

CONTROLE DE *Aedes aegypti* (LINNEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE) E *Anopheles* MEIGEN 1818 (DIPTERA: CULICIDAE) EM LABORATÓRIO UTILIZANDO *Bacillus thuringiensis israelensis*, PYRIPROXYFEN E *Saccharopolyspora spinosa*

Isabela Guimarães FERREIRA¹

João Antonio Cyrino ZEQUI²

Wanderli Pedro TADEI

Érika de Oliveira GOMES

¹Bolsista IC INPA

²Orientador CBIO/INPA

INTRODUÇÃO

No estado do Amazonas as características climáticas em conjunto com a ação antrópica geram condições ideais para a proliferação de *Aedes aegypti* e *Anopheles* durante o ano, o que expõe a população ao risco de contrair essas doenças. As Américas concentraram cerca de 1,1 milhão de casos de malária em 2010, com a maior parte dos casos registrados na Bacia Amazônica (Ministério da Saúde 2013). Além da malária endêmica na região há também o aumento de *Aedes aegypti* que é vetor do dengue e da febre amarela, arboviroses mais importantes do mundo, pois a cada ano há o aumento de trinta vezes no número de casos registrados. Em Manaus, o último levantamento rápido do índice de infestação para *Aedes aegypti* LIRAA realizado em fevereiro apresentou índice médio de 3,9%, próximo da condição de alto risco preconizada pelo Ministério da Saúde (SEMSA 2014). A região Amazônica além de ter condições climáticas com chuvas abundantes e altas temperaturas que favorecem a proliferação desses mosquitos possui um ambiente com diversidade de criadouros naturais e artificiais. A seleção de insetos resistentes a inseticidas afeta diretamente a reemergência de doenças, cujos patógenos são veiculados por vetores, principalmente aquelas em que não é possível a cobertura vacinal que garantiria a proteção da população humana. *Aedes aegypti* (L), com ocorrência nas áreas tropicais e subtropicais, na maioria das vezes está associado ao domicílio humano e suas proximidades, embora possa ser encontrado em ambientes distantes dos aglomerados urbanos. O controle químico tem sido ineficiente em conter esse mosquito. (Forattini 2002) o qual encontra facilidade em se adaptar a novos ambientes criados pela urbanização, dificultando o seu combate. Desse modo são necessários estudos e desenvolvimento de pesquisas que propiciem novos métodos de controle desse vetor. Podem ser mencionados como métodos de controle biológicos alternativos aqueles produtos onde o ingrediente ativo são microrganismos, os quais são aplicados de maneira semelhante a um inseticida. (Melo e Azevedo 1998). A pesquisa objetiva o controle dos vetores *Aedes aegypti* e *Anopheles albitalis* – este último um mosquito vetor secundário da malária infecciosa no Brasil - utilizando-se de *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Saccharopolyspora spinosa*, que são dois formulados bacterianos e o regulador de crescimento Pyriproxyfen, os quais são métodos de controle biológicos alternativos em comparação aos inseticidas químicos que causam a seleção de mosquitos resistentes. Além da obtenção das concentrações letais de cada produto (CL₅₀ e CL₉₀).

MATERIAL E MÉTODOS

Para os testes foi feita a manutenção do insetário de *Anopheles albitalis* já estabilizado dentro do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e a manutenção do insetário de *Aedes aegypti*. Para a realização do experimento (bioensaio) foi feita a pesagem dos produtos e diluições seguindo as metodologias de Lacey (1997) e WHO (1999) com modificações, sendo as mesmas concentrações para *Anopheles* e *Aedes*

aegypti. Os bioensaios para cada produto seguiram protocolo pertinente com utilização de larvas de 3° e 4° instar inicial. Repasto sanguíneo de mosquitos foi realizado por meio de autorização CEUA n°. 04/2013.

Protocolo para diluição do produto VectoBac® WG – lote 237-445-PG – validade janeiro de 2016

Foram pesados 50mg (0,05g) do produto, diluídos em 10 mL de água destilada, e colocados na ultrassônica por cerca de 20 minutos para a obtenção da solução 1 de 5000mg/L. Dessa concentração, foi retirado com a micropipeta 100µL (0,1mL) e acrescentado em 9,9mL de água destilada, adquirindo a solução 2 de 500mg/L e levado à ultrassônica por 10 minutos. Da solução obtida, retirou-se com a micropipeta, 1000µL (1mL) e acrescentado em 9 mL de água destilada, obtendo-se a concentração 3 de 50mg/L e levado à ultrassônica por 5 minutos. A partir dela são pipetados 800µL; 400µL; 200µL; 160µL e 100µL para obter as seguintes concentrações: 0,04mg/L; 0,02mg/L; 0,01mg/L; 0,008mg/L e 0,005mg/L em cinco copos contendo larvas de 3° ou 4° instar inicial, deixando o 6° copo para as testemunhas, onde realizam-se duas ou três repetições para obter a mortalidade de larvas em 24 e 48 horas.

Protocolo para diluição do produto Natular™ DT (Lote: 1309190010. Data de fabricação: 24/10/2013 Válido por 2 anos)

Foram pesados 50mg (0,05g) do produto, diluídos em 10 mL de água destilada, e colocados na ultrassônica por cerca de 20 minutos para a obtenção da solução 1 de 5000mg/L. Dessa concentração, foi retirado com a micropipeta 1000µL (1mL) e acrescentado em 9 mL de água destilada, obtendo-se a concentração 2 de 500mg/L e levado à ultrassônica por 10 minutos. A partir dela são pipetados 1000µL; 800µL; 600µL; 400µL; 200µL e 100µL para obter as seguintes concentrações: 5mg/L; 4mg/L; 3mg/L; 2mg/L; 1mg/L e 0,5mg/L em seis copos contendo larvas de 3° ou 4° instar inicial, deixando o 7° copo como testemunha, onde realizam-se duas ou três repetições para obter a mortalidade de larvas em 24 e 48 horas.

Protocolo para diluição do produto Sumilar V – lote 4303F4

Foram pesados 50mg (0,05g) do produto, diluídos em 10mL de água destilada, e colocados na ultrassônica por cerca de 20 minutos para a obtenção da solução 1 de 5000mg/L. Dessa concentração, foi retirado com a micropipeta 1000µL (1mL) e acrescentado em 9 mL de água destilada, obtendo-se a concentração 2 de 500mg/L e levado à ultrassônica por 10 minutos. A partir dela são pipetados 1000µL; 600µL; 400µL; 200µL; e 100µL para obter as seguintes concentrações: 1mg/L; 2mg/L; 3mg/L; 5mg/L; e 0,5mg/L em cinco copos contendo larvas de 3° ou 4° instar inicial, deixando o 6° copo para as testemunhas, onde realizam-se duas ou três repetições para obter a mortalidade de larvas em 24 e 48 horas. As avaliações dos bioensaios ocorreram de forma acumulativa durante 24 e 48 horas após a inoculação dos larvicidas. As pupas foram descontadas da estatística e a viabilidade dos formulados foi discutida de modo a garantir o uso da menor concentração de forma eficiente contra larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles albitarsis*. Para análise dos dados foi utilizado o software Probit SPSS® 14.0 (SPSS 2005), para bioensaio de resposta binária seguindo o modelo $\pi = F(\alpha + \beta x_i)$, no qual π significa a probabilidade da resposta; $x_i = \log$ dose; α e β = parâmetros e; F = função de distribuição acumulada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes com *Anopheles albitarsis* e *Aedes aegypti* utilizando-se o produto VectoBac WG (Bti) foi possível calcular as concentrações letais CL_{50} e CL_{90} na avaliação dos bioensaios em 24 e 48 horas. Para *Saccharopolyspora spinosa* e para o regulador de crescimento não foi possível calcular as concentrações letais somente a porcentagem de mortalidade das larvas em determinada concentração a 24 e 48 horas. A tabela abaixo mostra as concentrações

letais CL_{50} e CL_{90} , sendo a CL_{50} a concentração letal que matou 50% das larvas e a CL_{90} a concentração letal que matou 90% das larvas calculada pelo Probit e a porcentagem de mortalidade para os testes em que não foi possível o cálculo da CL_{50} e CL_{90} por que se buscava encontrar uma taxa de mortalidade mínima que fosse efetiva no controle.

Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) foi eficiente no controle das larvas dos mosquitos de *Aedes aegypti* e *Anopheles albiparvus* como foi citado em pesquisas sobre inseticidas, mecanismos de ação e controle que evidencia que a bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* provou ser tão efetiva que, alguns anos depois de sua descoberta tornou-se um dos principais componentes do Programa de Controle de Oncocercose da África Ocidental e passou a ser usada como uma alternativa para inseticidas químicos sintéticos, em muitos programas de controle de mosquitos WHO (1999) e ainda que os reguladores de crescimento (ou IGR, sigla derivada de *Insect Growth Regulator*), que atuam no desenvolvimento e na reprodução dos insetos, também são considerados inseticidas alternativos como o Pyriproxyfen, usado neste trabalho.

Tabela 1. Concentrações letais CL_{50} e CL_{90} e porcentagem de mortalidade para os três produtos testados em períodos de tempo diferentes.

Produto	<i>Anopheles albiparvus</i>		<i>Aedes aegypti</i>		
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (formulado bacteriano)	CL_{50}	0,12 (0,062 – 0,51)	0,018 (0,013 – 0,032)	0,03 (0,03 – 0,04)	0,014 (0,013 – 0,015)
	CL_{90}	2,84 (0,61 – 97,8)	1,40 (0,30 – 87,3)	0,12 (0,09 – 0,17)	0,039 (0,034 – 0,045)
<i>Saccharopolyspora spinosa</i> (formulado bacteriano)	CL_{50}	Mortalidade de 100% a 4mg/L	Mortalidade de 100% a 4mg/L	1,47 (1,20 – 1,76)	Mortalidade de 81,7% a 1mg/L
	CL_{90}	Mortalidade de 100% a 4mg/L	Mortalidade de 100% a 4mg/L	6,38 (5,9 – 8,46)	Mortalidade de 81,7% a 1mg/L
Pyriproxyfen (regulador de crescimento)	CL_{50}	Mortalidade de 13,3% a 2mg/L	Mortalidade de 32,2% a 2mg/L	Mortalidade de 10% a 5mg/L	Mortalidade de 17,5% a 5mg/L
	CL_{90}	Mortalidade de 13,3% a 2mg/L	Mortalidade de 32,2% a 2mg/L	Mortalidade de 10% a 5mg/L	Mortalidade de 17,5% a 5mg/L

Saccharolipora Spinosa apresentou alta porcentagem de mortalidade para as larvas de *Anopheles albiparvus* e *Aedes aegypti* causando excitação rápida do sistema nervoso do inseto. Devido a este modo de ação único, Spinosad está avaliado em programas de manejo da resistência (Salgado e Sparks 2010).

Em estudos no Sri Lanka, Yapabandara e Curtis (2002) estudaram o controle da malária, onde se buscava encontrar um método eficaz e econômico que controlasse o *anopheles*. Esses autores obtiveram resultados positivos com uso do regulador de crescimento Pyriproxyfen em testes em laboratório com larvas de *Anopheles*, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg/L, houve inibição completa em ambas as concentrações em comparação com as concentrações usadas nesta pesquisa há grande diferença na mortalidade das larvas como pode se observar na (Tabela 1). Não houve diferenças estatísticas entre as espécies testadas com o produto VectoBac, nas diferentes condições (Figura 1).

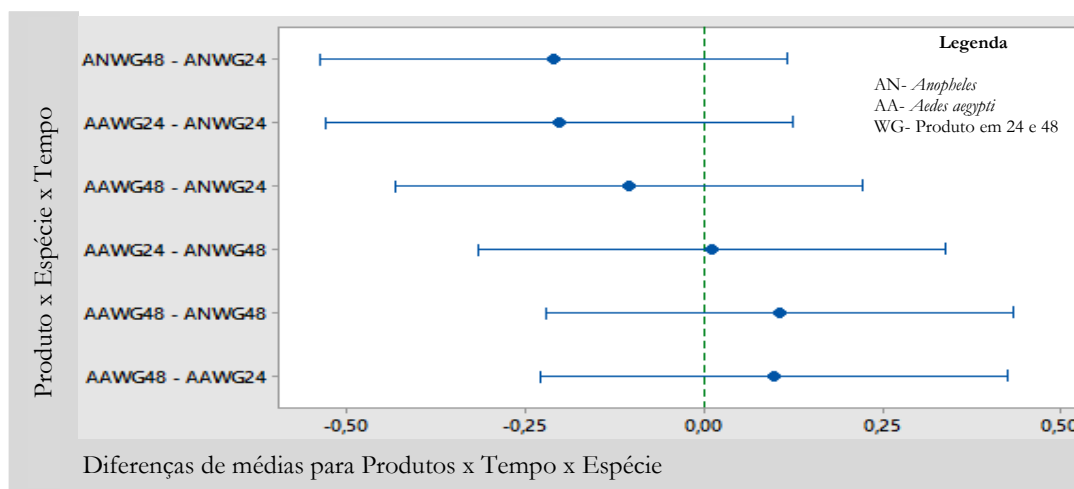


Figura 1. Diferenças de médias das CL₅₀ para *Anopheles albitalis* e *Aedes aegypti* submetidos ao produto *Bacillus thuringiensis israelensis*- Bti-VectoBac® WG; lote: 237-445- PG; em 24 e 48 horas em condições de laboratório pelo teste de Tukey (p<0,05).

CONCLUSÃO

Os produtos testados apresentaram bons resultados, podendo ser alternativos e específicos ao controle desses vetores no ambiente amazônico.

REFERÊNCIAS

- Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia Médica*. São Paulo: EDUSP. 860p.
- WHO. 2013. *World Malaria Report*. World Health Organization. Geneva. 284 p.
- Lacey, L.A. 1997. Laboratory bioassay of bacteria against aquatic insects with emphasis on larvae of mosquitoes and black flies. p. 79-90. In: Lacey, L.A. *Manual of Techniques in Insect Pathology*, London, Academic Press, 409p.
- Ministério da Saúde. 2013. *Boletim epidemiológico da dengue*. (www.saude.gov.br). Acesso em 12/01/2015.
- Melo, I.S.; Azevedo, J.L. 1998. Controle biológico. Jaguariúna, EMBRAPA, 264p.
- Salgado, V.L.; Sparks, T.C. 2010. The spinosyn: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance. In: Gilbert, L.I.; Gill, S.S. (eds). 2010. *Insect control: biological and synthetic agents*. 1 ed. London: Academic Press, p. 207-243.
- SEMSA. 2014. Profissionais de saúde discutem redução de casos de dengue e malária em Manaus. (<http://semsa.manaus.am.gov.br/profissionais-de-saude-discutem-reducao-de-casos-de-dengue-e-malaria-em-manaus/>). Acesso em 16/11/14.
- Yapabandara, A.M.G.M.; Curtis, C.F. 2002. Laboratory and field comparisons of pyriproxyfen, polystyrene beads and other larvicidal methods against malaria vectors in Sri Lanka (http://www.researchgate.net/profile/Manel_Yapabandara/publication/11524779_Laboratory_and_field_comparisons_of_pyriproxyfen_polystyrene_beads_and_other_larvicidal_methods_against_malaria_vectors_in_Sri_Lanka). Acesso em: 04/06/2015.
- WHO. 2014. *WHO campaigns*. World Health Organization. (<http://www.who.int/campaigns/malaria-day/2013/en/index.html>). Acesso em: 18/02/2014.