



UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DE UM BIOLARVICIDA À BASE DE
Bacillus thuringiensis SOROVAR. *israelensis*, DESENVOLVIDO NO
BRASIL, PARA O CONTROLE DO *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)

ANA PAULA DE ARAÚJO

RECIFE
2006

ANA PAULA DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DE UM BIOLARVICIDA À BASE DE
Bacillus thuringiensis SOROVAR. *israelensis*, DESENVOLVIDO
NO BRASIL, PARA O CONTROLE DO *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Animal, do Departamento de Zoologia do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, para
a obtenção do título de Mestre em Biologia
Animal.

ORIENTADORA

Dra. Lêda Regis

RECIFE

2006

Araujo, Ana Paula de

Avaliação de um biolarvicida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*, desenvolvido no Brasil, para o controle do *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) / Ana Paula de Araújo. – Recife: A Autora, 2006.

80 folhas : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. Biologia Animal.

Inclui anexos

1. Aedes Aegypti – Controle Biologico 2. Diptera I. Título.

**595.77
595.77**

**CDD (22.ed.)
CDU (2.ed.)**

**UFPE
CCB - 2006 -004**

ANA PAULA DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DE UM BIOLARVICIDA À BASE DE *Bacillus thuringiensis* SOROVAR. *israelensis*, DESENVOLVIDO NO BRASIL, PARA O CONTROLE DO *Aedes aegypti* (DIPTERA:CULICIDAE)

Orientadora:


Dra. Lêda Regis (Orientadora)
Deptº de Entomologia - CPqAM/FIOCRUZ

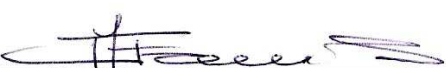
Examinadores:

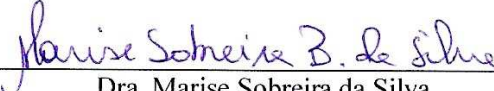

Dra. Christine Lamenha Luna
Deptº de Química e Meio Ambiente/UNICAP


Dra. Maria Helena N. L. Silva Filha
Deptº de Entomologia - CPqAM/FIOCRUZ


Dra. Cláudia M. Fontes de Oliveira
Deptº de Entomologia - CPqAM/FIOCRUZ

Suplentes:


Dra. Ângela Maria Isidro de Farias
Deptº de Zoologia /UFPE


Dra. Marise Sobreira da Silva
Deptº Ciências Naturais-FFPNM/UPE

RECIFE

2006

Dedico este trabalho a pessoas super importantes para mim, que dão sentido ao meu viver: Ana Cristina (Minha mãe, a luz da minha vida), meus avós, primos e tias e em especial a Erick Henrique e Maria Alice Varjal. Sem eles eu nunca teria conseguido, amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me guiado, me protegido e ter colocado pessoas iluminadas em minha vida.

À Dra. Lêda Régis e Maria Alice Varjal de Melo Santos pela orientação, paciência, amizade, incentivo e ensinamentos imprescindíveis a realização deste trabalho.

Ao Mestrado em Biologia Animal, sob a Coordenação da Dra. Maria Eduarda de Larrazábal, Vice-Coordenação do Dr. Simão Vasconcelos e a secretária Ana Elisabete Fraga, bem como aos professores, pelos incentivos e apoio constantes.

À Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia, na pessoa do Dr. Simão Vasconcelos e Dra. Ângela Maria Isidro de Farias pela concessão do espaço físico da Casa de Vegetação, onde foram conduzidos os testes realizados neste trabalho.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM, Departamento de Entomologia, pela infra-estrutura e fornecimento do material necessário para a realização deste trabalho.

À Dra. Eugênia Maranhão Rios pela amizade, confiança e fornecimento dos produtos testados neste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) na pessoa do Dr. Paulo Rela pela contribuição no processo de irradiação de um produto testado neste trabalho.

À Dra. Cláudia Fontes, Dra. Maria Helena Silva Filha, Dra. Cristine Lamenha Luna, Dra. Ângela Maria Farias e Dra. Marise Sobreira da Silva, pelas contribuições científicas dadas a esta dissertação.

Ao Dr. André Furtado, pela contribuição científica, a Dra. Constância Ayres e Dra. Cleide Albuquerque pela amizade, incentivos e exemplos constantes.

Aos amigos do Departamento de Entomologia/ CPqAM, Ana Lúcia, Alaíde, Daniela Anastácio, Jorge, Sidney Oliveira, Gleice, Elida e Mércia e da Bioticom, Gilvanda Ribeiro pelo apoio, colaborações e contribuições diretas na realização deste trabalho.

Aos amigos do mestrado, turma/2004, em especial à Ilca Priscila, Juliana, Lidiane, Walter Fabrício e Maria pela amizade e incentivos durante o curso.

À minha família, em especial à Ana Cristina, Erick Henrique, Maria Joselina, e Manuel Cabaíba pela dedicação, apoio, carinho, força e companheirismo constantes.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Página

- Tabela 1** Atividade tóxica de amostras de pó técnico de *Bacillus thuringiensis israelensis*, provenientes de diferentes lotes de produção, estimada através de bioensaios contra larvas de 4º estágio de *Aedes aegypti*-Recife-Lab. Foram utilizadas em média 480 larvas na avaliação de cada teste. 47
- Tabela 2** Atividade tóxica de amostras de pó técnico de *Bacillus thuringiensis israelensis*, provenientes de diferentes lotes de produção, estimada através de três bioensaios contra larvas de 4º estágio de *Aedes aegypti*-Recife-Lab. Foram utilizadas, em média 1.440 larvas na avaliação de cada teste. 48
- Tabela 3** Atividade larvicida residual de amostras de diferentes lotes de pó técnico e comprimido à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, contra larvas de *Aedes aegypti*-Recife-Lab, em testes realizados em recipientes à sombra, no período de fevereiro de 2005 a março de 2006. Todos os testes foram feitos em triplicata. 49
- Tabela 4** Mortalidade de larvas de 4º estágio de *Aedes aegypti*, segundo o tempo de armazenamento de comprimidos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, provenientes de dois diferentes lotes de produção, mantidos em temperatura ambiental variando de 25º a 27º C e umidade relativa de 60% a 80%. Os testes foram realizados em intervalos trimestrais, num período total de um ano. 50

Artigo 2

- Tabela 1** Atividade tóxica e concentração de esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis israelensis* observada para o pó técnico submetido à radiação gama, mensuradas através de bioensaios de laboratório e plaqueamento bacteriano, respectivamente. 76

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1	Página
Figura 1 Condições de manutenção dos recipientes experimentais na área teste. Recipiente retangular em plástico transparente na condição de sombra (A) e na condição de sol, destacando o sistema de renovação de água por torneiras e mangueiras (B).	51
Figura 2 Valores de CL ₅₀ dos pós técnicos de um produto experimental à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , em diferentes lotes de produção. A- Incluindo todos os lotes. B- Excluindo o lote 03.	52
Figura 3 Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 01 à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> mensurada contra larvas de 1º estágio de <i>Aedes aegypti</i> , em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade comparados com o nível de insolação semanal, registrado de fevereiro a maio de 2005. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.	53
Figura 4 Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 10 à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> mensurada contra larvas de 1º estágio de <i>Aedes aegypti</i> , em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade comparados com o nível de insolação semanal, registrado de setembro a outubro de 2005. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.	54
Figura 5 Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 10 à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> mensurada contra larvas de 1º estágio de <i>Ae. aegypti</i> , em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade comparados com o nível de insolação semanal. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.	55
Figura 6 Insolação média e temperatura máxima registradas nos meses de janeiro de 2005 a março de 2006, na Região Metropolitana do Recife. Dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.	56

- Figura 1** Relação entre diferentes doses da radiação gama e a viabilidade dos esporos (A) e toxicidade (B) do pó técnico de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, avaliada pelas unidades formadoras de colônias (UFC/ml) e pelas concentrações letais (CL₅₀) em bioensaios contra larvas de *Aedes aegypti*-Recife-Lab. 77
- Figura 2** Concentração de esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis israelensis* em recipientes tratados com pó técnico do produto experimental, contendo esporos ativos ou irradiados (20 KGy de radiação gama), deste patógeno, em ensaios de atividade contra larvas de *Aedes aegypti*. Os recipientes foram mantidos ao abrigo do sol, com reposição de 20% do volume de água três vezes por semana. 78
- Figura 3** Concentração de esporos viáveis em recipientes tratados com o comprimido de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, mantidos ao abrigo do sol, sem renovação de água, colonizados com larvas de *Aedes aegypti* em intervalos semanais ou mensais. 79

RESUMO

Neste trabalho foram determinados a atividade tóxica e o desempenho em campo simulado de um larvicida experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti*. Diferentes lotes de produção de pó técnico (PT) pré-formulado, foram avaliados em bioensaios, para definição das concentrações que eliminam 50% (CL₅₀) das larvas e definição da potência do produto. Um dos lotes foi submetido a diferentes doses de radiação gama para a inativação dos esporos, sendo avaliado quanto à viabilidade microbiológica e toxicidade. As apresentações em comprimido (C) contendo 15% de princípio ativo, em PT e em pó técnico irradiado (PTI) foram testadas nas concentrações de 250 mg/50L de água, em recipientes plásticos, em condições simuladas de campo (TCS). A eficácia inicial do produto foi estimada pela mortalidade de 50 L4 de *Ae. aegypti*, após 48 h de exposição, e a persistência, mortalidade observada ao longo do tempo, pela introdução periódica de 50 L1 e recuperação de pupas. Os recipientes foram submetidos às seguintes variáveis: exposição solar ou sombra, renovação de 20% ou 60% do volume da água periodicamente, e a diferentes frequências de colonização. Amostras de água foram coletadas para a verificação de esporos viáveis (UFC/ml) nos recipientes tratados. Os resultados demonstraram que existem diferentes níveis de toxicidade entre os lotes avaliados em laboratório, mas que estas diferenças não comprometem a atividade larvicida do produto em TCS. A CL₅₀ média foi estimada em $0,26 \pm 0,1$ mg/L, com potência de 750 UTI/mg. A dose de 20 KGy de radiação gama inativou o maior percentual de esporos (99,9%) com menor perda da toxicidade. Em TCS, PTI, PT e C promoveram de 90 a 100% de mortalidade inicial e controle total durante 6 meses, na sombra. Não houve diferenças entre recipientes que sofreram ou não reposição de água, nem entre aqueles colonizados com diferentes números de larvas. A densidade de larvas também não influenciou a concentração de esporos ao longo do experimento. Nos recipientes tratados com PTI as concentrações de esporos viáveis foram inferiores às observadas para o PT em todas as coletas. A exposição solar foi o único fator que limitou o tempo de persistência do produto nos recipientes. Concluímos que o produto avaliado apresenta boa qualidade de produção com níveis altos de toxicidade e excelente persistência.

ABSTRACT

The larvicidal activity of an experimental formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) was evaluated under laboratory and Semi Field Conditions against *Aedes aegypti* (Linnaeus) larvae. Different samples of technical powder (TP) were bioassayed, to establish the concentrations that eliminate 50% (LC₅₀) of the larvae as well as the product potency. One sample was submitted to different gamma radiation doses for inactivation of the spores. A tablet (T), containing 15% of active principle, the TP and irradiated technical powder (ITP) were tested at the concentrations 250 mg/50L of water, in plastic containers. The initial efficacy was measured by L4 mortality after 48h of exposure, and the residual activity, was assessed by periodical introduction of L1 and pupae recovery. The containers were submitted to the variables: sunlight direct exposition, renewal of 20% or 60% of the water volume at regular intervals, and to different colonization frequencies. Water samples were periodically taken from treated containers to estimated spore concentration. Results showed different toxicity levels among the TP samples in laboratory, but these differences didn't commit larvicidal activity under TCS. The mean LC₅₀ of the product was $0,26 \pm 0,1$ mg/L, with an equivalent potency of 750 ITU/mg. TP irradiation with 20 KGy caused a 99,9% spore inactivation, but the ITP toxicity showed a 50% reduction. Under TCS, larval mortality ranged from 90% to 100% after 48 h exposure to either ITP or TP or T and all the three materials promoted 100% mortality over the experiment time, witch was 180 days. There were no differences among containers that suffered or no water replacement, nor amongst those colonized with different numbers of larvae. The larvae density didn't influence the concentration of spores along the experiment. In the containers treated with ITP the concentrations of viable spores remained inferior to those observed for TP along the experimental time. Direct sunlight exposition was the only factor limiting the toxicity persistence in the containers. We concluded that the experimental product evaluated presents good production quality with high levels of toxicity and excellent persistence time.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Bactérias entomopatógenas: <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti).....	1
1.2 Reciclagem bacteriana.....	2
1.3 Produção de bactérias entomopatogênicas.....	3
1.4 Formulações de bioinseticidas.....	4
1.5 Padronização de produtos.....	6
1.6 Registro de produtos.....	7
1.7 Fatores que podem influenciar a atividade de produtos em campo.....	8
1.8 Uso de formulações à base de Bti no Brasil.....	10
1.9 O <i>Aedes aegypti</i> e sua importância epidemiológica.....	10
2. HIPÓTESE.....	13
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 OBJETIVO GERAL.....	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO I	
5. Artigo 1: Avaliação de um produto experimental à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , para o controle de larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Diptera:Culicidae).....	23
Resumo.....	24
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Material e Métodos.....	28
Quadro 1.....	32

Resultados	33
Discussão	35
Referências Bibliográficas.....	40
Tabelas	47
Figuras.....	51
CAPÍTULO II	
6. Artigo 2: Avaliação de fatores bióticos no desempenho de um produto experimental à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , para larvas de <i>Aedes aegypti</i>	58
Resumo	59
Abstract.....	60
Introdução.....	61
Material e Métodos.....	63
Resultados	67
Discussão	69
Referências Bibliográficas.....	72
Tabelas.....	76
Figuras.....	77
7. CONCLUSÕES.....	80
8. ANEXOS.....	81

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Bactérias entomopatógenas: *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti)

Em 1902 Ishiwata isolou de larvas de *Bombyx mori* um bacilo patogênico, ao qual deu o nome de “sotto disease bacillus”. Em 1911, Berlinger reisolou o bacilo, revelou alguns aspectos da patogenicidade e, ao descrever a bactéria que foi denominada *Bacillus thuringiensis* em 1915, notou a presença de cristais protéicos, porém não estabeleceu sua relação com a toxicidade. Apenas em 1953 Hannay conseguiu relacionar a patogenicidade dessa bactéria com a presença de cristais em culturas esporuladas. Segundo ele, estes cristais, ou corpos paraesporais, podiam induzir septicemia em larvas de insetos, o que foi comprovado experimentalmente por Angus (1956). Esta descoberta estimulou o interesse por estas bactérias, levando à pesquisa e obtenção de inúmeros isolados de *Bacillus thuringiensis* de diferentes regiões do mundo (HABIB; ANDRADE, 1998).

A sorovariedade *Bacillus thuringiensis israelensis*/H14 (Bti), bactéria aeróbica esporulante, foi isolada de cadáveres de larvas de mosquito por Goldberg e Margalit (1977) e caracterizada por de Barjac (1978). Testes da atividade tóxica desta sorovariedade demonstraram ação larvicida contra culicídeos e simulídeos. Na família Culicidae, os gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*, *Psorophora* e *Mansonia* são susceptíveis a este patógeno (DE BARJAC, 1990). A atividade larvicida do Bti está relacionada com os cristais protéicos, geralmente em forma bipiramidal, que incluem 4 principais pró toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A e CytA, de pesos moleculares 125 kDa, 135 kDa, 68 kDa e 27 kDa, respectivamente. Quando ingeridos pelas larvas suscetíveis, estes cristais são solubilizados no lúmen intestinal, em pH alcalino, liberando as protoxinas, que são clivadas por enzimas proteolíticas em fragmentos menores, tornando-se toxinas ativas. As toxinas interagem especificamente com receptores da membrana apical do intestino médio, causando sérios danos ao epitélio, que culminam com a morte da larva (GILL; COWLES; PIETRANTONIO, 1992). As toxinas agem sinergicamente para a completa expressão da toxicidade (CRICKMORE *et al.*, 1995; PONCET *et al.*, 1995). O tempo requerido para expressão máxima da toxicidade é de 24 horas de exposição das larvas ao Bti. Estudos sobre a toxicidade do Bti destacam a alta susceptibilidade do *Culex quinquefasciatus* e do

Aedes aegypti, bem como sua inocuidade para a fauna não alvo encontrada nos criadouros destas espécies (GARCIA; DES ROCHERS; TOZER, 1980).

1.2 Reciclagem bacteriana

As bactérias formadoras de esporos pertencem em sua maioria à família Bacillaceae, incluindo cinco gêneros: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* e *Sporosarcina*. O gênero aeróbico *Bacillus* é o maior, seguido pelo anaeróbico *Clostridium* (LIU; BAJPAI; BIHARI, 1994). Do processo de esporulação resulta um endósporo dormente, que sob condições favoráveis pode germinar dando origem a uma célula vegetativa. São as bactérias formadoras de esporos as de maior potencial para o controle biológico, pois esta é uma característica que lhes confere resistência às condições ambientais adversas e um dos pré-requisitos para sua produção em escala industrial (MORAES; CAPALBO; ARRUDA, 1998).

O *Bacillus thuringiensis israelensis* é encontrado naturalmente no solo, em ambientes aquáticos e em cadáveres larvais de insetos. Em algumas circunstâncias os cadáveres larvais servem como ambiente favorável ao crescimento e multiplicação da bactéria (ALY, 1985; ALY; MULLA; FEDERICI, 1985; KHAWALED; BARAK; ZARITSKY, 1988). Há evidências que o Bti também pode se reciclar em organismos não alvo. Manasherob *et al.* (1998) observaram, em vacúolos do protozoário *Tetrahymena pyriformis*, crescimento bacteriano e produção de esporos e toxinas de Bti, capazes de causar mortalidade em larvas *Ae. aegypti*. Entretanto, ainda há controvérsias sobre a capacidade de reciclagem do Bti em condições de campo (MULLA, 1990). Por outro lado o *Bacillus sphaericus*, outra bactéria tóxica para larva de mosquitos, é comprovadamente capaz de se reciclar em criadouros utilizando os cadáveres larvais para sua multiplicação (NICOLAS; DOSSOU-YOVO; HOUGARD, 1987; DES ROCHERS; GARCIA, 1984; BECKER *et al.*, 1995).

1.3 Produção de bactérias entomopatogênicas

O interesse comercial no desenvolvimento de produtos para o controle microbiano de insetos iniciou-se em torno de 1950, quando se percebeu a possibilidade de manipular microorganismos para causar epizootias em insetos susceptíveis, sem causar danos às espécies benéficas. Bactérias esporulantes podem ser utilizadas no desenvolvimento de produtos inclusive em escala industrial. Sua produção passa pelas etapas de fermentação, recuperação do ingrediente ativo e formulação. Para tanto, é necessário conhecer as relações entre as linhagens e os processos fermentativos, a fim de maximizar a produção, realizando o crescimento em condições fermentativas econômicas (MORAES; CAPALBO; ARRUDA, 1998).

Dentre os diferentes processos fermentativos empregados na produção do Bti, o mais usual é o processo submerso descontínuo, no qual o meio nutritivo líquido é utilizado para suspender e propagar a biomassa bacteriana. No estágio final da fermentação as fontes de nutrientes se tornam limitantes, promovendo a esporulação e posterior liberação de cristais e esporos no meio de cultura. O caldo final contém uma suspensão de células remanescentes do processo, fragmentos celulares, além de esporos e cristais, que predominam (BRYANT, 1994).

O próximo passo consiste em recuperar o princípio ativo, podendo ser utilizados os métodos de centrifugação, micro filtração ou floculação visando a recuperação dos esporos e cristais protéicos que se encontram misturados ao meio (COUCH, 2000; LUNA; LOPES; MASSARANI, 2002). Esta é uma etapa crítica do processo de produção, onde a potência do produto pode ser reduzida, caso a recuperação não seja adequada (BRYANT, 1994).

A centrifugação é um método bastante empregado, no entanto pode gerar perdas de 10 a 15% dos sólidos. Este método pode ser seguido por uma micro filtração que garante a recuperação de 100% dos sólidos, mas se torna dispendioso em termos de equipamento e tempo (COUCH, 2000). A floculação é uma alternativa para recuperar os esporos e cristais bacterianos, pois permite sua conversão em grandes agregados, favorecendo a deposição gravitacional. Várias substâncias que induzem e favorecem a floculação podem ser utilizadas, como polímeros e compostos inorgânicos, que separam satisfatoriamente a biomassa (LUNA; LOPES; MASSARANI, 2002).

Ao longo do desenvolvimento do produto, a verificação da atividade tóxica, através de bioensaios utilizando insetos alvo, deve ser feita para garantir a qualidade do produto final, servindo como parâmetro para dar continuidade às etapas posteriores do processo (HABIB; ALVES; ALVES, 1998). Além de ser utilizado na avaliação e padronização de produtos, os bioensaios também podem ser realizados quando se deseja conhecer o nível de susceptibilidade de populações de insetos ao Bti. Vale ressaltar que o uso contínuo de Bti em programas de controle de culicídeos, por 10 anos, não resultou na perda de susceptibilidade da população-alvo (BECKER; LUDWIG, 1993).

1.4 Formulações de bioinseticidas

Os entomopatógenos microbianos podem ser aplicados puros, isto é, em preparações sem nenhum aditivo, ou podem passar por um processo de formulação visando melhorar a sua estabilidade, dispersão, cobertura homogênea e desempenho no campo (BATISTA FILHO *et al.*, 1998). Segundo Cerón (2004), o objetivo de formular é promover uma correta combinação de auxiliares inertes e ingrediente ativo para formar um produto estável, eficaz e de fácil aplicação.

A seleção de substâncias adjuvantes adequadas é de extrema importância para o sucesso de uma formulação. Quando usados corretamente, estes componentes otimizam a atividade do ingrediente ativo e melhoram as características dos produtos formulados, agindo inclusive como fotoprotetores e fagoestimulantes. Os ingredientes inertes, diluentes, conservantes, absorventes, fotoprotetores e atrativos devem conferir ao produto propriedades que favorecem o armazenamento prolongado das formulações biológicas. Quando não escolhidos adequadamente os aditivos podem se associar ao entomopatógeno, podendo causar incompatibilidade, perda de viabilidade e inativação do princípio ativo (BATISTA FILHO *et al.*, 1998).

As pesquisas que caracterizam as relações entre os componentes de um formulado e os fatores que interferem em sua produção (temperatura, umidade e outros), têm favorecido, com o avanço tecnológico, o desenvolvimento de formulações com melhor estabilidade do princípio ativo, atividade residual, facilidade de aplicação em campo e tempo de estocagem e inclusive adequação ao habitat e hábitos dos insetos alvos (BECKER *et al.*, 1991; BECKER; RETTICH, 1994; BATISTA FILHO *et al.*, 1998; COUCH, 2000).

Existem diversos tipos de produtos à base de Bti disponíveis no mercado (Tabela 1): formulações líquidas, como concentrado emulsionável e suspensão concentrada; formulações sólidas que requerem a secagem do princípio ativo antes da adição dos adjuvantes, como pó e pó molhável, grânulos, briquetes, pérolas e comprimidos. Este último processo, apesar de ser mais oneroso, fornece produtos que apresentam maior concentração e estabilidade do ingrediente ativo quando comparado às formulações líquidas (COUCH, 2000).

Tabela 1. Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* disponíveis no mercado. (Modificado de MELO-SANTOS, 2001 e BECKER, 2003)

Nome comercial	Formulação	Potência (UTI/mg) ¹
Aquabac [®]	Pó primário	7.000
Bactimos PP [®]	Pó primário	10.000
Bactimos WP [®]	Pó molhável	5.000
Teknar [®]	Pó molhável	>10.000
Bactimos G [®]	Granulado	200
Teknar G [®]	Granulado	200
Ice cubes	Granulado de gelo	45
VectoBac TP [®]	Pó técnico	5.000
Teknar TC [®]	Pó técnico	10.000
VectoBac WDG [®]	Granulado dispersível em água	3.000
VectoBac DT [®]	Comprimido	2.250
Culindex Tab plus [®]	Comprimido	2.250
VectoBac [®] AS	Suspensão aquosa	1.200
Aquabac [®]	Suspensão aquosa	1.200
Teknar HP-D [®]	Fluido concentrado	1.200
VectoBac 12 AS [®]	Fluido concentrado	1.200
BioTouch [®]	Fluido concentrado	1.000
Bactimos [®] FC	Suspensão concentrada	600
Bt-horus SC ²	Suspensão concentrada	700

¹UTI: unidade tóxica internacional. ²Produto desenvolvido no Brasil (Empresa Bthek), em fase de registro.

O processo de produção e formulação de entomopatógenos deve também levar em conta os custos da produção e o preço final do produto, que deve ser compatível com a realidade do mercado e permitir a continuidade da produção (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998; BATISTA FILHO *et al.*, 1998).

Apesar do Bti ser seguro ambientalmente e não oferecer riscos à saúde humana (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999), em alguns países é exigido, para o uso em água potável ou em alguns ecossistemas, produtos bacterianos livres de esporos ou contendo esporos inviáveis. Estes tipos de produtos oferecem um nível extra de segurança, além de maior aceitação por parte da população (DULMAGE; CORREA; GALLEGOS-MORALES, 1990; BECKER, 2002).

1.5 Padronização de produtos

Com o aparecimento das primeiras formulações comerciais à base de *Bacillus thuringiensis*, surgiu também a necessidade de estabelecer metodologias para comparação de produtos desenvolvidos em diferentes regiões. O primeiro protocolo estava baseado na contagem de esporos, no entanto, como o número de esporos nem sempre reflete a quantidade de cristais protéicos, este método se revelou falho, sendo substituído pela metodologia baseada na comparação das LC₅₀ (concentrações letais para 50% dos indivíduos) dos produtos, para padronização de larvicidas bacterianos. Esta técnica tornou-se o instrumento utilizado pelas indústrias de fermentação e de desenvolvimento de formulações (SKOVMAND; ISABELLE; BENZON, 2000).

Os valores de LC₅₀, determinados através de bioensaios em laboratório são usados na padronização e determinação da potência dos produtos para larvas de *Aedes aegypti*, no caso do Bti. A potência é expressa em Unidade Tóxica Internacional por miligrama (UTI/mg) e é obtida utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Potência da amostra (UTI/mg)} = \text{LC}_{50} \text{ padrão} \times \text{potência padrão} / \text{LC}_{50} \text{ da amostra testada}$$

Para o Bti, o padrão utilizado é o IPS-82 (isolado 1884), cuja potência contra larvas de 4º estágio (L4) de *Aedes aegypti* foi estimada em 15.000 UTI/mg do pó (DE BARJAC; LARGET- THIERY, 1984) (Anexo).

De acordo com leis nacionais e internacionais, a quantidade de ingrediente ativo e potência do produto devem estar mencionadas no rótulo da embalagem. Estes valores devem ser mantidos com precisão em todas as remessas de produção, para estabelecer padrões e metodologias de controle de qualidade. Para isto, o monitoramento da produção deve ser feito desde o processo de fermentação até o desenvolvimento da formulação final. Por razões de segredo industrial, aspectos associados à produção em massa das bactérias entomopatogênicas são pouco publicados na literatura científica (BATISTA FILHO *et al.*, 1998; COUCH, 2000).

1.6 Registro de produtos

O passo seguinte ao desenvolvimento e padronização de produtos bacterianos consiste em seu registro nos órgãos públicos competentes. Nos Estados Unidos a Agência de Proteção Ambiental (EPA), com base em estatutos e legislações federais, regulamenta o registro dos biopesticidas, testes e informações como identidade e propriedade biológica do produto, modo de ação e manipulação, eficiência, resíduos, propriedades físico-químicas, ecotoxicologia e comportamento ambiental do agente microbiano, além da Avaliação do Impacto Ambiental (EIA) que são exigidos no processo de registro (NARDO; MORAES; SÁ, 1998).

No Brasil, até 1993 a regulamentação para o registro de produtos biológicos era a mesma estabelecida para os produtos químicos, o que não era satisfatório, pois os agentes microbianos apresentam modo de ação diferenciado e também potencial de sobrevivência, multiplicação e dispersão no ambiente, diferentes. No ano seguinte, após esforços de grupos de pesquisadores e com o interesse de comercialização destes produtos, o IBAMA, através da Diretoria de Registro, Controle e Fiscalização, propôs a avaliação específica para agentes microbianos de controle. Esta portaria sugere a avaliação de risco de produtos contendo agentes microbianos e disponibilização de informações para o registro submetido a instituições. Estas informações servem para registros definitivos e Registro Especial Temporário (RET), exigido para novos produtos destinados à pesquisa e experimentação, ainda não registrados para produção, comercialização e utilização no país (NARDO; MORAES; SÁ, 1998).

Para a utilização de produtos em campanhas de saúde pública e em tratamentos de água, o Ministério da Saúde avalia a sua eficiência como larvicida e o risco do produto à saúde humana, o IBAMA realiza a avaliação ambiental, enviando os resultados ao Ministério da Saúde, que conclui a apreciação do pedido de registro (NARDO; MORAES; SÁ, 1998).

1.7 Fatores que podem influenciar a atividade de produtos em campo

Antes de serem preconizados para o uso, larvicidas à base de Bti devem ser avaliados em condições que simulem aquelas encontradas em campo. A biologia do inseto alvo, a do patógeno e as interações entre eles devem ser conhecidas. Fatores biológicos associados a fatores ambientais têm importante papel no desempenho de produtos à base de bactérias entomopatogênicas (BECKER *et al.*, 1992). Os diferentes níveis de susceptibilidade das espécies de mosquitos às toxinas, seu comportamento alimentar, o grau de disponibilidade das toxinas na zona trófica das larvas são alguns fatores que podem influenciar a eficácia de produtos larvicidas (BECKER *et al.*, 1992; MULLA, 1990).

Outros fatores devem ser considerados, como por exemplo: densidade larval, estágio larval e presença de organismos não alvo: bioensaios de Bti contra larvas de 4º estágio *Ae. vexans* mostraram que a LC_{50} é 7 vezes mais alta quando se aumenta a densidade de 10 para 75 larvas /150 ml, isto indica que quanto maior o número de larvas, maior a quantidade de produto necessário para promover o controle larvicida (BECKER *et al.*, 1992). A sensibilidade das larvas ao Bti diminui à medida que elas se desenvolvem. Foi demonstrado, por exemplo, que L2 de *Aedes vexans* são 11 vezes mais sensíveis ao Bti que L4 (BECKER *et al.*, 1992) e L2 de *Aedes aegypti* são de duas a seis vezes mais sensíveis ao Bti do que larvas de 4º estágio; isto acontece porque para causar letalidade em larvas menores, pequenas quantidades do produto são suficientes (MULLA, 1990). A presença de outros organismos filtradores como os Cladocera, microcrustáceos branquiópodos, também ocasiona a redução da toxicidade no ambiente: os valores de LC_{50} e LC_{90} são 5 e 6 vezes mais altos na densidade de 90 *Daphnia* sp./150 ml do que na ausência de indivíduos desta espécie (BECKER *et al.*, 1992).

Temperatura: as taxas de alimentação de larvas de mosquitos são influenciadas pela temperatura da água. Becker *et al.* (2002) demonstraram que a taxa de alimentação de larvas de *Ae. vexans* diminui à medida que a temperatura cai, sendo as larvas 10 vezes mais sensíveis ao Bti a 25°C do que a 5°C.

Sedimento e agitação: a quantidade de sedimento de matéria orgânica no ambiente aquático pode afetar a eficácia do Bti, pois as partículas tóxicas podem se tornar indisponíveis na zona trófica de alimentação das larvas. A agitação é um importante fator, podendo favorecer a ressuspensão das partículas tóxicas (SHEERAN; FISHER, 1992).

Radiação solar: diversos estudos sobre a atividade de larvicidas bacterianos em campo têm demonstrado que a luz solar, em especial a radiação ultra violeta (UV), é um dos fatores que mais afeta a persistência destes produtos, por causarem a inativação das toxinas (OBETA, 1996; NAYAR *et al.*, 1999; MELO-SANTOS *et al.*, 2001; ARAÚJO, 2003).

Reciclagem bacteriana: cadáveres larvais contêm nutrientes e o micro ambiente necessários à multiplicação bacteriana e produção de toxinas associadas ao processo de esporulação. Experimentos realizados por Aly *et al.* (1985) comprovaram a reciclagem do Bti em cadáveres larvais de *Ae. aegypti*. *B. sphaericus*, bactéria altamente eficaz contra larvas de *Culex*, é comprovadamente capaz de se reciclar no ambiente, e a presença dos cadáveres larvais contribui para manutenção dos níveis de toxicidade (DES ROCHERS; GARCIA, 1984; NICOLAS; DOSSOU-YOVO; HOUGARD, 1987; BECKER *et al.*, 1995).

Estes conhecimentos ressaltam a importância do entendimento do impacto destes e de outros fatores no desempenho de larvicidas biológicos. Experiências com tratamentos rotineiros de criadouros de culicídeos têm demonstrado que o uso de concentrações e formulações apropriadas às situações locais pode gerar ganhos operacionais, econômicos e ecológicos, otimizando os programas de controle contra espécies de mosquitos (BECKER; RETTICH, 1994).

Testes sob condições simuladas de campo (TCS) são considerados adequados para avaliar e comparar diferentes produtos, bem como os fatores envolvidos na eficácia e persistência de sua atividade larvicida com maior segurança do que os testes realizados em condições reais de campo (THIÉRY *et al.*, 1999; REGIS; SILVA; MELO-SANTOS, 2000; MELO-SANTOS *et al.*, 2001).

1.8 Uso de formulações à base de Bti no Brasil

O Brasil iniciou, em 1983, experimentos com agentes biológicos para o controle de simulídeos. O estado do Rio Grande do Sul foi pioneiro na substituição do temephos, inseticida químico organofosforado, por produtos à base de Bti utilizando-o em sua rotina de controle. O controle de espécies de simulídeos, especialmente *S. pertinax*, tem o objetivo de reduzir a população destes dípteros hematófagos, pois, além de estarem relacionados com a transmissão de doenças como a oncocercose, causam forte incomodo e prejuízos à agropecuária e às atividades turísticas. (MARDINI *et al.*, 2000; POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003). Em 1986 a Secretaria de Saúde do estado de São Paulo iniciou o uso de produtos à base de Bti, no programa de controle de simulídeos ao longo da Serra do Mar e em 1990 este biolarvicida substituiu completamente o uso do temephos (ARAÚJO-COUTINHO, 1995). Estes são os dois programas existentes no Brasil que utilizam Bti visando o controle de simulídeos, ambos com excelentes resultados, demonstrando ser este um método eficiente (VILARINHOS *et al.*, 1998).

Até o ano de 2000, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) utilizava exclusivamente inseticidas químicos no combate ao inseto vetor do dengue *Aedes aegypti*. (FUNASA, 2002). O Ministério da Saúde divulgou em 2000, que entre 69 municípios investigados, em 19 deles foi confirmada a resistência de populações naturais de *Ae. aegypti* ao temephos. Outros 16 municípios apresentaram populações com indícios de resistência em desenvolvimento, incluindo Recife e Jaboatão dos Guararapes, os quais passaram ao “status” de resistentes no ano seguinte (FUNASA, 2000). Produtos importados à base de Bti foram incorporados ao programa em 2001, visando garantir a sustentabilidade das ações de combate ao *Ae. aegypti* nos municípios onde a resistência ao temephos foi confirmada (BRAGA *et al.*, 2004; VILARINHOS; MONNERAT, 2004).

1.9 O *Aedes aegypti* e sua importância epidemiológica

O *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 é um díptero da família Culicidae e encontra-se distribuído nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Apresenta frequentemente um padrão descontínuo de distribuição, em decorrência da dispersão passiva de seus ovos, muitas vezes depositados em produtos que podem armazenar água utilizados no

intercâmbio entre países (FORATTINI, 1965; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Seu ciclo biológico compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Anexo). As fêmeas, preferencialmente antropofílicas, após realizarem o repasto sanguíneo necessário à maturação de seus ovos, repousam e ao final da digestão procuram os sítios para oviposição. Os ovos são depositados isoladamente nas paredes internas de recipientes como tonéis, caixas d'água, descartáveis, vasos, pneus ou outros contendo água, que servirão de criadouro para o desenvolvimento de suas formas imaturas. As larvas se alimentam continuamente como filtradoras não seletivas e raspadoras de superfície, completando o ciclo entre 8 e 15 dias. Em condições ambientais adversas, como a perda progressiva de água dos recipientes, os ovos podem entrar em quiescência e se manterem viáveis por períodos prolongados (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; SILVA; SILVA, 1999).

O *Ae. aegypti* é o principal responsável pela manutenção do ciclo de transmissão da dengue em áreas urbanas (HENCHAL; PUTNAK, 1990). As fêmeas, uma vez infectadas, permanecem transmitindo o vírus para hospedeiros humanos durante a hematofagia e, verticalmente, a um percentual dos seus descendentes, ao longo de sua vida (JOSHI; SINGHI; CHAUDHARY, 1996). Este mosquito havia sido considerado erradicado do território brasileiro na década de 50, no entanto com o seu ressurgimento e disseminação entre 1976-1977 no Rio de Janeiro e Salvador, houve dispersão para os demais estados (PONTES; RUFFINO-NETO, 1994). Em 1998 todos os estados brasileiros estavam infestados pelo *Ae. aegypti* e em 23 deles a transmissão viral já estava estabelecida, com circulação simultânea dos sorotipos 1 e 2 em 19 estados, localizados sobretudo nas Regiões Nordeste e Sudeste do país (FUNASA, 1999).

A dengue é atualmente a principal doença re-emergente no mundo e há vários anos é um dos mais sérios problemas de saúde pública no Brasil (TAUIL, 2002; POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003). A Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde registrou, durante o ano de 2005, um total de 203.789 casos notificados de dengue forma clássica (BRASIL, 2005). Quando comparado o número total de casos entre os meses de janeiro a novembro com o mesmo período de 2004, verificou-se um aumento de 84,4% no número de notificações. Na região Nordeste houve um aumento de 157,6% em

relação a 2004 e o estado de Pernambuco se situa em terceiro lugar, com 12.051 casos registrados em 2005, com a ocorrência de 18 casos de febre hemorrágica de dengue e 2 óbitos. A circulação autóctone dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus foi identificada em 24 unidades federadas brasileiras. Os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul permanecem sem circulação do vírus. Não há ainda registros da circulação do DENV-4 no Brasil (BRASIL, 2005).

O aumento no número de casos de pessoas infectadas evidencia as dificuldades em manter sob controle doenças como a dengue, que apresentam alta velocidade de propagação e inexistência de vacina capaz de proteger as populações humanas (GUBLER; CLARK, 1995). Por este motivo, as estratégias de controle estão centradas no combate ao vetor, único elo vulnerável da cadeia epidemiológica da dengue. Além de ações de controle, é necessária uma constante vigilância entomológica, visando monitorar a densidade populacional do vetor em diferentes áreas, identificar e caracterizar os criadouros, acompanhar a evolução dos índices de infestação e avaliar a susceptibilidade da espécie-alvo aos agentes químicos ou biológicos usados no programa (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1995).

2. HIPÓTESE

A eficácia e a duração da atividade larvicida de produtos à base de Bti é afetada por fatores biológicos e ambientais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar a influência de alguns fatores ambientais sobre a eficácia inicial e a persistência de um larvicida biológico experimental à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti), para o controle do *Aedes aegypti*.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar os níveis de atividade larvicida de diferentes lotes de pó técnico à base de Bti, através do cálculo das concentrações letais, com base em bioensaios.
- b) Conhecer a performance da formulação em comprimido comparando-a com o pó técnico, pré-formulado.
- c) Verificar o efeito da radiação solar e da diluição progressiva sobre o tempo de persistência da atividade larvicida em condições simuladas de campo.
- d) Investigar a reciclagem bacteriana nos recipientes tratados com produtos contendo esporos ativos ou inativados por irradiação.
- e) Mensurar a persistência do produto em função da frequência de colonização dos recipientes experimentais.
- f) Avaliar a estabilidade do produto mantido em condições de armazenamento.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B.; MOINO, A.; ALMEIDA, J. E. M. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 1143-1163.

ALY, C. Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spores in the gut of *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.*, v. 45, p. 1-8, 1985.

ALY, C.; MULLA, M. S.; FEDERICI, B. A. Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *J. Invert. Pathol.*, v. 46, p. 251-258, 1985.

ARAÚJO, A. P. Avaliação da eficácia e persistência de larvicidas biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e de um análogo do hormônio juvenil à base de pyriproxyfen, no controle de *Aedes aegypti*. 2003. 32 p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE.

ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Biological control program against simuliids in the State of São Paulo, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 131-133, 1995.

BATISTA FILHO, A. et al. Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 917-956.

BECKER, N. et al. Efficacy of a new tablet formulation of an asporogenous strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, v. 16, p. 176-182, 1991.

BECKER, N. et al. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 8, n. 3, p. 285-289, 1992.

BECKER, N.; LUDWIG, M. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 9, n. 2, p. 221-224, 1993.

BECKER, N.; RETTICH, F. Protocol for the introduction of new *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control program in Germany. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 10, n. 4, p. 527-533, 1994.

BECKER, N. *et al.*. Role of cadavers in recycling processes of *Bacillus sphaericus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 11, p. 329-334, 1995.

BECKER, N. Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by gamma radiation. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 18, p. 57-62, 2002.

BECKER, N. Control of mosquitoes. In: BECKER, N. *et al.* *Mosquitoes and their control*. New York: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 345-375.

BRAGA, I. A. *et al.* *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 199-203, 2004.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Dengue – boletim da semana 52 / 2005*. Brasília: SVS, 2005. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_semana52_2005.pdf. Acesso em 11 Abr. 2006

BRYANT, J. E. Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Ecosyst. Environ.*, v. 49, p. 31-35, 1994.

CÉRON, J. Formulaciones. In: BRAVO, A., CERON, J. *Bacillus thuringiensis en control biológico*. Bogotá, Buena Semilla, 2004. p. 275-293.

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 297-314.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

CRICKMORE, N. *et al.* Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 131, p. 249-254, 1995.

DE BARJAC, H. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *B. thuringiensis* var. *israelensis* sérotype H14. *C.R. Acad.Sci.*, v. 286, n. D, p. 297-314, 1978.

DE BARJAC, H.; LARGET- THIERY. Characteristics of IPS82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. Mimeogr. Doc., WHO/VBC/84.892, 1984. 10 pp.

DE BARJAC, H. Characterization and prospective view of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. *Bacterial control of mosquitoes and blackflies*. New Jersey: Rutgers University Press, 1990. p. 10-15.

DES ROCHES, B.; GARCIA, R. Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*. *Mosq. News*, v. 44, p. 160-165, 1984.

DULMAGE, H. T.; CORREA, J. A.; GALLEGOS-MORALES, G. Potential for improved formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation development. In: DE BARJAC, H; SUTHERLAND, D. J. *Bacterial control of mosquitoes and black flies*. New Jersey: Rutgers University Press, 1990. p. 110-160.

FORATTINI, O. P. *Entomologia Médica*. São Paulo: Ed. Faculdade de Saúde Pública, USP, 1965.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). *Boletim Epidemiológico do Dengue*. Brasília, 1999.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). *Monitoramento da Resistência das Populações de Aedes aegypti do País*. Brasília, 2000.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). *Vigilância epidemiológica: Programa Nacional de Controle da Dengue*. Brasília, 2002.

GARCIA, R.; DES ROCHERS B.; TOZER, W. Studies on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against organisms found in association with mosquito larvae. *Mosq. Vector Control Assoc.*, v. 48, p. 33-36, 1980.

GOLDBERG, L.; MARGALIT, G. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*. *Mosq. News*, v. 37, p. 355-358, 1977.

GILL, S. S.; COWLES E. A.; PIETRANTONIO P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 37, p. 616-636, 1992.

GUBLER, D.; CLARK G. G. Dengue/Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 1, p. 55-57, 1995.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In S.B. ALVES, *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, 1998. p 383-446.

HABIB, M. E. M.; ALVES, S. B.; ALVES, L. F. A. Padronização de inseticidas microbianos. In S.B. ALVES, *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 779-797.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. *Rev. Clin. Microbiol.*, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

JOSHI, V.; SINGHI, M.; CHAUDHARY, R. C. Transovarial transmission of dengue 3 by *Aedes aegypti*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 90, p. 643-644, 1996.

KHAWALED, K.; BARAK, Z.; ZARITSKY, A. Feeding behavior of *Aedes aegypti* larvae and toxicity of dispersed and of naturally encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invert. Pathol.*, v. 52, p. 419-426, 1988.

LIU, W. M.; BAJPAI, R.; BIHARI, V. Higt density cultivation of sporeformers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 72, p. 310-325, 1994.

LUNA, C. L., LOPES, C. E., MASSARANI, G. Recovery of *Bacillus sphaericus* 2362 spores from growth medium by flocculation/sedimentation. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, v. 25, p. 213-216, 2002.

MANASHEROB, R. *et al.* Germination, growth, and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in excreted food vacuoles of the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, v. 64, n. 5, p. 1750-1758, 1998.

MARDINI, L. B. L. F. *et al.* *Simulium* spp. control program in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 1, p. 211-214, 2000.

MELO-SANTOS, M. A. V. *et al.* Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 859-860, 2001.

MELO-SANTOS, M. A. V. Eficiência de larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* no controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 2001. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: S.B. ALVES, *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 815-843.

MULLA, M. S. Activity, field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquitoes. In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. *Bacterial control of mosquitoes and blackflies*. New Jersey: Rutgers University Press, 1990. p. 134-160.

NARDO, E. A. B.; MORAES, G. J.; SÁ, L. A. N. Regulamentação do uso de agentes microbianos de controle. In: S.B. ALVES, *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 1119-1142.

NAYAR, J. K. *et al.* Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against two florida mosquito species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 15, p. 32-42, 1999.

NICOLAS, L.; DOSSOU-YOVO J.; HOUGARD J. M. Persistence and recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 spores in *Culex quinquefasciatus* breeding sites in West Africa. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 25, p. 341-345, 1987.

OBETA, J. A. N. Effect of inactivation by sunlight on the larvicidal activities of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* H-14 isolates from Nigerian soils. *J. Comun. Dis.*, v. 28, p. 94-100, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control*. Washington DC, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Microbial pest control agent Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria 217. Geneva, 1999.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev. Saúde Pública*, v. 37, p. 813-816, 2003.

PONCET, S. *et al.* Evaluation of synergistic interactions among the cryIVA, cryIVB, and cryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J. Invert. Pathol.*, v. 66, p. 131-135, 1995.

PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETO, A. Dengue em localidade urbana da Região Sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Rev. Saúde Públ.*, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.

REGIS, L.; SILVA S. B.; MELO-SANTOS, M. A. V. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 207-209, 2000.

SHEERAN, W.; FISHER, S. W. The effects of agitation, sediment, and competition on the persistence and efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 24, p. 338-346, 1992.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, v. 32, n. 4, p. 349-355, 1999.

SKOVMAND, O.; ISABELLE, T.; BENZON, G. Is *Bacillus thuringiensis* standardization still possible?. In: CHARLES J-F; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 275-295.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 18, p. 867-871, 2002.

THIÉRY, I. *et al.* Residual activity of *Bacillus thuringiensis* serovars *medellin* and *jegathesan* on *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 15, p. 371-379, 1999.

VILARINHOS, P. T. R. *et al.* Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. In: ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 447-480.

VILARINHOS, P. T. R.; MONNERAT, R. Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 20, p. 311-314, 2004.

Os resultados do projeto de pesquisa realizado durante o curso do Mestrado em Biologia Animal estão descritos em dois artigos científicos que serão enviados para o periódico **Journal of Applied Microbiology**. Em anexo encontram-se as regras para submissão de artigos à revista (Anexos).

CAPÍTULO 1

Avaliação de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*, para o controle de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Evaluation of experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae).

Ana Paula de Araújo¹; Sidney Oliveira Carlos²; Maria Alice Varjal de Melo Santos²; Eugênia Maria Maranhão Rios³; Lêda Regis².

¹Mestrado em Biologia Animal, Departamento de Zoologia – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Moraes Rego, 1235, CEP: 50670-420, Recife, PE. ²Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Caixa Postal 4742, CEP: 50670-420, Recife, PE. ³BIOTICOM – Biotecnológica Industria e Comércio. Recife, PE, Brasil.

Maria Alice Varjal de Melo Santos

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária

Campus da UFPE, Recife, PE

CEP: 50.670-420

E-mail: mavarjal@cpqam.fiocruz.br

RESUMO

A atividade larvicida de um produto experimental, pó técnico (PT) e comprimido (C) à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) foi avaliada em laboratório e sob condições simuladas de campo (TCS), contra larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus). Dez lotes de produção de pó técnico foram testados para definição das CL₅₀ e potência do produto. A eficácia inicial, bem como a atividade residual foram avaliadas em TCS. A eficácia inicial foi mensurada pela mortalidade de L4 nas primeiras 48 h de exposição e o efeito residual foi avaliado pela adição semanal de 50L1 e contagem de pupas sobreviventes. 250 mg do PT ou 01 C foram adicionados a 50 L de água, em recipientes plásticos, sendo renovado a intervalos regulares, 20% ou 60% deste volume. Os recipientes foram mantidos em locais com ou sem exposição direta ao sol. A CL₅₀ média do produto foi estimada em $0,26 \pm 0,1$ mg/L, com potência de 750 UTI/mg. Apesar das diferenças de toxicidade entre lotes do PT, a eficácia inicial foi de 98% a 100%, independentemente da CL₅₀ do lote. Tanto PT como C tiveram bom desempenho à sombra, promovendo controle total durante 6 meses. A renovação de água dos recipientes não afetou a atividade do produto. Ao sol, dependendo dos níveis de insolação, houve rápida redução da atividade, com perda total após quatro semanas, ou manutenção de bons níveis de atividade larvicida por mais de 2 meses. Os resultados demonstraram excelente desempenho do produto nas condições avaliadas, principalmente à sombra. Ao sol, a atividade residual do produto é fortemente influenciada por variações sazonais.

PALAVRAS- CHAVE: Bti, novas formulações, comprimidos, teste em campo simulado, controle biológico de mosquitos

ABSTRACT

The larvicidal activity of an experimental formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) was evaluated under laboratory and Semi Field Conditions against *Aedes aegypti* (Linnaeus) larvae. Ten samples of technical powder (TP) were assayed to establish the LC₅₀ as well as the product potency. The larvicidal activity of the TP and the tablet was evaluated under semifield condition to assess the initial efficacy measured by L4 mortality after 48h of exposure, and the residual activity, measured by introductions of L1 recovery of pupae. In this case, either 250 mg of TP or a 250 mg tablet were added to 50 liter of water, in plastic containers. At regular intervals, 20% or 60% of the water volume was replaced. Recipients were exposed to sunlight or remained in shadowed places. Results showed that the mean LC₅₀ of the product was $0,26 \pm 0,1$ mg/L, with an equivalent potency of 750 ITU/mg. In spite of the existence of significant differences in the toxicity among some technical powder lots, the initial efficacy of the product ranged between 98% and 100% and persisted during four to six months in recipients settled in the shadow. The renewal of water didn't affect the activity of the product. According to the season of the year, the larvicidal activity in the containers exposed to the sunlight was completely lost after four weeks, or remained at satisfactory levels for more than 2 months. We conclude that the product showed an excellent performance, especially in shadow. Seasonal differences strongly influences the persistence time of the product in containers exposed to the sunlight.

KEY WORDS: Entomopathogenic bacteria, Bti, tablet formulation, semi field test, mosquito control

INTRODUÇÃO

No mercado mundial existem cerca de 200 produtos microbianos registrados para o controle de insetos, dos quais 50% são à base de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus* (Alves et al. 1998). Estes agentes microbianos são os mais utilizados em todo o mundo no manejo integrado de pragas (MIP) agrícolas, sobretudo espécies de lepidópteros e coleópteros. Dentre os ativos contra dípteros de importância médico-sanitária, o *Bacillus sphaericus* (Bs) e o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), são os mais utilizados para o controle de culicídeos e simulídeos (Ruas Neto 1984; Hougard et al. 1997; Mardini et al. 2000; Regis et al. 2001). O Bti sintetiza durante seu processo de esporulação, cristais protéicos com ação inseticida, compostos por quatro principais pró-toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A e CytA, de pesos moleculares 125 kDa, 135 kDa, 68 kDa e 27 kDa, respectivamente. Seu mecanismo de ação envolve a ingestão e solubilização dos cristais seguida pela clivagem das pró-toxinas, sua ativação em toxinas e interação com células do epitélio intestinal de larvas susceptíveis (Gill et al. 1992). Estas toxinas agem sinergicamente para a completa expressão da toxicidade (Poncet et al. 1995), o que dificulta a seleção de populações de insetos resistentes a este patógeno. Este fato tem sido demonstrado na prática em programa de controle de culicídeos na Alemanha, que utiliza o Bti desde 1980 (Becker & Ludwig 1993). Outro aspecto importante é a seletividade da ação tóxica do Bti para larvas de espécies de culicídeos e simulídeos, garantindo a segurança do seu uso prolongado e em larga escala, sem danos para espécies não alvo. Estas características fazem do Bti um agente de escolha para garantir a sustentabilidade de programas de controle, inclusive daqueles cujas populações alvo se tornaram resistentes aos larvicidas químicos (Guillet et al. 1990; Mardini et al. 2000; Regis et al. 2000; Regis et al.

2001; Lima et al. 2003). No Brasil, larvicidas à base de Bti passaram a ser utilizados no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) a partir de 2001, para o manejo de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus) resistentes ao temephos, inseticida organofosforado utilizado desde 1986 (Macoris et al. 1999; Fundação Nacional de Saúde 2002; Macoris et al. 2003).

Os primeiros produtos à base de Bti disponíveis no mercado foram formulações líquidas. Produtos líquidos são inerentemente instáveis por não oferecerem proteção duradoura ao princípio ativo, que fica mais exposto às adversidades ambientais do que em formulações sólidas (Couch 2000). Trabalhos recentes têm demonstrado que produtos sólidos com liberação lenta do princípio ativo são mais indicados para o controle do *Aedes aegypti*, do que os líquidos (Becker 2000; Melo Santos et al. 2001). Segundo Couch (2000), além dos fatores relacionados à manutenção da viabilidade do microorganismo durante as fases de fermentação, concentração e recuperação da biomassa, o desenvolvimento final da formulação é extremamente importante para obter um produto eficaz e viável no que diz respeito ao custo da produção.

Avaliações de produtos de Bti nas décadas passadas indicavam variações de persistência da atividade larvicida entre 1 e 3 semanas, dependendo das condições do ambiente onde o produto era aplicado, indicando a necessidade de aplicações frequentes (Hougard et al. 1997; Mulla 1990; Becnel et al. 1996; Batista Filho et al. 1998). Novas formulações, mais apropriadas às características dos criadouros e aos hábitos alimentares das larvas de culicídeos e simulídeos têm sido desenvolvidas, resultando em aumento da persistência, com constantes ganhos operacionais, econômicos e ecológicos (Becker, Rettich 1994, Melo Santos et al. 2001). Para melhorar o desempenho do Bti em campo, novos produtos continuam sendo desenvolvidos, buscando obter maior estabilidade e tempo

de armazenamento, facilidade de manuseio e aplicação operacional, sem perda de qualidade (Couch 2000). No presente trabalho são apresentados experimentos de avaliação em laboratório e sob condições simuladas de campo, de um produto à base de Bti desenvolvido para o controle de larvas de *Ae. aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos. Foram utilizadas larvas de *Aedes aegypti* provenientes da colônia Recife-Lab, mantida no Insetário do Departamento de Entomologia CPqAM/Fiocruz desde 1996. As condições de manutenção foram: $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de 65% a 85%, fotoperíodo 12/12 (L/D), alimentação diária com ração para gatos (Whiskas®) esterilizada e macerada.

Produto experimental. Para este estudo, amostras de pó técnico e de comprimido contendo 15% de princípio ativo, provenientes de diferentes lotes de produção de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), cepa IPS82, foram fornecidas pela Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda (BIOTICOM). O processo de produção envolveu o crescimento bacteriano em meio à base de sais minerais, glicose e água de maceração do milho, pelo processo de fermentação submersa descontínua (batelada). A cultura foi produzida em fermentador tipo tanque agitado e a biomassa foi separada através da técnica de floculação/sedimentação para obtenção do princípio ativo (esporos e cristais protéicos), de acordo com a metodologia descrita por Luna et al. (2002), com modificações. O sedimento obtido foi centrifugado e seco em estufa, com circulação de ar, a 35°C para a obtenção do pó primário, representado pelo princípio ativo e resíduos sólidos do meio. Em seguida, foram adicionadas substâncias adjuvantes, entre elas um protetor solar, para a obtenção do

pó técnico ou pré-formulado. Este procedimento foi repetido na produção de 10 lotes (bateladas). A concentração de esporos viáveis do entomopatógeno foi verificada pela contagem de colônias crescidas sobre a superfície do meio agar nutritivo (AN) em placas de Petri, a partir de amostras dos pós técnicos (10 mg do pó técnico/ 4,5 ml de água esterilizada). Suspensões a 10^{-1} foram submetidas a um choque térmico de 80°C por 12 minutos, para eliminação das formas vegetativas. Em seguida foram feitas diluições seriadas destas amostras. Aliquotas de 5 µl das suspensões 10^{-5} , 10^{-6} ou 10^{-7} foram distribuídas em cinco pontos no meio AN e incubadas em estufa a 30°C por 24 horas, para a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) presentes na placa. Os resultados da contagem foram analisados estatisticamente através do Programa DIFMED e as médias comparadas pelo Teste t-student. A pureza microbiológica de cada lote foi analisada segundo a metodologia descrita por Medeiros (2001).

Testes da atividade tóxica em laboratório. O pó técnico de cada lote foi avaliado quanto à atividade tóxica *in vivo* para larvas de 4º estágio (L4) de *Aedes aegypti*. Os bioensaios seguiram o protocolo padrão para preparações de Bti descrito por de Barjac & Larget-Thiéry (1984). Grupos homogêneos de 20 L4 foram expostos a sete diferentes concentrações do produto, em três réplicas, para cada concentração, por um período de 24 horas. O grupo controle foi constituído por 20 L4 não expostas ao Bti, em três réplicas. As concentrações letais para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das larvas foram estimadas a partir dos dados de mortalidade, através de regressão linear log-probit, usando o programa SPSS 8.0 for Windows (1997). A CL₅₀ serviu como parâmetro para a determinação da potência do produto experimental, em unidades tóxicas internacionais (UTI/mg), comparado ao

liofilizado padrão IPS82, do Instituto Pasteur. Através de uma análise exploratória de dados com os valores de CL_{50} foi calculada a mediana e construído um intervalo de confiança de 95% para análise da toxicidade dos lotes. Foram caracterizados como “outliers” os valores que ultrapassaram em duas ou mais vezes o limite superior pré-estabelecido, sendo desconsiderados na avaliação.

Testes sob condições simuladas de campo (TCS). Amostras de pó técnico e de comprimido de três lotes foram avaliadas sob condições simuladas de campo de acordo com a metodologia descrita por Melo-Santos et al. (2001). Estes testes foram realizados para comparar diferentes lotes e diferentes formas de apresentação do produto (pó técnico e comprimido), quanto a atividade larvicida. As seguintes concentrações foram avaliadas: 250 mg de pó técnico/50 L de água e um comprimido de 250 mg/50 L de água bruta (de poço). Os experimentos foram realizados em recipientes plásticos transparentes (56,4 x 38,5 x 37,1 cm), preenchidos com 50 litros de água de poço, colocados em uma área coberta (96 m²). Para cada tratamento foram utilizadas três réplicas, além dos controles não tratados, também em triplicata. A temperatura e o pH da água foram verificados três vezes/semana.

Avaliação de efeitos de variáveis sobre a atividade larvicida. Os efeitos de duas variáveis sobre a atividade larvicida residual do produto foram avaliados: exposição direta à luz solar (Fig. 1A e B) e graus de reposição de água nos recipientes, de acordo com o desenho experimental mostrado no Quadro 1.

Avaliação do desempenho do produto em campo simulado. Dois parâmetros foram utilizados na avaliação do desempenho do produto. O primeiro deles foi a eficácia inicial, medida pela taxa de mortalidade de 50 L4 jovens por recipiente, nas primeiras 48 horas após a aplicação do produto. O segundo, a persistência ou atividade larvicida residual, período em dias durante o qual a mortalidade larval foi $\geq 80\%$, foi mensurada pela introdução semanal de 50 L1 e recuperação de pupas. Para comparação entre os tempos de persistência dos diferentes tratamentos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney para duas amostras, ao nível de significância de 5%, através do programa estatístico SPSS versão 8.0 for Windows (1997).

Avaliação da estabilidade do produto em armazenamento. A estabilidade do produto em função do tempo de armazenamento foi verificada a intervalos trimestrais por um período total de 12 meses. Foram testados os lotes 01 e 02 de produção. De cada lote, oito embalagens individuais contendo 10 comprimidos cada foram mantidas em local seco, ao abrigo da luz, e a temperatura ambiente variando de 25° a 27°C e umidade relativa (UR) de 60% a 80%. Três dos 10 comprimidos de uma embalagem de cada lote foram retirados aleatoriamente para a avaliação da eficácia de controle em TCS, utilizando grupos de 50 L4, com leitura de mortalidade após 48 h de exposição.

Quadro 1. Descrição dos testes sob condições simuladas de campo (TCS) realizados com um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, contra larvas de *Aedes aegypti* (Recife-Lab).

Grupo experimental	Apresentação	Condição experimental	Período do ano	Renovação de volume de água 3 vezes por semana	Total de larvas²
Lote 01	Pó técnico	Sol	Fevereiro – Maio/05	20%	1.650
		Sombra	Fevereiro – Agosto/05	0% e 20%	7.200
	Comprimido ¹	Sol	Fevereiro – Maio/05	20%	1.650
		Sombra	Fevereiro – Agosto/05	0%, 20% e 60%	10.800
Controle		Sol	Fevereiro – Maio/05	20%	1.650
		Sombra	Fevereiro – Agosto/05	0%, 20% e 60% ³	3.600
Lote 10	Pó técnico	Sol	Setembro-Outubro/05	20%	600
			Novembro/05-Março/06	20%	2.550
	Comprimido	Sol	Setembro-Outubro/05	20%	600
			Novembro/05-Março/06	20%	2.550
		Sombra	Setembro/05- Março/06	20%	3.600
Lote 05	Comprimido	Sombra	Setembro/05- Março/06	20%	3.600
Controle		Sol	Setembro-Outubro/05	20%	600
			Novembro/05-Março/06	20%	2.550
		Sombra	Setembro/05- Março/06	20%	3.600

¹Comprimido contendo 15% de princípio ativo; ²Introdução de 1 grupo de 50 L1 semanalmente nos recipientes, somando um total de 46.800 larvas; ³Apenas uma réplica de cada tratamento.

RESULTADOS

Atividade tóxica e avaliação da concentração de esporos viáveis

Os valores de CL_{50} e CL_{90} dos dez lotes do pó técnico são mostrados na Tabela 1. Os resultados revelam diferenças de níveis de toxicidade entre eles, sendo possível agrupá-los, em função dos valores de CL_{50} e respectivos intervalos de confiança, em: 1) 0,133 a 0,166 mg/L, 2) 0,184 a 0,279 mg/L, 3) 0,390 a 0,497 mg/L e 4) $> 1,2$ mg/L. O lote 03 mostrou ter uma toxicidade muito inferior aos demais, sendo, portanto, classificado como “outlier” (Fig. 2A) e desconsiderado nas avaliações subsequentes. A análise do intervalo de confiança (95%) indicou uma CL_{50} média de $0,26 \pm 0,10$ mg/L para o produto, cuja potência calculada, tomando por base a CL_{50} de 0,013 mg/L do IPS82, foi 750 UTI/mg de produto. Os lotes 01 e 07 apresentaram atividade larvicida maior e os lotes 04 e 05 atividades menores do que a média esperada (Fig. 2B). A viabilidade microbiológica, estimada pelo número de unidades formadoras de colônia, foi similar entre os lotes 01, 05 e 10, no entanto, as CL_{50} apresentaram variação de até 3,7 vezes entre elas (Tabela 2). O desempenho de comprimidos de cada um destes lotes foi testado em condições simuladas de campo (TCS).

Desempenho em campo simulado

No TCS, a eficácia inicial do pó técnico e do comprimido-lote 01 foi de 100%. A do comprimido-lote 05 e comprimido-lote 10 foi de 98%, à sombra ou ao sol. Nos recipientes controles, a mortalidade variou de 0 a 16%. Os resultados relacionados com a persistência

da atividade larvicida em recipientes à sombra (Tabela 3) revelaram que o pó técnico e comprimido-lote 01 permaneceram eliminando 100% das larvas durante os 180 dias de experimento, após um único tratamento. Os comprimidos dos lotes 05 e 10 testados à sombra promoveram 100% de mortalidade larval desde o 7º dia até o final do experimento, aos 180 dias após um único tratamento, não havendo diferenças significativas entre eles ($p=1$). A atividade larvicida do lote 01 não sofreu modificação em função da renovação periódica de até 60% volume de água. Independente da renovação de 20% ou 60% ou não renovação de água, e da apresentação (pó técnico ou comprimido), o produto permaneceu eliminando 100% das larvas no período de 180 dias.

Ao sol, a atividade larvicida residual nos recipientes tratados com o pó técnico e o comprimido-lote 01, em fevereiro-maio de 2005, se manteve por 11 semanas, com índices de mortalidade oscilando entre 55% e 100% (Fig. 3). O menor índice de mortalidade foi registrado uma semana após o tratamento, momento em que ocorreu o maior valor médio de insolação (9,2 h/dia) no período. No caso do pó técnico e comprimido-lote 10, testados no período de setembro-outubro de 2005, houve uma queda progressiva da mortalidade a partir da 2ª semana, com perda completa da atividade larvicida na 4ª semana (Fig. 4). Em outubro foram registrados valores mais elevados de insolação no ano de 2005 (Fig. 6). Quando o mesmo produto foi testado em um período com níveis menores de insolação (novembro/2005 a março/2006), permaneceu eliminando entre 66% e 97% das larvas durante 17 semanas (Fig. 5). Em todos os testes ao sol, uma mortalidade igual a 100% foi verificada apenas na 1ª semana após o tratamento.

A temperatura da água nos recipientes variou de 26,5° a 31,3°C ao sol e de 26,3° a 29,8°C à sombra, ao longo dos períodos de teste. O pH da água variou de 6,9 a 9,9 nos recipientes ao sol e de 6,9 a 8,4 nos recipientes à sombra.

Os testes de estabilidade realizados com comprimidos dos lotes 01 e 02 demonstraram que não houve alteração na eficácia inicial de controle do produto em TCS, que se manteve acima de 97% ao longo de 12 meses (Tabela 4), sob condições usuais de armazenamento.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, um produto à base de Bti avaliado sob as formas de pó técnico e de comprimido apresentou um nível desejável de atividade tóxica para larvas de *Ae. aegypti*, boa estabilidade em condições de armazenamento e excelente tempo de persistência da atividade larvicida em campo simulado, principalmente nos testes conduzidos à sombra.

As CL_{50} para L4 de *Ae. aegypti*, definidas a partir dos bioensaios de amostras de 10 lotes de pó técnico produzidos sob condições padronizadas, revelam variações da ordem de até 4,7 vezes no nível de toxicidade entre as amostras. Um dos lotes foi eliminado por apresentar atividade muito baixa, os demais tiveram níveis aceitáveis de toxicidade. Dois lotes apresentaram atividade larvicida significativamente maior do que a média estimada ($CL_{50} = 0,26 \pm 0,1 \text{ mg/L}$, potência de 750 UTI/mg) e dois tiveram atividade menor do que esta. A literatura sobre produção de bactérias entomopatogênicas registra variações da toxicidade, consideradas inerentes ao processo de produção, podendo resultar de diversos fatores, desde pequenas diferenças em parâmetros como temperatura, oxigênio dissolvido, pH e concentração de açúcar durante a fermentação, até a perda de cristais protéicos durante a recuperação ou formulação da biomassa concentrada (Couch 2000; Skovmand et al. 2000). Segundo Skovmand et al. (2000), nem sempre há uma correlação linear entre a

concentração de esporos de uma cultura e a quantidade de cristais tóxicos produzidos durante o processo fermentativo. Este foi, aliás, o motivo da substituição do parâmetro concentração em esporos pela medida da toxicidade (CL_{50}), na padronização dos produtos (Skovmand et al. 2000). Nossos resultados corroboram esta observação visto que não houve uma correlação direta entre a quantidade de esporos viáveis e a toxicidade dos diferentes lotes do produto (Tabela 2). Melo-Santos (2001) ao avaliar outro produto experimental à base de Bti, observou uma concentração de esporos superior ($9,0 \times 10^8$ UFC/ml) e toxicidade similar (CL_{50} 0,5 mg/L) à registrada no presente estudo.

Foram testados, em campo simulado, amostras de três diferentes lotes, sob as formas de pó técnico e comprimido, com graus de toxicidade acima, abaixo e igual à média estimada para os nove lotes. Não houve mudança de desempenho, à sombra, entre os três lotes, sugerindo que as diferenças observadas entre as CL_{50} dos lotes não foram significativas do ponto de vista da atividade larvicida, não repercutindo sobre o desempenho do produto em campo. Alguns estudos sugerem que a potência de um produto pode não ser um indicador preciso do seu desempenho em campo, no que se refere à persistência da atividade larvicida (Melo-Santos 2001; Vilarinhos & Monnerat 2004). A potência dos produtos é, entretanto, um parâmetro muito importante para a padronização do processo de produção, devendo variar o mínimo possível (Skovmand et al. 1997; Habib et al. 1998; Skovmand et al. 2000).

Ao longo do processo de produção de um entomopatógeno como o Bti, espera-se que ocorra um aumento da atividade tóxica como resultado da concentração do caldo fermentado (cultura total) para recuperação da biomassa. Nas demais etapas do processo, sobretudo aquelas relacionadas à secagem e formulação, pode ser esperada a manutenção ou mesmo uma diminuição da toxicidade do produto (Couch 2000). Em nosso estudo, a

compressão do pó técnico para obtenção do comprimido não acarretou em perda da atividade larvicida, indicando que este processo não danificou o princípio ativo. O produto sob a forma de comprimidos facilita o trabalho operacional, dispensando o uso de instrumentos de medida, reduzindo o risco de falhas de dosagem na sua aplicação e desperdícios. Segundo Becker (2003) o desenvolvimento de formulações sólidas na forma de granulados, biscoitos, comprimidos, etc, bem como de novas metodologias de aplicação, tem gerado ganhos operacionais em programas de controle, quer pela facilidade de armazenamento, transporte e manuseio em campo, quer pela maior estabilidade e liberação sustentada do princípio ativo. Formulações do tipo comprimido podem ser mais adequadas às características particulares dos criadouros de espécies como o *Ae. aegypti*, por apresentarem maior praticidade de aplicação e aceitabilidade pela população, sobretudo por não modificar o aspecto da água e não gerar resíduos sólidos no recipiente (Becker 2000; Melo-Santos et al. 2001).

O produto avaliado neste trabalho permaneceu eficaz após um ano de armazenamento em condições ambiente, sugerindo que as características relativas à atividade larvicida do patógeno, preservação e velocidade de liberação do princípio ativo mantiveram-se estáveis, fato evidenciado pela reprodutibilidade dos resultados, ao longo de 12 meses de teste.

De acordo com informações da Funasa (2002), os criadouros de *Ae. aegypti* mais frequentes no Brasil são reservatórios de água para uso doméstico do tipo tonel, caixa d'água e outros. Uma característica comum à maioria deles é estarem total ou parcialmente protegidos da incidência direta da luz solar, por se localizarem no intradomicílio, ou pelo uso de tampas, embora estas nem sempre sejam à prova de mosquitos. No desenho experimental do TCS buscou-se simular as condições destes criadouros quanto ao uso da

água e a exposição ao sol. A colonização de recipientes tratados com L1 é também uma forma de aproximar os testes da situação real, visto que as fêmeas depositam ovos nos criadouros tratados. O uso de L1 em vez de larvas mais desenvolvidas aumenta a sensibilidade do teste, conforme demonstrado por Melo-Santos et al. (2001).

Tanto à sombra como ao sol, o pó técnico e o comprimido tiveram idêntica eficácia inicial de controle (mortalidade de 98 a 100%), indicando que o produto formulado libera uma quantidade satisfatória de princípio ativo na zona trófica das larvas nas primeiras 48 h após aplicação. Este fator é extremamente importante para garantir uma cobertura larvicida eficaz desde as primeiras horas após a aplicação, uma vez que em condições reais, larvas de diferentes estádios poderão estar presentes nos recipientes no momento da aplicação do produto. À sombra, os produtos testados permaneceram eliminando todas as larvas ao longo de 6 meses. A efetiva duração da atividade larvicida do produto pode ser maior, visto que na última avaliação foi detectado 100% de mortalidade das L1 expostas em todas as réplicas dos experimentos conduzidos à sombra. A retirada de até 60% da água tratada e conseqüente diluição do produto remanescente pela adição de água, poderiam ter efeito negativo sobre a persistência da ação larvicida, no entanto isto não ocorreu durante o período observado (180 dias). No caso do tratamento com comprimido, o fato deste sedimentar rapidamente e permanecer no fundo do recipiente, sugere que grande parte do princípio ativo permaneça concentrada nesta região. Assim, é possível que o processo de troca de água não tenha produzido uma agitação da água suficiente para ressuspender cristais e esporos, favorecendo sua eliminação.

Longa persistência de um comprimido à base de Bti foi também observada por Mulla et al. (2004), que registraram excelente controle de larvas de *Ae. aegypti* em jarras de cerâmica por cerca de 112 dias. Benjamin et al. (2005) relataram persistência de atividade

de 166 dias do comprimido VectoBac DT contra *Aedes* spp, com renovação semanal de 50% do volume de água, em jarros. Sabe-se que a persistência da atividade do Bti depende tanto de características próprias da formulação como de condições ambientais no criadouro, que sejam favoráveis à preservação da integridade das moléculas dos cristais protéicos. A preservação da viabilidade dos esporos é outro fator determinante, pois em condições favoráveis pode ocorrer, no interior das larvas mortas pelo Bti, multiplicação e esporulação com produção de toxinas (Aly 1985, Aly et al. 1985, Khawaled et al. 1988).

Os resultados do presente estudo confirmam a importância da radiação solar como fator de forte impacto negativo sobre a persistência da toxicidade do Bti no ambiente, como observado em estudos anteriores (Obeta 1996; Nayar et al. 1999; Thiéry et al. 1999, Melo-Santos et al. 2001, Vilarinhos & Monnerat 2004). No teste realizado no período com maior incidência de radiação solar (outubro, 2005), houve uma queda rápida do índice de mortalidade, para menos de 70% na 2ª semana, com perda total da atividade larvicida na 4ª semana após tratamento. Mudanças de alguns aspectos da água foram observados após a primeira semana, como a eutrofização e a alcalinidade do ambiente. Sabe-se que pH muito alcalino favorece a solubilização dos cristais protéicos, deixando as pró-toxinas mais expostas à degradação. A associação destes fatores parece contribuir para reduzir drasticamente a atividade larvicida do produto, sobretudo quando a radiação solar atinge níveis $\geq 9,0$ h diárias seguidas. Nossos resultados sugerem que os adjuvantes contidos na formulação podem proteger, até certo ponto os cristais de efeitos deletérios do ambiente. Nos testes com exposição solar realizados em outros períodos do ano, a persistência foi surpreendentemente longa: 77 a 119 dias. Apesar da queda dos índices de mortalidade abaixo do valor limite previamente estabelecido (80%), a avaliação foi continuada nestes

testes, com o objetivo de confirmar a perda de atividade do produto, o que não foi confirmado. A suspensão naquele momento poderia ter levado a uma interpretação equivocada sobre o tempo de persistência. Outro aspecto a ser considerado é a recuperação dos níveis de atividade larvicida nos recipientes, após a 2ª semana, mantendo índices quase sempre superiores a 80% nas semanas subsequentes (Fig. 3 e 5). Este quadro é bastante sugestivo da ocorrência de reciclagem bacteriana, que poderá ser também a causa da longa persistência nos experimentos à sombra. Em trabalhos recentes nos quais a concentração de esporos na água de recipientes tratados foi avaliada, constatou-se concentração de esporos maior aos cinco meses, do que aquela observada na 1ª semana após tratamento (Araújo et al., dados não publicados), sugerindo a ocorrência de reciclagem e seu possível envolvimento na manutenção da atividade larvicida do Bti por longos períodos.

Os resultados deste estudo confirmam o Bti como um larvicida eficaz para o controle de *Ae. aegypti* em criadouros e que este agente pode persistir por longos períodos mantendo excelente atividade em determinadas condições ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, S.B., Moino Jr., A. and Almeida, J.E.M. (1998). Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In *Controle microbiano de insetos* ed. Alves, S.B. pp. 1143- 1157. São Paulo: FEALQ.
- Aly, C. (1985). Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spores in the gut of *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.* **45**,1-8.

- Aly, C., Mulla, M.S. and Federici, B.A. (1985). Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (Diptera:Culicidae). *J. Invert. Pathol.* **46**, 251-258.
- Batista Filho, A., Alves, S.B., Alves, L.F.A., Pereira, R.M. and Augusto, N.T. (1998). Formulação de entomopatógenos. In *Controle microbiano de insetos* ed. Alves, S.B. pp. 917-956. São Paulo: FEALQ.
- Becker, N. and Ludwig, M. (1993). Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **9**, 221-224.
- Becker, N. and Rettich, F. (1994). Protocol for the introduction of new *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control program in Germany. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **10**, 527-533.
- Becker, N. (2000). Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application* ed. Charles J-F, Delécluse A. and Nielsen-LeRoux, C. pp. 383-396. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Becker, N. (2003). Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the controle of mosquito larvae: a new application technique. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **19**, 63-66.
- Becnel, J.J., Garcia, J. and Johnson, M. (1996). Effects of three larvicides on the production of *Aedes albopictus* based on removal of pupal exuviae. *J Am Mosq Control Assoc.* **12**, 499-502.
- Benjamin, S., Rath, A. Fook, C.Y. and Lim, L.H. (2005). Efficacy of a *Bacillus thuringiensis israelensis* tablet formulation, vectobac DT, for control of dengue

- mosquito vectors in potable water containers. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. **36**, 879-892.
- Couch, T.L. (2000). Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application* ed. Charles, J-F, Delécluse, A. and Nielsen-LeRoux, C. pp. 297-314. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- De Barjac, H & Larget- Thiery. (1984). Characteristics of IPS82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. *Mimeogr. Doc.*, WHO/VBC/84.892, 10 pp.
- Fundação Nacional de Saúde (2002). Vigilância epidemiológica: Programa Nacional de Controle da Dengue-2002.
- Gill, S.S., Cowles, E.A. and Pietrantonio, P.V. (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.* **37**, 616-636.
- Guillet, P., Kurstak, D.C., Philippo, B. and Meyer, R. (1990). Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for Onchocerciasis Control in West Africa. In *Bacterial control of mosquitoes and blackflies* ed. De Barjac, H. and Sutherland, D.J. pp. 187-199. New Jersey: Rutgers University Press.
- Habib, M.E.M., Alves, S.B. and Alves, L.F.A. (1998). Padronização de inseticidas microbianos. In *Controle microbiano de insetos* ed. Alves, S.B. pp. 779-797. São Paulo: FEALQ,
- Hougard, J.M., Yaméogo, L., SéKétèli, A., Boatin, B. and Dadzie, K.Y. (1997). Twenty-two years of blackfly control in the onchocerciasis control programme in west Africa. *Parasitology Today* **13**, 425-431.

- Khawaled, K., Barak, Z. and Zaritsky, A. (1988). Feeding behavior of *Aedes aegypti* larvae and toxicity of dispersed and of naturally encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invert. Pathol.* **52**, 419-426.
- Lima, J.B.P., Cunha, M.P., Silva Júnior, R.C., Galardo, A.K.R., Soares, S.S., Braga, I.A., Ramos, R.P., and Valle, D. (2003). Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**, 329-333.
- Luna, C.L., Lopes, C.E. and Massarani, G. (2002). Recovery of *Bacillus sphaericus* 2362 spores from growth medium by flocculation/sedimentation. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **25**, 213-216.
- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T., Takaku, L., Glasser, C.M., Garbeloto, V.C. and Cirino, V.C. (1999). Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of Sao Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica* **33**, 521-522.
- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T., Takaku, L., Glasser, C.M., Garbeloto, V.C. and Bracco, J.E. (2003). Resistance of *Aedes aegypti* from the state of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**, 703-708.
- Mardini, L.B.L.F., Torres, M.A.N., Silveira, G.L., and Atz, A.M.V. (2000). *Simulium* spp. Control Program im Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**, 211-214.
- Medeiros, F.P.M. (2001). Desenvolvimento de formulações à base de *Bacillus shpaericus* para obtenção de um biolarvicida. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE.

- Melo-Santos, M.A.V., Sanches, E.G., Jesus, F.J. and Régis, L.N. (2001). Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**, 859-860.
- Mulla, M.S. (1990). Activity, field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquitoes. In *Bacterial control of mosquitoes and blackflies* ed. De Barjac, H. and Sutherland, D.J. pp. 134-160. New Jersey: Rutgers University Press.
- Mulla, M.S., Thavara, U., Tawatsin, A. and Chompoosri, J. (2004). Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **20**, 64-73.
- Nayar, J.K., Knight, J.W., Aly, A., Carlson, D.B. and O'Bryan, P. D. (1999). Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against two Florida mosquito species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **15**, 32-42.
- Obeta, J.A.N. (1996). Effect of inactivation by sunlight on the larvicidal activities of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* H-14 isolates from Nigerian soils. *J. Commun. Dis.* **28**, 94-100.
- Poncet, S., Delécluse, A., Klier, A. and Rapoport, G. (1995). Evaluation of synergistic interactions among the cryIVA, cryIVB, and cryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J. of Invert. Pathol.* **66**, 131-135.
- Régis, L., Silva, S.B. and Melo-Santos, M.A.V. (2000). The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**, 207-209.

- Regis L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C. and Charles, J.F. (2001). Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasit.* **17**, 377-380.
- Ruas Neto, A. (1984). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como alternativa no controle de simulídeos no Rio Grande do Sul. 1. Susceptibilidade a campo. *Boletim de Saúde* **11**, 21-26.
- Skovmand, O., Isabelle, T. and Benzon, G. (2000). Is *Bacillus thuringiensis* standardization still possible?. In *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application* ed. Charles, J-F, Delécluse, A. and Nielsen-Leroux, C. pp. 275-295. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Skovmand, O., Hoegh, D., Pedersen, H.S. and Rasmussen, T. (1997). Parameters influencing potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products. *Biol. and Microbial Control* **90**, 361-369.
- Thiéry, I., Fouque, F., Gaven, B. and Lagneau, C. (1999). Residual activity of *Bacillus thuringiensis* serovars *medellin* and *jegathesan* on *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **15**, 371-379.
- Vilarinhos, P. T. R. and Monnerat, R. (2004). Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **20**, 311-314.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo apoio financeiro. À Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda (BIOTICOM), por fornecer o produto experimental utilizado neste estudo e permitir a divulgação dos resultados encontrados. Ao Instituto Pasteur por fornecer amostras do IPS82, liofilizado padrão à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*. A Fundação Oswaldo Cruz/PDT-SP/Rede Dengue pelo apoio financeiro. Ao Departamento de Zoologia da UFPE por ceder as instalações onde foram realizados os testes sob condições simuladas de campo. Ao Dr. André Freire Furtado pela valiosa contribuição científica dada na correção deste manuscrito.

Tabela 1. Atividade tóxica de amostras de pó técnico de *Bacillus thuringiensis israelensis*, provenientes de diferentes lotes de produção, estimada através de bioensaios contra larvas de 4º estágio de *Aedes aegypti*-Recife-Lab. Foram utilizadas em média 480 larvas na avaliação de cada teste.

Lote-Pó Técnico	Valor p ¹	CL ₅₀ ² (mg/L) (Intervalo de Confiança 95%)	CL ₉₀ ³ (mg/L) (Intervalo de Confiança 95%)
01	0,621	0,144 (0,133 - 0,154)	0,204 (0,191 - 0,222)
07	0,631	0,155 (0,146 - 0,166)	0,237 (0,219 - 0,263)
09	0,330	0,203 (0,184 - 0,222)	0,372 (0,340 - 0,416)
08	0,469	0,233 (0,214 - 0,254)	0,387 (0,356 - 0,427)
10	0,961	0,237 (0,213 - 0,265)	0,436 (0,388 - 0,506)
06	0,530	0,246 (0,221 - 0,273)	0,415 (0,377 - 0,465)
02	0,722	0,254 (0,231 - 0,279)	0,419 (0,381 - 0,469)
05	0,839	0,437 (0,390 - 0,497)	0,786 (0,694 - 0,919)
04	0,647	0,439 (0,396 - 0,485)	0,799 (0,728 - 0,893)
03 ⁴		> 1,2	

¹ P = probabilidade para um nível de 5% de significância.

² CL₅₀= Concentração letal para 50% das larvas

³ CL₉₀= Concentração letal para 90% das larvas

⁴ Lote desconsiderado para efeito de avaliação, por apresentar baixa atividade.

Tabela 2. Atividade tóxica de amostras de pó técnico de *Bacillus thuringiensis israelensis*, provenientes de diferentes lotes de produção, estimada através de três bioensaios, contra larvas de 4º estágio de *Aedes aegypti*-Recife-Lab. Foram utilizadas, em média 1.440 larvas na avaliação de cada teste.

Apresentação do produto-lote	CL ₅₀ ¹ (mg/L) Média±DP ³ (Intervalo de Confiança 95%)	CL ₉₀ ² (mg/L) Média±DP (Intervalo de Confiança 95%)	Viabilidade Microbiológica (UFC/ml) ⁴
Pó Técnico-lote 01	0,140 ± 0,004 (0,126 - 0,154)	0,241 ± 0,040 (0,220 - 0,269)	1,5 x 10 ⁷
Pó Técnico-lote 05	0,514 ± 0,097 (0,465 - 0,573)	0,889 ± 0,161 (0,797 - 1,02)	1,3 x 10 ⁷
Pó Técnico-lote 10	0,245 ± 0,014 (0,207 - 0,298)	0,436 ± 0,002 (0,373 - 0,575)	2,5 x 10 ⁷
Liofilizado-IPS82 ⁵	0,013 ± 0,002 (0,011 - 0,015)	0,026 ± 0,004 (0,023 - 0,031)	4,2 x 10 ⁹

¹CL₅₀= Concentração letal para 50% das larvas

²CL₉₀= Concentração letal para 90% das larvas

³Desvio padrão

⁴UFC = unidade formadora de colônia por mililitro

⁵IPS82 = liofilizado padrão para preparações à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*

Tabela 3. Atividade larvicida residual de amostras de diferentes lotes de pó técnico e comprimido à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, contra larvas de *Aedes aegypti*-Recife-Lab, em testes realizados em recipientes à sombra, no período de fevereiro de 2005 a março de 2006. Todos os testes foram feitos em triplicata.

Grupo	Período de avaliação	Apresentação	Nº larvas	Período de avaliação ¹ (dias)	Mortalidade ² larval (%) no período $\bar{X} \pm DP$ ³
Lote-01	fev-ago/05	Pó Técnico	3.600	180	100
		Comprimido	3.600	180	100
Controle ⁴	fev-ago/05	_____	3.600	180	4,6 $\pm$ 0,64
Lote-05	set/05-mar/06	Comprimido	3.600	180	100
Lote-10	set/05-mar/06	Comprimido	3.600	180	100
Controle	set/05-mar/06	_____	3.600	180	4,4 $\pm$ 0,41

¹ Período após um único tratamento com o produto, durante o qual a mortalidade larval foi superior a 80%.

² Mortalidade larval durante o período

³ Média $\pm$ Desvio padrão

⁴ Sem tratamento com Bti

Tabela 4. Mortalidade de larvas de 4º estágio de *Aedes aegypti*, segundo o tempo de armazenamento de comprimidos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, provenientes de dois diferentes lotes de produção, mantidos em temperatura ambiental variando de 25° a 27° C e umidade relativa de 60% a 80%. Os testes foram realizados em intervalos trimestrais, num período total de um ano.

Comprimido/Lote	Mortalidade larval (%) $\bar{X} \pm DP^1$				
	2 dias	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
01	98,7 $\pm$ 1,1	100,0	98,7 $\pm$ 1,1	100,0	98,7 $\pm$ 1,1
02	99,1 $\pm$ 0,5	98,7 $\pm$ 1,1	100,0	100,0	100,0
0 (controle)	0	1,0 $\pm$ 1,4	0	0,5 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 1,4

¹Média $\pm$ Desvio padrão

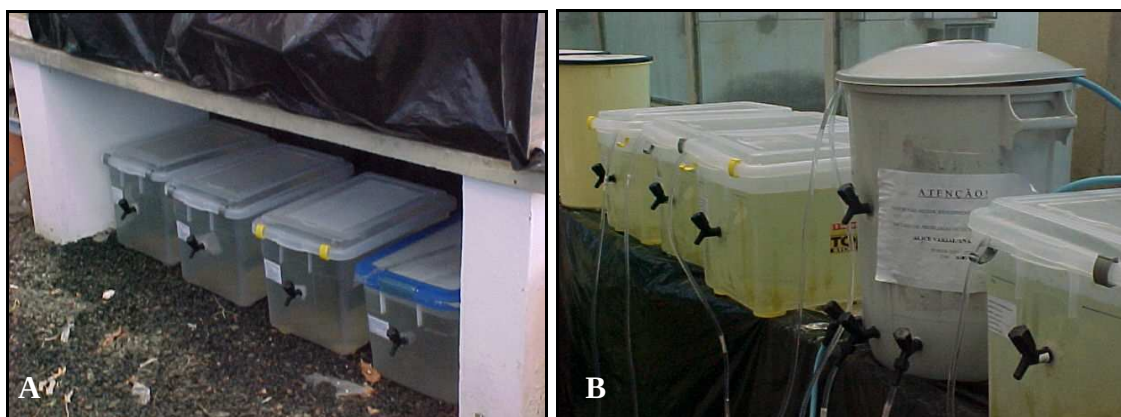


Figura 1. Condições de manutenção dos recipientes experimentais na área teste. Recipiente retangular em plástico transparente na condição de sombra (A) e na condição de sol, destacando o sistema de renovação de água por torneiras e mangueiras (B).

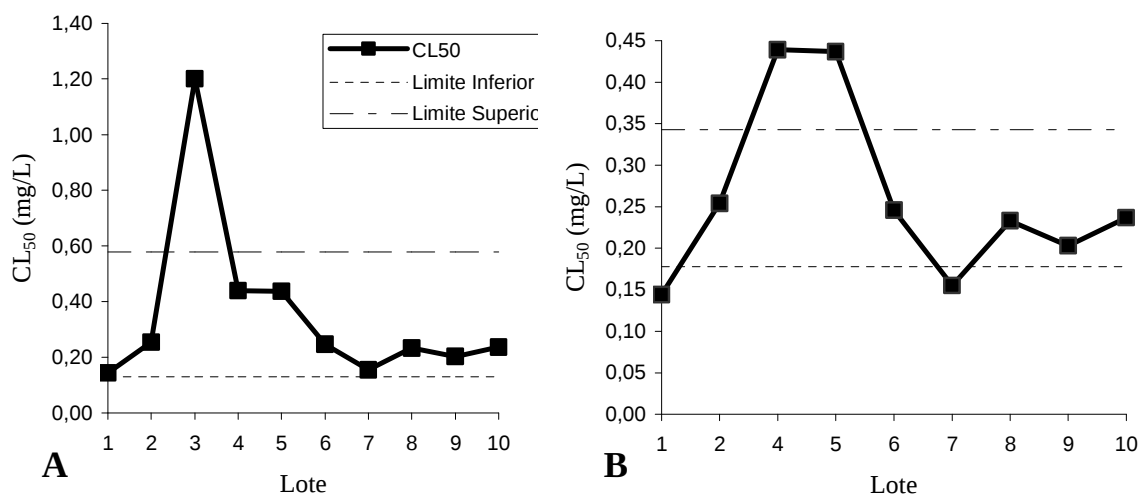


Figura 2. Valores de CL₅₀ dos pós técnicos de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, em diferentes lotes de produção. A- Incluindo todos os lotes. B- Excluindo o lote 03.

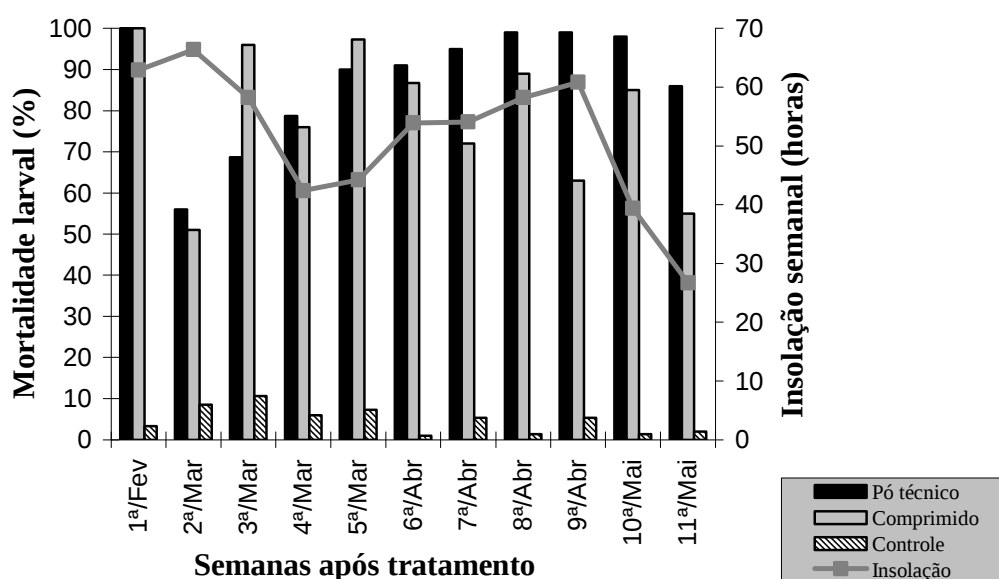


Figura 3. Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 01 à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* mensurada contra larvas de 1º estágio de *Aedes aegypti*, em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade comparados com o nível de insolação semanal, registrado de fevereiro a maio de 2005. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.

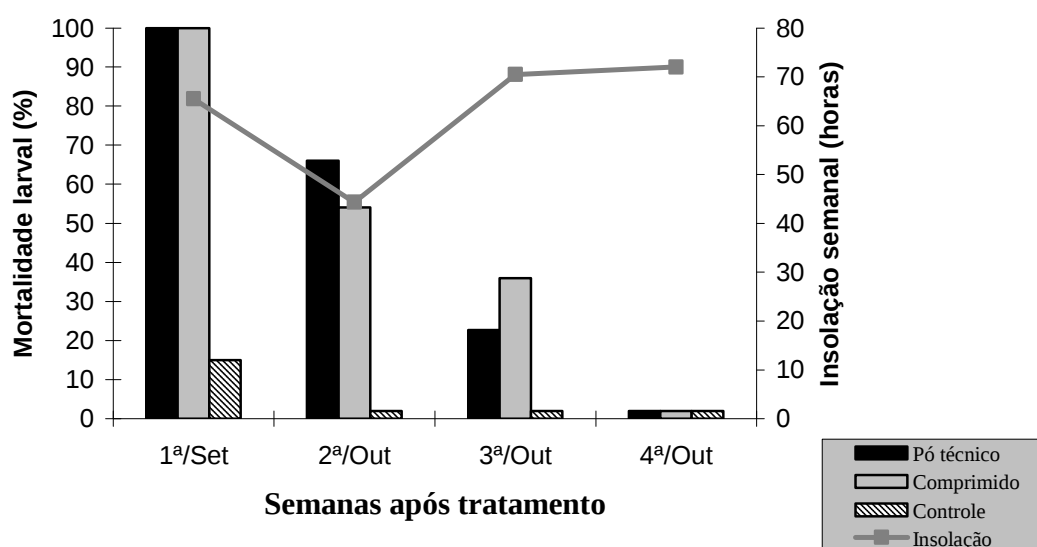


Figura 4. Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 10 à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* mensurada contra larvas de 1º estágio de *Aedes aegypti*, em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade comparados com o nível de insolação semanal, registrado de setembro a outubro de 2005. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.

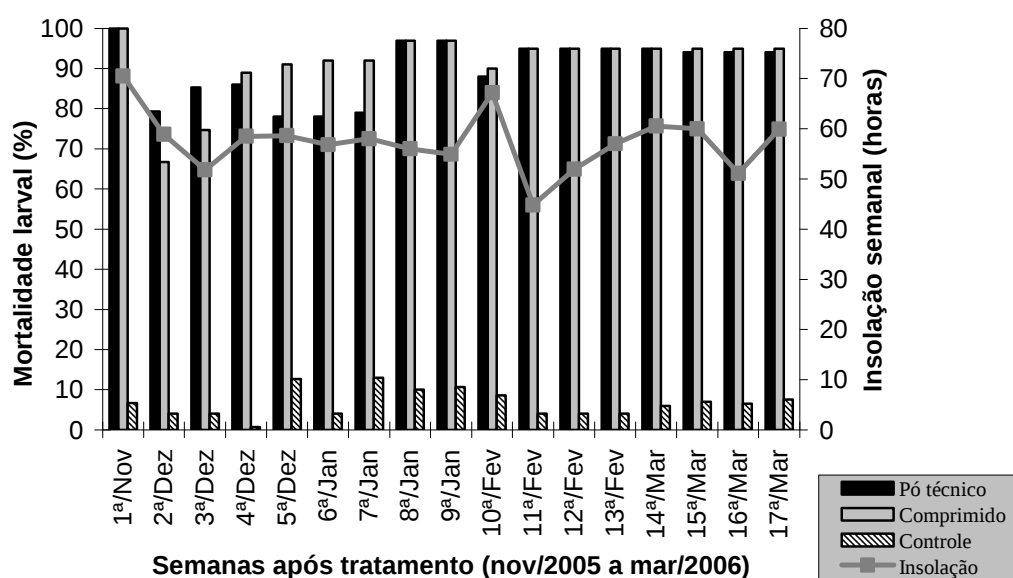


Figura 5. Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 10 à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* mensurada contra larvas de 1º estágio de *Aedes aegypti*, em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade comparados com o nível de insolação semanal. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.

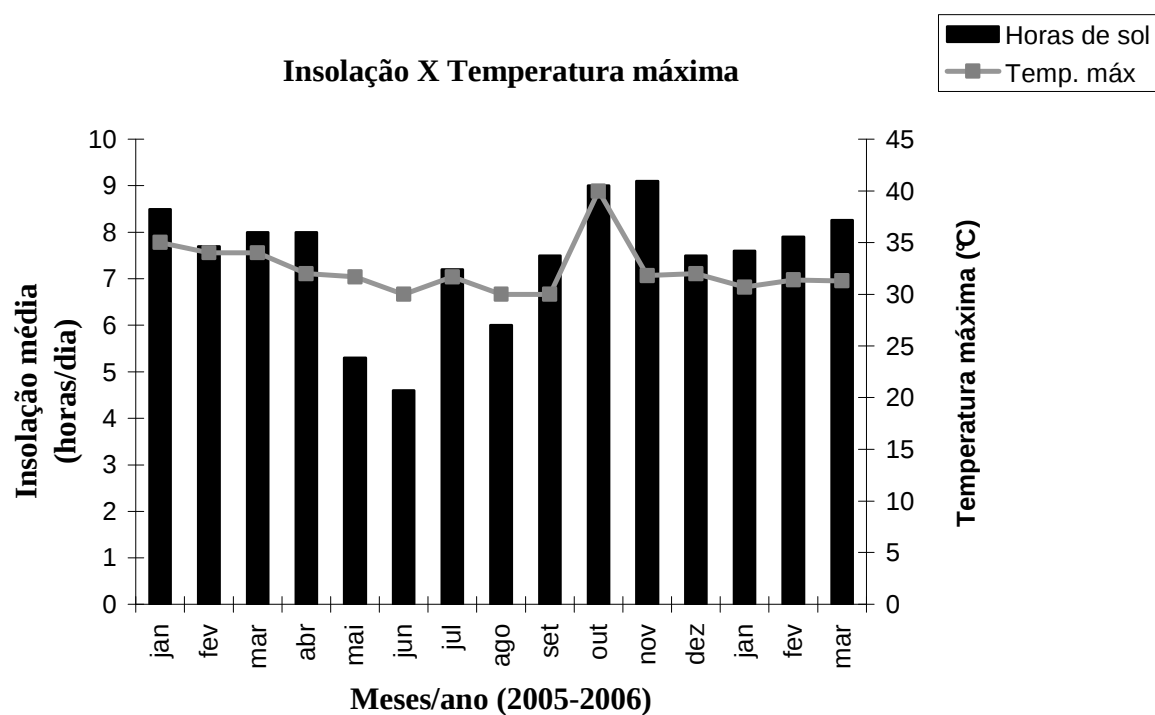


Figura 6. Insolação média e temperatura máxima registradas nos meses de janeiro de 2005 a março de 2006, na Região Metropolitana do Recife. Dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.

CAPÍTULO 2

**Avaliação de fatores bióticos no desempenho de um produto experimental à base de
Bacillus thuringiensis israelensis, para larvas de *Aedes aegypti***

Evaluation of biotic factors under an experimental product based on *Bacillus thuringiensis israelensis* against *Aedes aegypti* larvae.

**Ana Paula de Araújo¹; Sidney Oliveira Carlos²; Maria Alice Varjal de Melo Santos²;
Eugênia Maria Maranhão Rios³; Lêda Regis²**

¹Mestrado em Biologia Animal, Departamento de Zoologia – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Moraes Rego, 1235, CEP: 50670-420. ²Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Caixa Postal 4742, CEP: 50670-420. ³BIOTICOM – Biotecnológica Indústria e Comércio. Recife, PE, Brasil.

Maria Alice Varjal de Melo Santos

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária

Campus da UFPE, Recife, PE

CEP: 50.670-420

E-mail: mavarjal@cpqam.fiocruz.br

RESUMO

Testes em campo simulado (TCS) foram realizados para avaliar uma formulação experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) nas apresentações de comprimido (C) e pó técnico com esporos ativos (PT) ou inativados (PTI) contra larvas de *Aedes aegypti*. Os efeitos da radiação gama sobre a viabilidade microbiológica e a toxicidade do PTI foram avaliados em laboratório. O desempenho de um comprimido (250 mg), contendo 15% de princípio ativo, e de 250 mg de PT ou PTI, testados em recipientes plásticos com 50 L de água, à sombra, foi avaliado em TCS com as seguintes variáveis: presença ou não de esporos ativos; introdução semanal ou mensal de larvas. A eficácia inicial do produto foi estimada pela mortalidade de L4 em 48 h, e a persistência, estimada pela mortalidade ao longo do tempo, após introduções periódicas de lotes de L1. Amostras de águas foram coletadas durante os experimentos nos recipientes tratados para verificar a concentração de esporos (UFC/ml). Os resultados demonstraram que 20 KGy de radiação gama inativou 99,9% dos esporos, mas reduziu em 50% a CL₅₀ do Bti. Em TCS, PTI, PT, e C eliminaram de 90% a 100% das larvas em 48 h, e permaneceram promovendo controle total por 6 meses. Não houve diferenças na persistência da atividade larvicida entre recipientes tratados com PT ou PTI, nem entre aqueles colonizados com quantidades diferentes de larvas/mês. Diferenças significativas na concentração bacteriana foram observadas ao longo do tempo entre recipientes tratados com PT e PTI, mas a concentração de Bti mantida após um único tratamento garantiu permanência da atividade larvicida durante 6 meses em todas as situações experimentais testadas.

PALAVRAS-CHAVE: formulações experimentais, *Bacillus thuringiensis israelensis*, esporos inativos teste em campo simulado, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Tests under simulated field condition (TSF) were carried out to evaluate experimental products based on *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), a tablet (T) containing 15% of active principle, an irradiated technical powder (ITP) and a non-irradiated TP. The effects of gamma irradiation on spore viability and on the ITP toxicity have been assessed in laboratory. The TSF were conducted in a shadowed area using plastic containers filled with 50L of water treated with the dosages: one 250 mg T, or 250mg of TP or 250 mg of ITP/ container. The effects of the following conditions on the residual larvicidal activity have been evaluated: spore viability, and larval density. The initial efficacy of the products was estimated by assessing L4 mortality after 48 h exposure. The activity persistence time was estimated by counting the surviving pupae after periodical introduction of 50 L1. Water samples were periodically taken from treated containers to estimated spore concentration. Results showed that 20 KGy caused a 99,9% spore inactivation, but the ITP toxicity showed a 50% reduction. Under TSF, larval mortality ranged from 90% to 100% after 48h exposure to either ITP or TP or T and all the three materials promoted 100% mortality over the experiment time, witch was 180 days. No difference was observed in the persistence time between containers treated with ITP or TP. Similarly, no influence of the larvae density (50 or 200 L1 introduced per month) on the residual toxicity was observed. Significant differences on the bacterial concentration have been recorded between containers treated with ITP and those treated with TP, but the high levels of larvae mortality observed throughout the tests demonstrate that Bti remained in these as well as in all the other experimental containers in quantities enough to guarantee complete larvicidal activity for at least 6 months after only one treatment.

KEY WORDS: Experimental formulations, *Bacillus thuringiensis israelensis*, inactive spores, semi field test, *Aedes aegypti*.

INTRODUÇÃO

O interesse na aplicação do controle biológico de insetos na área de saúde pública tem aumentado nos últimos anos, em função de problemas relacionados ao aparecimento de populações resistentes de insetos de importância epidemiológica e à poluição ambiental, decorrente do uso continuado de inseticidas químicos. A resistência a inseticidas organofosforados é bem documentada para espécies como *Aedes aegypti*, *Anopheles* spp. e *Culex quinquefasciatus*, mosquitos envolvidos com a transmissão de dengue, malária e filariose, respectivamente (Brogdon et al. 1992; Rawlins 1998; Karunaratne & Hemingway 2001). O *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) é uma bactéria entomopatogênica que apresenta atividade contra estes dípteros (de Barjac 1978). O modo de ação deste agente depende da ingestão, solubilização e interação de cristais protéicos, produzidos ao término do processo de esporulação bacteriana, com as células do epitélio intestinal de larvas susceptíveis de mosquitos. Este mecanismo é considerado específico e seletivo, além de diferir inteiramente daqueles apresentados pelos produtos químicos (Gill et al. 1992; Brogdon & McAllister 1998; Braga et al. 2004).

As formulações contendo este entomopatógeno estão sendo continuamente aprimoradas visando otimizar a eficácia de controle, e o sucesso de sua utilização está diretamente relacionado à adequação da formulação às características biológicas e ecológicas do inseto-alvo (Becker et al. 1992). O uso de formulações e doses adequadas a cada situação ambiental é vantajoso, além de favorecer a estrutura de programas de controle (Becker et al. 1992; Becker & Rettich 1994; Couth 2000). Para tanto, é imprescindível que novas formulações sejam avaliadas levando em conta fatores que podem interferir em sua atividade, antes de serem preconizadas para uso (Becker et al. 1992; Consoli et al. 1995).

Estão disponíveis no mercado internacional cerca de 15 produtos à base de Bti, em formulações líquidas, sobretudo as suspensões concentradas, ou sólidas, sob a forma de pó molhável, grânulos, comprimidos, roscas e outras, a maioria delas contendo cristais e esporos em seu ingrediente ativo (Becker 2000).

O uso de produtos contendo esporos viáveis de Bti, em água potável, sofreu restrições por parte da Organização Mundial de Saúde, sob a alegação de insuficiência de estudos que comprovassem sua inocuidade à saúde humana. Esta medida foi revista em 1991, passando a considerá-los seguros para uso em qualquer tipo de ambiente (WHO 1999). No entanto, em países como a Alemanha existem leis que restringem a liberação de microorganismos na natureza, devido ao impacto ambiental que seu uso constante possa causar (Becker 2002). Formulações asporogênicas, isto é, que contenham em sua composição apenas cristais protéicos, são consideradas mais aceitáveis do que formulações contendo esporos e cristais (Dulmage et al. 1990; Becker et al. 1991). Uma dificuldade na obtenção de produtos livres de esporos é o custo do processo para a separação de esporo e cristais, tornando mais onerosa a produção (Couch 2000). Uma alternativa a este problema foi a adoção de substâncias quimioesterilizantes ou de radiações gama para a inativação dos esporos (Becker 2002). No entanto, alguns destes procedimentos podem comprometer a persistência da atividade larvicida dos produtos, seja por afetar adversamente os cristais protéicos reduzindo sua toxicidade (Becker 2002), seja por tornar impossível a reciclagem da bactéria no ambiente, em decorrência da inativação total dos esporos.

O objetivo deste estudo foi conhecer o efeito de fatores bióticos, relativos à presença de esporos viáveis e densidade de larvas, sobre a eficácia e persistência de um produto experimental à base de Bti em condições simuladas de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos: As larvas de *Aedes aegypti*, 1º (L1) ou 4º estágio (L4), utilizadas neste trabalho, foram provenientes da colônia Recife-Lab, mantida no Insetário do CPqAM/Fiocruz desde 1996. As condições gerais de manutenção foram: $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de 65% a 85%, fotoperíodo 12/12 (L/D), sendo alimentadas diariamente com ração para gatos (Whiskas®) esterilizada e macerada.

Produto: foram testadas amostras de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* cepa IPS82, sob a apresentação de pó técnico e comprimido. Os comprimidos, pesando 250 mg, continham 15% de princípio ativo, com potência de 750 UTI/mg. Este material foi produzido pela Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda (BIOTICOM/NECTAR-UFPE).

Inativação dos esporos por radiação gama: 10 g do pó técnico foram divididas em 5 amostras e submetidas às doses de 0 (amostra controle), 16, 18; 20 e 30 Kilogray (KGy) de radiação gama por um período máximo de 7,5 horas. Para tanto, foi utilizada como fonte de emissão a bomba de cobalto 60, no irradiador NordionGammacell 220, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Para verificar o efeito das diferentes doses de radiação sobre a viabilidade dos esporos, duas alíquotas de 100 µl de uma suspensão 100 mg/ml de cada amostra irradiada foram plaqueadas em meio agar nutritivo (AN). As placas foram incubadas em estufa a 30°C, por 24 horas, de acordo com o procedimento descrito por Becker (2002). A viabilidade microbiológica destas amostras foi verificada pelo

crescimento bacteriano, expresso em unidades formadoras de colônia (UFC/ml), e sua relação com a radiação foi analisada por regressão linear (Software R, versão 2.1.1). Este procedimento foi realizado para selecionar a amostra com maior inativação dos esporos em relação à amostra controle que não sofreu irradiação, para sua avaliação em testes sob condições simuladas de campo (TCS).

Avaliação de efeitos da radiação gama sobre a atividade larvícida: a atividade tóxica das amostras irradiadas foi estimada através de bioensaios realizados de acordo com a metodologia descrita por de Barjac & Larget-Thiéry (1984) para preparações de Bti. Grupos homogêneos de 20 L4 foram colocados em copos contendo 100 ml de água destilada e tratados com sete diferentes concentrações de cada amostra irradiada, sendo cada concentração testada em triplicata. Três copos não tratados serviram como controle. Os ensaios foram repetidos em três datas diferentes. A partir das respostas de mortalidade, verificadas às 24 horas de exposição ao patógeno, foram estimadas as concentrações letais para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das larvas, por regressão linear log-Probit (SPSS 8.0 for windows). A relação entre os valores de CL₅₀ e as doses de radiação gama usadas no tratamento das amostras foi também analisada por regressão linear.

Testes sob condições simuladas de campo (TCS): as duas apresentações do produto, pó técnico e comprimido, foram testadas de acordo com a metodologia descrita por Melo-Santos *et al.* (2001). Os experimentos foram realizados ao abrigo do sol na área interna de uma casa de vegetação (96 m²). Para os testes foram utilizados recipientes plásticos transparentes (56,4 x 38,5 x 37,1 cm), preenchidos com 50 litros de água de poço, tratados com: 1 comprimido, 250 mg do pó técnico-irradiado (PTI) ou 250 mg do pó técnico não

irradiado (PT). Para cada situação experimental foram utilizadas três réplicas. Um recipiente representativo de cada situação não recebeu tratamento com Bti e foi utilizado como controle. A temperatura e o pH da água foram registrados três vezes/semana.

Avaliação de efeitos de variáveis sobre a atividade larvicida: a atividade larvicida residual do produto foi analisada considerando duas variáveis: densidade larval e presença de esporos ativos ou inativos. A avaliação foi feita de acordo com o seguinte desenho experimental: **a)** os recipientes foram colonizados com 50 L1/semana ou 50 L1/mês sem reposição de água; **b)** recipientes foram tratados com o pó técnico irradiado ou com o pó técnico não irradiado, colonizados com 50 L1/semana, submetidos a renovação de 20% do volume de água, três vezes por semana. A renovação de água foi realizada neste experimento visando se aproximar da condição real de campo, simulando o consumo doméstico. A água foi retirada através de uma torneira, situada a 10 cm do fundo dos recipientes. A reposição do mesmo volume foi feita pela superfície, com mangueiras.

Acompanhamento da atividade larvicida em TCS: os parâmetros utilizados na avaliação da atividade larvicida foram: a) eficácia inicial, estimada pela mortalidade larval (%) nas primeiras 48 horas após a aplicação do produto, utilizando 50 L4 jovens/recipiente; b) persistência, que corresponde ao período em dias durante o qual a mortalidade larval foi $\geq 80\%$, estimada pelo número de pupas vivas recuperadas após a introdução, semanal ou mensal, de lotes de 50 L1/recipiente, durante 180 dias. Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados comparativamente pelo teste não paramétrico de Mann

Whitney para duas amostras, ao nível de significância de 5%, utilizando o programa estatístico SPSS versão 8.0 for Windows (1997).

Verificação da concentração de esporos de Bti nos recipientes tratados: a concentração de esporos foi verificada nos recipientes tratados com o pó técnico, irradiado ou não, para constatar se estava havendo ou não crescimento bacteriano, e nos recipientes tratados com comprimido, que receberam colonizações semanais ou mensais, para investigarmos a influencia de diferentes densidades de larvas sobre o crescimento bacteriano. Amostras de 5 ml de água foram coletadas em 3 pontos distintos no fundo dos recipientes com 1, 7 dias e a cada 30 dias após a aplicação do produto. Quando necessário, as amostras foram submetidas a uma diluição seriada antes do choque térmico a 80°C por 12 minutos e gelo por 5 minutos, para eliminação das formas vegetativas. Alíquotas de 5 µl das suspensões 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ou 10^{-3} foram semeadas em cinco pontos em placas de Petri contendo meio AN e incubadas em estufa a 30°C, por 24 horas. As colônias de Bti observadas foram contadas e os resultados, expressos em unidades formadoras de colônia (UFC/ml), foram analisados estatisticamente através do Programa DIFMED. Os valores médios de UFC/ml obtidos nos diferentes momentos de coleta foram comparados pelo Teste t-student com nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Efeitos dos raios gama sobre a viabilidade de esporos e toxicidade do Bti

A análise de regressão da viabilidade de esporos nas amostras expostas às doses 16, 18, 20 e 30 KGy de radiação gama, revelou uma redução significativa ($R^2 = 0,811$) do número de esporos viáveis em função da dose empregada, gerando uma correlação negativa entre estas variáveis ($r = -0,9$) (Fig.1) e (Tabela 1). A maior dose de irradiação reduziu em 99,9% os esporos viáveis. Com base nos resultados de bioensaios contra L4 de *Aedes aegypti*, as amostras irradiadas apresentaram uma redução de 20% a 83,0% da atividade larvicida, quando comparadas com a CL_{50} (0,26 mg/L) do material não irradiado (Tabela 1). Esta redução da toxicidade também apresentou uma correlação com a dose de irradiação ($r = 0,77$) (Fig.1).

Os testes em campo simulado foram realizados com a amostra submetida a 20 KGy, que apresentou o maior índice de inativação de esporos (99,9%) combinado com menor redução da atividade larvicida (Tabela 1), cuja CL_{50} média foi de $0,45 \pm 0,07$ mg/L. A mortalidade larval causada pelo pó técnico irradiado 24 h após tratamento dos recipientes foi de 90%, contra 98% para o pó técnico não irradiado. A partir do 7º dia, tanto o produto irradiado quanto o não irradiado permaneceram promovendo 100% de mortalidade larval até o final do experimento, aos 180 dias após um único tratamento.

A concentração de esporos nos recipientes tratados com o produto não irradiado foi da ordem de 5×10^5 UFC/ml, um dia após o tratamento (Fig. 2). Aos sete dias sofreu uma discreta redução, mantendo-se, entretanto, em valores acima de 1×10^4 UFC/ml nos 6

meses subseqüentes. Nos recipientes tratados com produto irradiado, esporos não foram detectados nas amostras colhidas 24 h após tratamento. A partir do 7º dia foi registrada a presença de esporos viáveis em todas as réplicas. Nos meses seguintes, a concentração bacteriana se manteve oscilando entre 2×10^2 e 7×10^2 UFC/ml (Fig. 2). Na maioria dos momentos analisados, a concentração bacteriana foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos recipientes tratados com o produto irradiado, com exceção das contagens feitas aos 90 e aos 150 dias, quando não foram constatadas diferenças estatísticas ($T=3,2$ e $3,0$ respectivamente, $p > 0,05$).

A temperatura da água nos recipientes variou de 26,3° a 29,8°C e o pH variou de 6,9 a 8,4 ao longo do teste.

Efeitos da frequência de colonização

A persistência da atividade larvicida do comprimido em recipientes com adição semanal ou mensal de larvas durou pelo menos 180 dias, com 100% de mortalidade larval até o final do experimento, independentemente da quantidade de larvas introduzidas no período.

A concentração de esporos nos recipientes colonizados com frequência semanal e mensal foi de $1,3 \times 10^2$ e $7,9 \times 10^1$ UFC/ml, respectivamente, com 1 dia após a aplicação do comprimido (Fig. 3). Uma elevação destes valores foi observada no 7º dia, seguida de redução ao final de um mês e retomada do crescimento bacteriano aos 60 dias (Fig. 3). A partir dos dois meses, valores elevados, oscilando entre $1,2 \times 10^4$ UFC/ml e $2,8 \times 10^4$ UFC/ml, foram mantidos até 6 meses após a aplicação do comprimido. Não houve

diferenças significativas dos valores de UFC/ml entre recipientes colonizados semanal ou mensalmente durante todo o período de avaliação ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

Os experimentos conduzidos neste estudo com o pó técnico de um produto experimental à base de Bti demonstraram que a inativação de esporos por radiação gama é eficaz, mas reduz a CL_{50} do patógeno. No entanto, esta redução não compromete seu desempenho contra larvas de *Ae. aegypti* nas condições deste estudo.

As doses mais altas utilizadas, 20 e 30 KGy, não inativaram completamente os esporos. Ambas promoveram o mesmo percentual de inviabilização, mas a dose mais alta levou a uma redução ainda maior da atividade larvicida, na ordem de 83%, mostrando que o aumento da radiação afetou bem mais os cristais protéicos. Estudos anteriores realizados por Becker (2002) relataram que uma dose de 20,6 KGy foi suficiente para inativar 100% dos esporos do pó molhável Bactimos®, com uma perda de apenas 20% da atividade tóxica.

Nos testes realizados em condições simuladas de campo, a eficácia inicial, bem como a atividade larvicida residual do pó técnico irradiado não diferiu da observada com o material não irradiado: ambos apresentaram excelente desempenho, promovendo controle total por até 180 dias. Embora não tenham sido detectados esporos viáveis de Bti nos recipientes um dia após o tratamento com o pó técnico irradiado, esporos de Bti foram observados nestes recipientes a partir do sétimo dia, embora em concentrações significativamente menores do que nos tratados com o pó não irradiado. O aparecimento de esporos aos 7 dias resultou, provavelmente da multiplicação dos poucos esporos

sobreviventes à radiação (0,1%). É importante destacar que o Bti pode se reciclar nos cadáveres larvais, como demonstrado por Aly et al. (1985).

Enquanto que nos recipientes tratados com o produto irradiado a concentração de esporos 24 h depois da aplicação do produto não foi detectável, nos recipientes tratados com o pó não irradiado a maior concentração bacteriana foi observada neste momento, seguida de uma redução gradual até os 6 meses, porém mantendo, até o final do experimento uma concentração elevada (10^4 esporos/ml). A renovação periódica da água pode ter influenciado nesta redução, causando diminuição da concentração do produto nos recipientes, pela retirada periodicamente de esporos, cristais e cadáveres larvais, e por reduzir a concentração de nutrientes no ambiente aquático, desfavorecendo a reciclagem da bactéria. De toda forma, a atividade larvicida nos recipientes tratados com o pó irradiado ou não irradiado, foi mantida em nível suficiente para causar mortalidade de todas as larvas introduzidas periodicamente nos recipientes, durante os 6 meses do experimento.

Outros trabalhos recentes têm mostrado que o aprimoramento de formulações de Bti tem prolongado o tempo de persistência de sua atividade com bons níveis de cobertura larvicida. Mulla et al. (2004), por exemplo, relataram persistência de até 112 dias do comprimido VectoBac, contra *Ae. aegypti*, em jarras de cerâmica. Benjamin et al. (2005) relataram persistência de atividade de 166 dias do comprimido VectoBac DT contra *Aedes* spp., em jarros.

A persistência da atividade larvicida do comprimido testado em recipientes colonizados mensal ou semanalmente com larvas de *Ae. aegypti*, foi a mesma durante 180 dias. No entanto, a densidade de larvas da espécie-alvo é um dos fatores considerados capazes de influenciar negativamente a atividade larvicida de produtos bacterianos (Mulla 1990; Becker et al. 1992; Nayar et al. 1999). Estudos realizados tanto em laboratório

quanto em campo mostraram que em ambientes com altas densidades de larvas, sobretudo em estágio mais avançado de desenvolvimento, quantidades maiores de produtos bacterianos são necessárias para promover controle completo (Mulla 1990; Becker et al. 1992). Em nossos experimentos utilizando larvas de primeiro estágio, tal efeito não foi observado, possivelmente por que a maior densidade larval testada não tenha promovido um consumo significativamente maior do produto. O uso de L1, em vez de L4, para o acompanhamento de persistência da toxicidade do Bti em experimentos em campo simulado, é importante porque simula a situação em campo real, e também porque as larvas mais jovens são mais sensíveis, permitindo maior precisão na avaliação da persistência (Melo-Santos et al. 2001). Outro fator importante para a manutenção da atividade destes produtos é a capacidade que têm estas bactérias de se reciclar nos cadáveres das larvas, prolongando a ação larvicida residual. De acordo com Aly et al. (1985) um cadáver de L4 de *Ae. aegypti* pode conter de 7 a 14×10^4 esporos de Bti, 72 h após sua ingestão. Neste caso, a alta densidade de larvas poderia influenciar positivamente, possibilitando maior crescimento bacteriano no criadouro. Em nosso estudo, o número de esporos viáveis foi, entretanto, similar entre os recipientes com diferentes quantidades de larvas.

As variações na concentração de esporos em recipientes devem ser interpretadas com cautela. A forma de apresentação do produto, por exemplo, deve ser levada em consideração. Em nossos experimentos, diferenças na concentração de esporos foram observadas 24 h após o tratamento com o pó técnico ou com o comprimido, aplicados na mesma dose. Isto se explica pela lenta liberação do princípio ativo agregado, no caso do comprimido. É interessante observar que aos 180 dias, concentrações similares, da ordem de 10^4 , foram registradas nos dois casos.

O aumento da concentração bacteriana observado no período entre 30 e 180 dias após tratamento com o comprimido, pode ser indicativo de reciclagem bacteriana, visto que aos 180 dias a concentração bacteriana foi 100 vezes maior do que aos 30 dias. Em resumo, independentemente das variáveis testadas, a avaliação da atividade larvicida pela introdução periódica de larvas de 1º estágio permite constatar a manutenção de altos níveis de toxicidade do produto aplicado, em forma de pó ou comprimido, durante pelo menos 180 dias. Este prolongado efeito residual ocorreu independentemente da elevação, manutenção nos mesmos níveis, ou redução da concentração de esporos de Bti nos recipientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aly, C., Mulla, M.S. and Federici, B.A. (1985). Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *J. Invert. Pathol.* **46**, 251-258.
- Becker, N., Djakaria, S., Kaiser, A., Zulhasril, O. and Ludwig, H.W. (1991). Efficacy of a new tablet formulation of an asporogenous strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*. *Bull. Soc. Vector Ecol.* **16**, 176-182.
- Becker, N., Zgomba, M., Ludwig, M., Petric, D. and Rettich, F. (1992). Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **8**, 285-289.
- Becker, N. and Rettich, F. (1994). Protocol for the introduction of new *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control program in Germany. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **10**, 527-533.

- Becker, N. (2000). Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. ed. Charles J-F, Delécluse, A. and Nielsen-LeRoux, C, pp. 383-396. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Becker, N. (2002). Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by gamma radiation. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **18**, 57-62.
- Benjamin, S., Rath, A., Fook, C.Y. and Lim, L.H. (2005). Efficacy of a *Bacillus thuringiensis israelensis* tablet formulation, vectobac DT, for control of dengue mosquito vectors in potable water containers. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **36**, 879-892.
- Braga, I.A, Lima, J.B.P., Soares, S.S. and Valle, D. (2004). *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **99**, 199-203.
- Brogdon, W.G., Beach, R.F., Barber, A.M. and Cordon-Rosales, C. (1992). A generalized approach to detection of organophosphate resistance in mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.* **6**, 110-114.
- Brogdon, W.G. and McAllister, J.C. (1998). Insecticide resistance and vector control. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 605-613.
- Consoli, R.A.G.B., Carvalho-Pinto, C.J., Oliveira, M.A., Santos, B.S., Lamounier, M.A., Alves, R.S.A., Silva, C.M.B. and Rabinovitch, L. (1995). Some environmental and biological factors influencing the activity of entomopathogenic *Bacillus* on mosquito larvae in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **90**, 121-124.
- Couch, T.L. (2000). Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application* ed. Charles, J-F., Delécluse, A. and Nielsen-Leroux, C. pp. 297-314. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

- De Barjac, H. (1978). Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *B. thuringiensis* var. *israelensis* sérotype H14. *C.R. Acad.Sci.* **286**, 297-314.
- De Barjac, H. and Larget-Thiery (1984). Characteristics of IPS82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. Mimeogr. Doc., WHO/VBC/84.892, 10 pp.
- Dulmage, H.T., Correa, J.A. and Gallegos-Morales, G. (1990). Potential for improved formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation development, In *Bacterial control of mosquitoes and black flies*. ed. de Barjac, H. and Sutherland, D. J. pp. 110-160. New Brunswick, NJ: Rutgers Univ. Press.
- Gill, S.S., Cowles, E.A. and Pietrantonio, P.V. (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.* **37**, 616-636.
- Karunaratne, S.H.P.P. and Hemingway, J. (2001). Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull. World Health Organ.* **79**, 1060-1066.
- Melo-Santos, M.A.V., Sanches, E.G., Jesus, F.J. and Régis, L.N. (2001). Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**, 859-860.
- Mulla, M.S. (1990). Activity, field efficacy and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes. In *Bacterial control of mosquitoes and black flies*.ed. de Barjac, H. and Sutherland, D. J..pp. 134-160. New Brunswick, NJ: Rutgers Univ. Press.
- Mulla, M.S., Thavara, U., Tawatsin, A. and Chompoosri, J. (2004). Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **20**, 64-73.

- Nayar, J.K., Knight, J.W., Aly, A., Carlson, D.B. and O'Bryan, P.D. (1999). Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against two florida mosquito species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **15**, 32-42.
- Rawlins, S.C. (1998). Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev. Panam. Salud Publica* **4**, 243-251.
- WHO [World Health Organization] (1999). *Microbial pest control agent Bacillus thuringiensis* Environmental Health Criteria 217. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

AGRADECIMENTOS

A Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda (BIOTICOM), por fornecer o produto experimental utilizado neste estudo e permitir a divulgação dos resultados encontrados. Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) pela irradiação do produto experimental. Ao Instituto Pasteur por fornecer amostras do IPS82, liofilizado padrão à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*. Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, onde foi realizado parte este trabalho. Ao Departamento de Zoologia da UFPE por ceder a casa de vegetação onde foram realizados os testes sob condições simuladas de campo. A CAPES pelo apoio financeiro.

Tabela 1. Atividade tóxica e concentração de esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis israelensis* observada para o pó técnico submetido à radiação gama, mensuradas através de bioensaios de laboratório e plaqueamento bacteriano, respectivamente.

Dosagem (KGy)	Número de esporos viáveis (UFC/ml) ² ± DP ³	CL ₅₀ ⁴ (mg/L) (Intervalo de confiança 95%)	Perda de toxicidade (%)
0 ¹	4.400.000.000 ± 148,49	0,26 (0,168-0,344)	0
16	40 ± 14,14	0,30 (0,251 – 0,379)	14,4
18	20 ± 14,14	0,38 (0,314 – 0,470)	31,5
20	5 ± 7,0	0,45 (0,314 – 0,432)	42,2
30	5 ± 7,0	1,41 (1,28 – 1,58)	81,6

0¹ = amostra não irradiada (controle);

²UFC= unidade formadora de colônia;

³Desvio Padrão

⁴CL₅₀= Concentração letal para 50% das larvas

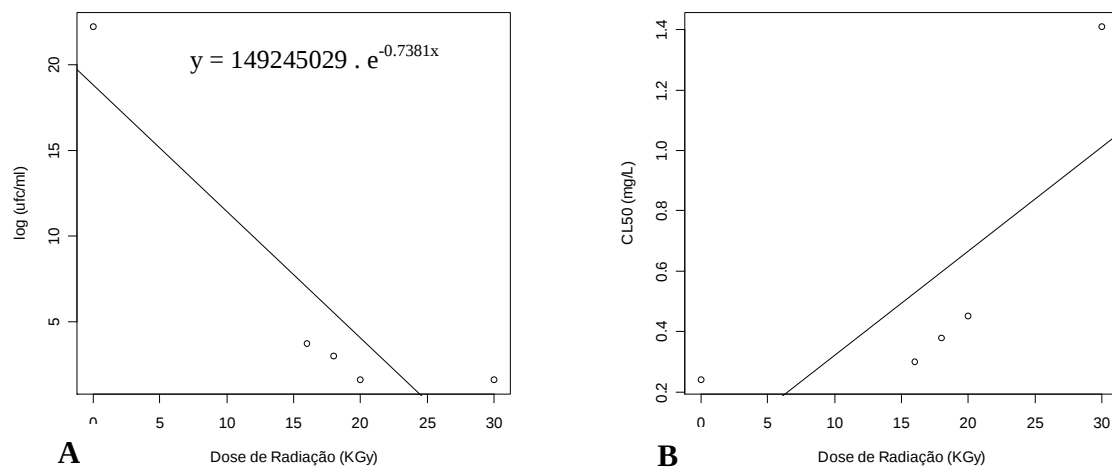


Figura 1. Relação entre diferentes doses da radiação gama e a viabilidade dos esporos (A) e toxicidade (B) do pó técnico de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, avaliada pelas unidades formadoras de colônias (UFC/ml) e pelas concentrações letais (CL₅₀) em bioensaios contra larvas de *Aedes aegypti*-Recife-Lab.

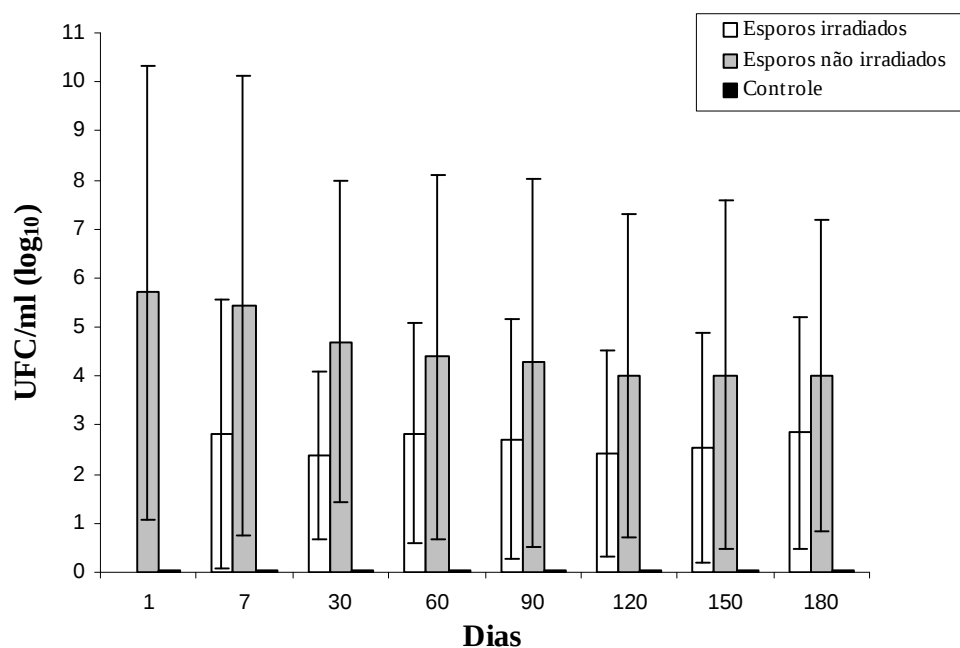


Figura 2. Concentração de esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis israelensis* em recipientes tratados com pó técnico do produto experimental, contendo esporos ativos ou irradiados (20 KGy de radiação gama), deste patógeno, em ensaios de atividade contra larvas de *Aedes aegypti*. Os recipientes foram mantidos ao abrigo do sol, com reposição de 20% do volume de água três vezes por semana.

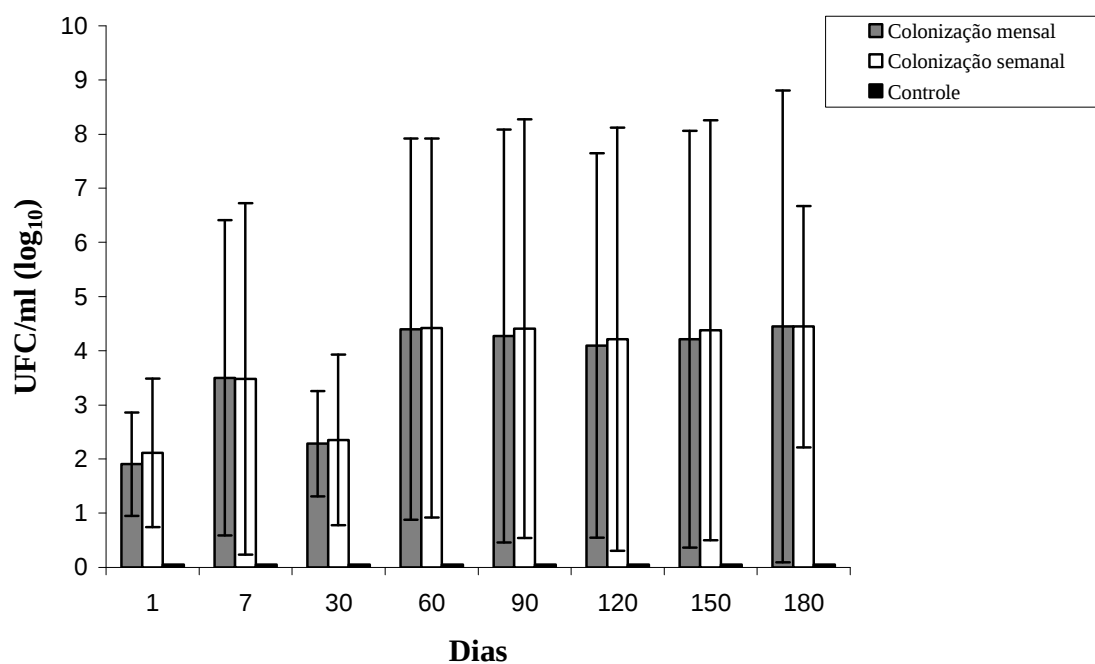


Figura 3. Concentração de esporos viáveis em recipientes tratados com o comprimido de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, mantidos ao abrigo do sol, sem renovação de água, colonizados com larvas de *Aedes aegypti* em intervalos semanais ou mensais.

7. CONCLUSÕES

- A pequena variação da atividade tóxica entre diferentes lotes do pó técnico indica reprodutibilidade das condições de produção.
- As diferenças de toxicidade entre os lotes não se refletem no desempenho do produto em campo simulado.
- As duas apresentações do produto promoveram controle larvicida total contra *Aedes aegypti*, por até 180 dias, à sombra, após um único tratamento.
- Variações sazonais influenciam fortemente a atividade larvicida residual do produto quando exposto ao sol.
- A radiação solar e outros fatores decorrentes dela reduzem a atividade residual do produto em campo simulado.
- Renovação do volume de água em até 60% três vezes/semana, não afetou a atividade residual do produto.
- Não foi possível associar diferenças no crescimento bacteriano com as diferentes densidades de larvas utilizadas.
- A inativação de 99,9% dos esporos não impediu o crescimento bacteriano, nem diminuiu a atividade residual do produto em campo simulado.
- A atividade larvicida do produto experimental em comprimido se manteve estável em condições de armazenamento, durante o período avaliado (um ano).

ANEXOS



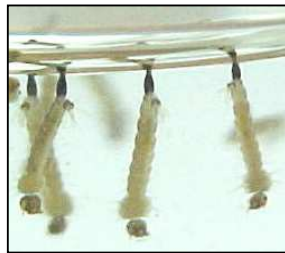
Fêmea



Pupas



Ovos



Larvas 4º estágio

Representação esquemática do ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*