

## CONTROLE BIOLÓGICO

Susceptibilidade de Populações de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) Sujeitas ao Controle com *Bacillus sphaericus* Neide no Rio Pinheiros, São PauloCARLOS F. S. ANDRADE<sup>1</sup>, JAIRO CAMPOS G.<sup>1</sup>, ISAÍAS CABRINI<sup>2</sup>, CARLOS A. M. MARQUES FILHO<sup>3</sup> E SUMIRE HIBI<sup>3</sup><sup>1</sup>Depto. de Zoologia, IB, Unicamp, Cx.Postal. 6109, 13084-971, Campinas, SP. E-mail: [cfeandra@unicamp.br](mailto:cfeandra@unicamp.br), [jairocag@yahoo.com](mailto:jairocag@yahoo.com)<sup>2</sup>Pós Graduação em Parasitologia, IB, Unicamp, Cx. Postal 6109, 13.084-971, Campinas, SP. E-mail: [Isaias\\_c04@yahoo.com.br](mailto:Isaias_c04@yahoo.com.br)<sup>3</sup>Gerência do Centro de Controle de Zoonoses, Coordenação de Vigilância em Saúde, Secretaria Municipal da Saúde, Av.Santa Eulália, nº 86 – Santana, 02.031-020, São Paulo, SP.

---

*BioAssay* 2:4 (2007)Susceptibility of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) populations subjected to control with *Bacillus sphaericus* Neide at Pinheiros River, São Paulo

**ABSTRACT** – Located in São Paulo city, the Pinheiros River is a large urban breed of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, and such situation has been worsening since its water pumping to the Billings dam was interrupted. The local Center for Zoonosis Control launched in 2002 a new control program using chemical adulticides and a biological larvicide (Vectolex G, potency 650 BsITU/mg) based on *Bacillus sphaericus*. It is presented here a first evaluation on the susceptibility of *C. quinquefasciatus* larvae from Pinheiros River after 16 to 18 applications of Vectolex G. The mosquito susceptibility baseline to *B. sphaericus* was initially established for a population from an area never exposed to control (population UNICAMP, Campinas, SP). The susceptibility of two populations from the Pinheiros River (under the bridges Guido Caloi – PGUICAL and Eusébio Matoso–PEUSMAT) was accessed. Serial dilutions from 0.00312 to 0.2 mg/L from a Vectolex WDG stock solution (10,000 mg/L) were used in four replicates of 30 larvae (L<sub>3</sub> and L<sub>4</sub>) each. The values for LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> to PGUICAL population are little above (respectively 2.85 and 2.66 times) and for the PEUSMAT population are close (respectively 0.60 and 1.34 times) of the values for UNICAMP population. Resistance ratios for both PGUICAL and PEUSMAT populations are in accordance to *Culex* populations susceptible to *B. sphaericus*, indicating that this larvicide could still be used.

**KEYWORDS** – monitoring, resistance, mosquito, microbial insecticide

**RESUMO** – Localizado na cidade de São Paulo, o Rio Pinheiros é um grande criadouro urbano do mosquito *Culex quinquefasciatus*, e tal situação tem piorado desde que o bombeamento da sua água para a represa Billings foi interrompido. O Centro de Controle de Zoonoses lançou em 2002, um novo programa de controle usando adulticidas químicos e um larvicide biológico (Vectolex G, 650 BsITU/mg de potência) à base de *Bacillus sphaericus*. Apresenta-se aqui uma primeira avaliação da susceptibilidade das larvas de *C. quinquefasciatus* do Rio Pinheiros depois de 16 a 18 aplicações de Vectolex G. A linha base de susceptibilidade do mosquito ao *B. sphaericus* foi inicialmente estabelecida para uma população de uma área nunca exposta a controle (população Unicamp, Campinas, SP). A susceptibilidade de duas populações do Rio Pinheiros (sob as pontes Guido Caloi – PGUICAL e Eusébio Matoso – PEUSMAT) foi estabelecida. Diluições seriadas de 0,00312 a 0,2 mg/L de uma solução estoque (10.000 mg/L) de Vectolex WDG foram usadas em quatro réplicas de 30 larvas (L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub>) cada. Os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> para a população PGUICAL foram superiores (respectivamente 2,85 e 2,66 vezes) e para a população PEUSMAT próximos (respectivamente 0,6 e 1,34 vez) aos encontrados para a população UNICAMP. As razões de resistência para ambas as populações, PGUICAL e PEUSMAT, estão de acordo com a de populações de *Culex* susceptíveis ao *B. sphaericus*, indicando que o uso desse larvicide pode continuar sendo feito.

**PALAVRAS-CHAVE** – monitoramento, resistência, mosquito, inseticida microbiano

Adultos e larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus* Say têm sido submetidos a controle no Rio Pinheiros, São Paulo, Capital, há mais de 30 anos. Desde 1992, no entanto, com a interrupção do bombeamento das águas do rio para a represa Billings, pelas Usinas Elevatórias de Traição e Pedreira (Fig. 1), o problema agravou-se (Anônimo, 2001). A partir de 2002, a Gerência do Centro de Controle de Zoonoses (GCCZ) iniciou então um novo Programa de Controle em parceria com a Empresa Metropolitana de Água e Energia (EMAE), com a OSCIP SOS-Saúde e Meio Ambiente e com a iniciativa privada, através de empresários da região, baseado no uso de um novo adulticida químico e de um larvicida biológico (Anônimo, 2006). Atualmente, são feitas aplicações regulares de produtos piretróides para o controle de adultos nos taludes do rio e aplicações de larvicida biológico no leito principal (Secretaria Municipal da Saúde, 2004).

Produtos à base da bactéria *Bacillus sphaericus* Neide vêm sendo utilizados com sucesso para o controle de mosquitos desde o final da década de 80, em vários países. Entre os anos 1992 e 1994, entretanto, experimentos de laboratório demonstraram a possibilidade do desenvolvimento de resistência em populações de *C. quinquefasciatus*.

Devido à falta de programas de monitoramento de resistência, falhas no controle desse mosquito foram registradas já nos anos seguintes, principalmente na França, Tunísia, Índia, China e Brasil (Estado de Pernambuco, Recife) (Su et al. 1997). E de acordo com Pei et al. (2002), quando submetidas à contínua pressão de seleção, populações de mosquitos desenvolvem resistência à toxina binária de *B. sphaericus* tanto no laboratório (com razões de resistência entre 35 e

150.000 vezes) como no campo (razões de resistência entre 10 a 10.000 vezes).

Até a época do presente estudo, foram feitas 16 aplicações na PGUICAL e 18 na PEUSMAT de produto à base de *B. sphaericus* no Rio Pinheiros, levando à necessidade de avaliações da susceptibilidade dos mosquitos como parâmetro para um programa de monitoramento. Objetivou-se estabelecer uma linha base de susceptibilidade de *C. quinquefasciatus* ao *B. sphaericus* (produto comercial Vectolex), a partir de uma população natural nunca exposta a esse agente de controle. E essa susceptibilidade base foi então usada como referência para se verificar o estado de duas populações de *C. quinquefasciatus* da área tratada.

### Materiais e Métodos

Para se determinar a linha base de susceptibilidade foram feitos dois testes com uma população de *C. quinquefasciatus* (População UNICAMP) estabelecida naturalmente em caixas d'água no ambiente urbano (Campus da Universidade Estadual de Campinas, Barão Geraldo, Campinas, SP), sendo essa uma área em que nunca se aplicou produtos à base de *B. sphaericus*.

As caixas d'água receberam fezes de coelho como matéria orgânica atrativa e alimento para as larvas e foram colonizadas em menos de uma semana, sendo assim mantidas com a adição periódica de fezes de codorna.

As populações de campo que foram avaliadas, eram provenientes de duas localidades distantes aproximadamente 11 km entre si no rio Pinheiros, uma sob a ponte Guido Caloi (Canal Superior) e a outra sob a ponte Eusébio Matoso (Canal Inferior) (Fig. 1).



**Figura 1.** Imagem de satélite do Rio Pinheiros indicando de onde foram obtidas as populações de *Culex quinquefasciatus* avaliadas - Ponte Guido Caloi (Canal Superior) e Ponte Eusébio Matoso (Canal Inferior).

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Insetos da Unicamp e na instalação da EMAE (Empresa Metropolitana de Água e Esgoto) que serve de base para as atividades do CCZ (Centro de

Controle de Zoonoses), próxima à Usina Elevatória de Traição. As larvas foram coletadas com conchas e levadas em baldes aos locais do ensaio, onde foram colocadas em bandejas brancas e selecionadas apenas

aqueles no fim do terceiro (L<sub>3</sub>) ou início do último estágio (L<sub>4</sub>).

As avaliações foram feitas entre janeiro e abril de 2005. A metodologia foi baseada em Zahiri *et al.* (2002), usando-se o produto Vectolex WDG (*B. sphaericus*- Formulação em grânulos para dispersão na água, com 650 BsITU/mg de potência, Lot# 15-498-PG, Valent BioScience Corp., EUA) recebido do fabricante em dezembro 2004.

Para os testes, foram preparados 20ml de suspensão estoques do produto a 1% (10.000 mg/L), homogeneizada pela agitação (5 min) em um pequeno frasco com tampa de rosca. Diluições seriais permitiram seis concentrações variando entre 0,00312 e 0,2 mg/L, preparando-se 2 L de cada concentração. Os bioensaios foram feitos em quatro repetições com 30 larvas cada, em copos plásticos contendo 250 ml de água mineral comercial. Acrescentou-se alimento para larvas (2 a 3 gotas) sendo composto de 2 g de fezes de coelho moída, em 20 ml de água destilada.

Os ensaios foram conduzidos a 25±1°C. A mortalidade foi verificada 24 h após a aplicação. Larvas moribundas foram contadas como mortas. As concen-

trações letais foram calculadas usando-se o programa POLO-PC (LeOra Software, 1987), para 95% de limite de confiança. As Razões de Resistência foram calculadas dividindo-se as concentrações letais encontradas para as populações do Rio Pinheiros pela média das concentrações letais encontradas para a população da UNICAMP.

### Resultados e Discussão

Nos dois testes para o cálculo da linha base de susceptibilidade (população UNICAMP), a mortalidade de larvas nas testemunhas foi zero. Comparando-se os resultados dessas duas avaliações (Janeiro de 2005 e Março de 2005) observam-se valores próximos para as CL<sub>S50</sub> e para as CL<sub>S90</sub> (Tabela 1), e sem diferença significativa entre os dois testes, considerando-se a sobreposição dos intervalos de confiança (Haddad, 1998). Ao avaliarem diferentes populações de *C. pipiens* L. da Califórnia, Wirth *et al.* (2001) também encontraram alguma variação da linha base de susceptibilidade com valores de até 5 vezes para as CL<sub>S50</sub> e CL<sub>S90</sub>.

**Tabela 1.** Respostas de três populações de *Culex quinquefasciatus* ao produto Vectolex G à base de *Bacillus sphaericus* (650 BsITU/mg de potência).

POPULAÇÃO	CL <sub>50</sub> (mg/L) (limites)	CL <sub>90</sub> (mg/L) (limites)	Coefficiente Angular ± E.P. <sup>1</sup>
UNICAMP (teste 1)	0,01610 (0,01025-0,02167)	0,03985 (0,02880-0,07594)	3,25 ± 0,75
UNICAMP (teste 2)	0,01575 (0,0130-0,01913)	0,05173 (0,0389-0,07811)	2,48 ± 0,18
PGUICAL	0,04546 (0,03479-0,05694)	0,12199 (0,09278-0,18854)	2,98 ± 0,46
PEUSMAT	0,00970 (0,00288-0,01582)	0,06173 (0,03183 - 0,84198)	1,59 ± 0,19

<sup>1</sup>( $\chi^2 = 0,0059$ ; gl= 3; p> 0,9; heterogeneidade = 0,001)

Nos testes feitos no Rio Pinheiros as mortalidades no controle foram 0,83% e zero respectivamente para as populações PGUICAL e PEUSMAT. Foram obtidos valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> para a população PGUICAL significativamente superiores do encontrado para população UNICAMP usada como referência, porém os encontrados para a população PEUSMAT não diferiram (Tabela 1).

Su & Mulla (2004) consideraram como Tolerância Moderada ou Baixo Nível de Resistência quando as razões entre as CL<sub>S50</sub> estiveram entre 7,3 e 12,8, e as razões para as CL<sub>S90</sub> estiveram entre 5,2 e 13,4 nos seus ensaios. A Tabela 2 apresenta as razões de resistência obtidas, comparando a média dos valores encontrados para os dois testes feitos com a população UNICAMP, com as populações PGUICAL e PEUSMAT. Como os valores encontram-se bem abaixo daqueles propostos por Su & Mulla (2004), pode-se concluir que estas

populações estão dentro dos padrões de susceptibilidade ao *B. sphaericus*.

**Tabela 2.** Razão de resistência para as CLs 50 e 90 (RR<sub>50</sub> e RR<sub>90</sub>) para a comparação das populações das pontes Guido Caloi (PGUICAL) ou Eusébio Matoso (PEUSMAT) com a população de *Culex quinquefasciatus* UNICAMP (média).

Populações	RR <sub>50</sub>	RR <sub>90</sub>
PGUICAL/UNICAMP	2,85	2,66
PEUSMAT/UNICAMP	0,60	1,34

### Literatura Citada

Anônimo, 2006. CENTRO DE CONTROLE DE ZOONOSES, Controle de Animais Sinantrópicos, Controle do pernilongo (*Culex* spp) no Rio

- Pinheiros; Controle do pernilongo (*Culex* spp) adulto. Disponível em: [http://www2.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/saude/vigilancia\\_saude/ccz/0003](http://www2.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/saude/vigilancia_saude/ccz/0003). Acesso em: 17 maio 2006.
- Anônimo, 2001. Centro de Controle de Zoonoses Apresenta Plano para Controle de Mosquitos no Rio Pinheiros. Disponível em: <http://www.sampaonline.com.br/reportagens/czz2001set25.htm>. Acesso em: 17 maio 2006.
- Haddad, M.L. 1998. Utilização do Polo-PC para análise Probit, p. 999-1013. In S.B. Alves (Ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163.
- LeOra Software. 1987. POLO-PC: A user's guide to Probit Logit analysis. Leora Software, Berkely, CA.
- Pei, G., C. M. F. Oliveira, Z. Yuan, C. Nielsen-LeRoux, M. H. Silva-Filha, J. Yan, & L. Regis 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes Slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl Environ Microbiol.* 68(6): 3003–3009.
- Secretaria Municipal da Saúde. Coordenação de Vigilância em Saúde. Revista da Vigilância em Saúde Ambiental. Novas estratégias de controle de *Culex* no rio Pinheiros utilizando controle biológico, químico e mecânico. São Paulo, 2004. p19-21.
- Su, T., L. Yang, T. Su, & S. Su. 1997. Mosquito resistance to microbial control agent *Bacillus sphaericus*: A concise review. *Annals Medical Entomology.* 6: 1-5.
- Su, T. & M.S. Mulla. 2004. Documentation of high-level *Bacillus sphaericus* 2362 resistance in field populations of *Culex quinquefasciatus* breeding in polluted water in Thailand. *Jour. Amer. Mosq. Control Assoc.* 20: 405-411.
- Wirth, M.C., J.A. Ferrari & G. P. Georghiou. 2001. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. *Journal of Economic Entomology.* 94: 920–928.
- Zahiri, N.S., T. Su, & M.S. Mulla. 2002. Strategies for the management of resistance in mosquitoes to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *J. Med. Entomol.* 39:513-520.