

Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos*

Larval susceptibility to chemical insecticides of two *Aedes aegypti* populations

Jairo Campos* e Carlos FS Andrade

Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Unicamp. Campinas, SP, Brasil

Descritores

Aedes.# Inseticidas derivados do carbamato.# Inseticidas organofosforados.# Piretróides.# Resistência a inseticidas. Controle de mosquitos.

Resumo

Objetivo

A susceptibilidade dos insetos tem sido um dos mais importantes aspectos a ser monitorados em programas de saúde pública que tratam do controle de vetores. O estudo objetiva avaliar a susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos em áreas sujeitas ou não a controle.

Métodos

Bioensaios foram realizados com concentração de diagnóstico e concentração múltipla, segundo padrão da Organização Mundial de Saúde para as coletas de larvas de *Aedes aegypti*, em uma área não sujeita – Campinas, SP – e em uma outra área sujeita – Campo Grande, MS – a tratamentos químicos de controle.

Resultados

Larvas de *Aedes aegypti* coletadas em Campinas indicaram resistência potencial à concentração-diagnóstico (CD) de 0,04 ppm do organofosforado temephos. O teste de concentração múltipla registrou sobrevivência de 24,5% à concentração de 0,0125 ppm. A susceptibilidade dessa mesma linhagem foi avaliada para o organofosforado fenitrothion (CD=0,08 ppm) e o piretróide cipermetrina (CD=0,01 ppm), resultando em valores normais para essas concentrações. Larvas de *Ae. aegypti* coletadas em Campo Grande mostraram susceptibilidade normal ao temephos (CD=0,04 ppm) e à cipermetrina (CD=0,01 ppm). Também foram estabelecidas as CL₅₀ e as CL₉₅ de cipermetrina 25 CE, cyfluthrin 5 CE, betacyfluthrin 1,25 SC e propoxur 20 CE para *Ae. aegypti*. Com base nos dados da linhagem-padrão Rockefeller, foram estimadas as razões de resistência de 2,9, 2,2, 2,4 e 1,3, respectivamente, pela CL₅₀, e de 3,5, 2,6, 3,9 e 1,3 pela CL₉₅.

Conclusão

Os resultados reforçam a necessidade de avaliações prévias e monitoramento da efetividade dos inseticidas que devem ser usados em programas de controle de mosquitos.

Keywords

Aedes.# Insecticides, carbamate.# Insecticides, organophosphate.# Pyrethroids.# Insecticide resistance. Mosquito control.

Abstract

Objective

Insect susceptibility has been one of the most important aspects to be monitored in public health programs for vector control. The purpose of the study is to assess the

Correspondência para/Correspondence to:

Jairo Campos
Departamento de Zoologia, IB, Unicamp
13084-971 Campinas, SP, Brasil
E-mail: jairocag@unicamp.br

*Parte dos resultados foram apresentados no I Workshop dos Pós-Graduandos da Unicamp, Campinas, setembro de 1998.

*Aluno de Pós-Graduação da Unicamp.

Recebido em 22/9/2000. Reapresentado em 9/3/2001. Aprovado em 2/4/2001.

susceptibility to chemical insecticides of Aedes aegypti larvae in both areas under vector control and no vector control.

Methods

World Health Organization standard bioassays for diagnostic concentration and multiple concentrations were performed in mosquito larvae collected in an area under no vector control (Campinas, SP) and an area under vector chemical control (Campo Grande, MS), in Brazil.

Results

*Potential resistance to a diagnostic concentration of temephos (DC=0.04 ppm) was registered for an *Ae. aegypti* larval population collected in Campinas. Multiple concentration tests confirmed the larvae resistance, with 24.5% of them surviving at the 0.0125 ppm concentration. Bioassays with the organophosphate fenitrothion (DC=0.08 ppm) and pyrethroid cypermethrin (DC=0.01 ppm) in the same population revealed their susceptibility to these agents. Bioassays carried out in an *Ae. aegypti* larval population collected in Campo Grande showed their susceptibility to temephos (DC=0.04 ppm) and cypermethrin (DC=0.01 ppm). LC_{50} and LC_{95} for cypermethrin (CE25), cyfluthrin (CE5), betacyfluthrin (SC1.25) and propoxur (CE20) were determined for *Ae. aegypti*. Using the Rockefeller standard strain values, ratios of resistance were estimated: 2.9, 2.2, 2.4 and 1.3 for LC_{50} and 3.5, 2.6, 3.9 and 1.3 for LC_{95} , respectively.*

Conclusion

The findings reinforce the need for routinely monitoring pesticide efficacy as a very important step in vector control management programs.

INTRODUÇÃO

Poucas espécies sinantrópicas de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* formam ainda hoje os maiores desafios em saúde pública. Estão implicadas na transmissão, respectivamente, da dengue, da filariose bancroftiana e da malária, de forma particularmente grave, em vários Estados brasileiros.

Os 50 milhões de casos anuais de dengue no mundo e o recrudescimento da filariose e da malária permitem questionar a competência dos responsáveis pelo controle dos vetores no terceiro mundo em relação a um freqüente emprego de inseticidas químicos. No caso da dengue, o uso desses produtos tem sido feito não só em áreas críticas, como cemitérios e ferrosvelhos, mas também no ambiente domiciliar, devido à dificuldade da população em eliminar criadouros de mosquito vetor pela mudança de hábitos.² Assim, a eficiência dos inseticidas rotineiramente empregados ou o desenvolvimento de resistência por parte dos vetores devem sempre ser avaliados como medida de segurança para a população envolvida e também como uma economia para os cofres públicos.

Embora avanços importantes tenham surgido no desenvolvimento de medidas alternativas para o controle de mosquitos, os inseticidas químicos ainda se mantêm como parte vital dos programas de controle integrado. Dessa forma, diversos casos de resistência têm sido registrados no mundo para espécies de mosquitos vetores^{3,6,11,13,14,17} e, mais particularmente,

para populações de *Aedes aegypti* no Brasil.^{1,9,10} Além da detecção de resistência para a formulação das estratégias de controle, também é fundamental o conhecimento dos seus mecanismos. Devido ao uso no passado, por exemplo, de DDT ou de inseticidas agrícolas clorados, a resistência cruzada pode reduzir a eficácia de piretróides, mesmo antes de sua introdução no combate a um vetor.

A avaliação rápida da susceptibilidade de mosquitos a inseticidas pode ser feita no laboratório por meio de testes de dose ou concentração-diagnóstico (DD ou CD). Dose, quando se trabalha com uma quantidade conhecida em contato de uma vez com o inseto, e concentração, quando os insetos são expostos a um meio contendo o agente letal por um determinado período. Trabalhando-se com uma colônia de mosquitos susceptível putativa, a CD para larvas é determinada para vários ensaios como sendo a menor concentração com capacidade de matar todos os indivíduos em 24 horas ou a que causa 99,9% de mortalidade ($CL_{99,9}$) em testes de múltiplas concentrações.³ Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) indica, por exemplo, uma CD de 0,012 mg/litro (ppm) de temephos para larvas de *Ae. Aegypti*.¹⁸

No Brasil, tem-se suspeitado ou registrado para *Ae. aegypti* a ocorrência de resistência a organofosforados pelo menos em oito municípios do Estado de São Paulo^{1,10} e em Goiás.^{9,16} Devido ainda à detecção de resistência ao temephos em municípios do Rio de Janeiro, o controle passou a ser feito com *Bacillus*

thuringiensis var. israelensis e methoprene a partir de um Fórum Estadual (setembro/2000). O presente trabalho avalia a susceptibilidade de uma colônia de laboratório de *Ae. Aegypti* estabelecida na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e de amostras desse mosquito obtidas em Campo Grande, MS, município com dengue na época e sob tratamento com inseticidas.

MÉTODOS

As larvas de *Ae. aegypti* avaliadas no presente estudo são de duas origens: da colônia *Aae*-Unicamp (Departamento de Zoologia) formada a partir das primeiras larvas coletadas em armadilhas no Campus, onde previamente não existia a espécie, e de coletas feitas no Campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (*Aae*-UFMS), em Campo Grande, MS (maio/98 e março/99). A colônia *Aae*-Unicamp foi iniciada ao final de 1997, assim que a espécie foi detectada no programa de monitoramento de mosquitos no Campus.* Até essa época, não foram feitas aplicações de quaisquer produtos de controle no campus, e não havia transmissão de dengue no município. Como padrão de referência, foi usada a linhagem Rockefeller, cedida pela Sucen (Superintendência de Controle de Endemias), Marília, SP, e proveniente do CDC (Center for Disease Control) em Porto Rico.

Os inseticidas usados (concentração, nome comercial) foram: o carbamato propoxur (20%, Baygon 20 CE), os organofosforados temephos (50%, Abate 500 E) e fenitrothion (40%, Sumithion PM) e os piretróides à base de cipermetrina (25%, Ciper 250 CE e 25%, Cymperator 25 CE), à base de cyfluthrin (5%, Solfac 5CE) e de betacyfluthrin (1,25%, Responsar 1,25 SC). Esses produtos foram inicialmente diluídos para uma solução estoque à concentração de 100 ppm i.a. em água (ou acetona, para o Solfac 5 CE). A seguir, foram feitas diluições em água destilada para se chegar às concentrações de trabalho.

Para os organofosforados, foram realizados testes de concentração-diagnóstico de resistência ao temephos (CD=0,04 ppm) para as larvas de *Aae*-Unicamp e de *Aae*-UFMS. Para a colônia da Unicamp, foi ainda feito o teste de concentração múltipla (CM=0,0125 a 1,5625 ppm) a esse inseticida. A susceptibilidade ao fenitrothion só foi avaliada para larvas de *Aae*-Unicamp pela CD (=0,08 ppm).

A resistência aos piretróides foi avaliada para a cipermetrina nas larvas de *Aae*-Unicamp, em vários testes de concentração múltipla e concentrações-

diagnóstico tentativas, usando-se os produtos Ciper 250 CE e Cymperator 25 CE. Para *Aae*-UFMS, foi realizado um teste com uma concentração de Ciper 250 CE (0,01 ppm i.a.).

Para a cipermetrina, o cyfluthrin, a betacyfluthrin e o propoxur, foram estabelecidas as concentrações letais mediana (CL₅₀) e as CL₉₅ com larvas de *Aae*-Unicamp.

Os bioensaios foram feitos seguindo os padrões previamente propostos.^{3,17,18} Usaram-se grupos de 25 ou mais larvas de terceiro estágio tardio e/ou quarto estágio inicial em copos descartáveis, com as soluções dos inseticidas para três ou mais réplicas. As testemunhas receberam água destilada ou água com acetona (Solfac 5 CE).

Nos testes de concentração múltipla, foram usadas quatro ou mais concentrações, produzindo mortalidade entre 0% e 100%. Durante toda a exposição aos produtos, observaram-se mortalidade ou paralisia das larvas. A mortalidade final foi avaliada 24 horas após o contato com os inseticidas. Os valores médios dos dados foram submetidos à análise probit,⁵ usando-se o programa POLO-PC.⁸

As razões de resistência (RR) foram calculadas para as CL₅₀ e CL₉₅, comparando-se os valores da colônia *Aae*-Unicamp com aqueles da linhagem susceptível Rockefeller, depois de ter verificado paralelismo nas respostas.⁸

RESULTADOS

Os testes realizados com larvas da colônia *Aae*-Unicamp indicaram, para o organofosforado temephos, sobrevivência (2,86%) para a CD adotada no presente trabalho (=0,04 ppm). No teste de concentração múltipla, a sobrevivência para a concentração de 0,0125 ppm (= CD adotada pela OMS) foi alta (24,5%). Para o fenitrothion, a mortalidade foi total para a CD adotada (0,08 ppm), e não foi avaliada a resposta dessa colônia à concentração 0,04 ppm, proposta pela OMS como CD. Para a cipermetrina, dois testes de concentração múltipla com essa colônia mostraram mortalidades de 99% e 100% para a concentração 0,01 ppm. As CL₅₀ e as CL₉₅ para os piretróides cipermetrina (Cymperator 25CE), cyfluthrin, betacyfluthrin e para o carbamato propoxur, comparadas com os valores obtidos para a linhagem-padrão Rockefeller, encontram-se na Tabela.

Para a população *Aae*-UFMS, foi observada 100% de mortalidade ao temephos (CD=0,04 ppm) e à

Tabela - Concentrações letais 50% e 95%, coeficiente angular e razões de resistência para larvas de *Aedes aegypti* da colônia Aae-Unicamp comparado com o padrão susceptível Rockefeller.

Inseticida linhagem/colônia	LC ₅₀ (ppb i.a.) (IC)*	LC ₉₅ (ppb i.a.) (IC)	Coef. ang. (b)	LC ₅₀	RR	LC ₉₅
Cipermetrina Rockefeller	0,626 (0,423-0,891)	1,684 (1,110-5,104)	3,8	—	—	—
Aae-Unicamp	1,842 (1,569-2,116)	5,834 (4,824-7,562)	3,3	2,9	—	3,5
Cyfluthrin Rockefeller	1,156 (0,707-1,710)	2,360 (1,627-11,047)	5,3	—	—	—
Aae-Unicamp	2,577 (1,733-4,129)*	6,054 (3,879-30,027)*	4,4	2,2	—	2,6
Betacyfluthrin Rockefeller	2,958 (2,246-3,674)	8,848 (6,473-16,289)	3,5	—	—	—
Aae-Unicamp	7,010 (4,332-14,221)*	34,298 (16,04-406,780)*	2,4	2,4	—	3,9
Propoxur Rockefeller	1,123 (881-1,393)	3,166 (2,331-5,591)	3,6	—	—	—
Aae-Unicamp	1,462 (1,039-2,001)	4,088 (2,786-9,030)	3,7	1,3	—	1,3

IC = intervalo de confiança (p=0,05 e 0,10).

b = coeficiente angular.

RR = razões de resistência.

cipermetrina (CD=0,01 ppm).

Usando-se a colônia Aae-Unicamp, observou-se diminuição na potência do produto comercial Ciper 250 CE, quando foram comparadas as respostas para 0,01 ppm i.a. espaçadas pelo período de um ano (de 100% para 67%). O produto estava ainda dentro de sua validade e foi adequadamente estocado no laboratório.

DISCUSSÃO

A colônia Aae-Unicamp pode ser considerada muito tolerante ao temephos ou mesmo resistente, quando comparada com outros trabalhos.^{11,13,17} Embora originada de ambiente nunca exposto às aplicações de inseticidas, os mosquitos fundadores dessa colônia podem ter chegado ao campus já na condição de resistentes. Esses mosquitos foram obtidos, ao final de 1997, assim que detectados em armadilhas de larvas e após seis anos de monitoramento sem sua presença. Em meados dos anos 90, Macoris et al⁹ trataram como modificação da susceptibilidade ao temephos a resistência de *Ae. aegypti* e, mais recentemente, relataram a resistência em populações de Campinas e Santos, SP, com RRs (CL₅₀) de 2,7 e 6,3 (Macoris et al¹⁰). Andrade & Modolo¹ (1991) já haviam indicado resistência para essa espécie em Campinas, devido à sobrevivência de larvas para concentrações de 0,025 ppm i.a. e de 0,05 ppm i.a. de temephos, em coletas feitas em 1987. Para o carbamato propoxur, as RRs para Aae-Unicamp (cf. Tabela) são menores que as encontradas em populações do Caribe.^{6,17}

Os piretróides são mais usados como adulticidas, e, por isso, a cipermetrina tem sido pouco avaliada con-

tra as larvas de *Ae. aegypti*. Ainda assim, algumas CL₅₀ foram estabelecidas para esse piretróide, tais como 0,16 ppb (a 20°C) e 0,34 ppb (a 30°C) para larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*, usando-se grau técnico.⁴ Shajahan,¹⁵ por sua vez, estabeleceu uma LC₅₀ muito maior (78 ppb i.a.) usando larvas de quarto estágio desse mosquito, mas estranhamente não considerou a colônia resistente, talvez por ter usado o produto comercial (Ripcord 10 CE) que, além de cipermetrina, contém outros inseticidas na sua formulação. De fato, as formulações podem influenciar, e uma diminuição de 5X na toxicidade foi verificada em ensaios com cipermetrina grau-técnico, quando comparados com um concentrado emulsionável 40 CE (LC₅₀=0,045 ppb i.a. e 0,233 ppb i.a., respectivamente).⁷ No presente trabalho, a toxicidade obtida para a cipermetrina 25 CE (1,842 ppb i.a. [Tabela]) foi menor ainda do que essas mencionadas, sugerindo resistência.

A perda de potência de um produto comercial à base de cipermetrina, detectada usando-se larvas de *Ae. aegypti*, deve-se ao fato dos piretróides em geral serem moléculas pouco estáveis. Mesmo quando armazenadas em temperaturas inferiores a 30°C e protegidas da luz, como foi o caso do produto usado, podem perder potência.

Os resultados obtidos para os mosquitos das áreas sujeitas ou não a tratamentos com inseticidas, Campo Grande e Campinas, e as conclusões apontadas em outros trabalhos asseguram a necessidade de monitoramentos rotineiros. A determinação dos coeficientes angulares e das razões de resistência (RR) permite acompanhar as mudanças temporais de susceptibilidade aos produtos químicos e orienta o plane-

jamento do manejo da resistência e das estratégias de controle a ser aplicadas. Mudanças da CL_{50} não acompanhadas por mudanças na CL_{95} podem ser manejadas com a troca temporária do produto. Ou caso seja econômico, pela substituição definitiva do produto por outros que não apresentem risco de resistência cruzada. No caso específico do temephos, a atual opção da Fundação Nacional de Saúde pelo uso do Bti e inibidores de crescimento (methoprene, por exemplo) é indispensável, mas poderia ter sido feito um rodízio monitorado desde o início dos programas oficiais de combate à dengue, em meados da década de 80, no Rio de Janeiro. No caso de *Ae. aegypti*, ao contrário do uso de inseticidas, o que melhor permite baixas populações

são as práticas como educação para mudança de hábito e a participação das comunidades.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pelo uso das instalações; à pesquisadora Maria de Lourdes G Macoris (Sucen/Marília, SP) pelo subministro da linhagem Rockefeller; à Sucen/Campinas, SP, e ao médico veterinário Paulo de Tarso G Rocha, do Centro de Controle de Zoonoses (Hortolândia, SP), pelo fornecimento de inseticidas; ao dr. José Bento do Instituto de Biologia do Exército – (Rio de Janeiro), por facilitar o programa estatístico.

REFERÊNCIAS

1. Andrade CFS, Modolo M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control. *Rev Saúde Pública* 1991;25:184-7.
2. Andrade CFS, Souza CE, Santos LU. Dengue: avaliação do conhecimento popular e da voluntariedade em uma campanha no Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP. *Rev Fac Ciênc Méd Unicamp* 1995;5:20-2.
3. Brown AWA. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J Am Mosq Control Assoc* 1986;2:123-40.
4. Cutkomp LK, Subramanyam B. Toxicity of pyrethroids to *Aedes aegypti* larvae in relation to temperature. *J Am Mosq Control Assoc* 1986;3:347-9.
5. Finney DJ. *Probit analysis*. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1971.
6. Georghiou GP, Wirth M, Tran H, Saume F, Knudsen B. Potencial for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. *J Med Entomol* 1987;24:290-4.
7. Helson BV, Surgeoner GA. Efficacy of cypermethrin for the control of mosquito larvae and pupae, and impact on non-target organisms, including fish. *J Am Mosq Control Assoc* 1986;2:269-75.
8. LeOra Software. *Polo-PC, probit or logit analysis*. Berkeley (CA); 1987.
9. Macoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT. Modificação da susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos. *Rev Patol Trop* 1995;24:31-40.
10. Macoris MLG, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser C, Garbeloto VC, Cirino CB. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1999;33:521-2.
11. Mazzarri MB, Georghiou GP. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc* 1995;11:315-22.
12. Mebrahtu YB, Norem J, Taylor M. Inheritance of larval resistance to permethrin in *Aedes aegypti* and association with sex ratio distortion and life history variation. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56:456-65.
13. Rawlins SC, Wan JOH. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J Am Mosq Control Assoc* 1995;11:59-65.
14. Sames WJ, Bueno Jr-R, Hayes J, Olson JK. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Lower Rio Grande Valley of Texas and Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 1996;12:487-90.
15. Shajahan RM. Effects of insecticide selection pressure on the larvae of the *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bangladesh J Zool* 1996;24:97-102.
16. Silva IG, Camargo MF, Elias CN, Silva HHG, Irata Y, Antunes SM. Provas biológicas para verificar a susceptibilidade do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) ao Cythion. *Rev Patol Trop* 1997;26:31-5.
17. Wirth MC, Georghiou, GP. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J Am Mosq Control Assoc* 1999;15:315-20.
18. World Health Organization. *Vector resistance to pesticides*. Geneva; 1992. (WHO - Technical Report Series, 818).