treatment at both doses (1 and 2 g/l). VectoBac T at 1 tablet/50 l, provided two weeks of 100% control, instead of the one week reached with 1 tablet/100 l. VectoBac WDG at both doses (1 and 2 g/500 l) provided 100% control for three weeks. Without sunlight exposure (covered boxes), VectoBac CG provided 9 weeks of continuous 100% control at the higher dose, whereas the lower dose provided 5 weeks of continuous 100% control. The VectoBac T provided initially two weeks of 100% control, after this period, control level fluctuated between 96-100%. VectoBac WDG provided continuous control of 100% during seven weeks for the lower dose and six weeks for the higher dose. In both doses of WDG 100% control was achieved in 11 weeks out of the 12 week period.

Key-words: biological control, mosquito, entomopathogenic bacteria

Introdução

Entre as atividades dos programas de controle de dengue, a redução dos criadouros de larvas é a chave para manter baixas densidades da população de *Aedes aegypti*, e assim reduzir o risco das epidemias de dengue. Larvicidas são importantes nesse contexto, para tratar os focos do mosquito, quando sua eliminação física imediata não é viável, como por exemplo, em alguns reservatórios de água (PAHO, 1994).

O organofosforado temefós com baixa toxicidade e boa persistência na formulação de grânulos de areia, tem sido amplamente utilizado nos programas de controle de dengue (Rozendaal, 1997). Entretanto, tem sido detectada resistência ao temefós em populações de *Aedes aegypti* (Rawlings & Wan, 1995; Macoris et al., 1999), levando à implementação de outras alternativas de larvicidas, para evitar falhas no campo. Este é o caso do Brasil, onde após a detecção de resistência ao temefós em populações de *Aedes aegypti* de 12 Estados, formulações de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), em grânulos de sabugo de milho (CG) e grânulos dispersíveis em água (WDG) foram introduzidas na rotina do tratamento focal (Vilarinhos, 2002). Para essa finalidade, a Fundação Nacional de Saúde tem importado centenas de toneladas de produtos comerciais de Bti, na ausência de produção comercial no Brasil (Vilarinhos, 2002).

O objetivo deste trabalho foi comparar o desempenho de três formulações de Bti e uma de temefós em reservatórios de água, para investigar a persistência larvícida e a influência da exposição à luz solar.

Material e Métodos

Caixas d'água de fibra de vidro com capacidade para 250 litros de água foram dispostas em uma área aberta, em dois grupos (Fig. 1); 1) com tampas cobrindo apenas 50% da caixa, permitindo a penetração direta da luz solar através da coluna de água (Fig. 2); 2) com as tampas fechadas, bloqueando a penetração da luz solar na coluna de água dentro da caixa.



Fig. 1. Vista das caixas d'água de 250 litros



Fig. 2. Detalhe das caixas d'água cobertas parcialmente

Após o enchimento das caixas com água de torneira, os tratamentos foram feitos em três repetições, com três caixas não tratadas mantidas como testemunhas cobertas e descobertas. As formulações, produtos e doses utilizados nos experimentos são apresentados na Tabela 1. As doses menores de Bti CG e WDG são as mesmas usadas no programa nacional de controle da dengue, assim como é a dose de temefós (1 ppm).

Tabela 1. Produtos de *Bacillus thuringiensis israelensis* e temefós, testados para persistência larvica na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Produto (potencia)	Formulação	Dose (UTI/l)
VectoBac® T(2,200 UTI/mg)	Tablete *	T1 = 1T/100 l (7,700) T2 = 1T/50 l (15,400)
VectoBac® WDG(3,000 UTI/mg)	Grânulos dispersíveis em água	WDG1 ** = 1g/500l(6,000) WDG2 = 2g/500l (12,000)
VectoBac® CG(200 UTI/mg)	Grânulos de sabugo de milho	CG1 ** = 1g/50 l (4,000) CG2 = 2g/50 l (8,000)
Fersol 1G	Grânulos de areia	1g/10 l **

®: VectoBac é a marca registrada pela Valent Biosciences Corporation (VBC).

UTI = Unidades Tóxicas Internacionais para *Aedes aegypti*.

* O tablete (VectoBac T) ainda não está disponível comercialmente pela VBC.

** Dose recomendada pela FUNASA.

A temperatura da água nas caixas foi registrada por um sensor digital de 64 bits, programado para fazer leituras a cada quatro horas.

Duas vezes por semana, nas segundas e quintas feiras, 20 larvas jovens de terceiro estágio foram adicionadas a cada caixa (Fig. 3). As larvas de *A. aegypti* foram obtidas de colônia de laboratório (Fig. 4), de uma cepa suscetível de *A. aegypti*, originada do laboratório da USDA de Gainesville, Flórida.



Fig. 3. Larvas de *Aedes aegypti* sendo adicionadas às caixas d'água



Fig. 4. Sala de criação de mosquitos

As caixas foram verificadas diariamente para a produção de pupas. As pupas dos controles e tratamentos eram removidas das caixas, contadas e registradas (Fig. 5). A porcentagem de produção de pupas por semana, nas caixas testemunha e tratadas foi usada para avaliar a atividade larvicida e a persistência das formulações.



Fig. 5. Contagem de pupas para avaliação do experimento

Resultados

A produção de pupas de *Aedes aegypti* é apresentada na Fig. 6. A porcentagem de larvas que atingiram o estágio pupal nas caixas controle a cada semana variou entre 7 a 50% nas caixas descobertas, e 9 a 60% nas caixas cobertas.

A temperatura da água variou entre 18,5-31,0°C nas caixas descobertas (média 23,4°C) e 19-31°C nas caixas cobertas (média 22,5).

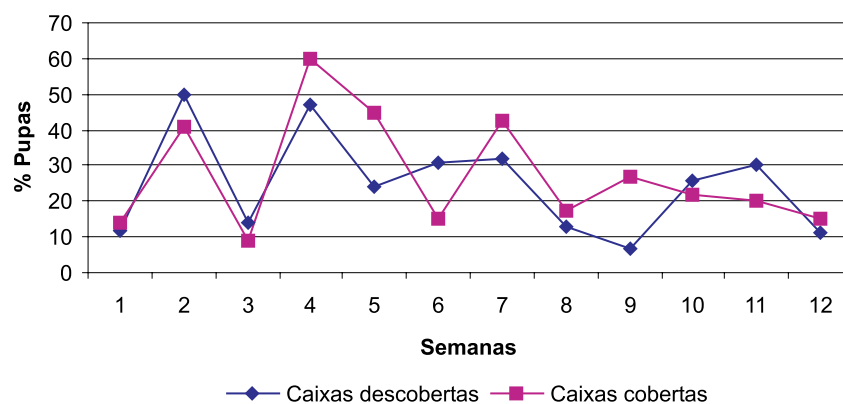


Fig. 6. Produção de pupas nas caixas testemunha.

A persistência larvídica das formulações expressa em termos de produção de pupas de *Aedes aegypti* é apresentada nas Figs. 7 a 10.

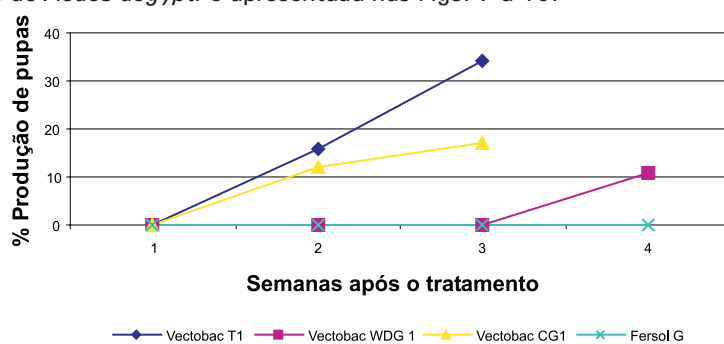


Fig. 7. Atividade larvídica das formulações em caixas d'água expostas à luz solar direta (sem tampa).

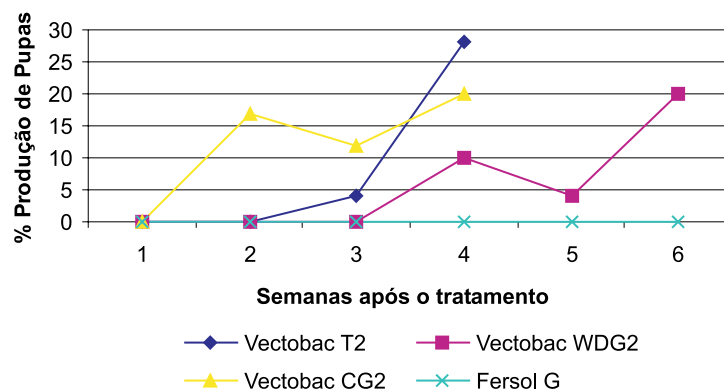


Fig. 8. Atividade larvídica das formulações em caixas d'água expostas à luz solar direta (sem tampa).

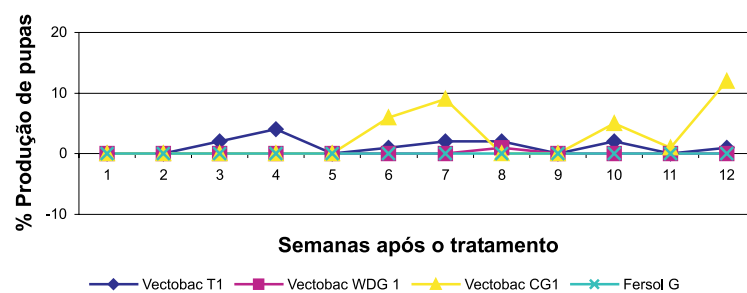


Fig. 9. Atividade larvídica das formulações em caixas d'água não expostas à luz solar direta (com tampa).

Persistência larvicida de formulações de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti*

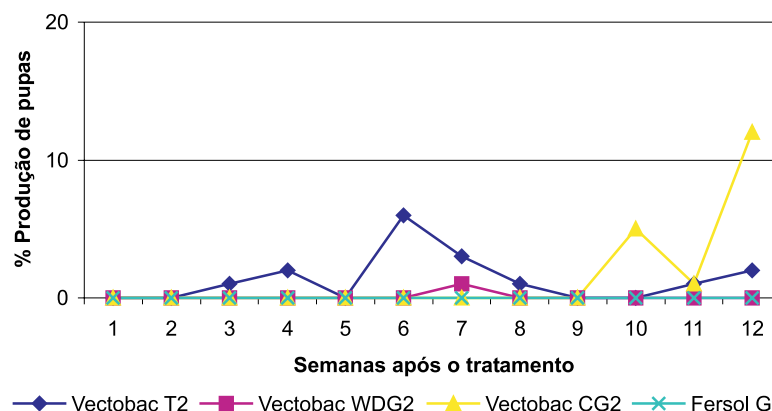


Fig. 10. Atividade larvicida das formulações em caixas d'água não expostas à luz solar direta (com tampa).

A formulação de temefós em grânulos de areia (Fersol 1G) manteve 100% de controle durante todo o período de 12 semanas em ambas as situações de exposição ao sol (dado não apresentado).

Sob exposição solar, o controle com VectoBac CG caiu abaixo de 90% na segunda semana após o tratamento em ambas as doses (Figs. 7 e 8). VectoBac T na dose mais alta, manteve duas semanas de 100% de controle, enquanto que a dose menor alcançou uma semana de 100% de controle (Figs. 7 e 8). VectoBac WDG manteve 100% de controle por três semanas em ambas as doses (Figs. 7 e 8).

Sem exposição solar (caixas cobertas), o VectoBac CG manteve 9 semanas seguidas de 100% de controle na dose mais alta, enquanto que a dose mais baixa manteve 5 semanas seguidas com 100% de controle. Após a décima semana o resultado foi igual nas duas doses (Figs. 9 e 10). O VectoBac T manteve inicialmente duas semanas com 100% de controle, após esse período, o nível de controle flutuou entre 96 a 100%, e ambas as doses alcançaram 100% em 5 das doze semanas do período experimental (Figs. 9 e 10). VectoBac WDG manteve controle de 100% por 7 semanas seguidas na dose mais baixa e 6 semanas na dose mais alta. Em ambas as doses do WDG, 100% de controle foi obtido em 11 das 12 semanas do período experimental.

Discussão

De acordo com os resultados apresentados, entre as formulações testadas, VectoBac CG parece ser a mais afetada pela luz solar, dado que nessa condição, foi obtida apenas uma semana de controle mesmo na dose mais alta, a despeito da concentração mais alta de princípio ativo desta dose, que foi mais alta que a dose mais baixa de Bti WDG (8000 e 6000 UTIs respectivamente). A eficácia do VectoBac T foi maior na dose mais alta, mas mesmo assim, o controle foi inferior ao observado com a dose mais baixa de WDG, com menos da metade do conteúdo de ingrediente ativo (15.400 e 6.000 UTIs respectivamente). Os dados sugerem que outros fatores, além da quantidade de princípio ativo e potência, desempenham papel importante na persistência das formulações de Bti.

A mais longa persistência larvicida foi obtida com VectoBac WDG, que em ambas as doses manteve 100% de controle por três semanas, ou mais de 90% por 5 semanas na dose mais alta. Os resultados observados por Melo-Santos et al. (2001), com uma formulação experimental em tablete, produzida por Far-Manguinhos (CP41), em caixas expostas e não expostas à luz solar, são similares aos aqui apresentados. Em caixas expostas ao sol Melo-Santos et al. (2001) obtiveram 5 semanas de 90% de controle, igual à observação para a formulação WDG na dose mais alta, para o mesmo nível de controle. A persistência do tablete de Vectobac T sob luz solar foi inferior em três semanas à observada para o tablete CP41. Entretanto, a potência do CP41 e o dado para a duração do controle no nível de 100% no trabalho de Melo-Santos et al. (2001) não foi informado. Nas caixas cobertas, a persistência de todas as formulações de Bti foi equivalente no presente trabalho, e foi mais longa da observada com CP41, porque mais de 90% de controle foi obtido durante 11 semanas (Figs. 9 e 10). Entretanto, os resultados com WDG foram melhores, uma vez que os tratamentos mantiveram 100% de controle por 11 semanas, enquanto que o resultado que mais se aproximou deste foi obtido com a dose mais alta de CG, que resultou em 9 semanas com 100% de controle.

A suscetibilidade do Bti à luz solar é bem documentada (Ignoffo et al., 1981; Liu et al., 1993; Myasnik et al., 2001). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com as observações dos autores citados, uma vez que houve uma diferença notável na persistência sob exposição solar em geral, quando comparada com os tratamentos das caixas cobertas. Os dados de temperatura não sugerem que haja influência deste parâmetro, considerando que as

temperaturas foram muito próximas nas duas situações (caixas d'água cobertas ou expostas).

Conclusão

A formulação de temefós em grãos de areia (Fersol 1G), na dose de 1 g/10 l (1 ppm) proporcionou 100% de controle das larvas de *Aedes aegypti* nos reservatórios de água, com ou sem exposição solar.

A exposição à luz solar afetou significativamente a persistência dos bioinseticidas. A dose de campo de VectoBac CG atualmente recomendada pela FUNASA proporcionou 100% de controle das larvas de *Aedes aegypti* nas caixas de água expostas diretamente à luz solar durante uma semana; dobrar a dose (2 g/50 l) não aumentou a persistência larvicida, sob exposição solar.

VectoBac CG na dose de 2 g/50 l proporcionou nove semanas seguidas de controle de 100% das larvas de *Aedes aegypti*, nos reservatórios onde a água não esteve exposta à luz solar direta, período que superou em quatro semanas o obtido com a dose recomendada pela FUNASA.

VectoBac T na dose de 1 tablete/50 l proporcionou duas semanas seguidas de controle de 100% das larvas de *Aedes aegypti*, mesmo nas caixas onde a água esteve exposta à luz solar direta.

VectoBac WDG proporcionou três semanas seguidas de controle de 100% das larvas de *Aedes aegypti*, com a dose de 1 g/500 l nas caixas onde a água esteve exposta à luz solar direta; esta dose manteve o nível de controle bem próximo dos 100% durante doze semanas, nas caixas onde a água não esteve exposta diretamente à luz solar.

Referências Bibliográficas

IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C.; KROHA, M. J.; COUCH, T. L. High temperature sensitivity of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Environmental Entomology**, College Park, MD, v. 2, p. 409-411, 1981

LIU, Y. T.; SUI, M. J.; JI, D. D.; WU, I. H.; CHOU, C. C.; CHEN, C. C. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of

Bacillus thuringiensis var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, NY, v. 62, n. 2, p. 131-136. 1993.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTTO, V. C.; CIRINO, V. C. B. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MELO-SANTOS, M. A. V; SANCHES, E. G; JESUS, F. J; REGIS, L. Evaluation of a New Tablet Formulation Based on *Bacillus thuringiensis* sorov. *israelensis* for Larvicidal Control of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 859-860, 2001.

MYASNIK, R. M.; MANASHEROB, R.; BEM-DOV, E.; ZARITSKY, A.; MARGALITH, Y.; BARAK, Z. Comparative Sensitivity to UV-B Radiation of two *Bacillus thuringiensis* Subspecies and Other *Bacillus* sp. **Current Microbiology**, New York, NY, v. 43, p. 140-143, 2001.

PAHO. **Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control**. Washington, 1994. p. 33-38. (Scientific Publication, v. 548).

RAWLINS, S C; WAN, J O. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Aliso Viejo, CA, v. 11, n. 1, p. 59-65, 1995.

ROZENDAAL, J. A. **Vector control**: methods for use by individuals and communities. Geneva: World Healthy Organization, 1997.

VILARINHOS, P. T. R. Dengue transmission and *Aedes aegypti* control in Brazil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8.; INTERNATIONAL CONFERENCE ON BACILLUS THURINGIENSIS 6.; ANNUAL MEETING OF THE SIP, 35., 2002, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: UEL: SIP, 2002. p. 55-57.