

**Carta Controle para Avaliação
de Estabilidade de *Bacillus
thuringiensis israelensis*
Utilizado nos Ensaio Contra
*Aedes aegypti***

Fotos: Lilian Botelho Praça



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa 297 e Desenvolvimento

**Carta Controle para Avaliação de
Estabilidade de *Bacillus thuringiensis*
israelensis Utilizado nos Ensaios
Contra *Aedes aegypti***

Lílian Botelho Praça
Fernanda Justen
Rose Gomes Monnerat

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *João Batista Teixeira*

Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*

Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*

Lucília Helena Marcelino

Lígia Sardinha Fortes

Márcio Martinelli Sanches

Samuel Rezende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Daniela Aguiar de Souza Kols

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do Nascimento Dias

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Fotos da capa: Lílian Botelho Praça

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Praça, Lílian Botelho

Carta controle para avaliação de estabilidade de *Bacillus thuringiensis israelensis* utilizado nos ensaios contra *Aedes aegypti*. / Lílian Botelho Praça, Fernanda Justen, Rose Gomes Monnerat. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013.

15 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 297).

1. Controle biológico. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. *Aedes aegypti*. I. Lílian Botelho Praça. II. Fernanda Justen. III. Rose Gomes Monnerat. IV. Série.

632.96 – CDD 21

© Embrapa 2013

Sumário

Resumo	05
Abstract	06
Introdução	07
Material e métodos	08
Resultados e discussão	09
Conclusões	13
Referências	14

Carta Controle para Avaliação de Estabilidade de *Bacillus thuringiensis israelensis* Utilizado nos Ensaio Contra *Aedes aegypti*

*Lilian Botelho Praça*¹
*Fernanda Justen*²
*Rose Gomes Monnerat*³

Resumo

Este trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia de avaliação que garanta a qualidade do padrão *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* Bti – IPS 82, utilizado nos ensaios de análise de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* contra mosquitos. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, Brasil) e seus resultados analisados por meio da construção de uma carta controle. Os resultados mostraram que a estirpe padrão Bti manteve-se estável pelo período de dois anos em que foi avaliada.

Termos para indexação: controle de qualidade, bactéria, controle estatístico de processo.

¹ Engenheira Agrônoma, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Graduanda em Biologia, Universidade de Brasília – UnB.

³ Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Control Chart for Evaluating the Stability of *Bacillus thuringiensis israelensis* Used in Assays Against *Aedes aegypti*

Abstract

This study aimed to establish an evaluation methodology that ensures conformity of *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* Bti - IPS 82 standard, used in bioassays of *B. thuringiensis* biopesticides against mosquitoes. Assays were performed in the Laboratory of Entomopathogenic Bacteria (LBE) of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology (Brasilia, Brazil), and the results were analyzed by constructing a control chart. The results showed that the tested Bti standard strain remained stable along two years period of evaluation.

Index terms: quality control, bacteria, statistical process control.

Introdução

Em 2005, iniciou-se um programa de implantação de sistema de qualidade na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com o objetivo de adequar seus laboratórios prestadores de serviço à norma ABNT NBR ISO/IEC 17025/2005, cujo órgão brasileiro acreditador é o Inmetro.

O Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) foi priorizado por prestar serviços de determinação da toxicidade de bioinseticidas utilizados para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, vetor da dengue. Assim, este laboratório está em fase de implantação de um sistema de qualidade bem documentado e eficaz para vir a se tornar uma dos primeiros laboratórios da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a ter seus ensaios acreditados pelo Inmetro.

Nesse contexto, a realização de diversos testes é importante para adequação do laboratório a alguns requisitos da Norma, entre eles a avaliação da estabilidade e qualidade do padrão *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* - IPS82 utilizado como material de referência (MR) nos bioensaios de avaliação de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* para o controle de *A. aegypti*. Para garantia da qualidade de MR, existem várias ferramentas e uma delas é o Controle Estatístico de Processo (CEP) por meio da utilização das cartas de controle de média. CEP é uma técnica estatística importante para acompanhar o processo de produção ou a prestação de serviços, propiciando bons níveis de qualidade e menor variabilidade nos resultados, diminuindo a perda de ensaios com isso o retrabalho, os custos com os serviços e possíveis atrasos na entrega de resultados.

A carta controle é uma ferramenta do CEP, fácil de preparar, extremamente útil na localização de problemas e ideal para avaliar a qualidade do processo ou do produto (CEP, 2011). O gráfico de controle é formado a partir de três linhas paralelas: a central que representa o valor médio ou limite médio – LM, que define o valor médio dos dados; o Limite Superior de Controle – LSC, que define o valor máximo da variável de um processo que se encontra sob controle poderia ter; e o Limite Inferior de Controle – LIC, que define o valor mínimo da variável de um processo. Os limites baseiam-se em controle estatístico e são calculados por fórmulas a partir de dados coletados no processo (SAMOHYL, 2011). Em outras palavras, é uma ferramenta estatística que desperta para a presença de causas especiais, como, por exemplo: problemas nas amostras e pessoal pouco treinado, entre outras.

Portanto, neste trabalho será apresentado um tipo de carta controle que pode ser utilizada em processos considerados homogêneos, em que não são necessários subgrupos com mais de uma amostra (CEP, 2011). Estes subgrupos serão representados pelos resultados de CL₅₀ (concentração necessária para matar 50% da população) apresentadas pelas análises da amostra padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS-82 ao longo de dois anos para avaliar sua estabilidade. Este trabalho visa atender aos requisitos da norma, como também assegurar aos nossos clientes que a Embrapa presta serviço com competência técnica e excelente qualidade em seus resultados, buscando melhoria contínua.

Material e métodos

A metodologia consistiu em realizar bioensaios com o padrão e avaliar os resultados de CL₅₀ ao longo de dois anos. O período entre as coletas dos dados foi variável, dependendo da necessidade do laboratório em realizar bioensaios.

Os insetos utilizados, larvas de *A. aegypti* foram mantidos na Plataforma de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em laboratório regulado a temperatura de 25°C ± 2, umidade relativa de 70% ± 10 e fotoperíodo de 14/10 horas. A alimentação das larvas foi feita com biscoitos de ração de gato (Schmidt et al., 2001).

O método utilizado para avaliação da amostra padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) IPS-82 foi o descrito no Procedimento de Bioensaios para o cálculo da CL₅₀ contra *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* elaborado pelo Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (código: 038.11.02.03.3.012): o bioensaio consistiu em colocar 25 larvas de 2º instar nos copos plásticos com 100 mL de água destilada. Em seguida, pesou-se 0,05 g da amostra padrão de Bti e transferiu para tubo de ensaio A (solução A) contendo 10 mL de água destilada com concentração final de 5 mg/mL. Depois da solução homogeneizada, foram transferidos 100 µL da solução A para tubo B, contendo 9,9 mL de água, determinando-se desta forma, após agitação, a solução B com concentração de 0,05 mg/mL. Um mL da solução B foi colocado no tubo C, contendo 9,0 mL de água destilada e, após agitação, obteve-se a solução C a uma concentração de 0,005 mg/mL. Após a homogeneização, utilizou-se a solução C de acordo com as alíquotas da Tabela 1 para a realização dos bioensaios.

Tabela 1. Alíquotas utilizadas na realização de bioensaios a partir de amostras sólidas de maior potência.*

Dose	Alíquota (µL) Solução C (0,005 mg/mL)	Concentração final no recipiente (ng/mL)
1	200	10,0
2	160	8,0
3	120	6,0
4	80	4,0
5	40	2,0
6	20	1,0
7	10	0,5

*Maior potência: quando o produto utilizado nos bioensaios é muito eficiente no controle das larvas de mosquitos e concentrações mais baixas da bactéria são necessárias para matar 50% da população testada.

As alíquotas foram aplicadas nos copos previamente identificados, contendo 25 larvas. Foram realizadas três repetições para cada uma das alíquotas. Após 24 horas, a leitura dos bioensaios foi realizada e calculada a diferença entre larvas vivas e mortas. O número de larvas mortas foi registrado em caderno-ata por alíquota. Os dados de mortalidade e suas respectivas concentrações foram analisados por meio do programa Polo Plus Probit e Logit analyses (ROBERTSON et al., 2002) e obtiveram-se os resultados de CL₅₀ da amostra padrão para *A. aegypti*.

Depois de realizados os bioensaios e analisados os resultados, formatou-se uma tabela a partir dos resultados de CL₅₀. Destes dados, 25 foram utilizados para a construção da carta controle para médias, para avaliar a qualidade da amostra padrão ao longo de dois anos. De acordo com os dados, foi realizado o cálculo da média total (\bar{X}) (soma de todas as médias/soma dos valores de CL₅₀ de cada um dos subgrupos ou amostras) e da Amplitude total (\bar{R}) (soma de todas as amplitudes de cada um dos subgrupos ou amostras), depois a média das médias ($\bar{\bar{X}}$) e amplitude média ($\bar{\bar{R}}$). A amplitude foi calculada entre os subgrupos em função do valor do subgrupo (2) menos o valor do subgrupo (1) igual a um valor absoluto (sem o sinal negativo ou positivo) e assim por diante a amplitude foi calculada para todos os valores, dois a dois.

Com estes dados, foram determinados o LSC (Limite Superior de Controle) e o LIC (Limite Inferior de Controle), utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$LSC = \bar{\bar{X}} + A2 * \bar{\bar{R}}$$

$$LIC = \bar{\bar{X}} - A2 * \bar{\bar{R}}$$

onde,

$\bar{\bar{X}}$ – Representa a soma das CL₅₀ divididas pelo número de subgrupos ou amostras.

A2 – Representa uma constante utilizada para o cálculo do LSC e LIC, de acordo com o tamanho da amostra, que para 25 amostras é 2,66.

$\bar{\bar{R}}$ – Amplitude média dos valores: calcula-se a partir da soma de todas as amplitudes de cada subgrupo divididas pelo número de subgrupos ou amostras.

Depois de realizados todos os cálculos, o gráfico foi montado com a utilização dos valores da média do LSC e LIC. Depois de montado o gráfico, todos os dados de CL₅₀ coletados entre 2008 e 2010 foram lançados e avaliados. Em função dos limites de controle, foi estabelecido o intervalo de aceitabilidade para os resultados de CL₅₀ com a amostra padrão Bti IPS82. Este tipo de carta foi utilizado em função dos dados de CL₅₀ terem resultado em dados homogêneos para a amostra padrão, em que foram utilizados subgrupos com uma amostra cada um.

Resultados e discussão

Os resultados de CL₅₀ apresentados na Tabela 2 representam a avaliação da amostra padrão contra *A. aegypti* ao longo dos anos de 2008 a 2010.

Tabela 2. Resultado dos bioensaios contra *A. aegypti* com a utilização da amostra padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Bti IPS-82.

Nº de bioensaios realizados	Datas da realização dos bioensaios	CL ₅₀ da amostra padrão (ng/mL)
1	22/01/2008	2,11
2	24/01/2008	1,54
3	31/01/2008	1,79
4	11/02/2008	1,63
5	18/02/2008	1,63
6	20/02/2008	2,00
7	27/02/2008	1,57
8	28/02/2008	2,00
9	05/03/2008	2,00
10	19/03/2008	1,85
11	25/03/2008	2,00
12	26/03/2008	1,55
13	07/04/2008	1,63
14	24/04/2008	1,42
15	27/05/2008	1,55
16	03/06/2008	1,95
17	09/06/2008	1,84
18	12/06/2008	1,82
19	16/06/2008	1,82
20	23/06/2008	1,47
21	26/06/2008	1,60
22	03/07/2008	1,97
23	31/07/2008	1,61
24	28/08/2008	1,86
25	01/09/2008	2,00
26	08/09/2008	2,00
27	06/11/2008	1,49
28	27/01/2009	4,30
29	28/01/2009	1,14
30	29/01/2009	1,07
31	04/02/2009	3,74
32	05/02/2009	0,34
33	02/03/2009	4,003
34	28/05/2009	1,486
35	16/06/2009	1,5
36	06/07/2009	3,015
37	30/09/2009	1,5
38	19/10/2009	2,495
39	04/11/2009	2,00
40	12/11/2009	2,079
41	23/11/2009	1,086
42	03/12/2009	0,697
43	16/12/2009	1,713
44	21/01/2010	2,051
45	27/01/2010	2,051
46	29/01/2010	4,284
47	02/02/2010	6,003
48	08/02/2010	3,670
49	23/02/2010	2,906

Destes 49 dados de CL₅₀ (ng/mL) coletados (Tabela 2), 25 (Tabela 3) foram selecionados aleatoriamente para a construção da carta controle (Figura 1). Depois de realizados todos os cálculos e construída a carta controle, todos os dados coletados até 2010 foram lançados no gráfico para análise.

Tabela 3. Tabela de média e amplitude de CL₅₀ da amostra padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Bti IPS-82.

Número do subgrupo/amostra	CL ₅₀ da amostra padrão (ng/mL)	Média	Amplitude R
1	2,11	2,11	
2	1,54	1,54	0,57
4	1,63	1,63	0,09
6	2	2	0,37
7	1,57	1,57	0,43
8	2	2	0,43
9	2	2	0
10	1,85	1,85	0,15
11	2	2	0,15
16	1,95	1,95	0,05
18	1,82	1,82	0,13
23	1,61	1,61	0,21
25	2	2	0,39
26	2	2	0
31	3,74	3,74	1,74
32	0,34	0,34	3,34
34	1,486	1,486	1,146
35	1,5	1,5	0,014
36	3,015	3,015	1,515
40	2,079	2,079	0,936
44	2,051	2,051	0,028
46	4,284	4,284	2,233
47	6,004	6,004	1,72
48	3,67	3,67	2,334
49	2,906	2,906	0,764
	Total	57,155	18,74
	Média	2,29	0,78

Logo abaixo, estão apresentados os cálculos:

$$LSC = \bar{X} + A2 * \bar{R} = 2,29 + 2,66 * 0,78 = 4,37$$

$$LIC = \bar{X} - A2 * \bar{R} = 2,29 - 2,66 * 0,78 = 0,22$$

De acordo com a carta controle, a faixa de aceitabilidade dos resultados das CL₅₀ ficou entre uma faixa de 0,22 e 4,37 ng/mL (Figura 1), considerados o Limite Superior de Controle (LSC) e o Limite Inferior de Controle (LIC), respectivamente. Portanto, conclui-se que os resultados de CL₅₀ devem estar dentro da faixa dos limites de controle, de acordo com Slack et al. (1996). Caso isso não ocorra, neste momento deve-se analisar os dados; se necessário, deve-se parar, adequar e reiniciar o processo.

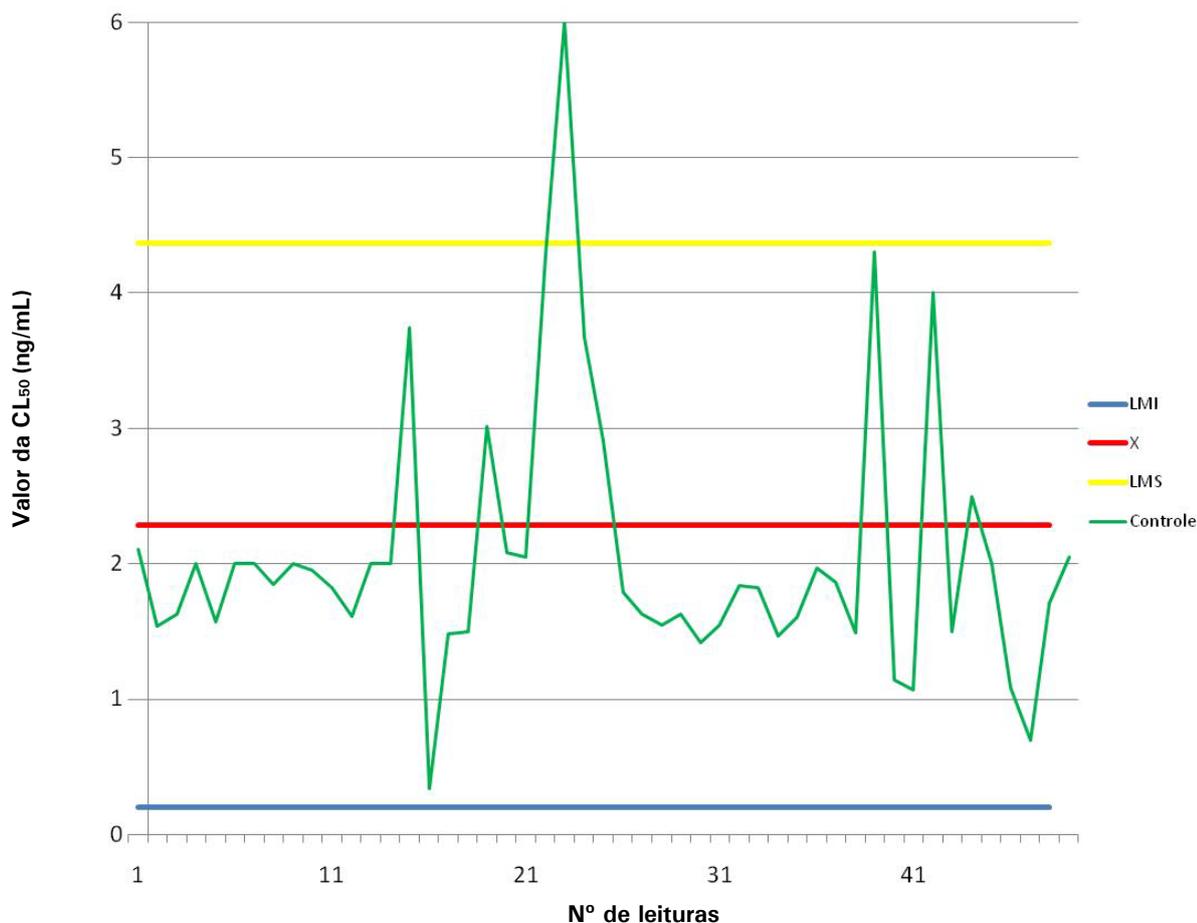


Figura 1. Carta controle do padrão *B. thuringiensis israelensis* IPS-82 em ng/mL com 49 leituras (número da amostra x valor da CL₅₀).

Portanto, neste determinado processo de análise da estabilidade do padrão, verificou-se que apenas um dos resultados de CL₅₀ ficou fora dos limites de controle do processo, com uma falha de apenas 2%, o que pode ser solucionado conforme mencionado acima. Foram avaliados os motivos que levaram à ocorrência desse ponto fora do limite de controle. No caso em estudo, pode ter sido a diferença de toxicidade da bactéria sobre as populações testadas com a possibilidade de existência de populações de *A. aegypti* menos suscetíveis ao Bti, ou pode ser em função do prazo de validade da solução mãe.

Em função da possibilidade de existência de causas especiais – como problemas com a amostra ou treinamento inadequado – que levaram à ocorrência de um ponto fora do limite de controle, decidiu-se por realizar um novo treinamento da equipe a partir dos resultados verificados na carta controle, mostrando os resultados e discutindo a importância de estabelecer uma data de validade para a solução mãe. Em casos de dados fora dos limites de controle, uma nova solução mãe deverá ser elaborada a partir da amostra padrão liofilizada, e novos ensaios deverão ser realizados a partir dessa amostra. Entretanto, o valor de 2% dos pontos fora dos limites de controle é considerado extremamente baixo, ou seja, do total de 49 amostras, apenas uma estava fora dos limites de controle.

Para evitar a variabilidade nos resultados, deve-se determinar um tempo de guarda para a solução mãe, que deverá ser avaliada ao longo do tempo a fim de tornar o processo

estável e previsível. Acredita-se que o prazo de validade deverá ser entre três e seis meses, podendo ser reavaliado sempre que necessário.

Portanto, conclui-se que o padrão apresentou ótimos resultados e alta estabilidade. Considera-se, portanto, desnecessária a aquisição de uma nova amostra padrão, apenas deve-se preparar uma nova solução mãe, todas as vezes que os bioensaios apresentarem resultados diferentes do intervalo calculado em função da carta controle (Figura 1), devendo-se apenas monitorar o prazo de validade da solução mãe. Além disso, no momento em que não se assegurar mais a qualidade dos resultados, a equipe deve adquirir uma nova amostra padrão diretamente do fabricante.

Conclusões

O CEP é uma boa ferramenta estatística que auxilia no controle de qualidade dos resultados do padrão Bti, diminuindo a variabilidade dos resultados e prevendo a ocorrência de resultados fora do limite de controle, além de demonstrar que a amostra padrão apresenta estabilidade nos resultados.

Referências

CONTROLE ESTATÍSTICO DE PROCESSO (CEP). Disponível em:
<<http://www.datalyzer.com.br>>. Acesso em: 11 ago. 2011.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Procedimento de manutenção da colônia de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus***. (038.11.02.00.3.002). Revisão 000. Brasília, 2007. (Documento não publicado)

ROBERTSON, J. R.; PREISLER, H. K.; RUSSELL, R. M. **Polo Plus**. Probit and logit analysis user's guide. Petaluna, CA: LeOra Software, 2002.

SAMOHYL, W. R. **Controle estatístico de processo e ferramentas da qualidade** – capítulo 9. Disponível em: <http://www.intecq.com.br/files/artigos/conceitos_basicos_de_controle_estatistico_de_processos.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2011.

SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 20p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

SLACK, N.; CHAMBERS, S.; HARLAND, C.; HARRISON, A.; JOHNSTON, R. **Administração da Produção**. São Paulo-SP: Atlas, 1996. p 651-652.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***