
CONTROLE DA MALÁRIA: EFICÁCIA DE FORMULADOS DE *Bacillus sphaericus* 2362 CONTRA LARVAS DE ESPÉCIES DE *Anopheles* EM CRIADOUROS ARTIFICIAIS-TANQUES DE PISCICULTURA E CRIADOUROS DE OLARIA

Iléa Brandão Rodrigues,¹ Wanderli Pedro Tadei,¹ Rosely Lacorte Cordeiro dos Santos,² Soraya dos Santos³ e João Bosco Baggio⁴

RESUMO

Objetivo: Avaliar a eficácia e a persistência de diferentes formulações de *Bacillus sphaericus* 2362, em doses com o dobro do que é recomendado pelos fabricantes, para controle das formas imaturas de espécies de *Anopheles*, vetor da malária, diante da composição da água dos criadouros artificiais. **Métodos:** Tanques de piscicultura e lagoas de oleria, localizados nos municípios de Manaus e Iranduba e contendo formas imaturas de anofelinos, foram tratados com concentrações dobradas. As doses dos larvicidas – Vectolex- 22Kg/ha, Griselesf- 200L/ha e Spherimos- 6L/ha – foram aplicadas nos seguintes criadouros: Sítio Fazendinha- 7 tanques e 1 controle (sem larvicidas); Sítio Três Irmãos- 6 tanques e 1 controle; Sítio Santa Cecília- 9 tanques e 2 controles; Oleria Cerama- 26 lagoas e 5 controles. Coletas de anofelinos para determinar os índices de larva por homem/hora (ILHH) das formas jovens (1º e 2º estádios) e das formas maduras (3º e 4º estádios) foram feitas antes da aplicação e após no 2º, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dias. **Resultados:** Os resultados da densidade larvária nos criadouros artificiais demonstram que, nos tanques de piscicultura, o número de larvas observado foi quatro vezes maior (33.729 larvas) do que nos criadouros de oleria (7.972 larvas). Na avaliação dos formulados nos tanques de piscicultura de Manaus e Iranduba, observaram-se menores valores do ILHH, na leitura do 2º dia, nos criadouros onde se aplicaram Vectolex e Spherimos do que nos criadouros-controle; nos tanques tratados com Griselesf, ao contrário, os valores do ILHH estavam próximos aos encontrados no controle, ultrapassando esses índices larvários nas demais observações. Os formulados Spherimos e Vectolex apresentaram padrões similares de redução próximos a 100%, no 2º dia de observação, tanto para as larvas jovens como para as maduras. Quando se consideram os resultados para o Griselesf, a maior porcentagem de redução foi de 55% para as larvas maduras; em relação às larvas jovens de anofelinos a redução foi de 36%. Na avaliação dos formulados aplicados em criadouros de oleria em Iranduba, verificou-se que, na leitura do 2º dia após a aplicação dos larvicidas, os índices larvários se mostraram baixos (0,5) nos criadouros tratados com Vectolex, quando comparados aos índices do controle (1,2); para os demais larvicidas, nesta leitura, os valores do ILHH foram maiores do que nos criadouros não

1 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Caixa Postal 478, CEP 69083-000, Manaus-AM;

2 Universidade Federal de Sergipe

3 Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, DF.

4 Secretaria de Saúde do Amazonas.

Endereço para contato: brandao@inpa.gov.br

Recebido para publicação em: 16/7/2007. Revisto em: 19/2/2008. Aceito em: 30/6/2008.

tratados. Nas observações seguintes, os índices de anofelinos aumentaram ou foram equivalentes aos controles. As porcentagens de redução de larvas maduras e jovens de anofelinos nos criadouros de olaria mostraram que os formulados Griselesf, Vectolex e Spherimos apresentaram pouca atividade larvicida contra as larvas maduras de anofelinos, sendo registrada a maior redução para o larvicida Vectolex (38%). As larvas jovens foram mais suscetíveis ao formulado Spherimos, com redução mínima de 45% e máxima de 72% dos anofelinos. O Griselesf apresentou redução de 55% no 2º dia e 76% no 35º dia de observação; ao passo que o Vectolex reduziu 8% das larvas jovens nestes criadouros artificiais no 2º dia. *Conclusões*: Os dois tipos de criadouros artificiais, os tanques de piscicultura e os criadouros de olaria, apresentam condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de espécies de *Anopheles*. A dose dobrada dos formulados - Spherimos e Vectolex - aplicada nos tanques de piscicultura foi efetiva contra larvas de espécies de *Anopheles*; os criadouros de olaria, no entanto, apresentaram baixa atividade larvicida para os diferentes formulados. Nos tanques de piscicultura, a maior redução de larva com os larvicidas testados ocorreu no 2º dia, mantendo-se baixo o número de larvas de anofelinos por 35 dias com Vectolex e 21 dias com o Spherimos. Esses resultados indicam que larvicidas bacterianos podem ser mais um componente utilizado em uma ação integrada nas campanhas de saúde pública.

DESCRITORES: Malária. Controle biológico. Anofelinos. *Bacillus sphaericus*.

INTRODUÇÃO

A ocorrência da malária no Brasil atualmente está restrita quase que exclusivamente à região da bacia Amazônica, sendo registrada tanto em áreas urbanas como rurais. A permanência da malária nesta região está relacionada ao fato de que é natural a reprodução de seu principal vetor—*Anopheles darlingi* Root, 1926—em razão da complexa ecologia, pois cada *habitat* possui características especiais que interferem na densidade populacional. Em consequência, registra-se sazonalidade das populações em resposta às mudanças anuais dos pulsos das enchentes e da vazante (Tadei et al., 1993). Outro fator de extrema importância na manutenção da malária na Amazônia são as alterações ambientais decorrentes das ações antrópicas. As colonizações humanas descontroladas, além de ações como construção de usinas hidrelétricas, abertura de estradas, projetos de irrigação, exploração de minérios ou de combustíveis fósseis, como petróleo e gás natural, colocam o homem em contato com a mata, proporcionando condições de reprodução para os anofelinos e aumento da densidade populacional. Esse intenso contato homem—vetor provoca a disseminação da malária (Tadei et al., 1988; 1998; 2007).

Considerando ainda as ações antrópicas, deve-se acrescentar também, como outro fator de crescimento da malária nesta região, a implantação dos tanques de piscicultura. Esta atividade vem recebendo um grande incentivo do governo nos últimos anos e o mercado é promissor, graças aos índices do consumo diário de peixe pela população local. Em Manaus e em Itacoatiara, na década de 1970, estimava-se que o consumo *per capita* de pescado variava entre 100 e 200 g/dia. Dados mais recentes indicam que as populações rurais ribeirinhas consomem cerca de 500g/pessoa/dia, um dos maiores índices do mundo (Santos et al., 2006). Esse fato tem originado novas criações de peixe na periferia de Manaus para

comercialização e como um meio de subsistência para as famílias. Essa situação fez surgir um problema de saúde pública, uma vez que nos tanques de piscicultura também se reproduz o *A. darlingi*, principal vetor da malária humana na região (Tadei et al., 2003, 2004, 2007).

Por ser uma doença focal (Tadei et al., 1993), a malária ocorre de conformidade com a área endêmica. Neste contexto, tornam-se obrigatórias mudanças constantes nas estratégias de combate ao vetor, de acordo com os pontos vulneráveis de cada área endêmica ou de risco. Em Manaus, além do grande número de criadouros naturais existentes na região, há também criadouros artificiais, como os tanques de piscicultura, que, mesmo no período de estiagem, continuam propiciando condições para a reprodução dos mosquitos (Tadei et al., 2003). Outro tipo de criadouro artificial de relevância entomológica são as lagoas artificiais que se formam com a retirada de barro para fabricação de tijolos pelas olarias em Iranduba. Esses criadouros, ao longo do tempo, tornam-se excelentes sítios de reprodução de diversas espécies de *Anopheles*. Considerando os dados de Tadei et al. (1998) relativos à BR-364 em Rondônia, o período para a colonização do *A. darlingi* nesses criadouros é estimado em, aproximadamente, três a cinco anos.

A maioria dos larvicidas utilizados para o controle das formas imaturas de mosquitos é composta por produtos químicos e não adequados para a aplicação em culturas de peixe. A busca de métodos alternativos e/ou complementares às campanhas de controle de vetores é altamente relevante. Estudos em condições de laboratório comprovam que a estirpe de *Bacillus sphaericus* 2362 é efetiva contra larvas de *A. darlingi* (Rodrigues et al., 1998; Litaiff & Rodrigues, 1999; Oliveira & Tadei, 2004) e que estirpes brasileiras são mais promissoras contra espécies de *Anopheles* e *Culex* do que a estirpe padrão 2362 (Vilarinhos, 1992; Rodrigues et al., 1999).

Vários fatores podem interferir na eficácia de um larvicida bacteriano contra o inseto alvo. Barjac (1990) destaca, entre eles, os efeitos da radiação solar, por meio do raio ultravioleta, para a inviabilização do esporo de *B. sphaericus* no qual se localiza a toxina larval; a qualidade da água (rica em matéria orgânica, etc.); o tipo de criadouro (lago, rio, etc.); a suscetibilidade da espécie alvo e a reciclagem da bactéria. No entanto, melhores resultados podem ser obtidos de acordo com a formulação.

A avaliação da efetividade e persistência de formulados de *B. sphaericus* 2362 em tanques de piscicultura e lagoas de olaria, criadouros artificiais permanentes de espécies de *Anopheles*, em Manaus e Iranduba, foi o objetivo da pesquisa neste projeto. Este estudo visava esclarecer se a utilização de larvicidas bacterianos pode ser uma alternativa para o controle das formas imaturas de anofelinos nestes ambientes.

Os testes foram possibilitados pela integração entre o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, as Secretarias Estadual e Municipal da Saúde do Amazonas e o Exército Brasileiro, com financiamento da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde.

MATERIAIS E MÉTODOS

Áreas de estudo

Neste trabalho foram pesquisados dois tipos de criadouros artificiais de espécies de *Anopheles*: os tanques de piscicultura e as lagoas de olaria.

Tanques de piscicultura

Segundo Maire (1983), os anofelinos, na sua fase larvária, desenvolvem-se em locais com água não poluída, vegetação aquática, pouca correnteza e outros fatores próprios do meio ambiente (biofísicos, microorganismos, matéria orgânica em decomposição). Em Manaus, os tanques de piscicultura possuem características ambientais semelhantes tanto em tanques de alevinos quanto nos de crescimento e engorda de peixe, exceto quanto à renovação da água. Nos tanques de alevinos, ela é constante, portanto o desenvolvimento de mosquitos é prejudicado nesses ambientes. Nos tanques de crescimento e engorda de peixes, ao contrário, a introdução diária de ração à base de soja gera um aumento de matéria orgânica que favorece a presença de fitoplâncton e zooplâncton, os quais constituem alimento para as larvas de anofelinos.

No município de Manaus, os testes ocorreram em tanques de crescimento e engorda de diferentes espécies de peixe, como Tambaqui (*Myletes bidens*) e Pirarucu, localizados no sítio Santa Cecília – Latitude: -02° 54' 29" S e Longitude: -59° 55' 52" W —, tendo sido analisados 11 criadouros e 2 controles (sem larvicidas). No município de Iranduba, no Sítio Três Irmãos – Latitude: -03 09' 27" S e Longitude: -60° 14' 50" W —, os testes ocorreram em seis tanques tratados e um controle; no Laticínio Fazendinha – Latitude: -03° 12' 56" S e Longitude: -60° 09' 54 W —, os larvicidas foram aplicados em sete tanques e um controle.

Lagoas de olaria

Os testes foram realizados na Olaria do Cerama, localizada no município de Iranduba, em locais próximos das margens da rodovia AM-070. Os oleiros fazem a retirada do barro para a fabricação dos tijolos, deixando grandes buracos que, com a invasão de águas do rio e das chuvas, formam grandes lagoas. Após o processo de eutrofização, esses ambientes tornam-se excelentes criadouros de mosquitos. No local foram tratados 26 criadouros com os formulados de *B. sphaericus* 2362 - Griselesf, Spherimos e Vectolex. Outras cinco lagoas foram mantidas como controle (sem larvicidas).

Larvicidas bacterianos utilizados

Os larvicidas bacterianos testados pertencem à Classe Toxicológica IV, levemente tóxico (tarja verde). A estirpe de *Bacillus sphaericus* 2362 é o princípio ativo dos produtos: Vectolex, formulado granulado; Spherimos e Griselesf, formulados líquidos. O Vectolex é produzido pela Abbott Laboratories Chemical & Agricultural Products Divisiere; o Spherimos, por Valent BioSciences Corporation (USA) e o Griselesf é licenciado por Labiofam-Cuba e produzido no Instituto Rosenbusch S.A. (Argentina). As doses aplicadas nos tanques de piscicultura e nos criadouros de olaria foram duplicadas em relação à recomendação dos fabricantes, considerando-se a presença de vegetação e matéria orgânica na água: Vectolex - 22 kg/ha, Spherimos - 6L/ha, Griselesf - 200L/ha. A potência dos produtos descrita nos rótulos é a seguinte: Vectolex - 50 Bs UTI/mg (7,5%); Spherimos FC - 120 Bs UTI/mg (12,5%) e Griselesf - 258 UTI/mg (0,5%).

Aplicação dos formulados

As aplicações foram feitas com bombas convencionais (Hudson X-Pet) para os formulados líquidos e atomizadores motorizados para o formulado granulado (Guarany). O tamanho de cada criadouro e o tempo de percurso para dispersão dos produtos nestes criadouros foram medidos. A distribuição dos tanques de piscicultura tratados com os formulados foi a seguinte: Griselesf- nove, Vectolex- seis, Spherimos- sete e controles- quatro. Nos criadouros de olaria, foi a seguinte: Griselesf- nove, Vectolex- oito, Spherimos- nove e controles- cinco. O monitoramento da presença de larvas vivas considerou os diferentes estádios e as leituras ocorreram antes da aplicação e após no 2º, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dias. As coletas para dimensionar a densidade larvária nos criadouros duravam 20 minutos de esforço de cada coletor nos criadouros, com o auxílio de concha padrão com capacidade volumétrica de aproximadamente 350 mL, abertura de 11cm e cabo de manuseio de um metro, vidros transparentes e um conta-gotas. Para dimensionar a densidade larvária nos diferentes estádios, adotou-se o cálculo do Índice de Larva por Homem/Hora (ILHH), seguindo a fórmula descrita por Tadei et al (2007):

$$ILHH = \sum_{j=1}^L \frac{N}{\frac{C \times h}{L}}$$

onde: N = nº exemplares de larvas, C = nº de coletores, h = nº de horas de coleta e L = nº de locais de coleta.

A metodologia adotada envolveu duas equipes: (1) uma para aplicação e (2) outra para avaliação. A equipe 1, com quatro pessoas, fazia a seleção dos inseticidas por meio de sorteio, determinando os criadouros que representavam

os controles negativos (sem larvicida) e os criadouros que seriam tratados com os diferentes formulados. A equipe 2 fazia as coletas prévias e as subseqüentes após a aplicação, sem tomar conhecimento se os criadouros haviam sido tratados ou não, nem qual larvicida havia sido aplicado. As equipes de avaliação eram formadas por duas pessoas e, durante o processo, uma delas realizava as coletas nos criadouros e a outra fazia as anotações do número de larvas/estádio/ponto e do tempo de início e término da leitura. Os dados eram registrados seguindo-se o modelo do formulário de capturas de *Anopheles* formas imaturas – malária da SUSAM/SEMSA (Secretarias Estadual e Municipal de Saúde).

Parâmetros limnológicos

Amostras de água foram obtidas dos tanques de piscicultura e dos criadouros de olaria para análises físico-químicas com os seguintes parâmetros: Demanda Química de Oxigênio (DQO), Turbidez, Matéria Orgânica e Material em Suspensão. Foram utilizados os seguintes métodos para as análises: DQO segundo APHA (1995); turbidez por turbidimetria (turbímetro B 250); matéria orgânica por combustão a 450°C e material em suspensão por gravimetria. Foram coletadas amostras dos seguintes criadouros: dos tanques de piscicultura, sete amostras do Sítio Fazendinha e cinco do Sítio Santa Cecília; dos criadouros da Olaria Cerama, foram coletadas dez amostras.

Análise dos dados

O total de larvas identificado nas leituras prévias e nas leituras subseqüentes foi comparado pelo teste quiquadrado.

O cálculo de porcentagem de redução de larvas capturadas nos tanques de piscicultura e nos criadouros de olaria foi feito seguindo-se a fórmula de Mulla et al. (1986), como segue:

$$\% \text{ RL} = 100 - \frac{\text{n larvas postratamento}}{\text{n larvas pretratamento}} \times 100$$

onde: RL = Redução larvária, n larvas postratamento = número de larvas após o tratamento, n larvas pretratamento = número de larvas antes do tratamento.

RESULTADOS

Densidade larvária

Considerando os 9 tanques analisados em Manaus, os 13 em Iranduba e os 4 controles, foram computadas, nessas 26 unidades de estudo, 9.090 larvas nas avaliações prévias e 24.639 nas leituras subseqüentes, totalizando 33.729 larvas,

levando-se em conta todas as leituras até o 35º dia. Nos 31 criadouros de olaria, em Iranduba, foram computadas 1.275 larvas nas avaliações prévias e 6.697 nas leituras subseqüentes, totalizando 7.972 larvas, consideradas todas as leituras até o 35º dia. A densidade larvária foi quatro vezes maior nos tanques de piscicultura do que nos criadouros de olaria, tendo sido coletadas 33.729 e 7.972 larvas, respectivamente.

Avaliação dos formulados em tanques de piscicultura – Manaus

Na Figura 1 estão expressos os dados obtidos com cada um dos três formulados, independentemente das localidades (Sítio Três Irmãos, Laticínio Fazendinha e Sítio Santa Cecília), comparando-se os resultados da densidade larvária da leitura prévia com os obtidos após o tratamento.

Observa-se, no 2º dia, a diminuição do número de larvas nos tanques onde foram aplicados os formulados Spherimos e Vectolex em relação aos valores encontrados na leitura prévia. Nas leituras subseqüentes, constata-se o aumento das larvas, mas com um número abaixo do encontrado antes do tratamento com Vectolex e Spherimos. Nos tanques tratados com o formulado Griselesf, os resultados revelam que o número de larvas de anofelinos, após a aplicação deste formulado, foi equivalente ou maior que o verificado na leitura prévia.

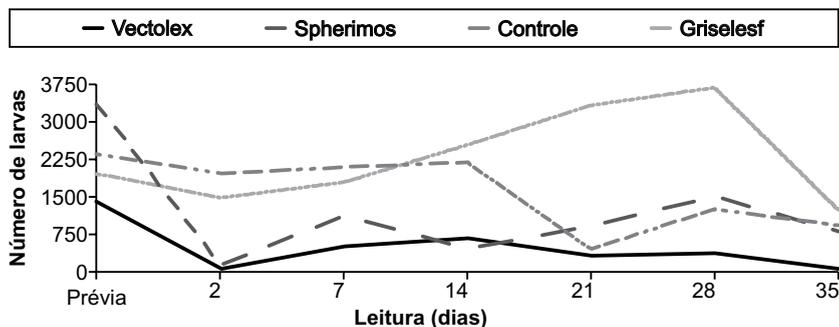


Figura 1. Número de larvas encontradas nos tanques de piscicultura, comparando-se os resultados da densidade larvária da leitura prévia com os obtidos após o tratamento.

Os resultados constantes da Tabela 1 referem-se aos dados do ILHH, comparando-se os resultados dos tanques tratados com os controles. Observam-se menores valores do ILHH na leitura do 2º dia nos criadouros nos quais foram aplicados o Vectolex e o Spherimos do que nos criadouros- controle. Nos tanques tratados com Griselesf, evidenciam-se valores do ILHH próximos aos encontrados no controle, ultrapassando esses índices larvários nas demais observações. Na leitura seguinte (7º dia), os índices de anofelinos aumentaram nos tanques tratados com os larvicidas Spherimos e Griselesf, mostrando maior eficácia para o formulado Vectolex.

Tabela 1. Média do índice de larvas (ILHH) encontradas, comparando-se os resultados dos tanques tratados com o dos controles

| Nº criadouro | 4 | 9 | 6 | 9 |
|----------------|----------|----------------------|--------------------|-------------------|
| Leitura (dias) | Controle | Larvicida | | |
| | | Griselesf (200mL/m2) | Vectolex (22Kg/ha) | Spherimos (6L/ha) |
| prévia | 23,4 | 18,5 (79%) | 13,7 (58%) | 32,8 |
| 2 | 17,7 | 14,7 (83%) | 0,4 (2%) | 1,3 (7%) |
| 7 | 20,8 | 17,8 (85%) | 4,9 (23%) | 11,2 (54%) |
| 14 | 21,3 | 25,4 | 6,7 (31%) | 4,5 (21%) |
| 21 | 11,4 | 28,5 | 3,1 (27%) | 9,1 (80%) |
| 28 | 12,4 | 38,8 | 3,7 (30%) | 15,2 |
| 35 | 9,2 | 11,7 | 0,6 (6%) | 6,0 (65%) |

No 14º dia de observação, os valores do ILHH foram baixos para Vectolex e Spherimos, este último apresentou, a partir desta leitura, índices de larvas de anofelinos próximos aos observados nos tanques-controle. Vale ressaltar que os índices larvários, registrados nos tanques tratados com Vectolex, após a aplicação não ultrapassaram os índices dos controles.

Consta, na Figura 2, a porcentagem de redução larval obtida nos testes separados em grupos de larvas maduras (M) e jovens (J), comparada à evolução das densidades larvárias ao longo do tempo de observação. Considerando os formulados Spherimos e Vectolex, constata-se redução significativa ($p < 0,001$) tanto para larvas maduras quanto para larvas jovens em todas as comparações; pode-se afirmar que houve mesmo drástica redução da quantidade de larvas. É importante ressaltar que o Vectolex e o Spherimos apresentaram, em algumas leituras, maiores reduções para as larvas maduras do que para as larvas jovens (Figura 2 – A e B). Quando se consideram os resultados obtidos com o Griselesf, observa-se que também os valores de quiquadrado foram significativos ($p < 0,001$), porém a maior porcentagem de redução foi de 55% para larvas maduras, ao passo que as larvas jovens de anofelinos apresentaram redução de 36%.

Avaliação dos formulados em criadouros de Olaria – Iranduba

Na Figura 3, são apresentados os dados relacionados à evolução das densidades larvárias. Neste gráfico, estão expressos os resultados obtidos com cada um dos três formulados testados, comparados com as leituras prévias (antes do tratamento). A maior diminuição do número de larvas de anofelinos foi observada no 2º dia, nos criadouros de olaria tratados com Vectolex. Os formulados Spherimos e Griselesf não se mostraram muito eficazes, nem mesmo nesta leitura. Convém ressaltar que, nos criadouros-controle, também se observou diminuição das larvas nesta leitura. A partir do 7º dia, o Spherimos manteve o número de larvas abaixo do

encontrado na leitura prévia. Os demais larvicidas apresentaram valores próximos ou maiores do que os observados antes do tratamento.

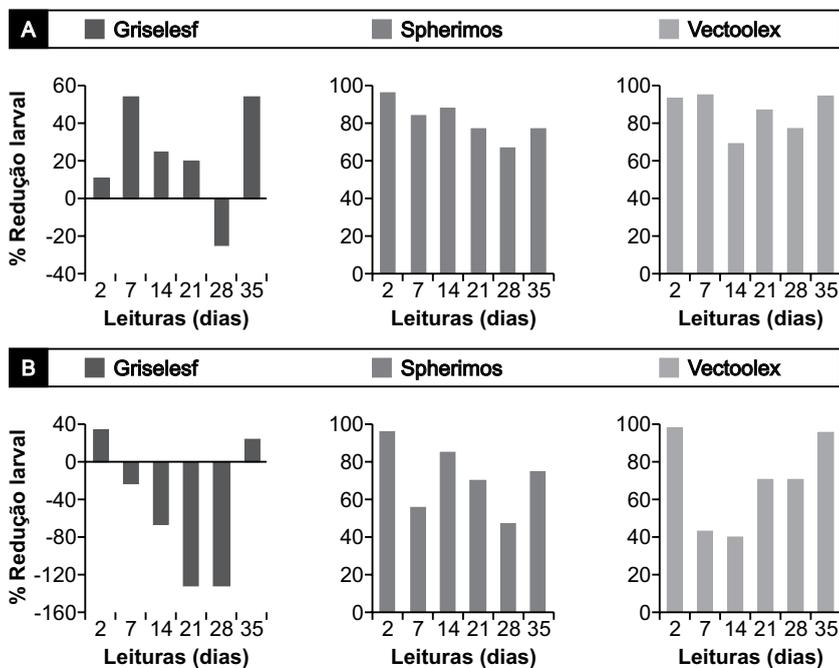


Figura 2. Porcentagem de redução de larvas maduras (A) e jovens (B) de espécies de *Anopheles* capturadas nos tanques de piscicultura, segundo cada tipo de larvicida bacteriano aplicado.

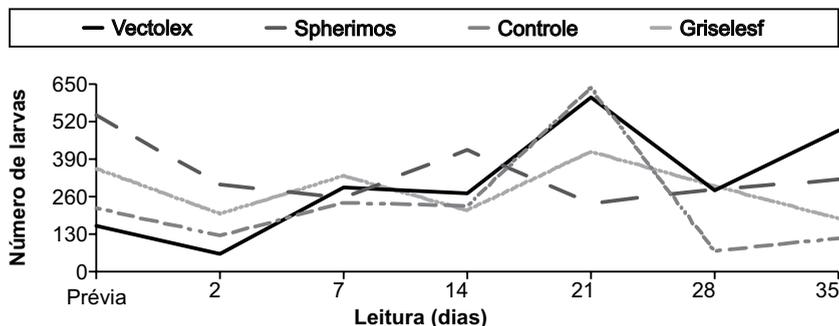


Figura 3. Número de larvas observadas nos criadouros de olaria, comparando-se os resultados da densidade larvária da leitura prévia com os obtidos após o tratamento.

Os valores das médias dos índices larvais (ILHH) encontrados na Olaria Cerama estão demonstrados na Tabela 2. Comparando os resultados dos criadouros de olaria tratados com os verificados nos controles (lagoas de olaria não tratadas), observa-se, na leitura do 2º dia após a aplicação dos larvicidas, que os índices larvários foram mais baixos nos criadouros tratados com Vectolex do que os índices do controle; para os demais larvicidas, nesta leitura, os valores do ILHH foram maiores do que nos criadouros não tratados. Nas observações seguintes, os índices de anofelinos aumentaram ou foram equivalentes aos índices observados nos criadouros de olaria não tratados (controles).

Tabela 2. Média do índice de larvas (ILHH) encontradas, comparando-se os resultados dos criadouros de olaria tratados com os controles

| Nº criadouro | 5 | 9 | 8 | | 9 |
|----------------|----------|----------------------|--------------------|-------------------|---|
| | | | Larvicida | | |
| Leitura (dias) | Controle | Larvicida | | | |
| | | Griselesf (200mL/m2) | Vectolex (22Kg/ha) | Spherimos (6L/ha) | |
| prévia | 2,8 | 2,5 (89%) | 1,4 (50%) | 4,8 | |
| 2 | 1,2 | 1,9 | 0,5 (42%) | 2,9 | |
| 7 | 2,2 | 1,7 (77%) | 1,5 (68%) | 2,5 | |
| 14 | 2,0 | 2,0 | 2,6 | 3,8 | |
| 21 | 6,3 | 3,3 (52%) | 5,8 (92%) | 2,2 (35%) | |
| 28 | 0,6 | 2,8 | 2,7 | 2,7 | |
| 35 | 1,1 | 1,7 | 4,0 | 3,1 | |

Na Figura 4, constam os valores das porcentagens de redução de larvas maduras e jovens de anofelinos encontradas nos criadouros de olaria. Observa-se maior suscetibilidade das larvas jovens ao formulado Spherimos do que das maduras; os demais formulados não apresentaram redução.

Parâmetros Limnológicos

Os resultados da análise físico-química de amostras da água dos tanques de piscicultura e dos criadouros de olaria, nos quais ocorreram os testes com os três larvicidas, estão demonstrados na Figura 5. Os tanques de piscicultura apresentaram valor médio de turbidez (colóides com diâmetros menores) de 18,6; a quantidade de matéria orgânica foi de 59,6; o material em suspensão (partículas de diâmetro maiores) teve média de 30,3. A demanda química de oxigênio (DQO) apresentou valor médio de 40,3. Já os criadouros de olaria mostraram, em alguns parâmetros limnológicos, resultados inversos aos dos tanques, por exemplo: a DQO teve valor

23; a quantidade de matéria orgânica, 51; a turbidez revelou maior valor (30) nos criadouros de olaria do que o observado nos tanques de piscicultura.

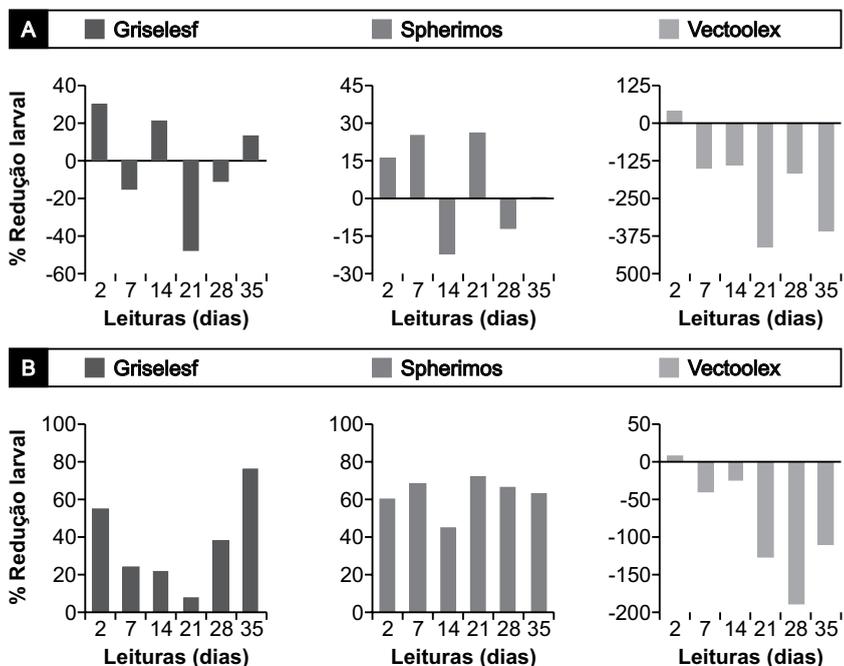


Figura 4. Porcentagem de redução de larvas maduras (A) e jovens (B) de espécies de *Anopheles* capturadas nos criadouros de olaria para cada tipo de larvicida bacteriano.

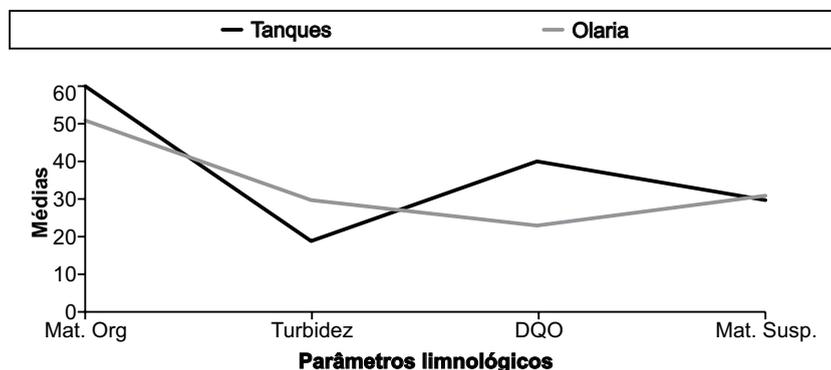


Figura 5. Médias de parâmetros limnológicos dos criadouros artificiais de espécies de *Anopheles* nos municípios de Manaus e Iranduba.

DISCUSSÃO

O índice larvário encontrado nos tanques de piscicultura e criadouros de olaria indica que, entre esses dois tipos de criadouros artificiais, os tanques de piscicultura apresentam condições ambientais mais favoráveis ao desenvolvimento de espécies de *Anopheles*. A densidade larvária observada nesses *habitats* demonstra o potencial que estes locais têm para o desenvolvimento de vetores em áreas endêmicas de malária nesta região.

Estudos revelam a importância da proliferação de *Anopheles* em tanques de piscicultura para o controle da malária em Manaus. Tadei et al. (2004) identificaram, no entorno de Manaus, cerca de 250 tanques de piscicultura em 2004. No entanto, essa quantidade já aumentou em razão da política de incentivo do governo ao cultivo de peixes. Esses autores observaram que, nas zonas leste e oeste da cidade, onde foram realizadas as inspeções para dimensionar a densidade larvária pelo índice de larva por homem/hora (ILHH), 100% dos 141 tanques monitorados foram positivos para anofelinos. O índice de positividade para *Anopheles darlingi*, principal vetor da malária, foi maior no início do ano de 2003 (com 75%) do que em 2004. Essas constatações demonstraram a importância de estudos de controle de larvas de anofelinos em criadouros artificiais na Amazônia.

Mulla et al. (1984a) avaliaram dois formulados de *B. sphaericus* (estirpe 2362 e IF-117) em campo contra larvas de mosquitos, observando a persistência da atividade larvicida desses formulados em poços ricos em matéria orgânica. Os autores verificaram que *B. sphaericus* tem potencial para o controle de larvas de mosquito por duas a três semanas e que, nestes criadouros extremamente ricos em matéria orgânica, registrou-se curta atividade larvicida, o que significa que aspectos ambientais devem ser considerados relevantes para um melhor controle do inseto alvo (Mulligan et al., 1978; 1980; Silapanuntakul et al., 1983; Des Rochers & Garcia, 1984; Hoti & Balaraman, 1984; Mulla et al., 1984a; 1988; Karch & Charles, 1987).

Outro aspecto estudado está relacionado à eficácia de diferentes formulados e à dosagem utilizada do larvicida. Estudo sobre a efetividade de dois formulados e de diferentes concentrações foi realizado na Nicarágua por Mendoza (1998), sendo utilizados um larvicida granulado (Vectolex CG) e outro líquido (Spherimos), em criadouros naturais de *Anopheles albimanus*. O autor utilizou para o primeiro formulado dose mínima de 2g/m² e máxima de 5g/m² e, para o formulado Spherimos, dose mínima de 0,3mL/m² e máxima de 0,6mL/m². Os resultados mostram que ambos os formulados (Spherimos e Vectolex) reduziram totalmente as larvas *A. albimanus* em 72 horas após a aplicação e que não houve diferença significativa da eficácia em relação às doses testadas.

Estudos realizados em criadouros naturais de *Anopheles* spp de Manaus (AM), utilizando Vectolex CG, formulado granulado na dose de 11 kg/ha, e Spherimos, formulado líquido na dose de 3 L/ha, como uma intervenção nas formas imaturas da localidade, foram realizados por Rodrigues (2006). A autora constatou

redução total de larvas de anofelinos em 45% de todos os criadouros tratados com estes dois formulados. A atividade larvicida dos formulados, levando-se em conta as larvas mais jovens, mostra que o Spherimos apresentou maior redução dessas larvas do que o Vectolex.

Os testes em criadouros artificiais (tanques de piscicultura), com os produtos dosados com o dobro do que é recomendado pelos fabricantes (Vectolex 22Kg/ha, Spherimos 6L/ha e Griselesf 200mL/m²), revelaram que os formulados Spherimos e Vectolex têm padrões similares de redução, diferentemente dos observados com o larvicida Griselesf, cuja maior porcentagem de redução foi de 55% para larvas maduras e de 36% para larvas jovens. Nos criadouros de olaria, houve pouca redução de larvas de anofelinos, apesar da dose dobrada dos formulados, somente o Spherimos obteve uma redução expressiva (72%). Os testes indicaram que Spherimos e Vectolex reduziram as larvas de anofelinos e que esta ação, somada às demais medidas adotadas nas campanhas de controle, contribuirá significativamente para a redução dos índices de incidência da malária na Amazônia.

Barjac (1990) destaca fatores bióticos e abióticos que influenciam na atividade de *Bacillus* no ambiente, dentre os quais ressalta a qualidade da água. A poluição e a presença de partículas coloidais influenciam a atividade padrão de *Bacillus thuringiensis* (Margalit & Borbroglgio, 1984; Margalit et al., 1985; Ramoska et al., 1982).

Os tanques de piscicultura caracterizaram-se, neste estudo, pela baixa turbidez e a alta quantidade de matéria orgânica e de material em suspensão, ficando evidenciado um equilíbrio nesses ambientes aquáticos. Verificou-se, também, uma alta demanda química de oxigênio (DQO), o que caracteriza um processamento químico intenso da matéria orgânica no corpo da água. Os criadouros de olaria, por sua vez, mostraram, em alguns parâmetros limnológicos, resultados inversos aos dos tanques: a DQO e a quantidade de matéria orgânica apresentaram valores baixos; em relação à turbidez, ficaram evidenciados maiores valores nos criadouros de olaria do que nos tanques de piscicultura.

Essas características limnológicas encontradas nos criadouros artificiais podem justificar o pouco tempo de atividade dos formulados, mas demonstram as várias condições físico-químicas nas quais os vetores podem se desenvolver e sugerem, até mesmo, a preferência das fêmeas de ovipor pelos tanques de piscicultura.

CONCLUSÃO

Os criadouros artificiais apresentam grande potencial para o desenvolvimento de larvas de espécies de *Anopheles*, vetores de malária nesta região. A maior densidade larvária foi observada nos tanques de piscicultura, sendo quatro vezes maior do que nos criadouros de olaria.

Em relação à eficácia dos diferentes formulados, constata-se equivalência na suscetibilidade dos anofelinos aos larvicidas Spherimos e Vectolex nos tanques

de piscicultura. O número de larvas registrado nos tanques tratados com Vectolex e Spherimos, após a aplicação, manteve-se abaixo do encontrado antes do tratamento ou nos tanques-controle, com exceção de algumas leituras. O formulado Griselesf obteve menor eficácia. Nos criadouros de olaria, os três formulados não se mostraram efetivos.

Nos tanques de piscicultura, a maior redução de larva ocorreu no 2º dia após a aplicação dos larvicidas testados, mantendo-se reduzido o número de larvas de anofelinos por 35 dias com Vectolex e 21 dias com o Spherimos.

Considerando-se o estágio larval, as maiores porcentagens de redução em consequência do tratamento com os diferentes formulados ocorreu com as larvas maduras nos tanques de piscicultura. Nos criadouros de olaria, não ocorreu redução das larvas, com exceção das larvas mais jovens nos criadouros tratados com Spherimos.

A dose dobrada dos larvicidas – Spherimos e Vectolex - aplicada nos tanques de piscicultura foi efetiva contra larvas de espécies de *Anopheles*; nos criadouros de olaria, não houve atividade larvicida com os diferentes formulados.

Quanto às características limnológicas desses criadouros artificiais, conclui-se que os parâmetros de matéria orgânica e DQO apresentam maiores médias nos tanques de piscicultura, ao passo que, nos criadouros de olaria, a maior média foi obtida pela turbidez.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Rose Costa Pinto (SVS) e ao Dr. Evandro Melo de Oliveira, da Secretaria de Vigilância em Saúde; ao Dr. Ladislau, do Ministério da Saúde/SVS e ao Exército Brasileiro do Amazonas, pelo apoio constante no desenvolvimento do projeto; à Dra. Maria do Socorro Rocha da Silva, do Laboratório de Limnologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pelas análises limnológicas realizadas.

ABSTRACT

Malaria Control: Efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 formulations against *Anopheles* species larvae in man-made breeding sites such as fish culture ponds and brickyard puddles

Objective: To evaluate the efficacy and persistence of different formulations of *Bacillus sphaericus* 2362, in double dose, as a larvicide of immature forms of *Anopheles* species in man-made breeding sites such as fish culture ponds and brickyard puddles in Manaus and Iranduba, Brazil. *Methods:* application in a dose twice as large as the indicated, of Vectolex (22K g/ha), Griselesf (200L/ha) and Spherimos (6L/ha) were performed at Sítio Fazendinha with 7 ponds and one control (without larvicide); Sítio Três Irmãos (6 ponds and one control), Sítio Santa Cecília (9 ponds and two controls); and 26 brickyard puddles with 5 controls in Olaria Cerama. Anopheline breeding sites samples were collected to calculate the man hour larva index (MHLI); the percentage

of reduction was performed in readings on the 2nd, 7th, 14th, 21st, 28th and 35th days following the application. *Results:* The results of density of larvae in man-made breeding sites demonstrated that fish culture ponds had four times more larvae (33.729) than breeding brickyard puddles (7.972). The efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Anopheles* species larvae in man-made breeding sites such as fish culture ponds presented low larvae indices (MHLI) at the 2nd day reading, they had been treated with Vectolex and Spherimos in comparison with controls. On the other hand, when considering the breeding sites where the Griselesf product was applied, similar larvae indices (MHLI) and controls were obtained at all readings. The percentage of reduction with Spherimos and Vectolex were nearly 100% at the 2nd day observation, for mature and young larvae. The Griselesf product presented lower reduction in fish culture ponds (55%). At the Cerama brickyard, the lowest larvae index averages were found in the breeding sites where the Vectolex larvicide was applied when considering the most mature larvae (3rd and 4th instars). The limnological analyses demonstrated a large amount of organic matter in the breeding sites, which would require lower toxicity, nonetheless, the results were positive, i.e., the tanks remained with no anopheline larvae. *Conclusions:* In man-made breeding sites such as fish culture ponds and brickyard puddle there are favourable conditions for the development of *Anopheles* species. The application of double doses than recommended of Spherimos and Vectolex were effective against *Anopheles* species, while in brickyard puddle these doses were less effective. In order to control *Anopheles* larvae in fish culture ponds under the conditions found in the Amazon, we conclude that the first option is Spherimos, followed by Vectolex and Griselesf as second and third options.

KEYWORDS: Malaria. Biological Control. Anopheline. *Bacillus sphaericus*.

REFERÊNCIAS

1. APHA. American Public Health Association. *Standard methods of the experimentation of water and wastewater*. 19th ed. New York, APHA, WWA, WPCR, 1995.
2. Des Rochers B, Garcia R. Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*. *Mosq News* 44: 160-165, 1984.
3. Hoti SL, Balaraman K. Recycling potencial of *Bacillus sphaericus* in natural mosquito breeding habitats. *Indian J Med Res* 80: 90-94, 1984.
4. Karch S, Charles JF. Toxicity, viability and ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 spore/crystal complex used in the field. *Ann Microbiol (Inst Pasteur)* 138: 485-492, 1987.
5. Litaiff EC, Rodrigues IB. Avaliação da atividade larvívica de diferentes estirpes brasileiras de *Bacillus sphaericus* contra *Anopheles nuneztovari*. Anais VIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/INPA. 21 a 23 de Julho, Manaus, AM, 1999. p. 159-162.
6. Margalit J, Bobroglio, H. The effect of organic materials and solids in water on the persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Z Angew Entomol* 97: 382-383, 1984.
7. Margalit J, Pasciar-Gluzman C, Bobroglio H, Barak Z, Lakhim-Tsrer L. Biocontrol of mosquitoes in Israel. In: Laird M, JW Miles (eds). *Integrated mosquito control methodologies*. Publishers, Orland, Florida, Vol 2 Academic Press, 1985. 444 p.
8. Maire A. Sélectivité des femelles de moustiques (Culicidae) pour leurs sites d'oviposition: état de la question. *Rev Can Biol Exptl* 42: 235-241, 1983.

9. Mendoza PR. Larvicidal impact of two formulations of *Bacillus sphaericus* (strain 2362: Vectolex CG, Spherimos liquid) on *Anopheles albimanus* larvae in natural habitats in Nicaragua in 1996. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 226, 1998.
10. Mulla MS, Norland RL, Fanara DM, Darwazah HA, Mckean DW. Control of chironomid midges in recreational lakes. *J Econ Entomol* 61: 300-307, 1971.
11. Mulla MS, Darwazah HA, Davidson EW, Dulmage HT. Efficacy and persistence of the microbial agent *Bacillus sphaericus* for the control of mosquito larvae in organically enriched habitats. *Mosq News* 44: 166-173, 1984.
12. Mulla MS, Axerlrod H, Darwazah H, Matanmi BA Efficacy and longevity of *Bacillus sphaericus* 2362 formulations for control of mosquito larvae in dairy wastewater lagoons. *J Amer Mosq Control Assoc* 4: 448-452, 1988.
13. Mulligan FS III, Schaefer CH, Muira T. Laboratory and field evaluation of *Bacillus sphaericus* as a mosquito control agent. *J Econ Entomol* 71: 774-777, 1978.
14. Mulligan FS III, Schaefer CH, Wilder WH. Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14 against mosquitoes under laboratory and field conditions. *J Econ Entomol* 73: 684-688, 1980.
15. Oliveira CD, Tadei WP. Avaliação do efeito das águas pretas e ácidas sobre o potencial larvídica de estirpes brasileiras de *Bacillus sphaericus* contra *Anopheles nuneztovari*. Relatório Bolsa ITI/ PCI/ INPA, 9 p., 2004.
16. Ramoska WA, Watts S, Rodrigues, RE. Influence of suspended particulates on the activity of *Bacillus thuringiensis* ser. H-14 against mosquito larvae. *J Econ Entomol* 75: 1-4, 1982.
17. Rodrigues IB, Tadei WP, Dias JMCS. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malaria vector species in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 441 – 444, 1998.
18. Rodrigues IB, Tadei WP, Dias JMCS. Larvicidal activity *Bacillus sphaericus* 2362 against *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles darlingi* and *Anopheles braziliensis* (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 41: 101-105, 1999.
19. Rodrigues IB. Controle da Malária: Avaliação da efetividade em laboratório e em campo de formulados de *Bacillus sphaericus* 2362 nos municípios de Manaus, Iranduba e Novo Airão. Tese Doutorado, 2006. 171 p.
20. Santos GM, Ferreira EJ, Zuanon JAS. *Peixes Comerciais de Manaus*. Manaus: IBAMA/AM, Próvarzea, 2006. 144 p.
21. Silapanuntakul S, Pantuwatana S, Bhuiratana A, Charoensiri K. The comparative persistence of toxicity of *Bacillus sphaericus* strain 1593 and *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae in different kinds of environments. *J Invertebr Pathol* 42: 387-392, 1983.
22. Tadei WP, Santos JMM, Scarpassa VM, Rodrigues IB. Incidência, Distribuição e Aspectos Ecológicos de espécies de *Anopheles* (Diptera, Culicidae), em regiões naturais e sob Impacto Ambiental da Amazônia Brasileira. In: Ferreira, E.J.G.; Santos,G.M.;Leão, E.L.M. & Oliveira, L.A. (Eds) *Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia*. Editora Humberto Calderaro Ltda Manaus, Amazonas. Vol. 2, 1993. p. 167-196.
23. Tadei WP, Rodrigues IB, Terrazas W, Lima CP, Santos JMM, Rafael MS, Baggio JB, Lago Neto JC, Gonçalves MJF, Figueiredo P. 3º Curso Implementação do Controle Biológico de Mosquitos usando Bioinseticida Bacteriano. Simpósio Satélite - Mosquitos Vetores de Doenças Tropicais e Controle Biológico. Resumos, vol. 1, 2003. p. 50-60.
24. Tadei WP, Pinto RC, Oliveira EM, Terrazas WC, Santos MM.J, Rodrigues IB, Rafael MS, Lima CP, Lopes NR, Ribeiro JMT. Controle da malária em Manaus: tanques de piscicultura e sua importância na proliferação de *Anopheles darlingi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 37 (supl. 1): 261-262, 2004.
25. Tadei WP, Passos RA, Rodrigues IB, Santos JMM, Rafael MS. Indicadores entomológicos e o risco de transmissão de malária na área de abrangência do projeto PIATAM. In: Cavalcante KV, Rivas AAF, Freitas CEC (Org.). *Indicadores Socioambientais e Atributos de Referência para o trecho Urucu-Coari-Manaus, Rio Solimões, Amazônia*, 2007. 160 p.
26. Vilarinhos PT, Dias SC, Nogueira RG, Lopes JB. Avaliação da potência larvídica de novos isolados de *Bacillus sphaericus* contra *Culex quinquefasciatus*. III Simpósio de Controle Biológico (Resumos). CNPDA/EMBRABA, 1992. p. 286.