

COMO CITAR ESSE DOCUMENTO:

Andrade, C.F.S.; Gutierrez, M., Cabrini, I., Freitas A.R.R., Galbini, M.B.D. & Felizardo, M. 2007. Uma Comparação entre Vectobac AS e Bt-horus para Larvas de *Aedes aegypti* (Linhagem Rockefeller), 9pp. Página na Internet: Ecologia Aplicada - Instituto de Biologia da UNICAMP. Disponível em: http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/artigos_tecnicos.htm
Acesso em: (colocar a data de acesso)

UMA COMPARAÇÃO ENTRE VECTOBAC AS E BT-HORUS PARA LARVAS DE *Aedes aegypti* (Linhagem Rockefeller).

Carlos Fernando S. Andrade¹ Maria Gutierrez¹ Isaías Cabrini¹, André Ricardo Ribas Freitas², Marisa Bevilacqua Denardi Galbini² e Márcia Felizardo²

¹Departamento de Zoologia, IB - UNICAMP

² Centro de Controle de Zoonoses – Prefeitura de Campinas, SP

Outubro de 2007

1- INTRODUÇÃO

Os produtos Vectobac AS e BtHorus são biolarvicidas de mosquitos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* variedade *israelensis*.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) foi descoberta em 1903 por Ishiwata, causando doença nas larvas do Bicho da Seda, no Japão. A essa doença, o pesquisador deu o nome de ‘Sotto Disease’. Passados alguns anos, foi novamente detectada e formalmente descrita por Berliner em 1911, na Alemanha na província de Thuringia, causando doença na Traça da Farinha que trazia prejuízos aos moinhos. Depois de vários estudos sobre a segurança e especificidade, laboratórios iniciaram a produção em larga escala e assim, o *Bt* foi usado pela primeira vez como inseticida comercial em 1938, na França e depois, passou a ser usado nos EUA a partir de 1950.

Boas revisões podem ser encontradas em HABIB & ANDRADE (1986), VILARINHOS et al. (1998) e Polanczik, R. & Alves, S.B. 2003.

Vários estudos têm demonstrado que *Bt* é uma bactéria nativa de vários ambientes (Meadows, 1993 *apud* Polanczik, R. & Alves, S.B. 2003). A análise de amostras de solo de 30 países representando 5 continentes, em mais de 70% dos casos revelou a presença de várias subespécies de *Bt*, com uma variação de 94% na Ásia e África central e do sul a um mínimo de 56% para a Nova Zelândia. E mais de 60% das amostras de solo da América do Norte também permitiram isolados dessa bactéria. E também, tem sido isolada de ambientes aquáticos e de insetos mortos. A linhagem *israelensis*, por exemplo, já foi até

isolada do solo do Nepal (numa região com 6.000 m altitude, lugar onde nem se cogita encontrar insetos (mosquitos).

A história do descobrimento da linhagem *israelensis*.

Bacillus thuringiensis israelensis (*Bti*) - Foi descoberta em agosto de 1976. E segundo seus descobridores, em uma epizootia no leito quase seco de um riacho no deserto de Negev (próximo ao Kibutz Zeelim). Numa poça de 15x60m, e profundidade de 30 cm, foram encontradas larvas do mosquito *Culex pipiens* mortas pela bactéria, de onde foi isolada (Goldberg & Margalit, 1977). Como nessa época, final da década de 70 já havia produtos à base de *Bt*, em poucos anos foram feitos os estudos de segurança e viabilidade, e essa nova linhagem passou então a ser comercializada.

Atualmente, 21 produtos à base de *Bti* são registrados nos EUA, além dos produtos disponíveis em Cuba e na Europa.

Alguns deles são:

- VectoBac® WDG (Valent Biosciences, USA), Potência: 3.000 ITU/mg
- Vectobac 12 AS (Valent Biosciences, USA), Potência: 1.200 ITU/mg
- Teknar® G e CG (Valent Biosciences, USA), Potência: 200 ITU/mg
- Bactimos® Pellets (Valent Biosciences, USA), Potência: 400 ITU/mg
- Acrobe® (Becker Microbial Products, FL, USA), Potência:
- Mosquito Dunks (Summit Chemical, USA) Potência: 7.000 ITU/mg
- LarvX™ SG (Meridian Vector Management, USA)
- Bmp Green Thumb Ready-to-Use Granules (Becker Microbial Products Inc., Truserv corporation, USA)
- Bactivec ® (Labiofan, Cuba) Potencia não declarada

Esses produtos têm sido desenvolvidos para o controle das formas larvais de dípteros, como mosquitos e borrachudos e são utilizados no mundo todo.

No Brasil, algumas tentativas de se colocar produtos no mercado foram feitas, por exemplo:

- Em 1989, foi assinado o primeiro Acordo de Cooperação Técnico-Científico associando as entidades Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, MS e INPAL S.A. Indústrias Químicas, cujo objetivo foi o de desenvolver um processo de produção de inseticida biológico larvicida à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (B.t.i.), de interesse para a Saúde Pública.
- A Universidade Estadual de Londrina pesquisa o bioinseticida desde 1996 e suas fórmulas já estão sendo usadas experimentalmente por prefeituras e indústrias do norte do Paraná. Há um ano, a Universidade Federal de Pernambuco também desenvolveu um inseticida à base do *Bacillus thuringiensis*, misturado a um

preparado de gramíneas capaz de atrair o mosquito. Fonte: Folha de S.Paulo [19/2/2003].

- A Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Uenf), em Campos dos Goytacazes, no Rio de Janeiro, desenvolve estudos para a obtenção de um produto com as mesmas características e custo reduzido. Segundo Marília Berbet de Molina, do Laboratório de Biotecnologia e coordenadora do projeto, um dos focos da pesquisa é *"otimizar as condições do processo de crescimento microbiano de modo a conseguir o máximo de cristal tóxico, responsável pela morte da larva do Aedis Aegypti"* (sic).

Fonte: <http://www.vivaciencia.com.br/default.asp>

- Em 2003 (EVANILDO DA SILVEIRA, O Estado de S. Paulo, 2003) as notícias indicavam que dois bioinseticidas, um desenvolvido pela empresa Bthek Biotecnologia, de Brasília, em parceria com o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), e outro pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Far-Manguinhos), da Fiocruz, no Rio estavam sendo desenvolvidos para o controle de *Aedes aegypti*.
- Informava-se que: *'...o bioinseticida da Bthek, empresa do agrônomo Marcelo Soares, é líquido e indicado principalmente para lagos e açudes. Segundo Soares, a idéia de produzir o inseticida surgiu em 1999, quando ele fazia pós-doutorado em controle microbiano na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília. "Um ano depois fundei a empresa e dei início ao projeto", conta.'*
'Comprimido - A outra arma, desenvolvida no Far-Manguinhos, é um comprimido, indicado para uso doméstico, como em caixas d'água, piscinas e cisternas. De acordo com os pesquisadores que o desenvolveram, o bioinseticida foi testado e aprovado, dentro dos padrões internacionais de segurança, por uma empresa independente. A aplicação só pode ser feita, no entanto, por agentes de saúde ou empresas especializadas, pois a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e não permite a venda desse tipo de produto para a população leiga.
Os dois bioinseticidas chegarão ao mercado em breve. O da empresa de Brasília começará a ser vendido inicialmente em pequena escala para o Norte e o Nordeste, para operadoras de saúde e empresas especializadas. Sua produção em escala industrial está prevista para setembro. Segundo Soares, o produto custará metade do preço dos similares importados. Os comprimidos do Far-Manguinhos começarão a ser fabricados assim que forem encerradas as negociações com uma empresa brasileira do ramo de fermentações."

Atualmente, outubro de 2007, o produto colocado no mercado brasileiro é o

-Bt-horus ® (Bthek Biotecnologia+ IPT+ Embrapa, Brasil) [Potência: 1.200 UTI](#)

Notícias sobre esse produto dão conta que *‘Essa bactéria é entomopatogênica, ou seja, específica para controlar o mosquito transmissor da dengue e borrachudos, e, portanto, o produto é inofensivo à saúde humana e ao meio ambiente, podendo ser utilizado em locais que acumulam água, como plantas, lagos e caixas d’água, entre outros. Basta uma gota do Bt-horus para cada litro de água e as larvas do Aedes aegypti morrem em 24 horas. Segundo a pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Rose Monnerat, responsável pelo desenvolvimento do bioinseticida, o produto foi distribuído gratuitamente em todas as residências de São Sebastião por uma ação multistitucional entre a Embrapa, Bthek, Secretaria de Saúde, Emater, Administração Regional de São Sebastião e SLU, entre outras (Fernanda Diniz, 2007).*

POTÊNCIA DOS PRODUTOS.

A potência de produtos à base de bactérias para controle de insetos deve ser determinada em bioensaios padronizados, comparando-se o produto que foi fermentado nas fábricas com uma amostra padrão. Assim, os produtos à base de *Bti* são padronizados em ensaios com larvas de *Ae. aegypti*, usando-se como padrão o IPS-82 (Instituto Pasteur), e podem ter por exemplo 600 ou 1.200 UIP/mg (Unidades Internacionais de Potência por miligrama) (Andrade & Cabrini, 2007).

Por exemplo, o *Bti* (granulado em sabugo de milho – Vectobac-G) é importado dos Estados Unidos e adotado para o controle da dengue no Estado do Rio de Janeiro e em outras cidades do Brasil. As formulações suspensão aquosa (AS) com 1.200UIP/mg são, operacionalmente falando, mais difíceis de serem empregadas no controle da dengue. Precisam ser diluídas antes de serem aplicadas, pois em criadouros pequenos (1 a 5 litros de água) a dose a ser aplicada é muito pequena.

O fabricante do produto nacional Bt-horus realizou recentemente um trabalho entregando para a população frascos para que as pessoas colocassem uma gota de produto por litro de água dos criadouros. Mas, é importante mencionar, que se fosse essa de fato a potência do produto, já seria suficiente a dose de uma gota para cada 200 litros de água.

Em 1992, quando os cemitérios em Campinas ainda abrigavam milhares de vasos de flores, uma formulação aquosa de Bti foi diluída em pequenos aplicadores manuais como esses usados em floriculturas, e foi usada aplicando-se um pequeno jato em cada vaso. Os resultados mostraram um controle eficiente e que havia praticidade nessas aplicações quando feitas pelas equipes municipais de combate à dengue Santos et al., 1994). Como era de se esperar, algum tempo depois, esse problema foi resolvido em Campinas e vários outros municípios do Brasil, pela simples proibição (e fiscalização) de vasos com flores naturais ou floreiras que pudessem armazenar água nos cemitérios.

No início do ano de 2007, a Secretaria Municipal de Saúde de Campinas (Coordenadoria de Vigilância em Saúde) adquiriu 250 litros do produto Bt-horus para uso no programa contra a dengue, e para melhor definição das concentrações a serem usadas, solicitou a presente avaliação.

2- PROTOCOLO

Adotou-se como base dados da tese de doutorado de Jairo Campos G. disponível na internet (Campos & Andrade, 2005)

$CL_{50}=0,06$ ppm (produto com 1.200 U.I.P./mg)
 $CL_{95}=0,37$ ppm

No ensaio foram avaliadas duas concentrações, a CL_{50} e uma concentração bem maior, e equivalente a 9 vezes a CL_{50}

a) Concentração..... $CL_{50}= 0,06$ ppm

b) Concentração..... 9 vezes a CL_{50} (= 1,46 vezes a CL_{95}) = 0,54 ppm

- Foram utilizadas 3 repetições (25 indivíduos cada) para cada concentração.
- Foram usados 3 copos plásticos (A, B e C) com as concentrações correspondentes (0,06 ou 0,54 ppm) onde foram colocadas 25 larvas de *Aedes aegypti* por copo. Dois copos testemunha com igual número de larvas foram utilizados para posterior comparação de resultados.
- Foram usadas larvas no final do terceiro e início do quarto estágio, de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller (CDC Atlanta, EUA)

Ficando então o experimento da seguinte forma:

TRATAMENTOS

a) 0,06 ppm

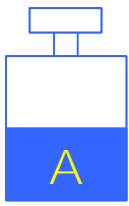


b) 0,54 ppm



As concentrações foram obtidas a partir de 20ml de uma solução estoque "A" a 1% (0,2g em 20ml), que permite uma concentração de 10.000ppm dos produtos.

Da solução estoque "A" foi separado 2,7ml (com 0,54mg de produto), adicionados a 1 litro de água para se obter a concentração 0,54ppm.



20ml água
+
0,2g de produto = 1% ou 10.000 ppm

Dessa concentração (0,54ppm) separou-se 333ml para serem adicionados a 677ml de água (somando no total 1 litro) para se obter a concentração 0,18ppm e novamente separou-se 333ml para serem adicionados a 677ml de água (somando no total 1 litro) para se obter a concentração 0,06ppm.

Após as larvas serem transferidas para as concentrações, a leitura da mortalidade foi feita a partir do surgimento das primeiras mortas. As leituras de mortalidade foram feitas em progressão geométrica de fator 1,4 para se estabelecer posteriormente o Tempo Letal Mediano (TL_{50}), isto é, o tempo necessário para ocorrer 50% de mortalidade entre as larvas expostas.

3. RESULTADOS

Não houve mortalidade nas larvas mantidas como testemunha, não sendo, portanto necessárias as correções de mortalidade.

Os tempos letais medianos foram calculados pelo programa POLO-PC.

CONCENTRAÇÃO : 0,06 ppm

3.1) Vectobac

Vect subjects 450 controls 50

Log (L)=-177.1 slope=5.010+- .393 nat.resp.=.000+- .000

Heterogeneity=2.60 g=.072

TL10=78.223 limits: 61.863 to 91.257

TL₅₀=140.978 limits: 125.097 to 160.551

TL90=254.077 limits: 213.223 to 335.106

Mortalidade final: 100% (4,5 horas após a aplicação).

3.2) Bthorus

Não foi possível cálculo de Tempo Letal Mediano.

Mortalidade final: Menor que 50% (24 horas após a aplicação)

CONCENTRAÇÃO: 0,54 ppm

3.3) Vectobac subjects 450 controls 50

Log (L)=-101.7 slope=9.017+- .824 nat.resp.=.000+- .000

Heterogeneity=1.44 g=.060

TL10=44.070 limits: 38.755 to 48.126

TL₅₀= 61.131 limits: 57.047 to 65.572

TL90=84.798 limits: 77.489 to 96.816

Mortalidade final: 100% (74 minutos [1 hora e 14 minutos] após a aplicação).

3.4) Bthorus subjects 448 controls 50

Log (L)=-90.83 slope=9.964+- .956 nat.resp.=.000+- .000

Heterogeneity=1.57 g=.065

TL10=101.728 limits: 90.411 to 110.247

TL₅₀= 136.790 limits: 128.180 to 146.504

TL90=183.937 limits: 168.493 to 209.977

Mortalidade final: 100% (201 minutos [3 horas e 21 minutos] após a aplicação).

4. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES.

Considerando-se que os dois produtos ...

- 1- Bt-horus ® (Bthek Biotecnologia+ IPT+ Embrapa, Brasil) e
- 2- Vectobac 12 AS (Valent Biosciences, USA)

.... têm a mesma Potência Declarada: 1.200 UTI, era de se esperar a mesma resposta nos ensaios padronizados com larvas de *Ae. aegypti*. Para as respostas serem consideradas não diferindo significativamente para um nível de probabilidade pré-estabelecido, os intervalos de confiança dos Tempos Letais Medianos (limits) deveriam se sobrepor. E não foi o que se obteve.

Para a concentração menor (0,06ppm), enquanto Vectobac permitiu 50% de mortalidade em cerca de 2 horas e 20 minutos (TL₅₀=140.978), o produto Bt-horus sequer chegou a causar 50% de mortalidade final, mesmo após 24 horas depois da exposição das larvas.

Como essa concentração (0,06ppm) é indicada como sendo aquela que deveria causar 50% de mortalidade final (24 horas após a exposição), pode-se também concluir que houve uma resposta muito forte ao Vectobac, que pode estar com potência maior do que a

declarada no rótulo. A potência para o Bt-horus poderia estar correta, mas para se certificar dessa conclusão, seriam necessários ensaios de múltiplas concentrações. De qualquer forma, Bt-horus apresentou bem menos potência do que Vectobac.

Para a concentração maior (0,54ppm), novamente pode-se perceber uma grande diferença entre as potências dos produtos, uma vez que o Tempo Letal Mediano foi mais de duas vezes menor para o Vectobac.

Essas avaliações são importantes no sentido de se comparar opções de mercado, para os programas de controle de mosquitos, e devem ser complementadas com avaliações em condições simuladas de campo e mesmo condições de campo.

BIBLIOGRAFIAS RECOMENDADAS

- CAMPOS, J. & ANDRADE, C. F. S. – 2005. Protocolo Para Avaliação de Susceptibilidade e Monitoramento da Resistência a Inseticidas Químicos Usados no Controle de Mosquitos/ 4ª ed. – Disponível em: http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/arquivos/artigos_tecnicos/Protocol_Suscep_Jairo2005.pdf
Acesso em: 10 de setembro de 2007
- ANDRADE, C.F.S.; CABRINI, I. 2007. “Controle de Pernilongos e Borrachudos em Áreas Urbanas”. cap.5. In: PINTO, A. de S.; ROSSI, M.M.; SALMERON, E. (eds.) Manejo de Pragas Urbanas. Piracicaba: CP 2, 2007. p.55-66. (208p., formato 21x28cm, ISBN: 978-85-60409-02-0).
- POLANCZIK, R. & ALVES, S.B. 2003. *Bacillus thuringiensis* – Uma Breve Revisão. Agrocência 7 (2):1-10. Disponível em <http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/VOL7/2/p1-10.pdf>
Acesso em 10/10/2007.
- HABIB, M.E.M. & C.F.S. ANDRADE, 1986. "Bactérias Entomopatogênicas" Cap. VII em Controle Microbiano de Insetos. S.B. ALVES coord. Editora Manole, pp 127-170.
- VILARINHOS, P.T.R, DIAS, J.M.C.S., ANDRADE, C.F.S; & COUTINHO C.J.P.C.A, 1998 “Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlídeos” Cap. XIII em Controle Microbiano de Insetos. S.B. ALVES coord. Editora FEALQ/USP, pp 447-480
- GOLDBERG, L.J. & MARGALIT J. (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News 37, 355-358.
- SANTOS, L.U., SOUZA, A.B., ANDRADE, C.F.S. & C.E.P. SOUZA, 1994. Uso de *Bacillus thuringiensis* (H-14) como agente controlador de mosquitos em um cemitério. *REVISTA DE PATOLOGIA TROPICAL*. 23(2):151 -158.
- MCLAUGHLIN, R. E., H. T. DULMAGE, R. ALLS, T. L. COUCH, D. A. DAME, J. M. HALL, R. I. ROSE, and P. L. VERSOI. 1983. U.S. standard bioassay for the potency assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. *Bull. Ent. Soc. Amer.* 30:26-29.

FERNANDA DINIZ - Jornalista 2007. Embrapa e GDF encerram campanha contra dengue em São Sebastião com exposição de tecnologias.

Disponível em: <http://www.clicnews.com.br/eventos/view.htm?id=61684>

Dica Adicional 1.: RESUMO DO TRABALHO: Skovmand O, Thiery I, Benzon GL, Sinègre G, Monteny N, Becker N., 1998. Potency of products based on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: interlaboratory variations. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998 Sep;14(3):298-304.

Six quality-control laboratories in 4 countries independently bioassayed aliquots of a flowable formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.) against the international standard powder IPS-82. All laboratories substantially followed World Health Organization or U.S. Department of Agriculture standard protocols. Significant differences were found in resulting potency values between laboratories. Factors that may have influenced results, such as age, stage, and strain of larvae used, amount and type of food provided to larvae, and processing of samples were examined. Use of different rearing temperatures, different strains of *Aedes aegypti* L., or late 3rd instars vs. the recommended early 4th instars did not explain the inconsistencies. The slope of the dose-response curve of the IPS-82 powder was influenced by particle size, which varied with the nature and duration of sample homogenization. Laboratories using low-intensity processing obtained a greater slope in the dose-response curve for the flowable product than for the powder standard. The type and quantity of food provided to larvae affected susceptibility. Larvae fed an excess of protein-rich food became 4th instars in 3 days and were less susceptible to B.t.i. than those fed smaller quantities of carbohydrate-rich food that became 4th instars in 5-7 days. Overall, deviations from standard protocols with regard to larval stage, holding temperature, and lighting regime may not be as important as differences in sample processing and pretest rearing conditions. The need to improve standardization in these areas, which are not clearly specified in current protocols, is discussed.

Dica Adicional 2. For potency calculations, we used the internationally recognized standard for mosquito assay, IPS82 (15,000 ITU/mg) provided by Institute Entomopathogene, Institut Pasteur, Paris, France. Standard vials are kept at -18°C in our laboratory.

Product potency was calculated by:

$$\text{Potency (A)} = \text{Potency (STD)} \times (\text{LC50}^{\text{STD}} / \text{LC50}^{\text{A}})$$

where (A) is the product and (STD) is the standard.