

**Influência dos fatores abióticos na efetividade de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Berliner, 1911) para larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)**

**Influence of abiotic factors on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Berliner, 1911) against larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)**

**Influencia de los factores abióticos en la efectividad de la *Bacillus thuringiensis israelensis* (Berliner, 1911) contra larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)**

Esp. Antonia Santos da Silva,<sup>I</sup> Esp. Katiane dos Santos Lobo,<sup>I</sup> Me. Joelma Soares da Silva,<sup>I,II</sup> Cíntia Fernandes da Silva Vale,<sup>I</sup> Dr. Wanderli Pedro Tadei,<sup>III</sup> Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro<sup>I</sup>

<sup>I</sup> Laboratório de Entomologia Médica, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA/Caxias-MA), Brasil.

<sup>II</sup> Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Campus Codó - MA, Brasil.

<sup>III</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Laboratório de Malária e Dengue, Manaus-AM, Brasil.

---

**RESUMO**

**Introdução:** *Bacillus thuringiensis*, tem sido usado mundialmente para o controle de culicídeos, especialmente no combate ao *Aedes aegypti*. Várias formulações vêm sendo fabricadas, no entanto, a efetividade desses inseticidas variam bastante de acordo com as condições ambientais.

**Objetivo:** avaliar a influência dos fatores abióticos na efetividade de *B. thuringiensis var. israelensis* para larvas de *Ae. Aegypti*.

**Métodos:** realizou-se bioensaio experimental no campus do CESC/UEMA, com utilização de 20 tanques de cimento, destes, 10 ficaram expostos aos fatores ambientais, e apenas 5 foram tratados e 5 serviram como controle. Os outros

10 tanques foram colocados à sombra, também 5 tratados e 5 não tratados (controle). Após o tratamento foram colocadas 25 larvas em estágio L 3 em cada tanque e realizadas leituras de mortalidade após 24 horas e a cada 7 dias. Semanalmente foram coletadas amostras de água de todos os tanques para medir o número de esporos viáveis e avaliar a reciclagem bacteriana.

**Resultados e Discussão:** o larvicida apresentou eficácia inicial, matando 100 % das larvas nos tanques que estavam ao sol e a sombra. Os fatores ambientais, insolação, temperatura e pluviometria afetaram negativamente a efetividade do produto, pois se observou diminuição na eficácia do produto ao longo da realização do experimento. Observou-se variação do número de esporos ao longo do desenvolvimento do experimento, demonstrando que a bactéria apresenta potencial de reciclagem.

**Conclusão:** esses dados servem como parâmetros para melhoramento de inseticidas à base de Bti, no sentido de se fabricar formulações mais adequadas às condições ambientais da nossa região.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*, controle biológico, dengue, vetor.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** *Bacillus thuringiensis*, has been used worldwide for the control of mosquitoes, particularly in combating *Aedes aegypti*. Various formulations have been made however, the effectiveness of these insecticides vary considerably according to the environmental conditions.

**Objective:** to evaluate the influence of abiotic factors on the effectiveness of *B. thuringiensis* var. *israelensis* to against larvae of *Ae. aegypti*.

**Methods:** we conducted bioassay experiments in the campus of the CESC / UEMA. With use of 20 Twenty cement tanks, of these, were used, 10 of which were exposed to environmental factors, and only. Of these, 5 were treated and 5 served as controls. The other 10 tanks were placed in the shade, also again 5 were treated and 5 untreated were not (control). After treatment, the 25 stage L 3 larvae were placed in 25 L 3 each stage tank and mortality. Mortality readings were taken after 24 hours and every 7 days. Weekly water samples were collected from all tanks to measure once a week to check the number of viable spores and evaluate bacterial recycling.

**Results and discussion:** the larvicidal efficacy: The larvicide showed initial efficacy, killing 100 % of the larvae in tanks that were located both in the sun and in the shade. Environmental factors, sunlight, temperature and rainfall negatively affected the effectiveness of the product, because for there was a reduction in the effectiveness of the product throughout the experiment. It was observed variation in the number of spores during the development of the experiment demonstrating, showing that the bacterium has potential recyclability.

**Conclusion:** these data serve as parameters for improving to in Bti-based insecticides, in order to make the with a view to making formulations more suited toin keeping with the environmental conditions of our region.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, biological control, dengue, vector.

## RESUMEN

**Introducción:** la *Bacillus thuringiensis* se ha utilizado en muchas regiones del mundo para el control de los mosquitos, sobre todo en el combate contra el *Aedes aegypti*. Se han elaborado varias formulaciones; sin embargo, la efectividad de esos insecticidas varía considerablemente según las condiciones ambientales.

**Objetivo:** evaluar la influencia de los factores abióticos en la efectividad de la *B. thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de *Ae. aegypti*.

**Métodos:** se realizaron bioensayos experimentales en el campus de la CESC / UEMA. Se utilizaron 20 tanques de cemento, 10 de los cuales quedaron expuestos a factores ambientales. De ellos, 5 fueron tratados y 5 sirvieron como controles. Los otros 10 tanques fueron ubicados en la sombra, y también en este caso 5 fueron tratados y 5 no (controles). Después del tratamiento, se colocaron 25 larvas en estadio larval L3 en cada tanque. Se realizaron lecturas de mortalidad luego de 24 horas y cada 7 días. Se tomaron muestras de agua de todos los tanques una vez a la semana para comprobar el número de esporas viables y evaluar el reciclaje bacteriano.

**Resultados y discusión:** el larvicida mostró eficacia inicial, matando el 100 % de las larvas de tanques ubicados tanto al sol como en la sombra. Los factores ambientales, la luz solar, la temperatura y la lluvia afectaron negativamente la efectividad del producto, constatándose una reducción de la misma a lo largo del experimento. Se observaron variaciones en el número de esporas durante el experimento, lo que demuestra que la bacteria presenta potencial de reciclaje.

**Conclusión:** los datos obtenidos sirven de parámetros para el mejoramiento de los insecticidas a base de Bti, con vistas a elaborar formulaciones más acordes con las condiciones ambientales de nuestra región.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, control biológico, dengue, vector.

---

## INTRODUÇÃO

No contexto atual, a dengue é considerada a mais importante arbovirose e representa um problema de saúde pública de ordem mundial. Estima-se que aproximadamente 2/3 da população mundial viva em áreas infestadas por mosquitos vetores.<sup>1,2,3</sup> É uma doença infecciosa aguda, cujo agente etiológico é um vírus pertencente à família Flaviviridae do gênero *Flavivirus*. São conhecidos quatro sorotipos do vírus dengue, VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3, e VDEN-4.<sup>4,5</sup>

Nas Américas, a principal espécie incriminada na transmissão da dengue é o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) (Linnaeus 1762). A expansão das áreas de disseminação dos quatro sorotipos do dengue no Brasil e no mundo está associada com a dispersão desse vetor, uma vez favorecido tanto pela urbanização sem a devida estrutura de saneamento, quanto à globalização da economia.<sup>6,7,8,9</sup>

No Brasil desde a década de 20 a base da eliminação dos estágios imaturos (larvas), é realizada com larvicida químico temefós.<sup>10,11,12,13</sup> A utilização em larga escala dos larvicidas químicos organofosforados e piretróides para combate das formas imaturas do *Ae. aegypti*, ocasionou problemas de resistência, detectada em vários

Estados brasileiros, pela Rede Nacional de Monitoramento de Resistência a Inseticidas.<sup>14</sup>

Além dos problemas graves evidenciados com a falta de especificidade dos larvicidas químicos, há também registros de populações de insetos, com tegumentos alterados, menos permissivo a ação do inseticida; modificações na estrutura ou expressão de nível de enzimas naturalmente desintoxicante; mutações no sistema nervoso central que impedem interações com o inseticida e mudanças comportamentais.<sup>15</sup>

No universo de agentes de controle biológico, as bactérias se destacam pela produção em larga escala, e por outras vantagens como: segurança, poder residual, reciclagem mais rápida no ambiente e boa condição de manejo. Apresentam residualidade de até três meses em estação chuvosa e mortalidade em até 24 horas e como não prejudica o homem, e pode ser utilizado juntamente com produtos químicos para aumentar a eficiência do controle.<sup>16,17</sup>

Atualmente, a bactéria mais utilizada no controle de vetores é o *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti). Experimentos em vários laboratórios e em condições simulada de campo em várias partes do mundo, já demonstraram a maior eficácia do Bti no controle de larvas de *Ae. aegypti*.<sup>18,19</sup> Sua utilização têm um aspecto mais amplo em sua atividade contra a espécie *Aedes aegypti* e espécies dos gêneros *Culex* *Anopheles*.<sup>20</sup>

Atualmente no mercado estão disponíveis vários produtos industrializados, à base de Bti, sob diferentes formulações. A maioria dos formulados constitui de formas líquida e granulada, contendo os cristais com atividade inseticida e os esporos viáveis que auxiliam o processo de reciclagem da bactéria.<sup>21,22</sup>

Assim, a eficiência dos inseticidas empregados no controle dos vetores deve sempre ser avaliada nas diferentes regiões com a finalidade de verificar a influência das condições climáticas sob a persistência dos formulados.<sup>23</sup> Pois, além da patogenicidade e virulência desses patógenos, os aspectos como os efeitos subletais sobre os indivíduos sobreviventes, como prolongamento do estágio larval e a diminuição da quantidade de ovos, a reprodução e a persistência dos esporos do larvicida nas larvas mortas certamente representam um importante parâmetro, que auxilia na sua atividade tóxica.<sup>16</sup>

Considerando o Estado do Maranhão, principalmente a região leste do Estado, que sofre influência das condições climáticas da região do semi-árido, possui condições climáticas com temperaturas elevadas e altos níveis de insolação, é necessário avaliar a eficiência desses larvicidas nesta região para verificar a influência dos fatores abióticos na persistência dos formulados de Bti rotineiramente empregados no controle de *Ae. aegypti*. Esses dados podem servir como parâmetros para estudos de melhoramento na fabricação desses inseticidas. Com isso, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência de fatores abióticos na efetividade do Bti em larvas de *Aedes aegypti* em duas estações climáticas em condições simuladas de campo.

## MÉTODOS

*Manutenção da população de Ae. aegypti em laboratório para a realização do bioensaio*

Para a realização do bioensaio foram utilizadas larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* que foram obtidas da colônia mantida no Laboratório de Entomologia Médica (LABEM) do CESC/UEMA. As larvas foram criadas sob condições de temperatura média de  $26 \pm 2$  °C, umidade relativa a 85 % e fotofase de 12 horas.

Inicialmente foram colocados ovos para eclosão, e após a mesma, as larvas receberam alimento diariamente, consituído de amido de milho triturados. A cada dois dias, foi realizada a limpeza das bacias, com a troca de 1/3 da água, para evitar a formação de película e a proliferação de microorganismos. As larvas foram mantidas nas bacias até chegar ao terceiro estágio, momento no qual foram selecionadas para serem utilizadas nos experimentos. As larvas não selecionadas, foram deixadas nas bacias até atingir o estágio de pupa, e posteriormente foram levadas para gaiolas próprias para atingirem o estágio adulto.<sup>6</sup>

Na manutenção dos mosquitos adultos, fêmeas e machos foram alimentados com solução de água e açúcar a 10 %, umedecida em algodão. Para as fêmeas foi oferecido o repasto sanguíneo utilizando-se um hamster (*Mesocricetus auratus*). As fêmeas ingurgitadas foram postas para desovar em copos revestidos de papel-filtro umedecido para evitar dessecação dos ovos. Após o período de oviposição, em média de três a cinco dias, as desovas foram guardadas em caixas de isopor, para conservação dos ovos.

Quando necessárias larvas para a realização dos bioensaios, as desovas de *Ae. aegypti* foram transferidas para bacias de plástico contendo água potável e alimento, seguindo o mesmo ciclo de atividades, como já mencionado anteriormente.

#### *Bioensaio de avaliação do larvicida biológico*

Foram realizados testes sob condições simuladas de campo (TCS) empregado para avaliar a eficácia do larvicida biológico Vecto Bac WG *Bacillus thuringiensis* sorotipo H-14, formulação a base de grânulos dispersíveis em água, concentrado seco (Potência aproximada 3000 Bt ITU/mg), para a realização do experimento utilizou-se 0,08 gramas de larvicida, bem como os fatores envolvidos na persistência de sua atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti*. O experimento foi conduzido na Universidade Estadual do Maranhão/UEMA, Campus do Centro de Estudos Superiores de Caxias-CESC.

Os bioensaios foram realizados seguindo os métodos descritos por Araújo (2006).<sup>24</sup> Na realização dos bioensaios foram utilizados tanques de cimento (48 x 24 cm), escolhidos devido à alta frequência desses recipientes com larvas de *Ae. aegypti* na região. Foram utilizados 20 tanques com capacidade para 20 litros cada. O experimento consistiu-se em 20 tanques montados da seguinte maneira: 10 tanques posicionados de forma que ficassem expostos aos fatores ambientais durante todo o dia, sendo cinco tratados com o biolarvicida e cinco mantidos sem tratamento, servindo como controle negativo. Outros 10 tanques foram colocados no interior de uma área coberta protegida da ação da chuva e radiação solar. O acompanhamento da atividade larvicida foi feita segundo dois parâmetros: a) Eficácia inicial do larvicida foi estimada pela mortalidade larval nas primeiras 24 horas após a aplicação do produto e b) Persistência do produto definida com o período em dias durante o qual a mortalidade foi  $\geq 80$  %, que foi medida pela introdução semanal de 25 larvas de terceiro estágio em cada tanque e foram realizadas leituras de mortalidade das larvas, a cada 24 horas, no período matutino.

#### *Coleta de dados dos Fatores ambientais*

Durante a realização do bioensaio foram coletados dados semanais de insolação, pluviometria e temperatura, fornecidos pela Estação Meteorológica e Climatológica Principal de Caxiasque fica a 265m de distância do local de realização do experimento, para verificar a influencia desses fatores sobre a persistência do biolarvicida testado. O experimento foi realizado em dois períodos, seco (setembro a dezembro) e chuvoso (fevereiro a maio).

#### *Reciclagem bacteriana*

A verificação do crescimento bacteriano nestes tanques se deu pela contagem semanal de Unidade Formadora de Colônia (UFC/ml) em amostras retiradas dos recipientes tratados.

Em cada recipiente foram retiradas 3 amostras de 1 ml de água, coletados em 3 pontos distintos do tanque, totalizando 3 ml acondicionados em um tubo Falcon. A coleta da água foi realizada logo nas primeiras 24 horas após o início do experimento, e a cada sete dias, após a aplicação do Bti. As amostras foram encaminhadas ao LABEM. As amostras coletadas foram submetidas a choque térmico (80 °C/12 min e /0 °C/5 min), usado para eliminar células vegetativas e bactérias não esporulantes da suspensão, posteriormente submetidas à diluição seriada de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  em água destilada. Alíquotas de 100 µl de cada diluição foram homogeneizadas e em seguida semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura Agar nutriente, posteriormente espalhada na placa com auxílio de uma alça de Drigalsky, sendo que para cada diluição foram preparadas duas réplicas. Em seguida as placas foram invertidas e armazenadas para o crescimento das colônias em estufa bacteriológica a 28 °C, durante 48 horas.

Após esse período, foi feita a identificação das bactérias obtidas e a contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC/ml) baseada no modelo de contagem em placa.<sup>25</sup>

#### *Contagem das colônias bacterianas*

A contagem foi realizada por meio da multiplicação da quantidade de colônias na placa x 10 (valor da diluição) x 10 (quantidade da diluição aplicada na placa).<sup>25</sup>

#### *Análise dos dados*

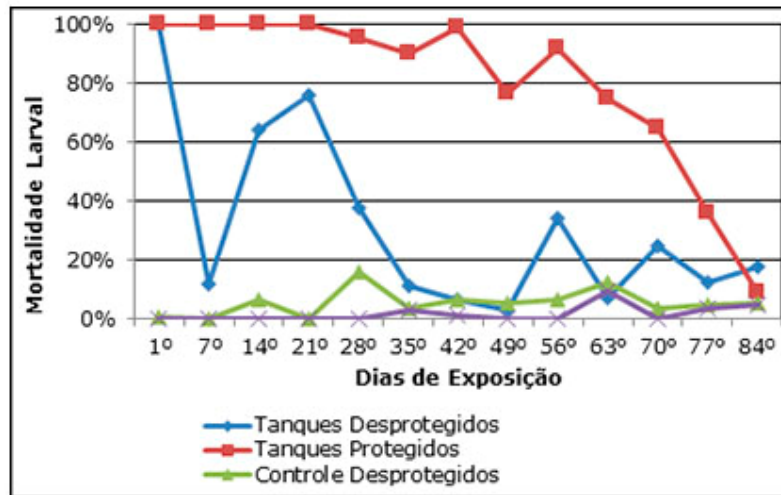
Os dados foram digitados em planilhas do Programa Microsoft Office Excel 2007, para montagem de um banco de dados e construção de gráficos e tabelas.

## **RESULTADOS**

#### *Período seco*

Os bioensaios mostraram alta mortalidade das larvas nos tanques expostos aos fatores ambientais somente nas primeiras 24 horas de exposição das larvas a ação da bactéria, com percentual de 100 %, observando uma queda acentuada logo na segunda semana para 12 %. Nos tanques protegidos dos fatores ambientais, foi verificado que a persistência do larvicida foi de 42 dias, com percentual de mortalidade entre 100 e 80 %. Os tanquescontroles negativos apresentaram

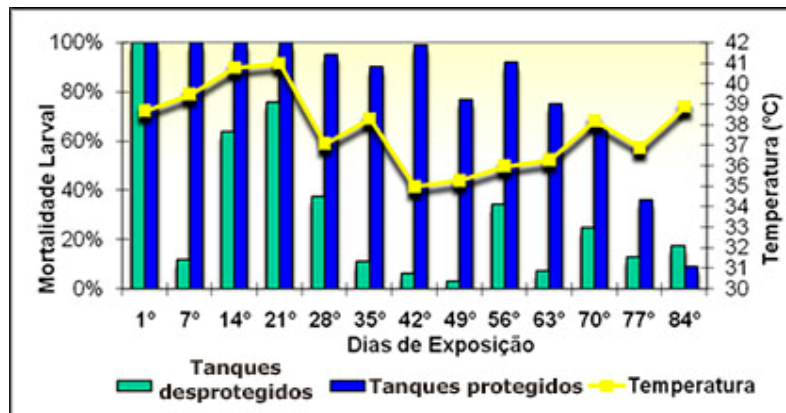
mortalidad e inferior a 20 %, tanto os que estavam protegidos, quanto os que ficaram expostos aos fatores ambientais (Fig. 1).



**Fig. 1.** Percentual de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* utilizadas no bioensaio com o larvicida biológico WG, realizado no Campus do CESC/UEMA no período seco (setembro a dezembro) de 2011.

As figuras 2, 3 e 4 demonstram respectivamente os dados de mortalidade em relação à temperatura máxima semanal, insolação e níveis pluviométricos semanais registrados no período de setembro a dezembro de 2011.

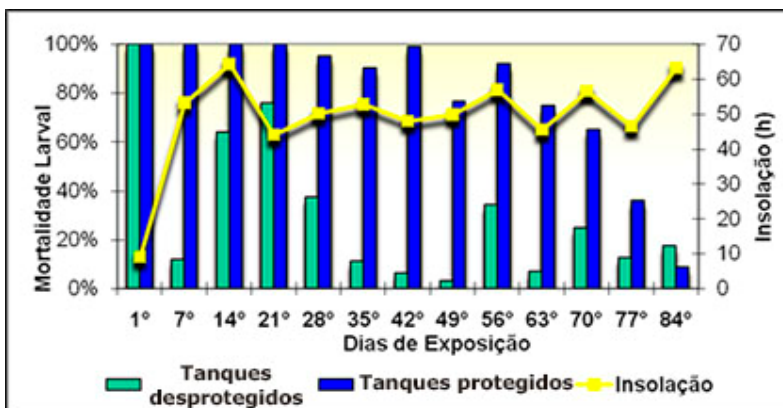
Em relação à temperatura verificou-se que na primeira semana de realização do experimento obtiveram-se os maiores valores registrados, com máxima de 38,7 °C e permanecendo bastante elevada até o 21° dia, com 41 °C. Neste período verificou-se a maior redução na efetividade do larvicida em tanques exposto aos fatores ambientais, contrariamente aos que estavam protegidos que não verificou-se redução na efetividade do larvicida (Fig.2).



**Fig. 2.** Percentual de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* em relação à temperatura máxima semanal verificada no bioensaio realizado no Campus do CESC/UEMA no período seco (setembro a dezembro) de 2011.

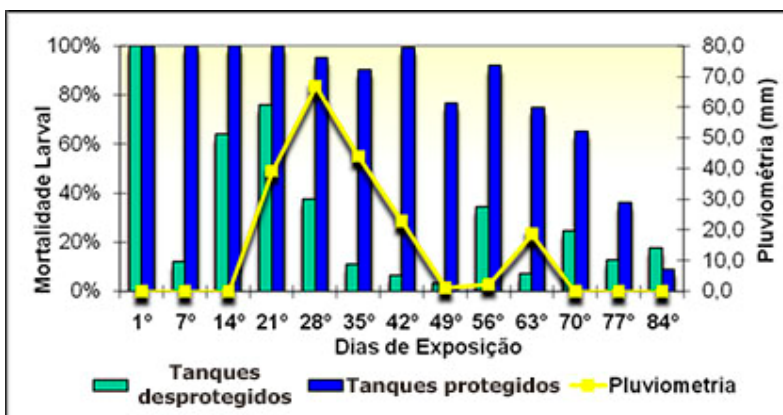
O mesmo resultado foi observado para insolação, sendo que nas primeiras semanas de experimento foi o período que obteve-se maior horas de sol, cujo o maior registro foi 64,4 horas semanal, coincidindo com o período de maior redução nos

índices de mortalidade nos tanques expostos aos fatores ambientais, enquanto que neste mesmomomento, nos tanques protegidos não foi observado queda na mortalidade larval (Fig. 3).



**Fig. 3.** Percentual de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* em relação à insolação semanal verificada no bioensaio realizado no Campus do CESC/UEMA no período seco (setembro a dezembro) de 2011.

A realização dos bioensaios, ocorreu chuvas no 21º (39,3 mm), com maior pico no 28º (66,9mm) e com menor intensidade nas semanas seguintes 35º (44 mm) e 42º (22,9 mm), período no qual observou-se uma redução contínua nos índices de mortalidade nos tanques expostos aos fatores ambientais (Fig. 4).



**Fig. 4.** Percentual de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* em relação aos índices pluviométricos verificados no bioensaio realizado no Campus do CESC/UEMA no período seco (setembro a dezembro) de 2011.

A viabilidade do larvicida foi medida semanalmente por meio da contagem de esporos viáveis nos tanques tratados. Os dados da tabela 1 mostram a relação da mortalidade larval e da viabilidade microbiológica para os tanques que estavam

A viabilidade do larvicida foi medida semanalmente por meio da contagem de esporos viáveis nos tanques tratados. Os dados da tabela 1 mostram a relação da mortalidade larval e da viabilidade microbiológica para os tanques que estavam protegidos dos fatores ambientais e os desprotegidos. Pode-se observar que nas primeiras 24 horas de experimento, obtiveram-se taxas de esporos de  $1,2 \times 10^3$  e



$1,5 \times 10^3$  nos tanques expostos aos fatores ambientais e os protegidos desses fatores respectivamente, nesta leitura, obteve-se mortalidade de 100 % em ambos os ambientes.

Ao longo do desenvolvimento do experimento, pode-se verificar que o número de esporos viáveis variou juntamente com a mortalidade larval, o que pôde ser verificado principalmente nos tanques protegidos, nos quais observou-se que nas primeiras semanas houve um maior número de esporos viáveis, o que foi observado até o 28º de experimento, coincidindo com o período de maior mortalidade larval, com valores em torno de 100 %.

Na contagem de esporos viáveis dos recipientes expostos aos fatores ambientais, notou-se um comportamento semelhante, no qual observou-se que quando há diminuição dos esporos, há também uma redução no percentual de mortalidade, como mostra a tabela 1. No entanto foi possível verificar que a redução do número de esporos é mais acentuada nesses recipientes, quando comparados no mesmo período, com os tanques protegidos dos fatores ambientais. Verificou-se uma queda acentuada da concentração de esporos logo na segunda semana de experimento, acompanhada da redução também acentuada da mortalidade das larvas. Na leitura 14º dia houve um aumento de cerca de 50 % na mortalidade, concomitantemente teve-se uma elevação no número de esporos viáveis, aumento que manteve-se até a semana seguinte, com viabilidade microbiológica de  $1,6 \times 10^3$  e mortalidade de 76 %, com redução dos índices de mortalidade e esporos viáveis na leitura do 28º. No entanto, 35º dia de experimento apesar da elevação do número de esporos, houve uma redução da mortalidade.

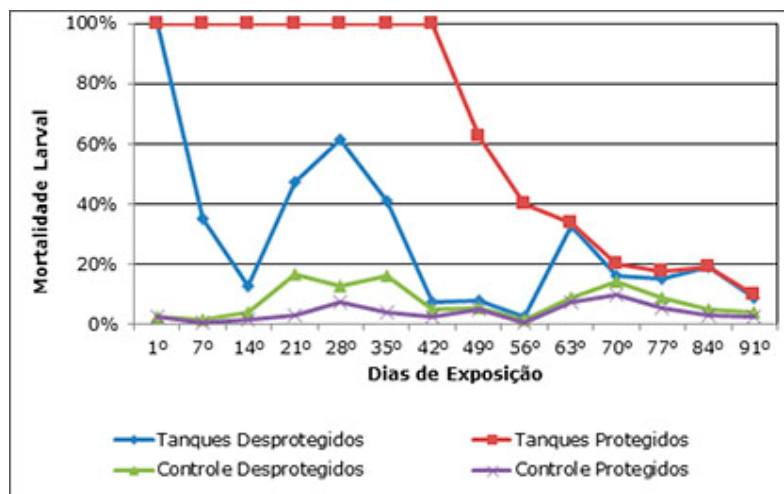
A partir do 42º dia de exposição verificou-se elevações intercaladas com redução tanto da efetividade do larvicida contra as larvas de *Ae. aegypti* como da viabilidade dos esporos até o 84º dia de experimento (Tabela 1).

#### *Período chuvoso*

Os dados da efetividade do larvicida no experimento realizado no período chuvoso estão demonstrados na figura 5. Nos tanques desprotegidos somente nas primeiras 24 horas de exposição das larvas a ação da bactéria, obteve-se mortalidade com percentual de 100%, observando uma queda logo na segunda semana para 35 %. No entanto nos tanques protegidos a efetividade manteve-se por 42 dias, período em que manteve percentual de mortalidade larvária de 100 %, a partir do 49º houve redução para 62 %, sendo que nas leituras seguintes houve apenas quedas progressivas na mortalidade larval, atingindo índices de 20 % aos 70º dia e diminuindo sucessivamente até os 91º dia com mortalidade de 10 %. Durante a realização do experimento os tanques controles negativos apresentaram mortalidade e inferior a 20 %, tanto os que estavam protegidos quanto os tanques que ficaram expostos aos fatores ambientais.

**Tabela 1.** Atividade tóxica e concentração de esporos viáveis do larvicida biológico a base de *Bacillus thuringiensis*, estimada em bioensaio contra larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*

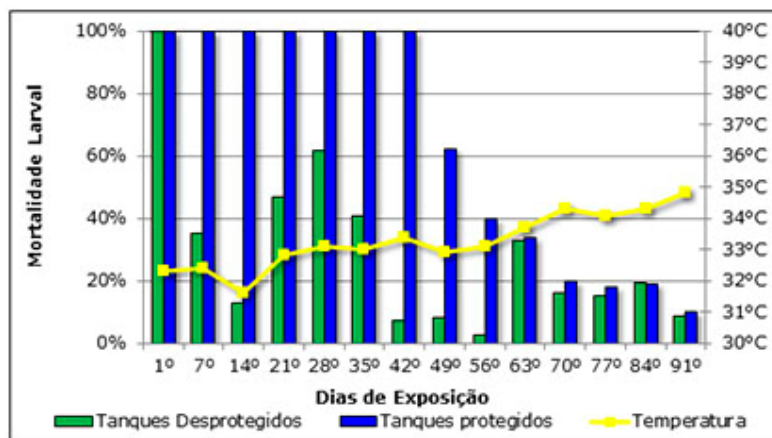
Dias	TANQUES DESPROTEGIDOS		TANQUES PROTEGIDOS	
	Mortalidade (%)	Viabilidade Microbiológica (UFC/ml)	Mortalidade (%)	Viabilidade Microbiológica (UFC/ml)
1º	100	1,2x10 <sup>3</sup>	100	1,5x10 <sup>3</sup>
7º	12	2,8x10 <sup>2</sup>	100	1,2x10 <sup>3</sup>
14º	64	2,3x10 <sup>2</sup>	100	2,4x10 <sup>3</sup>
21º	76	1,6x10 <sup>3</sup>	100	2,4x10 <sup>3</sup>
28º	37,6	5,0x10 <sup>2</sup>	95,2	1,9x10 <sup>3</sup>
35º	11,2	1,5x10 <sup>3</sup>	90,4	7,6x10 <sup>2</sup>
42º	6,4	6,7x10 <sup>2</sup>	99,2	1,3x10 <sup>3</sup>
49º	3,2	7,3x10 <sup>2</sup>	76,8	1,7x10 <sup>3</sup>
56º	34,4	8,7x10 <sup>2</sup>	92	1,87x10 <sup>3</sup>
63º	7,2	6,5x10 <sup>2</sup>	75	1,17x10 <sup>3</sup>
70º	24,8	4,3x10 <sup>2</sup>	65	8,87x10 <sup>2</sup>
77º	12,8	2,3x10 <sup>2</sup>	36	6,12x10 <sup>2</sup>
84º	17,6	2,7x10 <sup>2</sup>	9	4,15x10 <sup>2</sup>



**Fig. 5.** Percentual de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* utilizadas no bioensaio com o larvicida biológico WG, realizado no campus do CESC/UEMA no período chuvoso (fevereiro a maio) de 2012.

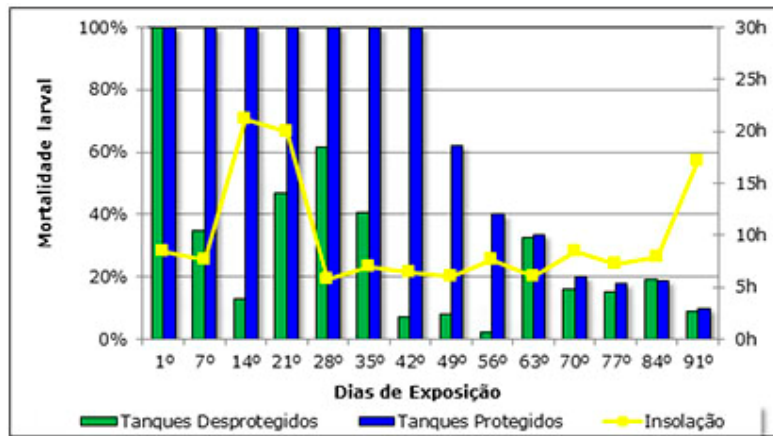
Os dados de mortalidade em relação à temperatura máxima semanal, insolação e níveis pluviométricos registrados no período de fevereiro a maio de 2012; estão demonstrados nas [figuras 6, 7 e 8](#).

Verificou-se primeiramente em relação à média de temperatura máxima semanal que durante todo o andamento do experimento os índices variaram entre 30 °C e 35 °C. Na primeira e segunda semana de experimento obtiveram-se índices de 32,3 °C e 32,4 °C respectivamente; neste período verificou-se redução na efetividade do larvicida em tanques expostos aos fatores ambientais, sendo que nos recipientes protegidos os índices de mortalidade permaneceram de 100 %. Aos 14º dia observou-se que a temperatura caiu para 31,6 °C, concomitantemente também teve-se queda na mortalidade nos tanques desprotegidos o que pode ter sido influenciado pelas altas temperaturas das semanas anteriores ([Fig.6](#)).



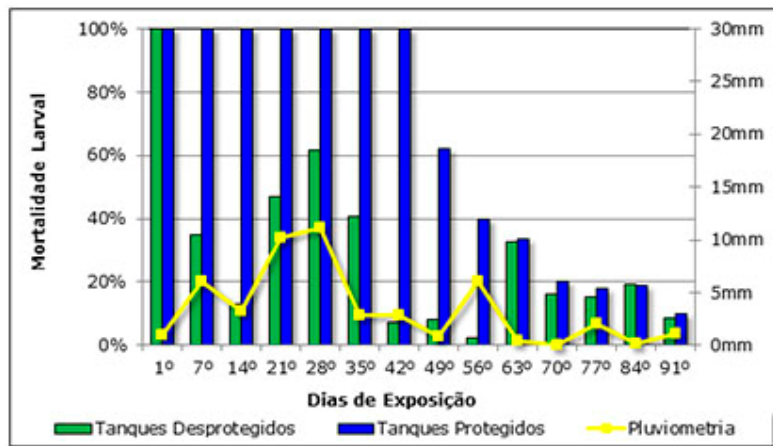
**Fig. 6.** Percentual de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* em relação à temperatura máxima semanal verificada no bioensaio realizado no Campus do CESC/UEMA no período chuvoso (fevereiro a maio) de 2012.

Os resultados observados para insolação teve-se poucas horas de sol sendo que os maiores registros foram obtidos no 14º e 21º dias de experimentos com 21,2 e 20,3 horas semanais, coincidindo com o período de redução no índice de mortalidade nos tanques expostos aos fatores ambientais, enquanto que neste mesmo momento nos tanques protegidos não foi observado queda na mortalidade larvária, a partir dos 28º aos 49º dias a média de insolação semanal permaneceu estável o que pôde-se observar queda progressiva nos recipientes desprotegidos, já os tanques protegidos apresentou queda a partir da leitura dos 49º dia. Aos 56º, 70º e 91º dias houve uma pequena elevação de insolação com índices de 7,6h, 8,4h e 17,1h respectivamente, obtendo queda tanto nos recipientes protegidos quanto os desprotegidos dos fatores ambientais ([Fig.7](#)).



**Fig. 7.** Percentual de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* em relação à insolação semanal verificada no bioensaio realizado no Campus do CESC/UEMA no período chuvoso (fevereiro a maio) de 2012.

Em relação à pluviometria verificaram-se registros muitos baixos apesar da época de realização dos experimentos; tendo os maiores picos aos 21º dia com 10,2(mm) e aos 28º dia com 11,2(mm); concomitantemente houve elevação da mortalidade nos tanques desprotegidos, sendo que os protegidos permaneceram com alta mortalidade; a partir de então teve-se menores registros pluviométricos, sendo que aos 56º dia teve índice de 6,0(mm); observando-se que a mortalidade nos tanques expostos aos fatores ambientais teve redução, o que foi observado também nos tanques protegidos, nas leituras das semanas seguintes até o término do experimentos os valores pluviométricos foram quase que desprezíveis (Fig. 8).



**Fig. 8.** Percentual de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* em relação aos índices pluviométricos verificados no bioensaio realizado no Campus do CESC/UEMA no período chuvoso (fevereiro a maio) de 2012.

Os dados da tabela 2 mostram a relação da mortalidade larval e da viabilidade microbiológica. Sendo observado que nas primeiras 24 horas obtiveram-se taxas de esporos de  $2,1 \times 10^3$  e  $2,7 \times 10^3$  nos tanques desprotegidos e protegidos dos fatores ambientais com mortalidade de 100 %.

Conforme o andamento do experimento averigua-se maior numero de esporos viáveis com apenas pequenas variações na viabilidade desses esporos, nos tanques protegidos até os 42º dia coincidindo com o período de maior mortalidade larval em

torno de 100 %. Ao longo do desenvolvimento do experimento pode-se verificar que a quantidade de esporos variou juntamente com a mortalidade. A partir dos 49º dias até o término do experimento tem se redução nos números de esporos o que também foi observado que a mortalidade larvária nos tanques protegidos também reduziu progressivamente.

Nos tanques desprotegidos notou-se que quando há diminuição dos esporos também se tem diminuição da mortalidade. No entanto foi possível verificar que a redução do número de esporos também é mais acentuada nesses recipientes, quando comparados no mesmo período, com os tanques protegidos dos fatores ambientais. Verificando-se uma queda dos esporos no 7º dia com  $3,5 \times 10^2$  e aos 14º dias com  $3,6 \times 10^2$  observando redução acentuada da mortalidade das larvas; nas leituras dos 21º e 28º dias houve um aumento dos esporos viáveis de  $1,2 \times 10^3$  e  $2,3 \times 10^3$  respectivamente teve-se elevação da mortalidade. Aos 35º dia ouve uma pequena redução da mortalidade, mas o numero de esporos manteve-se elevado com  $2,9 \times 10^3$ .

A partir dos 42º dias de exposição dos tanques obteve-se redução intercalares tanto da mortalidade larval quanto da viabilidade microbiológica, sendo que aos 63º dias houve um aumento da mortalidade, mas os esporos viáveis mantiveram-se baixo com  $2,3 \times 10^2$ , nas leituras seguintes obtiveram-se taxas de esporos baixas até o término do experimento (Tabela 2).

**Tabela 2.** Atividade tóxica e concentração de esporos viáveis do larvicida biológico a base de *Bacillus thuringiensis*, estimada em bioensaio contra larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*

Dias	TANQUES DESPROTEGIDOS		TANQUES PROTEGIDOS	
	Mortalidade (%)	Viabilidade Microbiológica (UFC/ml)	Mortalidade (%)	Viabilidade Microbiológica (UFC/ml)
1º	100	$2,1 \times 10^3$	100	$2,7 \times 10^3$
7º	35	$3,5 \times 10^2$	100	$3,5 \times 10^3$
14º	13	$3,6 \times 10^2$	100	$2,9 \times 10^3$
21º	47	$1,2 \times 10^3$	100	$1,6 \times 10^3$
28º	61,6	$2,3 \times 10^3$	100	$2,8 \times 10^3$
35º	40,8	$2,9 \times 10^3$	100	$3,0 \times 10^3$
42º	7,2	$2,2 \times 10^2$	100	$2,4 \times 10^3$
49º	8	$3,5 \times 10^2$	62	$4,9 \times 10^2$
56º	2,4	$6,7 \times 10^2$	40	$6,6 \times 10^2$
63º	32,8	$2,3 \times 10^2$	33,6	$2,1 \times 10^2$
70º	16	$4,8 \times 10^2$	20	$3,4 \times 10^2$
77º	15,2	$3,8 \times 10^2$	18	$4,6 \times 10^2$
84º	19,2	$5,4 \times 10^2$	19	$3,7 \times 10^2$
91º	8,8	$1,5 \times 10^2$	10	$2,7 \times 10^2$

## DISCUSSÃO

A contínua utilização de inseticidas químicos pode selecionar populações de insetos resistentes.<sup>15</sup> Essa problemática da resistência a esses inseticidas e a crescente conscientização de problemas de poluição ao meio ambiente, resultaram no desenvolvimento de alternativas para o controle do mosquito, tais como o uso de agentes biológicos.<sup>19</sup>

O larvicida biológico Vecto Bac® WG, composto de *B. thuringiensis* var. *israelenses* apresenta boa eficácia inicial tanto em situação de exposição aos fatores ambientais quanto protegidos desses fatores. Em relação à eficiência do mesmo, foi observada que é maior em recipientes protegidos dos fatores ambientais no qual se observou nos períodos seco e chuvoso que a efetividade é de aproximadamente 42 dias. Por outro lado nos recipientes expostos aos fatores ambientais a redução da efetividade acontece a partir da segunda semana sendo que essa queda é bastante acentuada no período seco, a partir de então durante os dois períodos de realização do experimento a efetividade do larvicida nos recipientes desprotegidos variaram.

De acordo com Soares-da-Silva et al. (2009)<sup>26</sup> em seus estudos também realizados em Caxias, logo verificaram que a efetividade e persistência dos larvicidas pode variar bastante de acordo com os fatores ambientais. Esses autores mostraram que a efetividade nos recipientes totalmente protegidos dos fatores ambientais, é mais elevada, permanecendo com mortalidade de 100 % até 28º dia de exposição, enquanto nos expostos aos fatores ambientais a mortalidade de 100 % só foi observada nas primeiras 24 horas de teste. Assim, a eficiência dos inseticidas empregados no controle dos vetores devem sempre ser avaliados nas diferentes regiões com a finalidade de verificar a influência das condições climáticas sob a persistência dos formulados.<sup>23</sup>

Esses dados mostram que apesar da excelente atuação dessa bactéria no controle de larvas de culicídeos, são necessários estudos que mostrem a ação das diferentes formulações comercializadas, nas distintas situações ambientais, para que dessa forma possa estabelecer formulações mais eficientes para cada condição. Neste sentido os testes tiveram como parâmetros avaliar a eficácia do larvicida em relação aos fatores ambientais predominantes na região onde foi realizado o experimento.<sup>21</sup>

Além das condições ideais para realização dos testes é necessário observações quanto aos parâmetros ambientais. Nesse estudo, durante os experimentos, pode-se observar que as radiações solares, temperatura e os índices pluviométricos diminuíram o poder residual do larvicida à base de Bti, fato verificado de forma especial no período seco, onde as altas temperaturas e as horas prolongadas de sol afetaram negativamente a eficácia do larvicida. No período chuvoso a influência desses fatores foi menor, mas afetou também essa efetividade, sendo que nos dois períodos de realização dos experimentos observaram-se poucos índices pluviométricos proporcionando assim queda na mortalidade larvária.

Por meio da contagem dos esporos viáveis, pôde-se observar ainda que nos recipientes desprotegidos, há uma redução mais rápida no número de esporos viáveis, o Bti eficientemente recicla-se em tanques de cimento com larvas de *Ae. Aegypti*. Outros estudos feitos por Vilarinhos et al. (1997);<sup>27</sup> Habib & Andrade (1998),<sup>28</sup> verificaram que as formulações de Bti apresentam limitações na sua utilização, a principal delas é a pequena atividade residual, especialmente em águas com muita matéria orgânica e a baixa persistência no ambiente devido aos fatores a que são expostos. Nesta pesquisa nota-se nitidamente que conforme tem-se aumento da viabilidade microbiológica, há elevação nos índices de mortalidade

larvária, sendo que no período chuvoso observa-se que a concentração de esporos ao decorrer do experimento é um pouco mais elevado do que no período seco.

Testes realizados no Brasil com formulações líquidas e sólidas mostraram resultados variáveis quanto ao efeito residual do Bti, para o controle de *Ae. aegypti*, com variação da efetividade de 15 a 180 dias. Araújo (2006)<sup>24</sup> consideram que estas diferenças estejam mais associadas a falhas nos métodos empregados na avaliação dos produtos do que ao desempenho dos mesmos.

Com base nos experimentos realizados no presente estudo na cidade de Caxias, Maranhão, constatou-se que a radiação solar, temperatura e pluviometria interferem na eficiência do VectoBac WG, mas apesar disto os esporos de Bti têm um grande poder residual através do cadáver das larvas, o que influencia na eficácia do biolarvicida por muito mais tempo, pois mantém o microorganismo no ambiente por períodos prolongados. Verificou-se que a efetividade do larvicida foi maior em recipientes mantidos protegidos dos fatores ambientais.

Esses resultados evidenciam que o produto tem menor efetividade em regiões de clima quente, com muita insolação e nos locais onde os recipientes de armazenamento de água estão localizados no extradomicílio, expostos aos fatores ambientais, por isso há necessidade de melhorar as formulações para atender essa necessidade.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão-FAPEMA. À ValentBiosciences e aos Colaboradores do LABEM.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gubler DJ, Reiter P, Ebi KL, Yap W, Nasci R, Patz JÁ. Climate Variability and Change in the United States: Potential Impacts on Vector- and Rodent-Borne Diseases. *Environ Health Perspectives*. 2001;109:223-233.
2. Melo-Santos MAV & Regis LN. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Estudos Populacionais e Estratégias Integradas para Controle Vetorial em Municípios da Região Metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007 [Tese]. Doutorado em Saúde Pública - Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz; 2008.
3. MS - Ministério da Saúde. SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue. Análise de situação e tendências; 2012.
4. Forattini OP. *Culicidologia Médica*. Vol. 2. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002.
5. Rocha LA & Tauil PL. Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2009;42:18-22.

6. Consoli RAGB & Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1994.
7. Tauil PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. Cad. Saúde Pública. 2002;18:867-871.
8. Ribeiro AF, Marques GRAM, Voltolini JC & Condino MLF. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. Rev. Saúde Pública. 2006;40:671- 6.
9. Teixeira MG, Costa MCN, Barreto F & Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. Cad. Saúde Pública. 2009;1:7-18.
10. Camargo MF, Santos AH, Oliveira AWS, Abraão N, Alves RBN & Isac E. Avaliação da ação residual do larvicida temefós sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. Rev. Patol. Trop. 1998;27:65-70.
11. Oliveira RM. A dengue no Rio de Janeiro: repensando a participação popular em saúde. Cad. Saúde Pública. 1998;69-78.
12. Rebêlo JMM, Costa JML, Silva FS, Pereira YNO & Silva JM. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. Cad. Saúde Pública. 1999;(15):477-486.
13. Carvalho MSLED, Caldas ND, Vilarinhos PTR, Souza LCKR, Yoshizawa MAC, Knox MB & Oliveira C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. Rev. Saúde Pública. 2004;(38):623-629.
14. Soares-da-Silva J. Controle da Dengue: Isolamento, Caracterização Molecular e Atividade Larvicida de *Bacillus thuringiensis* BERLINER 1911 em *Aedes aegypti* LINNAEUS 1762 (DIPTERA: CULICIDAE) [Dissertação]. Manaus-AM: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Programa de Pós-Graduação em Entomologia; 2011.
15. Martins AJ, Ribeiro CDM, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, et al. Effect of Insecticide Resistance on Development, Longevity and Reproduction of Field or Laboratory Selected *Aedes aegypti* Populations. PLoS ONE. 2012; 7: e31889. Doi:10.1371/journal.pone.0031889.
16. Polanczyk RA & Alves SB. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. Agrociência. 2003;2:1-10.
17. Augusto LGS, Carneiro RM & Martins PH. Abordagem Ecológica em Saúde - Ensaio para o controle de Dengue. Ed. Universitária da UFPE. 2005; Recife, PE. 320p.
18. Rabinovitch L, Silva CMB & Alves RSA. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: Melo IT & JL Azevedo. Controle biológico. Embrapa. 2000;17-85 p.
19. Lima JBP, Melo NV & Valle D. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2005;47:125-130.
20. Gloria CR, Jorge S & Sergio O. Treatment of an *Aedes aegypti* colony with the Cry11Aa toxin for 54 generations results in the development of resistance. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2012;107:74-79.



21. Becker N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles JF, A Delécluse & C Nielsen-Leroux (eds). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 2000;383-396p.
22. Couch TL. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: Charles JF, A Delécluse & C Nielsen-Leroux (eds). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 2000;297-314 p.
23. Campos J & Andrade CFS. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. Unicamp, Campinas SP. Rev. Saúde Pública. 2001;35:236-6.
24. Araújo AP. Avaliação de um biolarvicida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*, desenvolvido no Brasil, para o controle do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) [Dissertação]. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco; 2006.
25. Alves SB. Controle Microbiano de Insetos. Vol. 4. Piracicaba-SP: Fundação de Estudos Luiz de Queiroz; 1998.
26. Soares-da-Silva J, Pinheiro VCS & Tadei WP. Avaliação Experimental de duas Formulações de Larvicida Biológico *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, no Controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), em Caxias, MA [Monografia]. Caxias-MA: Universidade Estadual do Maranhão. Curso de Licenciatura em Ciências com Habilitação em Biologia; 2009.
27. Vilarinhos PTR, Dias JMCS, Andrade CFS & Araújo-Coutinho CJPC. Uso de bactérias para o controle de mosquitos e simúlideos. In: Alves SB. Controle Microbiano de Insetos. No prelo (ed), 2. Ed., Brasil: Editora Manole; 1997.
28. Habib MEM & Andrade CFS. Bactérias Entomopatogênicas. In: Alves SB. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: Editora Manole; 1998.

Recibido: 7 de mayo de 2013.

Aprobado: 28 de febrero de 2014.

Valéria Cristina Soares Pinheiro. Curso de Ciências Biológicas, Laboratório de Entomologia Médica, Universidade Estadual do Maranhão/Centro de Estudos Superiores de Caxias-CESC/UEMA. Praça Duque de Caxias, s/n, Morro do Alecrim, Caxias - MA, 65600-000, Brasil.  
Correo electrónico: [vcpinheiro@hotmail.com](mailto:vcpinheiro@hotmail.com)  
[antoniasantosbio@hotmail.com](mailto:antoniasantosbio@hotmail.com)