

Avaliação da Eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no Controle de Formas Imaturas do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em Ambiente de Laboratório

Cleber Barreto Espindola¹, Roberta Novo Guedes² & Roberta Coelho Pereira de Souza²

1. FAETEC/ Instituto Superior de Tecnologia, Paracambi, RJ e-mail: cbespindola@hotmail.com. Autor para correspondência. 2. Universidade Estácio de Sá (UNESA). e-mail: roberngue@yahoo.com.br; robertamv@gmail.com

EntomoBrasilis (1)1: 10-13 (2008)

Resumo. *Aedes aegypti* (L.) é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, está restrito às vilas e cidades, sempre com características domiciliares e peridomiciliares e, raramente é encontrado em ambientes onde a densidade populacional é baixa. Este mosquito é o único vetor do arbovírus da dengue e da febre amarela urbana em todo território nacional, e é considerado um dos vetores mais importantes na veiculação de patógenos a humanos. A grande resistência dos mosquitos a inseticidas químicos e a freqüente preocupação social com a poluição ambiental, resultou na procura de alternativas para o controle desses insetos, tais como a utilização de bactérias entomopatogênicas. Esse trabalho foi realizado objetivando mensurar a eficácia dessa bactéria no controle das formas imaturas de *Ae. aegypti*. Para a realização deste, foram criadas individualmente 350 larvas de geração F2 de *Ae. aegypti* em copos plásticos de 200 ml, contendo 100 ml de água não clorada. Na contaminação foi usado 5mg de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Berliner) para cada estágio larval. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney a 5%. A mortalidade das larvas contaminadas foi de 100%, 98%, 98%, 100% e 4% para o 2º, 3º, 4º estágio e pupa. A média do número de dias de vida das larvas após contaminação no 1º, 2º, 3º, 4º estágio e pupa foi de 1,36; 2,46; 1,24; 1,22 e 3,46 dias respectivamente, exceto para a pupa, a duração dos estágios foi menor para os indivíduos contaminados, ($P < 0,05$). O *B. thuringiensis* var. *israelensis* demonstrou ser um bioinseticida eficaz, causando mortalidade total de 99,5% das larvas contaminadas, embora para a fase de pupa não tenha sido eficaz. Desta forma ele representa uma boa opção para o controle de larvas de *Ae. aegypti*, entretanto para as pupas, outras alternativas devem ser estudadas.

Palavras-Chave: Controle biológico, *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

Evaluation of Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the Control of Immature Forms of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) in Laboratory

Abstract. *Aedes aegypti* is considered a cosmopolitan mosquito that lives in tropical and subtropical region. In Brazil, it's habitat is restricted to cities and villages, living next to humans and being rarely found in a place with low human density. This species is the only vector of Dengue and Yellow Fever virus in all Brazilian national territory. It's considered one of the most important vectors related with the transmission of pathogens to humans. The social concern with the environment and the mosquito's resistance to chemical insecticides, resulted on the search of an alternative method to the control of *Ae. aegypti*. An entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, is an alternative method control. The objective of this work was to measure the efficacy of this bacteria on the control of *Ae. aegypti* immature forms. In such case, 350 individuals larvae were created in plastic glasses with 200ml of non-chlorated water. In the contamination were used 5mg of *B. thuringiensis* var. *israelensis* water-dispersible granules for each larval stage. Statistical analyses were performed by Mann-Whitney non-parametric test. The mortality was 100%, 98%, 98%, 100% and 4%, 1st, 2nd, 3rd, 4th stages and pupae, respectively. The mean number of live days of the contaminated stages were 1.36; 2.46; 1.24; 1.22; 3.46 days. Except for the pupae, all others stages lived less longer than the control individuals ($P < 0.05$). *B. thuringiensis* var. *israelensis*, showed to be an effective insecticide, causing 99.5% of larvae death. And even not being able to act in the pupae, it represents a good alternative choice to the control of *Ae. aegypti* immatured forms.

Key words: Biological control, *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

O reaparecimento da dengue nas últimas décadas transformou essa doença em um sério problema de saúde pública, principalmente em países localizados em regiões tropicais (PINHEIRO 2002). Sua larga distribuição reflete a do seu vetor, e também da Febre Amarela, *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.), (JETTEN 1997). Este mosquito, pertence à família Culicidae e apresenta, de acordo com LOZOVEI (2001), escudo ornamentado com escamas branco-prateadas formando um desenho em forma de lira e, clipeo com dois tufo de escamas branco prateadas. Esse inseto é provavelmente oriundo da Etiópia, e segundo FONSECA (1999) foi introduzido nas Américas durante o período colonial, com o tráfico de escravos.

Esse díptero é essencialmente antropofílico, sendo encontrado em áreas urbanas e povoados rurais. Seu comportamento alimentar é bem particular dentre outras espécies estudadas de mosquitos (FUNASA 2001; DAY 2005). NAKSATHIT (1998) cita que, dentre as espécies mais estudadas de mosquito, essa possui hábitos alimentares únicos, uma vez que, as fêmeas dessa espécie, quase nunca se alimentam de açúcar, e sim, ao fim de cada ciclo gonadotrófico, necessitam de sangue humano. Este autor afirma ainda que aquelas fêmeas alimentadas somente com sangue humano desenvolvem vantagem em seu

desempenho alimentar, o que se mostra epidemiologicamente importante, uma vez que, a maior quantidade de picadas de um vetor, aumenta a chance de transmissão de arbovírus, o que, no caso dessa espécie de mosquito, são os vírus da dengue e febre amarela urbana, ao ser humano.

A ovoposição desse vetor é, preferencialmente, aquática e é realizada em depósitos artificiais, como pneus, vasos de planta com água, caixas d'água destampadas e ocios de árvores. Os ovos são depositados em pequenas coleções d'água, a poucos milímetros acima do nível da água, uma vez que resistem à dessecação, podendo permanecer viável por mais de um ano. Em contato com a água, os ovos começam seu desenvolvimento embrionário, e se, suas progenitoras estiverem infectadas com os arbovírus da dengue ou com o da febre amarela, esses novos insetos recém emergidos, serão capazes de infectar seres humanos quando fêmeas na forma adulta, e novamente, pela transmissão transovariana, produzir novos descendentes já infectados com os vírus (FIGUEIREDO & FONSECA 1999; CHADEE 1991).

O aumento populacional urbano, juntamente com maior número de locais propícios para ovoposição desse vetor, proporcionou condições ideais para a dispersão do *Ae. aegypti* por quase a totalidade do território brasileiro, fazendo com

que populações distintas e de diferentes áreas geográficas do Brasil, entrassem em contato com as doenças virais comumente transmitidas por esse mosquito (PINHEIRO 2002).

O controle da população desses dípteros tem sido feita, ao longo dos anos, mediante o uso de inseticidas químicos que, pelo fato de causarem alto grau de resistência dos insetos vetores num curto espaço de tempo e, também, por levar a supressão de seus inimigos naturais causando dependência crescente de seu uso, atualmente vem sendo substituídos por métodos de controle alternativo (MARCONDES 2001). Os bioinseticidas aparecem como resposta à crescente preocupação com o meio ambiente, se mostrando eficientes no controle de insetos vetores, mas com poucos danos ao ambiente (MARCONDES 2001).

O *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Berliner) é uma bactéria produtora de toxina que possui propriedades altamente tóxicas, principalmente, para larvas de dípteros das famílias Culicidae e Simuliidae, possuindo vantagens como não poluir o meio ambiente, preservar a maioria da fauna associada e de não ser tóxico ao homem e aos animais (THIERRY 1998; YAP 2002; PETRY 2004; LEE 2005; MERRITT 2005; FLOORE 2006).

Esse trabalho teve como objetivo a avaliação da eficácia das toxinas do *B. thuringiensis* var. *israelensis* no controle das formas imaturas de *Ae. aegypti*, verificando a taxa de mortalidade e o número de dias de vida pós-infecção larval, em ambiente laboratorial.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste projeto foram capturados ovos de *Ae. aegypti* através de armadilhas do tipo ovitampa colocadas no bairro de Vargem Pequena, Rio de Janeiro, RJ (Figura 1). Estes ovos foram postos para eclodir, e as larvas resultantes foram criadas para obtenção de adultos e assim da geração F1 proveniente desses casais é que foram obtidos ovos para o trabalho.

Após eclosão, as larvas (L1) foram individualizadas em copos plásticos de 200 mL, contendo aproximadamente 100ml de água não clorada.

Esses copos foram numerados de modo a identificar o indivíduo em uma planilha própria, onde, diariamente dados

da biologia, como: data de eclosão do ovo, mudança de estágio larval (L1, L2, L3, L4 e pupa), estágio de aplicação do produto testado, morte e observações a cerca de seu comportamento, foram anotados.

A alimentação das larvas foi realizada com ração comercial floculada para peixes ornamentais, em intervalos semanais. Os estágios larvais, e o estágio de pupa, foram mantidos no mesmo recipiente até a eclosão do adulto. No entanto, os copos contendo pupas, foram colocados em gaiola confeccionada a partir de embalagens de sorvete com aberturas nas laterais e parte superior protegidas por tecido de malha fina de náilon e plástico transparente, para observação e manutenção dos adultos (Figura 2). Estes foram alimentados com solução de água e açúcar a 10%, e as fêmeas foram alimentadas com sangue humano a cada 48 horas.



Figura 2. Gaiola utilizada para criação de adultos de *Aedes aegypti* no laboratório de Iniciação Científica da Universidade Estácio de Sá.

Para a realização do experimento foram utilizados um total de 250 espécimes de *Ae. aegypti*, 50 larvas para cada estágio larval (L1, L2, L3, L4) e 50 pupas que foram contaminadas, sendo aplicado uma única vez 5mg do *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) em forma de grânulos (3000 ITU/mg, pertencente ao lote 92.800.PG, cedido pela Fundação Nacional de Saúde). Os cinco estágios foram contaminados logo após sua mudança de fase. O grupo controle foi composto de 100 larvas mantidas nas mesmas condições daquelas que foram infectadas, com a diferença de não terem sido submetidas a contaminação.

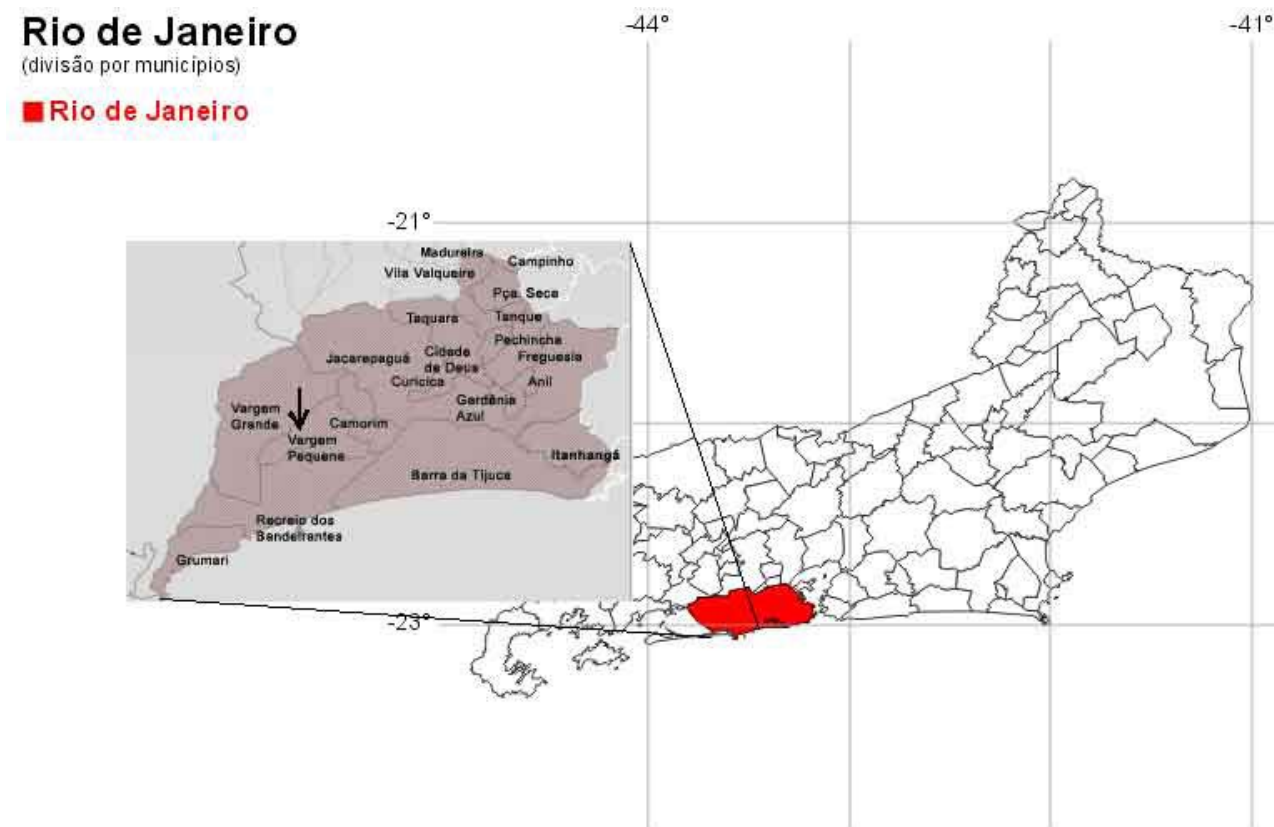


Figura 1. Localização do ponto de coleta de ovos de *Aedes aegypti*, bairro de Vargem Pequena, Rio de Janeiro, RJ.

Para a realização da análise estatística, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de mortalidade obtida para as larvas de *Ae. aegypti* que foram contaminadas em L1 foi de 100% (Controle 17%), para as contaminadas em L2 e L3 foi de 98% (Controle 28% e 7% respectivamente), e para L4 100% (Controle 5%) (Tabela 1). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por BATRA *et al.* (2000) e YAP (2002), a partir de larvas de 3° e 4° instars, encontrando taxa de mortalidade de mais de 92,5% nas espécies *Ae. aegypti*, *Aedes albopictus* (Skuse), *Culex quinquefasciatus* Say e *Anopheles dirus* Peyton & Harrison. Já LIMA & VALLE (2005) trabalhando com larvas de 3° estágio em diversos recipientes, em condições naturais no Rio de Janeiro, nunca atingiu mortalidade superior a 70% em recipientes de amianto.

Tabela 1. Taxa de mortalidade e número de dias de vida, de *Aedes aegypti*, contaminados com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e grupo controle.

Estágio	Taxa de Mortalidade (%)		Dias de vida (n°)	
	Infectado	Controle	Infectado	Controle
L1	100	17	1,36 ^a	3,44 ^b
L2	98	28	2,46 ^a	3,06 ^b
L3	98	7	1,24 ^a	2,35 ^b
L4	100	5	1,22 ^a	5,04 ^b
Pupa	4	10	3,46 ^a	3,40 ^b

Letras diferentes representam resultados significativos no teste estatístico de Mann-Whitney 5%. L1, L2, L3 e L4 representa o 1°, 2°, 3° e 4° estágio larval respectivamente.

O resultado da infecção das pupas, por sua vez, mostrou taxa de mortalidade bem baixa, em torno de 4% (Controle 10%), não tendo diferença significativa, fato que pode ser explicado pelo mecanismo de ação do produto que, segundo FLOORE (2006), age ao entrar em contato com o sistema digestivo da forma imatura, o que não possui muitas chances de ocorrer com a fase de pupa, uma vez que essa não se alimenta, assim o produto não consegue atingir seu sítio de ação, e não produz o efeito desejado nesse estágio.

A média do número de dias de vida (Tabela 1) do grupo infectado foi de 1,36; 2,46; 1,24; 1,22; 3,46 e a do grupo controle foi de 3,44; 3,06; 2,35; 5,04; 3,40 respectivamente para os 1°, 2°, 3°, 4° estágios e pupa.

Assim, foi observada uma redução dos dias de vida das larvas de 1°, 2°, 3° e 4° estágios, no entanto, os dados não puderam ser comparados com os trabalhos revisados da literatura, uma vez que esses utilizam a metodologia com grupos de larvas, o que prejudica na quantificação da média do número de dias de vida pertencente a cada estágio larval (BATRA *et al.* 2000; BROWN 2001; TOMA *et al.* 2003; VILARINHOS & MONNERAT 2004;).

No caso das pupas, não houve diferença significativa na média do número de dias de vida ($P > 0,05$).

Foi observado que, quando infectadas, as larvas perdiam agilidade ficando a maior parte do tempo no fundo do copo, sem se alimentar, subindo somente para efetuar a respiração. O tegumento perdia o brilho, adquirindo coloração fosca, porém após a sua morte as larvas apresentavam manchas de coloração preta (Figura 3). Esses dados não são relatados na literatura revisada, provavelmente pela criação das larvas em grupo e não individualmente.

Na fase de pupa não foi observado comportamento significativamente diferente do normal apresentado pela espécie, uma vez que não foi constatada ação do produto sobre essa forma.

O *B. thuringiensis* var. *israelensis* mostrou ser um bioinseticida eficaz, apresentando mortalidade total de 99,5% nos indivíduos testados. Esse resultado foi semelhante aos trabalhos de BATRA *et al.* (2000), VILARINHOS & MONNERAT (2004) e LEE *et al.*

(2005), que obtiveram mortalidade de 100%.

A mortalidade das larvas ocorreu, em sua maioria, dentro de 1 a 2 dias, o que confirma resultados de TOMA *et al.* (2003) e LEE *et al.* (2005), embora tenha sido registrado a sobrevivência de uma larva infectada no 2° estágio que permaneceu viva até a fase adulta, e uma no 3° estágio que permaneceu viva até o 4° estágio.



Figura 3. Aspecto de larvas de 4° estágio de *Aedes aegypti* criadas no Laboratório de Iniciação Científica da Universidade Estácio de Sá. A – Larva contaminada; B – Larva Sadia.

Para o caso da larva de 2° estágio, pode ter ocorrido a não ingestão ou a ingestão de doses sub-letais do produto e por isso não ocorreu o efeito esperado; no entanto FLORES (2004) afirma que a ingestão de doses sub-letais promove a diminuição do ciclo de vida, o que não ocorreu, uma vez que esse indivíduo sobreviveu até 31 dias após sua contaminação; uma terceira hipótese, seria de que essa larva teria ingerido o Bti, porém fosse resistente a ele, embora até hoje não haja suficiente literatura relatando resistência do *Ae. aegypti* a esse produto. Esta resistência deve ser motivo de grande preocupação, uma vez que a Fundação Nacional de Saúde tem utilizado o Bti como base para o combate do *Ae. aegypti* no Estado do Rio de Janeiro. No entanto este fato deve ser melhor estudado para confirmação da hipótese, uma vez que só ocorreu com uma única larva testada.

REFERÊNCIAS

- Batra, C.P., P.K. Mittal & T. Adak. 2000. Control of *Aedes aegypti* breeding in desert coolers and tires by use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulation. Journal of the American Mosquito Control Association, 16: 321-323.
- Brown, M.D. 2001. Evaluation of liquid *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products for control of Australian *Aedes* Australian arbovirus vectors. Journal of the American Mosquito Control Association, 17:08-11.
- Chadee, D.D. 1991. Seasonal incidence and vertical distribution patterns of oviposition by *Aedes aegypti* in the urban environment in Trinidad, W. I. Journal of the American Mosquito Control Association, 07: 383-386.
- Day, J.F. 2005. Host-seeking strategies of mosquito disease vectors. Journal of the American Mosquito Control Association, 21:17-22 (supplement).
- Floore, T.G. 2006. Mosquito larval control practices: past and present. Journal of the American Mosquito Control Association, v. 22:527-533.
- Flores, A.E. 2004. Effects of sublethal concentrations of Vectobac® on biological parameters of *Aedes aegypti*. Journal of the American Mosquito Control Association, 20: 412-417.
- Fonseca, B.A.L. & L.T.M Figueiredo. 1999. Febre Amarela, p. 251-257. In: Veronesi, R. & R. Focaccia. Tratado de infectologia. 2° v. São Paulo: Atheneu, 2388p.
- FUNASA. 2001. Dengue. Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. Manual de Normas Técnicas. Brasília.
- Jetten, T.H. & D.A. Focks. 1997. Potential changes distribution

- of Dengue transmission under climate warming. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57: 285-297.
- Lee, Y.W., J. Zairi, H.H. Yap & C.R. Adanan. 2005. Integration of *Bacillus thuringiensis* H-14 formulations and Pyriproxyfen for the control of larvae of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21: 84-89.
- Lima J.B.P., N.V. Melo & D. Valle. 2005. Persistence of vectobac WDG and Metoprag S-2G against *Aedes aegypti* larvae using a semi-field bioassay in Rio de Janeiro. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 47: 7-12.
- Lozovei, A.L. 2001. Culicídeos (mosquitos), p. 59-104. In: Marcondes, C.B. *Entomologia médica e veterinária*. São Paulo: Atheneu, 432p.
- Marcondes, C.B. 2001. Controle de artrópodes – Princípios gerais, p. 327-342. In: *Entomologia Médica e Veterinária*. São Paulo: Atheneu, 432p.
- Merritt, R.W., J.L. Lessard, K.J. Wessell, O. Hernandez, M.B. Berg, J.R. Wallace, J.A. Novak, J. Ryan & B.W. Merritt. 2005. Lack of effects of *Bacillus sphaericus* (VECTOLEX®) on nontarget organisms in a mosquito-control program in Southeastern Wisconsin: A 3-year study. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21: 201-212.
- Naksathit, A.T. & T.W. Scott. 1998. Effect of female size on fecundity and survivorship of *Aedes aegypti* fed only human blood versus human blood plus sugar. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14: 148-152.
- Petry, F.; A.L. Lozovei, M.E. Ferraz & L.G. Santos Neto. 2004. Controle integrado de espécimes de *Simulium* (Diptera: Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*. Curitiba, 48: 127-132.
- Pinheiro, V.C.S. & W.P. Tadei. 2002. Frequency, diversity and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de S. Paulo*, 44: 245-250.
- Thiery, I. & S. Hamon. 1998. Bacterial control of mosquito larvae: investigation of stability of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* standard powders. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14: 472-476.
- Toma, L., R. Severini, A. Bella & R. Romi. 2003. A Semifield evaluation of Vectobac® DT (ABG-6499), a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for control of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 19: 424-429.
- Vilarinhos, P.T.R. & R. Monnerat. 2004. Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20: 311-314.
- Yap, H.H., Y.W. Lee, & J. Zairi. 2002. Indoor thermal fogging against vector mosquitoes with two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulations, Vectobac® ABG6511 water-dispersible granules and Vectobac® 12AS liquid. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18: 52-56.

Recebido em: 25/01/2008

Aceito em: 29/03/2008

Como citar este artigo:

Espindola, C.B., R.N. Guedes & R.C.P. Souza. 2008. Avaliação da Eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no Controle de Formas Imaturas do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em Ambiente de Laboratório. *EntomoBrasilis*, 1(1): 10-13. www.periodico.ebras.bio.br/ojs

