

**4<sup>th</sup> COURSE: IMPLEMENTATION OF BIOLOGICAL CONTROL OF  
MOSQUITOES USING BACTERIAL BIOINSECTICIDES**

**19 – 22 Outubro, 2004**

**2<sup>nd</sup> SATELLITE SYMPOSIUM: MOSQUITO VECTOR BORNE TROPICAL  
DISEASES AND BIOLOGICAL CONTROL**

**RESUMO DE PALESTRA: *Bacillus* no MANEJO de Mosquitos:  
Dengue – Febre Amarela – *Culex* e Borrachudos**

**Carlos F. Andrade  
Zoologia/ UNICAMP**

Os princípios do Manejo Integrado de Pragas, que na verdade são os mesmos princípios adotados no Manejo de Vetores definem como primeiro passo o conhecimento das espécies que precisamos controlar. É a base de todo enfrentamento – Conhecer seu Inimigo. A presente abordagem é sobre os mosquitos, e portanto o primeiro ponto é obter o melhor conhecimento possível da sistemática e bio-ecologia desses hematófagos incômodos ou vetores.

O segundo passo é determinar em estudos populacionais e epidemiológicos as densidades locais das espécies vetoras. No caso dos mosquitos, estabelecer suas taxas de ataque, que podem ser avaliadas pelo número de picadas, por hospedeiro e por unidade de tempo, por exemplo. Próximo passo é definir a capacidade vetorial do mosquito. São informações que obtemos tanto em condições de laboratório como de campo. Outro passo importante é conhecer o nível de antropofilia da espécie de mosquito, e sua preferência e impacto sobre seres humanos, animais sinantrópicos, animais de criação (pecuária) ou animais silvestres. E por fim avaliar seus danos, tanto na forma de impacto que causam do ponto de vista de saúde, de qualidade de vida como do ponto de vista econômico. Se não causam doenças epidêmicas, que são bastante impactantes do ponto de vista sócio-econômico, deve-se ter estimativas dos prejuízos que causam ao turismo, à produtividade de trabalhadores, ou à produtividade de rebanhos, por exemplo. (Veja resumo da palestra sobre Parâmetros Entomológicos, de R. Zimmerman)

O quadro de opções para um programa de Manejo Integrado pode ser caracterizado pelos métodos de controle, basicamente em três frentes: Controle Biológico, Controle Químico e Controle Físico, complementados por dois outros componentes fundamentais, que são a Participação Comunitária e a Educação.

Os Métodos Físicos devem sempre ser os primeiros considerados e cuidadosamente avaliados. Seus componentes básicos são : 1- A eliminação dos Criadouros, estratégia de evidente impacto. 2- Uso de Telas ou redes, no sentido de evitar ao máximo o contato dos mosquitos com o hospedeiro vertebrado. 3- Uso de Armadilhas, que além de permitirem o monitoramento das populações, podem ser associadas a substâncias atraentes, e por algum método eliminar larvas ou adultos e 4- Barreiras de Superfície, método que serve tanto para impedir a emergência dos adultos, como para evitar que as fêmeas depositem ovos. Um exemplo típico desse último componente é o uso de bolinhas de isopor em caixas d'água sem tampa (contra *Aedes aegypti*) ou em fossas negras (contra *Culex quinquefasciatus*). Esses métodos muitas vezes são muito duradouros ou mesmo definitivos, e costumam portanto ter uma ótima relação custo-benefício.

Os Métodos Químicos são em geral mais amplamente utilizados e divulgados. Podem ser voltados ao controle dos adultos alados (que se encontram dispersos no ambiente) ou contra as larvas (que podem se deslocar bem menos e se encontram mais agrupadas que os adultos). Seus componentes são os inseticidas à base de plantas (como o piretro) ou sintéticos (como os organofosforados e piretróides, por exemplo). Essas substâncias são essencialmente neurotóxicas e obviamente não são completamente específicas aos mosquitos. Outra categoria mais moderna de inseticidas é a dos chamados (impropriamente) Reguladores de Crescimento (ou pela sigla IGR, do inglês *Insect Growth Regulators*). São análogos aos hormônios dos insetos ou inibidores de processos bioquímicos típicos nos insetos, como a síntese de quitina. Na verdade, desregulam o crescimento, e seriam melhor chamados de Inibidores de Desenvolvimento. Complementa esse arsenal as substâncias químicas repelentes e atraentes. Os repelentes podem ser espaciais ou pessoais, e podem ser à base de plantas ou sintéticos. E os atraentes podem ser associados a outro método mortal, ou mesmo usado para o monitoramento de populações como foi mencionado. Alguns exemplos são o uso de infusões de capim para atrair *Aedes* ou do feromônio sintético de oviposição (MOP) para atrair fêmeas de *Culex quinquefasciatus*.

Os Métodos Biológicos são em geral mais elaborados, mas costumam permitir maior sustentabilidade. Os mais utilizados são os agentes patogênicos que podem ser utilizados na forma de inóculos no ambiente ou na forma de inseticidas biológicos (veja outros resumos nesse simpósio). Predadores e parasitos já foram bastante usados no controle de mosquitos, mas seu emprego ficou muito ofuscado pelo desenvolvimento dos biolarvicidas bacterianos. Peixes e nematódeos por exemplo já foram produzidos comercialmente. Copépodos e planárias já participaram de vários programas de controle. E hoje deveriam ser melhor estudados para programas comunitários. Podem ser usados de forma inoculativa ou em aplicações repetidas. Podem também ser associado a armadilhas letais. Outras opções têm surgido com os avanços da genética e biologia molecular, na forma de mosquitos transgênicos (Veja resumo da conferência de L. Moreira e M Jacobs-Lorena nesse simpósio). Embora pouco utilizados, deve-se mencionar também o uso de competidores de mosquitos e no caso do ataque a animais de criação, a opção por linhagens mais resistentes aos ataques.

Um Pouco de História e danos causados.

No passado pudemos nos beneficiar de bons exemplos de sucesso no controle de mosquitos vetores. Tal foi o caso da campanha levada a cabo no início do século passado no Rio de Janeiro, por Oswaldo Cruz. Depois que o médico cubano Carlos Finlay realizou experimentos em Havana e confirmou que era o *Aedes aegypti* o vetor da febre amarela urbana, as epidemias puderam ser controladas com a eliminação do mosquito. Em 1992 o Rio de Janeiro tinha cerca de 700.000 habitantes e 1.000 mortes por ano devido à febre. 1903 Oswaldo Cruz foi nomeado Chefe da Diretoria de Saúde Pública e disse: “*Dêem-me liberdade de ação e eu exterminarei a febre amarela dentro de três anos*”. E assim foi. Realizou com a sua equipe 110.000 visitas domiciliares, interditou 626 edifícios e casas e realizou inúmeras aplicações de fumaça de Enxofre e Piretro. Os resultados foram 48 mortes em 1904 e nenhuma morte em 1909.

Também já conseguimos erradicar o *Aedes aegypti* do Brasil e de boa parte das Américas na década de 70, mas o mosquito voltou, junto com a dengue. São também vários os casos de eliminação de malária em comunidades isoladas no

Brasil. Doença que também não existe mais em países do primeiro mundo, aonde era bastante comum. E mesmo a febre amarela silvestre, para a qual Existe vacina desde a década de 40, deveria estar erradicada, mas não está. Em 2002 foram registrados 41 casos, sendo destes 31 em Minas Gerais, com 22 mortes (Vasconcelos, 2003).

A dengue, embora tenha apresentado menos casos mais recentemente, continua uma ameaça, pela introdução do sorotipo IV que ainda não provocou grandes epidemias no Brasil. Estamos cada vez melhor aparelhados e preparados para o enfrentamento, adotando cada vez mais os larvicidas bacterianos a base de Bti (Andrade *et al*, 2001), mas não estamos livres da doença e de seus prejuízos econômicos e sociais (ver resumo da palestra de P.T. Vilarinhos, nesse Simpósio)

Sofremos com os ataques de *Cx. quinquefasciatus* e em algumas cidades há ainda o agravo da filariose. Braga *et al.* (2001) por exemplo registraram em um bairro Olinda, PE uma taxa de 20 a 60 *Culex*/quarto/noite. Estudaram nesse bairro 3.222 pessoas e encontraram 42 positivas (1,3%) para a filariose.

Mais ao sul e sudeste do Brasil, sofremos pelo intenso ataque antropofílico de uma espécie de borrachudo, o *Simulium pertinax*. Na região de Nova Bandeirantes e Juruena, MT a espécie que acarreta enorme desconforto aos humanos é o *simulium minusculum*, que já foi também incriminado como possível vetor da oncocercose no foco de Minaçu, GO (Shelley *et al.*, 2001).

No Rio Grande do Sul, *Simulium pertinax* ocorre nos riachos encachoeirados da serra gaúcha. No pequeno município de Nova Petrópolis já foi registrado mais de 380 pessoas/ ano necessitando de cuidados médicos devido às picadas de *S. pertinax* (SOUZA, 1984). Na região, registrou-se também 5% da população necessitando de cuidados médicos, e 0,3% necessitando de hospitalização. Já na região turística do litoral de São Paulo, em municípios como Ilhabela e Ubatuba pudemos registrar níveis de até 400 borrachudos/hora/homem (Obs. Pers.).

#### Um pouco de Controle.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* foi descoberta em 1903 por Ishiwata, atacando um inseto benéfico, o Bicho da Seda, no Japão. Depois, essa bactéria foi novamente isolada e descrita em 1911 por Berliner, na Alemanha na província de Thuringia. Dessa vez, causando doença em uma praga, a Traça da Farinha. A partir dessas descobertas e do avanço da microbiologia como um todo, iniciou-se a fermentação industrial e a bactéria foi usada a primeira vez como inseticida comercial em 1938, na França, e depois, mais frequentemente em 1950 nos EUA. Mas era uma variedade (ou sorotipo) com atividade apenas para as lagartas desfolhadoras, larvas de Lepidoptera, e todas as tentativas de usa-la no controle de mosquitos haviam falhado. Foi em 1976, que pesquisadores encontraram pela primeira vez uma variedade *Bacillus thuringiensis* que podia matar as larvas de mosquitos. Acharam no solo, na água de uma pequena poça no leito de um rio seco e em larvas mortas e moribundas de *Culex pipiens* (uma epizootia), no deserto de Negev, em Israel, e deram a ela o nome *B. th. Israelensis* (Bti) (Goldberg & Margalit J., 1977). É interessante notar que essa mesma variedade já foi re-isolada inúmeras vezes, no solo de pelo menos 30 países, nos 5 continentes, e até mesmo no solo do Nepal, numa localidade a 6.000m de altitude, aonde certamente nunca existiu nenhuma espécie de mosquito. E interessante também, que nunca mais foi registrada qualquer outra epizootia, além daquela descrita em Israel, pois na verdade, essa espécie não causa de fato epizootias pois não recicla nas larvas mortas de forma a permitir isso.

Outra bactéria muito importante hoje em dia é o *Bacillus sphaericus* (Bs), descrita em 1904, e também re-isolada inúmeras vezes em vários países. Também é gram positiva e formadora de esporo. E tanto quanto Bt, as linhagens tóxicas para mosquitos podem sintetizar várias toxinas. A mais importante toxina de Bs é a Toxina Binária, com 2 proteínas (BinA e BinB: 42kDa e 51-kDa respectivamente), que são produzidas durante a esporulação e depositadas como cristais parasporais dentro do exosporio.

Uma curiosidade recente pode ser encontrada pela Internet. A notícia diz que em maio, 1995; uma bactéria de 40 milhões de idade (*Bacillus sphaericus*) foi encontrado no estomago de uma abelha imersa em âmbar da República Dominicana. Informa ainda que a bactéria foi “ativada” no laboratório, ou seja, pode ser cultivada. Os resultados da análise genética mostraram que o *Bacillus sphaericus* ancião diferia da espécie atual em apenas 6,7% (detalhes, e uma foto interessante, podem ser encontrados em <http://www.godandscience.org/evolution/evol1995.html#39> e <http://www.extremescience.com/OldestLivingThing.htm>.

A ciência não para de buscar novas possibilidades para o uso dos inseticidas microbianos (e em especial os bacterianos) para o controle de mosquitos. Assim, algumas pesquisas tratam hoje de avaliar a possibilidade de expressão das toxinas de uma bactéria em outra. É o caso dos trabalhos de Brian Federici e colaboradores (2003). Eles conseguiram linhagens recombinantes do *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), que produzem a toxina binária de *Bacillus sphaericus* (Bs) 2362. Eles usaram uma linhagem acristalífera transformada com um plasmídeo que produz a toxina binária de Bs 2362. Usaram também o Bti IPS-82 transformada com o mesmo plasmídeo. Na microscopia eletrônica foi possível ver o cristal grande de Bs e o cristal típico de Bti, de forma bem evidentes na célula esporulada. Fizeram análise de SDS-PAGE para comparar o padrão do Bti IPS-82 e com o Bti IPS-82 produzindo as proteínas de Bti e de Bs. O próximo passo agora é realizar avaliações de campo e estudar a viabilidade de novos produtos bacterianos com espécies recombinantes.

Uma das críticas aos larvicidas bacterianos, é que do ponto de vista prático, os tratamentos precisam ser repetidos como se eles fossem inseticidas químicos. Como as bactérias são organismos vivos, poderíamos esperar que elas se multiplicassem no ambiente, sendo necessárias apenas algumas aplicações. Essa técnica, que não é possível com o Bti, foi mencionada acima como Método de Inoculação. Assim, por enquanto, os tratamentos com *Bacillus thuringiensis* precisam ser repetidos. Foi pensando nisso que pesquisadores estão testando a toxina do Bti, associada a outros microrganismos, que possam se multiplicar no ambiente. Alguns exemplos estão nos trabalhos de Manasherob e colaboradores (1997 e 1998). Que aumentaram a atividade de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra as larvas de *Anopheles stephensi*, quando encapsularam a bactéria no protozoário *Tetrahymena pyriformis*.

#### Produtos Convencionais e Algumas avaliações.

Existem hoje cerca de 21 produtos registrados nos EUA à base de *B. th. israelensis* (Veja também palestra de N. Becker nesse Simpósio). São eles: VectoBac® WDG Potência: 3.000 ITU/mg, Vectobac 12 AS Potência: 1.200 ITU/mg, Teknar® G e CG, Potência: 200 ITU/mg e Bactimos® Pellets, todos da Valent Biosciences, USA), Potência: 400 ITU/mg. E ainda Acrobe® (Becker Microbial Products, FL, USA), Potência não declarada, Mosquito Dunks (Summit

Chemical, USA) Potência: 7000 ITU/mg, LarvXTM SG (Meridian Vector Management, USA), Bmp Green Thumb Ready-to-Use Granules (Becker microbial products inc Truserv corporation, USA). Além do Bactivec® (Labiofan, Cuba) Potência não Declarada e Bthek Biotecnologia – IPT- Embrapa (Brasil) também com Potência não Declarada.

Os produtos à base de *Bacillus sphaericus* encontrados são: SPIC Biomass. Water soluble granules (SG), produzido pelo 'National Centre for Integrated Pest Management, Lal Bahadur Shastri Building, Pusa Campus' em Nova Delhi, INDIA, e sem Potência declarada. Também existem o VectoLex Control Granule (CG) da Valent BioScience Corp americana, com Potência: 50 *Bacillus sphaericus* [B.s.] International Toxic Units [ITU]/mg), o VectoLex WDG (Water Dispersible Granule), Potência: 650 B.s. ITU/mg e ainda o cubano Griselesf (Labiofan, Cuba ), Potência não Declarada. No Brasil, tem sido produzido o Spherico L , pela empresa Geratec associada à EMBRAPA (CENARGEN), desde 1992, com Potência não Declarada.

Em nossos estudos de campo (Andrade, Visockas e Guarda, 2002, não publicado) avaliamos a ação residual do Vectobac WDG em três tipos de recipientes (baldes plásticos, potes de cerâmica e pneus), e em duas situações, expostos ao sol ou em locais sombreados, no controle das larvas de *Ae. aegypti*, no município de Santa Bárbara D'Oeste, SP. Constatamos uma boa eficiência geral (acima de 90% de controle) para os três recipientes até 24 dias após a aplicação. Quando considerados apenas os recipientes em locais sombreados, essa eficiência (>90%) durou bem mais, foi até 43 dias após o tratamento.

Avaliamos também em outro estudo de laboratório produtos com a validade vencida, ou seja, que aparentemente não serviriam mais para uso no controle de mosquitos. Testamos: **1) Vectobac Tablete** (lote PK009-2, fabricado Novembro/2000, com 3,5 anos de idade, sendo portanto já passados 1,5 anos com a sua validade expirada), em duas concentrações: 27mg/4L (1tablete/50 litros) e 13,5mg/4L (1/2 tablete/50litros); **2) Vectobac WDG** (3000 ITU/mg) (lote 72-578-PG fabricado Dezembro/2000, com 3,4 anos de idade, sendo já passados 1,4 anos com a validade expirada) e; **3) Mosquito Dunks** (2800 ITU/mg) (fabricado Jan./2001, com 3,3 anos de idade, e sendo portanto 1,3 anos com a validade expirada), na concentração 1/4 dunks (=4500mg/8370cm<sup>2</sup>). Verificamos o percentual médio de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* até 50 dias da aplicação. Após esse período, todos os tratamentos resultaram em baixa mortalidade (entre 60 e 80%), mas até 40 dias do tratamento, as mortalidades causadas por esses produtos 'vencidos', era ainda muito boa, e igual ou acima de 99% !

Estamos avaliando atualmente, máquinas aplicadoras manuais, não motorizadas, para usar nos tratamentos com Vectolex G no controle de *Culex* ou *Anopheles*. O maior programa de controle de *Culex* atualmente em curso no Brasil está sendo feito no Rio Pinheiros, em São Paulo, capitã. São tratados 54Km de margens do rio, e para isso são usados aerobarco e uma máquina motorizada que permite uma maior vazão de produto. Para o tratamento de pequenas áreas entretanto, a opção tem sido o lançamento à mão, desse produto que é formulado em grânulos de sabudo de milho. A aplicação feita à mão não é fácil de calibrar (dependendo do funcionário encarregado) e não permite distribuição muito uniforme. Avaliamos equipamentos nacionais (Máquina tabaqueira marca Guarany, costal manual) e as sementeiras da empresa PlantMate americana (Powder Mill, Scatter Box e Broadcast Spreader). Os resultados são promissores.

## BIBLIOGRAFIAS DE REFERÊNCIA

- Andrade, C. F.; I. Cabrini & M. M. Carvalho Filho, 2004. Avaliação de formulados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* com prazo de validade vencido e armazenados em diferentes ambientes, para larvas de *Aedes aegypti* (DIPTERA - CULICIDAE) em condições de laboratório. *Resumos XX Congr. Bras. Entomologia*, Gramado - RS - 2004
- Andrade, C.F. & M. Modolo, 1991. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control. *Rev. Saúde públ. São Paulo*, 25(3): 184-187.
- Andrade, C.F., J. R. Duarte, Z. Martins & J. Campos. Training dengue operational managers for swapping temephos by *Bacillus thuringiensis israelensis* in the *Aedes* control program in the State of Rio de Janeiro, Brazil. 3<sup>rd</sup> International Congress of Vector Ecology – Barcelona, Spain. 16/21 September 200.1
- Campos G. J. & Andrade C.F.S. 2001 Susceptibilidade Larval de duas Populações de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicinae) a inseticidas químicos. *Revista Saúde pública* 35 (3): 232-236.
- Campos J. & C.F. Andrade. Larval susceptibility to chemical insecticides of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations *Rev. Saúde Pública, SP, USP*. 37(4), 2003.
- Federici, B. A., H.-W. Park, D. K. Bideshi, M. C. Wirth & J. J. Johnson, 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. *The Journal of Experimental Biology* 206, 3877-3885
- Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, 2003. Febra Amarela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.36 no.2 - Uberaba Mar./Apr. 2003
- SANTOS. L.U., SOUZA, A.B., ANDRADE, F.C. & SOUZA, C.E.P. 1994. Uso de *Bacillus thuringiensis israelensis* como agente controlador de mosquitos em um cemitério. *Rev. Patol. Tropical* 23(2):151-158.
- Shelley AJ, Maia-Herzog M, Dias AP, Camargo M, Costa EG, Garritano P, Lowry CA. Biting behaviour and potential vector status of anthropophilic blackflies in a new focus of human onchocerciasis at Minaçu, central Brazil. *Med Vet Entomol.* 2001 Mar;15(1):28-39.
- Goldberg LJ, Margalit J. (1977). A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News* 37, 355-358.
- Manasherob, R., Bendov, E., Margalit, J., Zaritsky, A. and Barak, Z., 1997. Raising activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Anopheles stephensi* larvae by encapsulation in *Tetrahymena pyriformis* (Hymenostomatida, Tetrahymenidae). *Journal of the American Mosquito Control Assoc.* 12: 627-631.
- Manasherob, R., Ben-Dov, E., Zaritsky, A. and Barak, Z.e., 1998. Germination, growth, and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in excreted food vacuoles of the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1750-1758.
- Vilarinhos P. 2001 Current status of the National Program to Fight against *Aedes aegypti* in Brazil In: Symposium: Vector Control Programs with Economic and Technologic Considerations Organizers: Norbert Becker (Germany), Jean Marc Hougard (France) and Jack E. Hazelrigg (USA).