

A RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS E SUA MEDIDA EM MOSQUITOS *

Mario B. Aragão

Depois de um ligeiro histórico sobre a evolução dos inseticidas, o autor chama a atenção para a mudança radical sofrida pela tática de combate a insetos, com o aparecimento aos inseticidas orgânicos persistentes. Antes o que se visava era o inseto ou o seu alimento, depois passou-se a envenenar todo o espaço frequentado por esses animais. Lembra que existem, em alguns lugares, ambientes naturalmente envenenados onde prosperam seres vivos, perfeitamente adaptados a essas condições. Isso permitia prever o aparecimento de resistência aos inseticidas na escala hoje observada.

Cita alguns gens e enzimas responsáveis pela resistência a alguns grupos de inseticidas e salienta a importância desses estudos para a descoberta de substâncias sinérgicas.

Descreve a técnica adotada pela Organização Mundial da Saúde para medir a susceptibilidade de mosquitos adultos.

*Menciona os processos de controle biológico por machos esterilizados, parasitas e predadores, e lembra que as duas campanhas contra insetos de importância sanitária que tiveram maior êxito no Brasil, a do *Aedes aegypti* e a do *Anopheles gambiae*, utilizaram táticas ecléticas, como é hoje preconizado pelos entomologistas de vanguarda, no que se convencionou chamar de luta integrada.*

INSETICIDAS

O uso de inseticidas é relativamente recente e a palavra inseticida data do começo do século XIX. Os primeiros a serem usados foram os produtos naturais, principalmente a nicotina e o piretro. Este último, sob a forma de flores de *Chrysanthemum* pulverizadas, era de emprego muito antigo na Pérsia e, dos produtos naturais, é o único ainda usado em certa escala, agora porém como desalojante de triatomíneos domiciliares. O piretro era a base do antigo "Flit" e parece que voltará a ser usado em larga escala porque,

adicionado de substâncias sinérgicas, torna-se ativo em doses muito baixas, com a vantagem de ser de rápida decomposição.

Outro inseticida natural que teve algum emprego foi a rotenona, extraída dos timbós.

Atualmente há um grande volume de pesquisas, não propriamente de inseticidas, mas de produtos naturais que sejam facilmente transformáveis em hormônios. Aqui mesmo no Brasil há um grupo pertencente à UFRJ empenhado nessa tarefa e no ano passado foi publicado um trabalho, feito por pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz e desse Centro de Produtos

* Palestra realizada no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, em 7/12 71. Recebido para publicação em 29-12-71.

Naturais, em que uma substância obtida a partir do geraniolgeraniol, extraído de frutos de urucum e de favoiro, mostrou possuir moderada atividade juvenilizante em um triatomíneo, um colóptero tenebrionídeo e no *Culex fatigans* (7).

Com a destilação do carvão, para a produção de coque metalúrgico e gás de iluminação, começaram a ser usados os fenóis e cresóis, que são subprodutos. A antiga cicolina, que era muito eficiente contra larvas de mosquitos, tinha por base esses derivados do carvão mineral. Posteriormente, esses fenóis e cresóis passaram a ser nitrados, dando compostos muito mais tóxicos, como o dinitro-orto-cresol.

Des produtos da destilação do petróleo foram usados diversos óleos leves e também, o óleo lubrificante depois de utilizado nos motores de explosão. Perto daqui, em Florianópolis, quando na década de 50 foi descoberto um foco de filariose, o inseticida usado contra as larvas de *Culex* foi o óleo lubrificante depois de usado.

Des produtos da indústria química inorgânica, sobressaíram, de longe, os arsenicais, principalmente o arseniato de chumbo na agricultura e o verde-paris (acetarsenito de cobre) na saúde pública. Até o aparecimento do DDT, o verde-paris foi o grande inseticida contra larvas de anofelinos. Foi o que resolveu na campanha de erradicação do *Anopheles gambiae* no nordeste do Brasil.

A descoberta das propriedades inseticidas do DDT e de outros tóxicos persistentes, mudou completamente o panorama do combate aos insetos. Como a aplicação desses inseticidas deixa depósitos que persistem ativos durante vários meses, o que se passou a visar não foi mais os insetos propriamente ditos e sim o seu ambiente. A preocupação de atingir o corpo do inseto ou o seu alimento foi substituída pela intenção de intoxicar todo o espaço freqüentado pelo animal; se este é uma casa, todas as paredes e tetos devem ficar recobertos por uma película de inseticida; se é um córrego, onde se criam simulídeos, toda a torrente líquida deve ser transformada numa solução de inseticida. No entanto, é na agricultura que essas circunstâncias tornam-se mais graves e sempre com tendência a piorar. Nas pulverizações manuais apenas a planta e um pouco do solo recebem inseticida, porém nas grandes

lavouras a questão econômica obriga ao emprego do avião, que cobre não só toda a cultura com o tóxico como também toda a vizinhança para onde o vento transporta as gotículas da solução. Esse envenenamento do ambiente vem se intensificando, ainda mais, com a aplicação da técnica de volume ultra reduzido, que chega a produzir uma pulverização invisível e, portanto, com velocidade de queda quase nula, o que permite que o vento transporte o inseticida a distâncias muito maiores. Na literatura é a essa aplicação de inseticidas com avião que se atribui a contaminação dos mares com o DDT, através do seu transporte pelas águas das chuvas e dos rios.

Curioso que os principais defeitos do DDT, o de não se decompor, o de ficar retido nas gorduras, o de ser veneno cumulativo etc., estão registrados na bibliografia pelo menos desde 1951 (8), porém só nos últimos anos passaram a causar preocupação.

RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS

A OMS define como uma população de insetos resistentes a um inseticida uma população de uma espécie originalmente susceptível, que perdeu essa susceptibilidade em um grau em que o inseticida não mais atua eficazmente contra ela.

O aparecimento de raças de insetos resistentes a inseticidas é um fenômeno conhecido pelo menos desde 1908 quando, no Estado de Washington, o *Aspidiotus perniciosus* (homóptero diaspidídeo conhecido por escama de São José) passou a sobreviver às aplicações de calda sulfocálcica, um produto que foi bastante usado contra insetos sugadores. Até 1940, quando na Califórnia costumavam cobrir as laranjeiras, cada uma com uma barraca e fumigar com ácido cianídrico, apareceram várias raças resistentes de coccídeos, uma das quais, *Saissetia olea*, se espalhou bastante. Com respeito aos arsenicais, estão citados na literatura uns poucos insetos, entre os quais o berne *Dermatobia hominis* aqui no Brasil e um carrapato; tanto esse carrapato quanto o berne se tornaram resistentes devido aos banhos carrapaticidas à base de arsênico. Não existe nenhum registro de resistência a produtos naturais (piretro, nicotina ou rotenona), isso naturalmente

devido à sua rápida decomposição, o que faz com que a pressão de seleção seja muito baixa.

Com o aparecimento do DDT e outros inseticidas orgânicos persistentes, não só o emprego de inseticidas aumentou enormemente — nos Estados Unidos, entre 1938 e 1961, foi multiplicada por 100 — como mudou-se a tática de luta. Como já foi mencionado, em vez de procurar atingir o inseto, o que se passou a visar foi tornar o ambiente impróprio à vida das espécies susceptíveis. Geier em 1966 (6), fazendo uma revisão sobre o controle de insetos pragas, diz que “isso é mais ou menos a mesma coisa do que passar um buldozer na natureza, o que freqüentemente cria maior número de problemas do que resolve”. Existem na natureza ambientes naturalmente envenenados, como são as nascentes de águas termais sulfurosas, que são habitados por seres vivos perfeitamente adaptados a essas condições. Sendo assim, era lógico esperar a seleção de raças resistentes a qualquer tóxico intensamente aplicado. Isso tem-se revelado um fenômeno geral, cuja velocidade depende, principalmente, da intensidade da pressão de seleção e da rapidez com que a espécie realiza o seu ciclo vital. Nas bactérias é muito mais rápido do que nos insetos. Quanto ao primeiro elemento, isto é, à pressão de seleção, aqui em Paranaguá há um exemplo muito elucidativo — enquanto o *Culex fatigans*, que vive dentro das casas, está completamente resistente ao DDT, os anofelinos que freqüentam os domicílios numa proporção que varia entre 10 e 20% do número de exemplares simultaneamente capturados dentro da mata, apresentam 100% de mortalidade com a dose aplicada nas casas. Deve-se ainda acrescentar que, entre os anofelinos, somente as fêmeas penetram nos domicílios, o que dificulta ainda mais a manifestação de um gen recessivo, como é o caso da resistência ao DDT. Aliás, até hoje, o único anofelino encontrado com resistência no Brasil, o foi em Belém, onde se aplicou BHC nos criadouros, colocando, assim, toda a população em contato com o tóxico. Nos outros países a maioria das raças de anofelinos resistentes resultou da aplicação de inseticidas por meio de aviões nas lavouras, o que faz com que os criadouros sejam atingidos. Isto se observa de maneira clara nas tabelas de anofelinos resistentes

publicadas pela OMS, onde estão registradas espécies resistentes a vários tóxicos nos países produtores de algodão, que é a lavoura que mais emprega inseticidas.

O primeiro inseto a aparecer com resistência ao DDT foi a mosca doméstica que, em 1946, dois anos depois do início do emprego do inseticida, já possuía raças resistentes na Itália e na Suécia. Atualmente essa resistência está tão generalizada e a tantos inseticidas, que a OMS — Comitê de Expertos de la OMS en Insecticidas (3) — que tanto defende o uso de inseticidas, principalmente o DDT, diz que: “a resistência da mosca doméstica está tão difundida e a tantos inseticidas, que não é mais possível lutar contra esses insetos apenas com meios químicos”.

Com respeito a esses insetos que vivem nas casas, verifica-se uma exceção justamente num dos grupos de insetos mais domiciliares, os triatomíneos. No caso do Brasil é fácil entender o fenômeno. É que, a não ser no Estado de São Paulo, nenhuma campanha teve continuidade, o que seria necessário em virtude desses insetos terem ciclo vital muito longo, no máximo duas gerações por ano. Em São Paulo, por motivos econômicos, somente aplicam inseticida uma vez em todas as casas; depois borrifam apenas os domicílios em que encontram triatomíneos.

Ainda com respeito à resistência em insetos de interesse sanitário, tem-se observado em várias áreas que, apesar dos anofelinos estarem resistentes, o DDT continua a impedir a transmissão da malária. É que os mosquitos evitam entrar nas casas dedetizadas. Uma das espécies que está nesse caso é o *Anopheles sacharovi*, justamente o primeiro em que foi encontrada resistência. O Dr. Renato Correia, do Serviço de São Paulo, possui dados inéditos, colhidos em Minas Gerais, que mostram que em casas construídas lado a lado, uma dedetizada e outra que nunca recebeu inseticida, os anofelinos penetram em números muito mais elevados nas últimas. Essa ação repelente parece, também, ser a principal responsável pelo efeito do DDT aqui no litoral sul do Brasil, pois é comum verem-se os anofelinos voarem do exterior para as pessoas, sugar e depois sair diretamente para fora da casa. Os mosquitos encontrados pousados, em geral, estão sobre móveis ou outros objetos não dedetizados.

A resistência resulta de um processo selectivo que aumenta a frequência de um gen ou de genes responsáveis pela resistência na população que está sujeita à ação do inseticida. Se bem que a seleção de populações resistentes tenha origem genética, os mecanismos que asseguram a sobrevivência dos indivíduos resistentes são, principalmente, bioquímicos. A desintoxicação enzimática parece ser o fator singular mais importante, intervindo também a redução da penetração e a diminuição da sensibilidade nervosa.

Os principais tipos de resistência conhecidos são:

- 1 — Ao DDT e compostos afins;
- 2 — Resistência ao dieldrin, derivados do ciclodieno e BHC;
- 3 — Resistência aos organofosforados;
- 4 — Resistência aos carbamatos.

A resistência ao DDT é recessiva, aos organofosforados é dominante e ao dieldrin é intermediária.

Na mosca doméstica foram descobertos três genes responsáveis pela resistência ao DDT. O principal *Deh*, situado no cromossoma II, rege o mecanismo de desintoxicação pelo enzima DDT-desclorohidrase; o gen *kdr* situado no cromossoma III intervéem reduzindo a penetração cuticular e diminuindo a sensibilidade nervosa; e um terceiro situado no cromossoma V provoca a oxidação do DDT no microsoma. A resistência da mosca doméstica aos organofosforados se deve a um gen *a* situado no cromossoma II, que determina a conversão da alisterase em uma esterase desintoxicante. Com respeito aos carbamatos a resistência é devida a um gen situado no cromossoma II que determina a sua oxidação no microsoma. O mecanismo da resistência aos ciclodienicos ainda não é conhecida. O estudo desses mecanismos bioquímicos é da máxima importância, pois permite a descoberta de compostos que sejam sinérgicos. Assim é que, na mosca doméstica e nos mosquitos, a DDT-dehidroclorinase pode ser inibida pela adição do clorofenotol, que é um acaricida clorado.

MEDIDA DA RESISTÊNCIA EM INSETOS DE INTERESSE SANITÁRIO

Recentemente a OMS — Comitê de Expertos de la OMS en Insecticidas, 1970 (3)

— publicou um informe em que estão reunidas 20 técnicas para a medida da susceptibilidade dos principais grupos de vetores de moléstias a diversos inseticidas, a maioria das quais já estava padronizada há muito tempo. Há uns doze anos essa organização vem fornecendo não só a aparelhagem para a execução das provas (os chamados "kits"), como os papéis impregnados com diversas concentrações de inseticidas, as soluções para provas em meio líquido e algumas formulações em pó. Essas provas se baseiam na exposição dos insetos a diversas concentrações de inseticidas, durante um espaço de tempo fixo ou então, na observação do efeito de uma mesma dose durante períodos de tempo variáveis. O primeiro método foi sempre preferido e ainda é utilizado para o DDT e o dieldrin, porém o grande número de organofosforados e de carbamatos aparecidos ultimamente obrigou a OMS a distribuir para cada composto dessas categorias apenas papéis com duas concentrações e adotar a técnica do tempo de exposição variável. A diferença entre os resultados obtidos é que um fornece a CL_{50} e a CL_{100} para uma hora de exposição, e o outro, o TL_{50} e o TL_{100} para a concentração utilizada. Essa sigla CL_{50} significa concentração letal mediana, isto é, a concentração que mata metade dos exemplares expostos num dado período de tempo. A CL_{100} é aquela que mata todos os insetos. O TL_{50} , tempo letal mediano, é o espaço de tempo necessário para matar metade dos exemplares com determinada dose e o TL_{100} se refere à mortalidade de todos os insetos.

A prova de susceptibilidade tem duas finalidades:

- 1 — Determinar a susceptibilidade de uma espécie aos diversos inseticidas que se poderá ter necessidade de utilizar. Essas provas devem ser feitas nas áreas onde a espécie tenha tido menos contato com inseticidas;
- 2 — Descobrir e, se possível, medir as variações da susceptibilidade durante as operações de profilaxia. A indicação mais importante dessas provas de acompanhamento é a de uma dose dupla da CL_{100} , determinada nas primeiras provas, não matar todos os insetos expostos.

Técnica para determinar o grau de susceptibilidade de mosquitos adultos aos inseticidas clorados

É interessante fazer uma prova preliminar com cada uma das concentrações que vem nos papéis fornecidos juntamente com o equipamento para a prova. Com base no resultado dessa prova se escolhem quatro concentrações que incluem uma que mate todos os mosquitos e outra que mate uma percentagem inferior a 50%, isso, naturalmente, para evitar extrapolações. Escolhidas essas concentrações fazem-se quatro provas com a mesma população de mosquitos. Se a densidade permitir, devem-se repetir essas provas em diversas épocas do ano. Nas provas subsequentes usa-se apenas uma concentração dupla da que provocou mortalidade de 100%, de preferência com cinco repetições e, no caso dos mosquitos estarem escassos, pelo menos duas. No caso de sobrevivência de mosquitos em mais de uma prova, deve-se repetir a prova básica com as mesmas quatro concentrações. Em todas as provas só se empregam fêmeas recém-alimentadas com sangue. É necessário o maior cuidado com a contaminação por inseticidas, tanto do local das provas, quanto da roupa dos operadores.

Os estojos fornecidos pela OMS trazem, além dos tubos para descanso e para exposição dos mosquitos, cinco caixas com papéis impregnados com solução de DDT em óleo mineral, nas concentrações de 0,25%, 0,50%, 1%, 2% e 4%, uma caixa com papéis impregnados com óleo mineral puro para servir de testemunha e sete caixas de papel impregnado com solução de dieldrin em concentrações que vão de 0,05% a 4%. Em anexo vêm instruções para a realização da prova, formulários para o registro dos resultados e três folhas de papel com escala probito-logarítmica para o traçado das curvas de regressão.

Antes de capturar os mosquitos prepara-se o material para a prova. Nos tubos de plástico com a marca correspondente a repouso dos mosquitos, coloca-se uma folha de papel branco comum revestindo as paredes internas e, nos outros tubos, os papéis das diversas concentrações. O estojo traz umas molas que fixam os papéis às paredes dos tubos evitando, assim, que os mosquitos se intrometam por baixo deles.

Procede-se então à captura dos mosquitos, finda a qual passa-se de preferência 20 mosquitos para cada um dos tubos de espera, que estão com papel comum. Deixa-se em repouso durante uma hora, depois da qual inspecionam-se os tubos retirando os mosquitos que apresentarem sinais de terem sofrido traumatismo. Completam-se então os 20 exemplares de cada tubo, podendo mesmo aumentar esse número para 25. Atarracha-se a cada tubo o outro que está com papel de prova e transferem-se os mosquitos retirando a gaveta separadora e soprando suavemente. Anota-se a hora exata e separa-se o tubo de descanso. Terminado o prazo de uma hora de exposição, repete-se a operação de transferência dos mosquitos, agora em sentido inverso. Coloca-se, então, um algodão umedecido com água na janela de tela de cada um dos tubos e guarda-se, durante 24 horas, num local abrigado da luz forte, do calor e do vento. Ao final dessas 24 horas faz-se a leitura, isto é, a contagem dos mosquitos vivos e mortos. Para facilitar a contagem dos sobreviventes pode-se anestesiá-los com clorofórmio ou éter. As provas onde a mortalidade das testemunhas ultrapassar de 20% não são aproveitadas. Si essa mortalidade variar entre 5 e 20%, faz-se a correção aplicando a fórmula de Abbott:

$$\frac{\text{Mortalidade \% dos expostos} - \text{mortalidade \% do testemunho}}{100 - \text{mortalidade \% do testemunho}} \times 100$$

Fazem-se todas as anotações no formulário, inclusive das temperaturas máxima e mínima e da umidade, registradas durante a prova. Pode-se, então, passar os dados de mortalidade para o papel de escala probito-logarítmica, traçar a linha de regressão e calcular, graficamente, a CL_{50} .

MÉTODOS PARA CONTORNAR A RESISTENCIA

É na procura de novos inseticidas que tem sido concentrada a maior soma de esforços para contornar o problema da resistência. A OMS possui em marcha um grande programa onde utiliza tanto laboratórios próprios quanto de outras instituições, mediante convênios. Acontece, entretanto, que apesar de ter obtido bons resultados com algumas substâncias, ainda

não recomendou nenhuma delas para ser usada na prática. Num laboratório onde trabalharam três colegas nossos foram feitos estudos com um carbamato conhecido pela sigla OMS - 33, que, apesar de ter dado ótimos resultados em áreas onde os mosquitos são completamente resistentes, até hoje não foi empregado em trabalhos rotineiros.

A questão dos sinergentes, também, até hoje não saiu do laboratório.

O uso de armadilhas luminosas está, atualmente, bastante difundido nos estabelecimentos comerciais do Rio de Janeiro, mas ainda não foi cogitado pelas autoridades sanitárias.

A maioria dos métodos de luta biológica contra vetores de doenças, também permanece em fase experimental. De uma maneira sumária eles podem ser divididos nos seguintes grupos:

- 1 — Liberação de machos esterilizados por radiações ou por quimioesterilizantes;
- 2 — Liberação de insetos portadores de gens deletérios;
- 3 — Controle por parasitas e predadores.

Com respeito ao último item, têm sido observadas altas infestações de insetos de

interesse sanitário por fungos do gênero *Coelomomyces*, microsporídeos dos gêneros *Nosema* e *Thelohania*, e contra moscas e mosquitos, têm sido usadas, na prática, algumas cepas do *Bacillus thuringiensis*. Em campanhas de escala nacional os peixes larvófagos foram usados contra diversos mosquitos. Essa prática foi completamente abandonada mas, no corrente ano, uma publicação da OMS, que contém diversos artigos defendendo o DDT (9), recomenda que se volte a usar os peixes dos gêneros *Gambusia* e *Lebistes*, contra larvas de mosquitos. Informa a mesma publicação que os americanos estão obtendo ótimos resultados com o *Gambusia*, no Hawai.

Incluimos esse adendo sobre processos biológicos, para lembrar que as campanhas contra vetores de doenças, que lograram maior êxito no Brasil, utilizaram na verdade a luta integrada, que é considerada, hoje em dia, como a meta ideal para o combate aos insetos. Na campanha que erradicou o *Aedes aegypti* do país foram empregados inseticidas, peixes e destruição dos criadouros. Também na erradicação do *Anopheles gambiae* do Nordeste, a base foi a aplicação de verde-paris nos criadouros e de "Flit" nas casas, porém com emprego de peixes e eliminação de criadouros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) BROWN, A. W. A. — Insect control by chemicals. John Willey & Sons, Inc., London, 1951.
- 2) BUSVINE, J. R. — Insects and Hygiene. Methuen & Co. Ltd., London, 1966.
- 3) COMITÉ DE EXPERTOS DE LA OMS EN INSECTICIDAS, Resistencia a los insecticidas y lucha contra los vectores. Org. mund. Salud Ser. Inf. técn., 443: 1-306, 1970.
- 4) COPE, O. B. — Interactions between pesticides and wildlife. Ann. Rev. Entomol., 16: 325-64, 1971.
- 5) FORATTINI, O. P. — Entomologia médica (1.º vol.). Faculdade de Higiene e Saúde pública, São Paulo, 1962.
- 6) GEIER, P. W. — Management of insect pests. Ann. Rev. Entomol., 11: 471-90, 1966.
- 7) MOUSSATCHÉ, H.; LENT, H.; KITAGAWA, M. & GILBERT, B. — Insect juvenile hormone-like activity in a diterpene. Rev. Brasil. Biol., 30: 55-60, 1970.
- 8) O'BRIEN, R. D. — Mode of action of insecticides. Ann. Rev. Entomol., 11: 369-402, 1966.
- 9) ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD — El problema de la resistencia a los insecticidas y su solución. Cronica de la OMS, 25: 221-25, 1971.
- 10) ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD — Metodos alternados de lucha antivectorial. Cronica de la OMS, 25: 235-41, 1971.
- 11) WINTERINGHAM, F. P. W. & LEWIS, S. E. — On the mode of action of insecticides. Ann. Rev. Entomol., 4: 303-18, 1959.