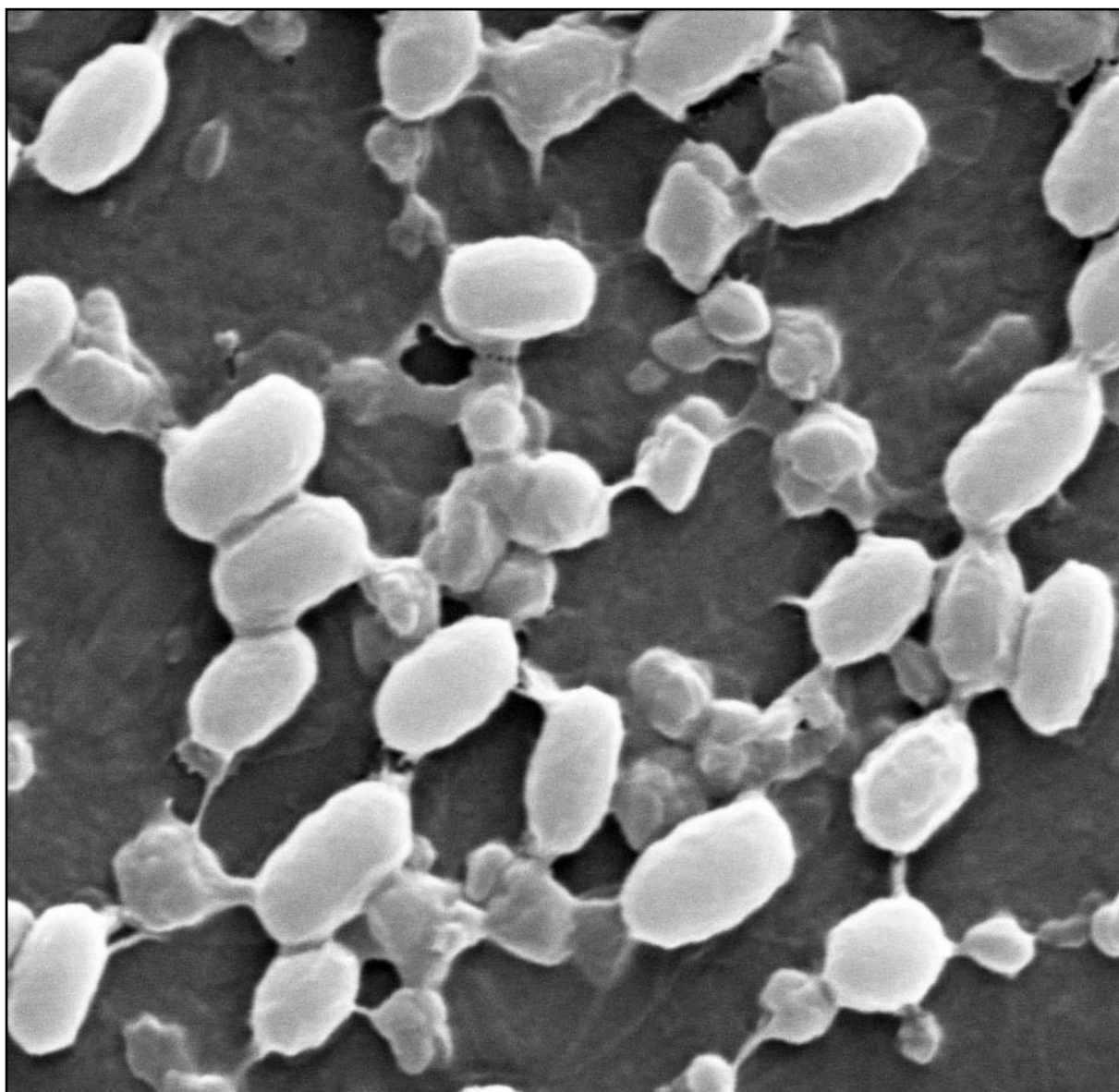


**Comparação Intralaboratorial  
de dois Métodos para  
Determinação de CL<sub>50</sub> de  
*Bacillus thuringiensis* Tóxicas  
a Larvas de *Aedes aegypti***

Foto: Ana Cristina M. Gomes e Lilian Botelho Praça



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

## ***Boletim de Pesquisa 305 e Desenvolvimento***

**Comparação Intralaboratorial de  
dois Métodos para Determinação de  
CL<sub>50</sub> de *Bacillus thuringiensis*  
Tóxicas a Larvas de *Aedes aegypti***

Lílian Botelho Praça  
Fernanda Justen  
Anita Burgamn  
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](mailto: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

Foto da capa: Ana Cristina M. M. Gomes e 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**

---

Comparação intralaboratorial de dois métodos para determinação de CL<sub>50</sub> de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a larvas de *Aedes aegypti*. Lílian Botelho Praça [et al.] – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013.  
14 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 305).

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

632.96 – CDD 21

---

© Embrapa 2013

# Sumário

<b>Resumo</b>	05
<b>Abstract</b>	06
<b>Introdução</b>	07
<b>Material e métodos</b>	07
<b>Material testado</b>	07
<b>Insetos utilizados</b>	07
<b>Determinação da CL<sub>50</sub></b>	08
<b>Resultados e discussão</b>	10
<b>Conclusões</b>	11
<b>Referências</b>	13

# Comparação Intralaboratorial de dois Métodos de Determinação de CL<sub>50</sub> de *Bacillus thuringiensis* Tóxicas a Larvas de *Aedes aegypti*

*Lilian Botelho Praça*<sup>1</sup>  
*Fernanda Justen*<sup>2</sup>  
*Anita Burgamn*<sup>3</sup>  
*Rose Gomes Monnerat*<sup>4</sup>

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo comparar dois métodos (procedimentos do laboratório e da Organização Mundial da Saúde – OMS) utilizados na realização de bioensaios para calcular a CL<sub>50</sub> de *B. thuringiensis* necessária para matar larvas de *Aedes aegypti*, buscando atender ao requisito de garantia da qualidade da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025/2005. Os resultados mostraram que as duas metodologias são eficientes ao uso pretendido, como uma diferença na concentração de *B. thuringiensis* necessária para matar larvas de *A. aegypti*. O procedimento do laboratório demonstrou que larvas de segundo instar são mais suscetíveis ao *B. thuringiensis* do que larvas de quarto instar, um fato importante no controle precoce de insetos vetores de doenças, já que evita a emergência do adulto e a transmissão da doença, como também possibilita maior economia na utilização de bioinseticidas.

**Termos para indexação:** bactéria, controle de qualidade, controle biológico.

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Graduada em Biologia, Universidade de Brasília – UnB.

<sup>3</sup> Graduada, Centro Universitário de Brasília – UNICEUB.

<sup>4</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

# **Intralaboratory Comparison of two Methods for Determination of LC<sub>50</sub> of *Bacillus thuringiensis* Toxic to *Aedes aegypti* Larvae**

---

## **Abstract**

The aim of this study was to compare two methods (Lab procedure vs WHO) used for performing bioassays to calculate the LC<sub>50</sub> of *B. thuringiensis* on *Aedes aegypti* larvae. The quality assurance is a requirement of the Standard ISO/IEC 17025/2005 to demonstrate the quality of results. The two methodologies showed efficient and consistent results although the concentration of *B. thuringiensis* required to kill larvae of *A. aegypti*. The Lab procedure methodology showed that second instar larvae are more susceptible to *B. thuringiensis* than the ones of the fourth. The early control of disease vectors is an important approach, thereby avoiding adult emergence and transmission of diseases, besides promoting greater economy in the use of bioinsecticides.

**Index terms:** bacteria, quality control, biological control.

## Introdução

Em 2005, iniciou-se um programa de implantação de sistema de qualidade na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com o objetivo adequar seus laboratórios prestadores de serviços 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 controle de qualidade de bioinseticidas utilizados para o controle do mosquito vetor da dengue e da filariose. Assim, este laboratório implementou um sistema de qualidade bem documentado e eficaz para se tornar um dos primeiros laboratórios da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a ter seus ensaios acreditados.

Nesse contexto, diversos testes são realizados, entre eles a determinação da CL<sub>50</sub> (concentração necessária para matar 50% da população testada) de biolarvicidas sobre larvas de *Aedes aegypti* e/ou *Culex quinquefasciatus*.

Durante o processo de implantação do sistema de qualidade, o laboratório passou por auditorias externas e durante essas auditorias foram feitas algumas recomendações. A equipe do laboratório foi orientada sobre a necessidade de validar a metodologia do bioensaio, uma vez que o laboratório segue a metodologia da Organização Mundial da Saúde – OMS, mas com algumas modificações.

A partir dessa recomendação, o laboratório iniciou uma discussão sobre como realizar a validação do método e decidiu por realizar inicialmente uma comparação intralaboratorial dos dois métodos com o objetivo de demonstrar a eficiência e a estabilidade do método utilizado pelo laboratório.

## Material e métodos

### Produto testado

Para a realização dos ensaios, foi utilizada a amostra padrão *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* Bti IPS-82 originária do Instituto Pasteur, em Montpellier, na França. Esta é a bactéria padrão utilizada em ensaios para cálculos de CL<sub>50</sub> (concentração necessária para matar 50% da população testada) de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a larvas de *A. aegypti*.

A metodologia consistiu em realizar bioensaios com uma mesma amostra de *B. thuringiensis* ou *B. sphaericus* e comparar os resultados de CL<sub>50</sub> obtidos por meio dos dois métodos.

### Insetos utilizados

Larvas de *A. aegypti* ou *C. quinquefasciatus* criadas 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 realizada com biscoitos de ração de gato (SCHMIDT et al., 2001). Nesse ensaio para validação da metodologia, foram utilizadas larvas de *A. aegypti*.

## Determinação da CL<sub>50</sub>

A determinação da CL<sub>50</sub> foi realizada por meio dos bioensaios, utilizando-se o procedimento de bioensaios para o cálculo da CL<sub>50</sub> de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* contra *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (código: 038.11.02.03.3.012). Esse procedimento consiste em utilizar 25 larvas de 2º instar de *A. aegypti* para a realização dos bioensaios, colocando-as em copos plásticos com 100 mL de água destilada. Para o preparo da amostra a ser testada, pesou-se 0,05 g de alguma amostra *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Bti IPS-82, que foi transferida para um tubo de ensaio (tubo 1- solução A) contendo 10 mL de água destilada com concentração final de 5 mg/mL. Depois de homogeneizada a solução, transferiu-se 100 µL da Solução A para tubo B, contendo 9,9 mL de água, com concentração de 0,05 mg/mL, que foi agitada vigorosamente. Em seguida, transferiu-se um 1 mL da solução B para tubo C, contendo 9,0 mL de água, com concentração final de 0,005 mg/mL. Após a homogeneização, utilizou-se a Solução C para a realização dos bioensaios. Os copos foram identificados com as alíquotas correspondentes às concentrações das Tabelas 1 ou 2. Três copos foram utilizados para cada uma das alíquotas e para o controle. Os valores das alíquotas utilizadas a partir da Solução C poderiam variar de acordo com a potência do produto a ser testado. Por exemplo, caso não ocorresse mortalidade ou alta mortalidade nas dosagens utilizadas, estas deveriam ser diluídas ou concentradas. A partir disso, deve-se realizar um bioensaio teste para a determinação das alíquotas a serem utilizadas no bioensaio, conforme as tabelas apresentadas a seguir.

**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 pequenas concentrações da bactéria são necessárias para matar 50% da população testada.



**Tabela 2.** Alíquotas utilizadas na realização de bioensaios a partir de amostras sólidas de menor potência.\*

Doses	Alíquotas (µL)	Solução C (0,005 mg/mL)	Concentração final no recipiente (ng/mL)
1		1000	50
2		800	40
3		400	20
4		200	10
5		100	5

\*Menor potência: quando o produto não é tão eficiente quanto o padrão *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* e concentrações maiores da bactéria são necessárias para matar 50% da população testada.

A leitura e o registro da mortalidade das larvas foram feitos após 24 horas, pois o inseto utilizado foi *A. aegypti* e a bactéria foi uma amostra de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Quando são utilizadas larvas de *C. quinquefasciatus* com produtos ou estirpes de *B. thuringiensis* e com produtos ou estirpes de *B. sphaericus* para qualquer uma das espécies, a leitura do bioensaio deve ser realizada após 24 e 48 horas. Os bioensaios foram repetidos três vezes em três períodos diferentes. Os dados de mortalidade foram anotados em caderno-ata por alíquotas. As três repetições dos dados de mortalidade de cada uma das alíquotas foram somadas e estes dados e suas respectivas concentrações foram analisadas por meio dos programas *Polo Plus Probit* e *Logit analyses* (ROBERTSON et al., 2002).

O Método da OMS (1999) consistiu em utilizar 25 larvas de 4º instar de *A. aegypti* para a realização dos bioensaios, colocando-as em copos plásticos com 150 mL de água destilada. Para o preparo da amostra a ser testada, foram pesados 50 mg de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Bti IPS-82, que foram transferidos para um tubo de ensaio (tubo 1- solução 1) contendo 10 mL de água destilada. A amostra foi homogeneizada por 10 minutos a 700 rpm e depois do uso fechada e estocada a 4º C por alguns meses. A solução mãe (solução 1) ficou em uma concentração final de 5 mg/mL. Depois de homogeneizada, 0,1 mL da solução mãe foi transferido para tubo 2, contendo 9,9 mL de água destilada, que em seguida foi agitada em *vortex* por poucos segundos, obtendo-se dessa forma a solução estoque a uma concentração de 0,05 mg/mL. Após a homogeneização, a solução estoque foi utilizada para realização dos bioensaios. Os copos foram identificados com as alíquotas correspondentes às concentrações apresentadas na Tabela 3. Quatro copos foram utilizados para cada uma das alíquotas e para o controle.

**Tabela 3.** Alíquotas utilizadas na realização de bioensaios segundo metodologia da OMS.

Doses	Alíquotas (µL)	Solução Estoque (0,005 mg/mL)	Concentração final no recipiente (ng/mL)
1		120	40
2		90	30
3		60	20
4		30	10
5		24	8
6		15	5

Caso as concentrações apresentadas nas tabelas não sejam suficientes para causar a mortalidade dos insetos, bioensaios testes deverão ser realizados para definir o número de concentrações que mostrem um resultado de mortalidade entre 10 e 90%. Para os bioensaios testes, podem ser utilizados apenas dois copos plásticos por concentração.

A leitura e o registro da mortalidade das larvas podem ser realizados após 24 horas para *A. aegypti*, após 24 e 48 horas para *C. quinquefasciatus* com produtos ou estirpes de *B. thuringiensis* e após 24 e 48 horas para produtos ou estirpes de *L. sphaericus*. Neste caso, foram utilizadas larvas de *A. aegypti* e amostras de *B. thuringiensis*, portanto as leituras dos bioensaios foram feitas após 24 horas. Os bioensaios foram repetidos três vezes em três períodos diferentes. Estes dados de mortalidade foram anotados em caderno-ata por alíquotas. As quatro repetições de cada uma das alíquotas foram somadas e os dados analisados juntamente com suas respectivas concentrações nos programas *Polo Plus Probit* e *Logit analyses* (ROBERTSON et al., 2002).

Para a comparação das duas metodologias, as três repetições de cada um dos ensaios foram avaliadas por análise de variância e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls, com o auxílio do programa estatístico *Sigma Stat* (KUO et al., 1992).

## Resultados e discussão

Os resultados obtidos após a realização dos bioensaios, em que os dois métodos foram utilizados em triplicata, mostraram que os valores de CL<sub>50</sub> foram estáveis, o que pode ser observado pelo intervalo de confiança de 95% apresentado pelas repetições em ambos os métodos testados (Tabela 4 e 5 – 3ª coluna), que mostram a sobreposição dos dados e a homogeneidade dos resultados das três repetições dentro da mesma metodologia. Além disso, os resultados das CL<sub>50</sub> encontradas demonstram a eficiência da amostra Bti testada nos dois métodos utilizados, o que já tinha sido observado por Praça et al. (2004), quando utilizaram o Bti como padrão em seus ensaios para o controle de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

**Tabela 4.** CL<sub>50</sub> da estirpe padrão *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* IPS 82 a larvas de 2º instar de *A. aegypti* – Procedimento do Laboratório.

Bti IPS-82	CL <sub>50</sub> (ng/mL)	Intervalo de confiança a 95% (ng/mL)
1	1,720	1,284 – 2,142
2	1,379	0,941 – 1,953
3	1,523	0,647 – 2,546

**Tabela 5.** CL<sub>50</sub> da estirpe padrão *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* IPS 82 a larvas de 4º instar de *A. aegypti* – Metodologia da OMS.

Bti IPS-82	CL <sub>50</sub> (ng/mL)	Intervalo de confiança a 95% (ng/mL)
1	13,113	8,883 – 17,599
2	9,677	5,907 – 12,688
3	13,938	9,700 – 18,949

Os resultados da tabela 6 mostraram que houve diferença entre as concentrações necessárias para matar as larvas utilizadas em cada um dos métodos (ANOVA: F = 66,89, P = 0,001), uma vez que larvas de 2º instar utilizadas no procedimento do laboratório apresentaram uma maior suscetibilidade a *B. thuringiensis israelensis* IPS-82 que as larvas de 4º instar utilizadas no método da OMS, portanto maiores concentrações do produto foram necessárias para matar as larvas de 4º instar.

**Tabela 6.** Comparação dos dois métodos de bioensaio para cálculo de CL<sub>50</sub> da estirpe padrão *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* IPS 82 a larvas de *A. Aegypti*.

Bti IPS-82	CL <sub>50</sub> (ng/mL)
Procedimento/Laboratório	1,541a
OMS	12,243b

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas entre os tratamentos.

## Conclusões

HUANG et al. (1999) afirmaram que lagartas do 2º instar de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) foram muito mais sensíveis ao *B. thuringiensis* do que as mais velhas, não havendo diferenças significativas entre o 3º, 4º e 5º estágios nas diferentes concentrações testadas. Este fato é de suma importância, uma vez que lagartas precisam ser controladas o mais rapidamente possível, pois, quanto maiores elas são maiores é a capacidade alimentar e de repasto sanguíneo e maior o prejuízo para a agricultura e a saúde pública.

No entanto, quando se avalia a efetividade da estirpe, observa-se uma concentração menor necessária para matar larvas de 2º instar, o que demonstra a possibilidade de um menor custo no controle, além de um controle precoce das larvas que se não forem controladas no tempo certo, poderão mudar de estágio larval para pupa e em seguida para

adulto, que é o estágio responsável pela transmissão da dengue. Além disso, as bactérias do gênero *Bacillus* atuam de forma mais eficiente apenas nos primeiros estágios larvais dos insetos (ESPINDOLA *et al.*, 2008), pois não agem sobre os estágios de pupa e adulto. Por todos os fatores relatados acima, a equipe do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas optou por utilizar o procedimento do laboratório, pois é adequada ao uso pretendido e retrata a realidade do campo em seus ensaios.

Por ser *B. thuringiensis* um princípio ativo altamente eficiente na fase larval dos insetos, inócuo ao ser humano e ao meio ambiente e utilizado em todo o mundo há mais de 60 anos, é importante a sua utilização nos primeiros estágios de desenvolvimento larval para a obtenção de excelentes resultados. Dessa forma, evita-se a proliferação do mosquito e a transmissão da dengue, doença que significa risco à saúde e à sobrevivência da população brasileira.

## Referências

- EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Procedimento de bioensaios para o cálculo de CL<sub>50</sub> contra *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*** (038.11.02.03.3.012). Revisão 001. Brasília, 2007. 15 p. (Documento não publicado).
- EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Procedimento de manutenção da colônia de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus***. (038.11.02.00.3.002). Revisão 001. Brasília, 2007. 13 p. (Documento não publicado).
- ESPINDOLA, C. B.; GUEDES R. N.; SOUZA, R. C. P. Avaliação da eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no controle de formas imaturas do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em ambiente de laboratório. **EntomoBrasilis**, v. 1, n. 1, p. 10-13, 2008.
- HUANG, F.; BUSCHMAN, L.; HIGGINS, R. A. Susceptibility of different instars of european corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to diet containing *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 547-550, 1999.
- KUO, J.; FOX, E.; MACDONALD, S. **Sigmastat**: statistical software for working scientists: user's manual. San Francisco, CA: Jandel Scientific, 1992.
- PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. DE S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.
- ROBERTSON, J. R.; PREISLER, H. K.; RUSSELL, R. M. **Polo Plus**. Probit and logit analysis user's guide. Petaluma, CA: LeOra Software, 2002.
- SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 20 p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Draft guideline specifications for bacterial larvicides for public health use**: report of the who informal consultation. Geneva, Switzerland: WHO, 1999. 44 p.



---

***Recursos Genéticos e  
Biotecnologia***