

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA AGRÍCOLA
CÁTEDRA DE MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS AGRÍCOLAS Y URBANAS
FUNDAMENTOS DEL MANEJO INTEGRADO DE INSECTOS PLAGA

PRÁCTICA
EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN INSECTICIDA BIOLÓGICO MEDIANTE ANÁLISIS PROBIT
Profa. Nereida Delgado Puchi

INTRODUCCIÓN

El paso inicial en la selección de insecticidas químicos o biológicos para el control de insectos de importancia agrícola o médico-veterinaria, es la evaluación de la susceptibilidad en condiciones de laboratorio, utilizando métodos estandarizados que permitan hacer análisis comparativos.

Estas pruebas biológicas, mejor conocidas como bioensayos, tienen como premisa la existencia de una relación estímulo-respuesta, específicamente si esta relación es positiva y directamente proporcional, es decir: un incremento en la intensidad del estímulo, provoca el aumento en la intensidad de la respuesta. En el caso de la susceptibilidad a insecticidas, la relación estímulo-respuesta, podría entenderse como la relación dosis-mortalidad o tiempo de exposición-mortalidad.

Por ello, los resultados de los bioensayos de susceptibilidad o pruebas de eficacia, deben estar sustentados sobre la base de un diseño experimental apropiado, que permita hacer inferencias confiables acerca de la eficacia de una o varias formulaciones comerciales o en proceso de desarrollo. La confiabilidad y las interpretaciones apropiadas de los resultados, deben a su vez, partir de un análisis estadístico acorde con el diseño experimental. En este caso, el Análisis Probit es la herramienta generalmente utilizada en los estudios de evaluación de susceptibilidad a insecticidas.

PARÁMETROS UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS

La relación dosis respuesta es el fundamento sobre el cual se basan los estudios de susceptibilidad o eficacia de una formulación. A través de esta relación, se puede estimar la Dosis Letal Media (DL_{50}), o dosis que produce un 50% de mortalidad en la población bajo estudio. La DL_{50} es el parámetro más usado en la evaluación de eficacia de un insecticida, sobre todo cuando ésta evaluación se realiza de forma comparativa. Expresiones equivalentes, tales como el Tiempo Letal 50 (TL_{50}), Concentración Letal 50 (CL_{50}) o Knock-Down 50 (KD_{50}), pueden ser igualmente utilizadas como indicadores de eficacia.

Es posible estimar las DL_{50} , CL_{50} , TL_{50} , ó KD_{50} , cuando la relación dosis-respuesta (mortalidad) se ajusta a una curva sigmoide, en la cual las dosis, concentraciones, o tiempos de exposición, son las variables independientes y el porcentaje

de mortalidad o de insectos caídos (efecto knock-down) actúan como variables dependientes. Una curva sigmoide refleja que los valores de mortalidad o KD obtenidos se ajustan a una distribución normal (Figura1).

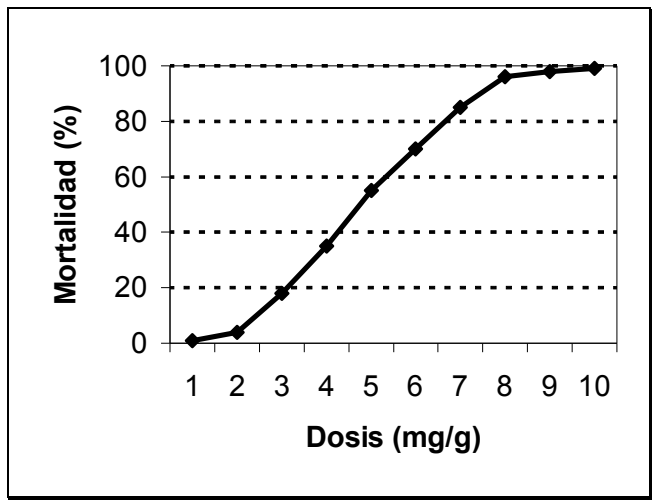


Figura 1. Relación dosis-mortalidad.

DESCRIPCION DEL EXPERIMENTO

Para la determinación de las Dosis, concentraciones o tiempos letales 50 es necesario exponer grupos de insectos a dosis o concentraciones crecientes de insecticidas, siguiendo los criterios de aleatorización, repetición y control local.

Ejemplo: Determinación las CL₅₀ de un insecticida biológico (*Bacillus thuringiensis var. israelensis*) sobre larvas de de 4to instar temprano de *Aedes aegypti* (Mosquito patas blancas)

Material biológico: Larvas del último instar de *Ae. aegypti* mantenidas bajo condiciones de laboratorio. La población de insectos debe ser homogénea en relación a la edad y condiciones de cría (temperatura, alimentación, densidad), a fin de eliminar del bioensayo factores que pudiesen influir en la susceptibilidad individual de los insectos expuestos al producto. De esta forma, se reduce también la magnitud del error experimental.

Unidad Experimental: 25 larvas de *Ae. aegypti* con las características mencionadas anteriormente, colocadas en un envase de 150 ml de capacidad

Tratamientos: Los tratamientos serán las distintas concentraciones de cada insecticida que van a ser aplicadas por unidad experimental. Para fines de la determinación de la CL₅₀ y CL₉₅, se recomienda preparar 5 a 7 dosis, a fin que la CL₅₀ estimada posteriormente se encuentre al menos 1 concentración por encima y otra por debajo del intervalo de las dosis o tratamientos evaluados.

Repeticiones: Cada dosis o tratamiento será aplicado en 4 unidades experimentales o repeticiones. Los tratamientos serán distribuidos al azar en las unidades experimentales diseñadas para tal fin, con lo cual se asegura que cada grupo de larvas tiene la misma probabilidad ser escogida para cualquiera de los tratamientos.

Control Local o Testigo: En el testigo, unidades experimentales (en este caso 4 repeticiones) son expuestas a las mismas condiciones que las anteriores, pero sin la presencia del producto que se desea evaluar. Las larvas son tratadas de igual manera, pero en este caso sólo se aplica el solvente con el cual se prepararon las dosis o concentraciones. Nótese que en este caso debe existir un control para cada tipo de insecticida, a menos que el solvente sea el mismo.

Variable a medir: Se determinará el porcentaje de insectos muertos por tratamiento y tipo de insecticida 24 h después iniciado el bioensayo. En algunos casos, se puede observar mortalidad en el Control, debido a factores intrínsecos o extrínsecos que generalmente no están bajo el control del investigador. Cuando esto sucede, se puede tolerar un intervalo de mortalidad en el Control entre 0 y 5 %.

Una mortalidad en el Control mayor del 5 %, es indicativo que la mortalidad observada en los tratamientos se debe tanto al insecticida aplicado como a algún otro factor intrínseco o introducido al sistema por efecto de la manipulación de los individuos que se están evaluando. Si la mortalidad en el control oscila entre el 5 y 20 % se debe sustraer este factor de mortalidad adicional de las unidades experimentales tratadas con insecticida, a fin de asegurar que los valores de mortalidad obtenidos se deban exclusivamente al efecto letal del producto que se desea evaluar. Esta corrección se logra a través de la fórmula de Abbott (1925), en la cual:

$$\%Mc = (X - Y / X) \times 100 \quad \text{donde,}$$

%Mc = Porcentaje de Mortalidad corregida

X = Porcentaje de larvas vivas en el control

Y = Porcentaje de larvas vivas en el tratamiento

Si el porcentaje de mortalidad en el control excede el 20 %, se debe descartar el bioensayo para ser repetido nuevamente (Busvine 1971).

Parámetro indicador de eficacia: CL_{50} y CL_{95} de cada uno de los insecticidas evaluados, estimados a partir de la regresión Log (dosis)-porcentaje de mortalidad. Este último método se conoce como Análisis Probit (Finney 1971), el cual tiene como fundamento la distribución normal de los porcentajes de mortalidad observados en función de las dosis (Busvine 1971).

B. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y MÉTODOS PARA LA ESTIMACIÓN DE LAS CL_{50} Y CL_{95}

1. Método gráfico: Consiste en graficar los porcentajes de mortalidad observados en función del logaritmo de las dosis aplicadas. Una vez graficados los puntos o valores de mortalidad se traza la línea recta que se encuentre más cercana a los valores de mortalidad observados. Posteriormente, se extrapola una línea horizontal desde el punto 50% en el eje Y que corte la recta que contiene los valores de mortalidad esperados; en ese punto de corte, se traza otra recta perpendicular a la anterior dirigida hacia el eje X. El punto de corte en dicho eje nos indicará la dosis que produce un 50 % de mortalidad o DL_{50} (Figura 2). La desventaja de este método, es que no permite saber si los valores observados (u obtenidos experimentalmente), son estadísticamente similares a los valores esperados, obtenidos a través de la recta, por lo que el nivel de precisión de los parámetros estimados tampoco se conoce con exactitud.

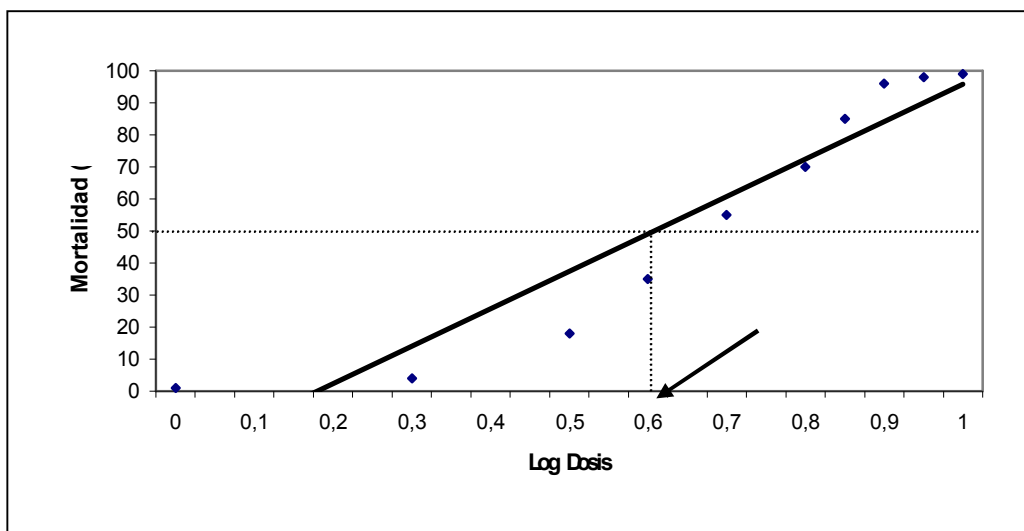


Figura 2. Método gráfico de extrapolación para estimar la CL_{50} (Busvine 1971). El punto de corte en el eje X, representa la dosis que produce el 50% de mortalidad en la población.

2. Análisis de Regresión log dosis-unidades probit

Varios estudios han demostrado que la relación entre la dosis y el porcentaje de mortalidad, se ajusta más exactamente a una línea recta, cuando las dosis son transformadas a logaritmo (base 10) y los porcentajes de mortalidad a unidades probit. Las unidades probit se basan en las frecuencias de la desviación estándar de una curva de distribución normal, en la cual el 50% de frecuencia acumulada es equivalente a 5 unidades probit, el 83,13 % equivale a 6 unidades probit y el 2,27 % a 3 unidades probit (Busvine 1971, Sokal and Rohlf 1981). A continuación, se presenta la tabla de conversión de los porcentajes a unidades probit.

The probit transformation

% kill	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
00	—	2·67	2·95	3·12	3·25	3·36	3·45	3·52	3·59	3·66
10	3·72	3·77	3·82	3·87	3·92	3·96	4·01	4·05	4·08	4·12
20	4·16	4·19	4·23	4·26	4·29	4·33	4·36	4·39	4·42	4·45
30	4·48	4·50	4·53	4·56	4·59	4·61	4·64	4·67	4·69	4·72
40	4·75	4·77	4·80	4·82	4·85	4·87	4·90	4·92	4·95	4·97
50	5·00	5·03	5·05	5·08	5·10	5·13	5·15	5·18	5·20	5·23
60	5·25	5·28	5·31	5·33	5·36	5·39	5·41	5·44	5·47	5·50
70	5·52	5·55	5·58	5·61	5·64	5·67	5·71	5·74	5·77	5·81
80	5·84	5·88	5·92	5·95	5·99	6·04	6·08	6·13	6·18	6·23
90	6·28	6·34	6·41	6·48	6·55	6·64	6·75	6·88	7·05	7·33

Cálculo manual de las CL₅₀ y CL₉₅

Una vez obtenidos los porcentajes de mortalidad, los datos se transforman a su equivalente probit, según la Tabla anterior y las concentraciones a log base 10. Posteriormente, estos datos se ingresan en una calculadora que realice análisis de regresión, a fin de obtener los valores de la función que intenta relacionar valores probit observados (PO) con el log de la dosis (Sokal 1958). Esta función se define como:

$$Y = A + B (\text{Log } X) \quad \text{donde}$$

Y= % Mortalidad (expresada en unidades probit)

X= Dosis

A = mortalidad cuando log dosis=0 (Intercepto)

B= Pendiente de la recta

Conocidos los valores de A y B, es posible calcular los valores de CL₅₀ y CL₉₅ al despejar la variable X de la ecuación obtenida. Es decir:

$$\text{Log } (X) = (Y - A) / B \quad \Rightarrow \quad X = \text{Antilog } [(Y - A) / B]$$

donde Y es igual a 5,00 (50 % de mortalidad) o igual a 6,64 (95 % de mortalidad). Igualmente, se pueden calcular los porcentajes de mortalidad esperados (ME), ingresando en la fórmula el log de cada dosis.

La significancia de la regresión Log dosis-% Mortalidad se estima a través de una prueba de Ji-Cuadrado para detectar heterogeneidad (Sokal 1958, Throne et al. 1995). En esta prueba, la hipótesis nula o *Ho* establece que no existe diferencia entre los valores esperados y observados. En consecuencia, si los resultados de la prueba de Ji-Cuadrado indican que debe aceptarse *Ho* esto significa que existe relación entre las variables dependiente e independiente y por tanto las estimaciones de las DL₅₀ y DL₉₅ son válidas.

A continuación se presenta un ejemplo de valores de mortalidad producidos por distintas concentraciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre larvas de 4to instar temprano de *Ae. aegypti*

Concentración		Mortalidad observada (MO)		Mortalidad Esperada (ME)
(ppm)	(Log)	(%)	Probit	Probit
0,0350	-1,5	95	6,64	6,54
0,0250	-1,6	87	6,13	6,30
0,0150	-1,8	80	5,84	5,82
0,0100	-2	70	5,52	5,35
0,0075	-2,1	55	5,13	5,11
0,0050	-2,3	30	4,48	4,63
0,0025	-2,6	15	3,96	3,91

(*) Veinte larvas por repetición, 8 repeticiones por tratamiento. La mortalidad en el tratamiento control promedió 2,5 %, por lo que no fue necesario hacer correcciones mediante la fórmula de Abbott.

El valor de χ^2 se calcula de la siguiente manera:

$$\chi^2 = \sum [(MO-ME)^2 / (ME) (100-ME)]$$
$$\chi^2_{\text{final}} = \chi^2 * (\text{No Larvas-réplica})$$

Estadístico que será comparado con el de la Tabla de χ^2 para (n-2) g.l. y P=0,05

En este ejemplo tenemos que:

$$\chi^2 = \sum [(6,64-6,54)^2 / (6,54) (10-6,54)] + [(6,13 - 6,30)^2 / (6,30) (10-6,30)] + \dots = \mathbf{0,002875876}$$

$$\chi^2_{\text{final}} = \mathbf{0,002875876} \times 20 \text{ larvas} = \mathbf{0,057517521}$$

$$\chi^2 (0,05 - 5 \text{ g.l.}) = \mathbf{1,145} \quad \Rightarrow \quad \chi^2_{\text{final}} = \mathbf{0,057517521} < \mathbf{1,145} \quad (\text{n.s.}) \quad \underline{\text{Se acepta } H_0}$$

Por tanto se concluye que no hay diferencia entre los valores observados y esperados. Así, la estimación de las CL_{50} y CL_{95} puede hacerse ingresando cada valor de mortalidad (50 = 5,00 y 95 = 6,64) en la ecuación obtenida mediante la Regresión Log dosis – probit. En este caso los valores de la ecuación son los siguientes:

$$A = 10,12 ; B = 2,38 \quad (R = 0,99; R^2 = 0,98)$$

Es decir: $X = \text{Antilog} [(Y - A) / B]$;

$$\text{Luego, } CL_{50} = \text{Antilog} [(5 - 10,12) / 2,38] ; CL_{95} = [(6,64 - 10,12) / 2,38]$$

$$CL_{50} = \mathbf{0,0071 \text{ ppm}} ; CL_{95} = \mathbf{0,0344 \text{ ppm}}$$

REFERENCIAS

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol 18:265-267.
- Busvine JR. 1971. Techniques for Testing Insecticides. 2nd Ed. C.A.B. England. 345 p.
- Chacín F. 2000. Diseño y análisis de experimentos para generar superficies de respuesta. Fac. Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 348 p.
- Cochran WG, Cox GM. 1965. Diseños Experimentales. Editorial F. Trillas. Mexico. 661 p.
- Finney M. 1971. Probit Analysis. The Syndics of the Cambridge University Press. 400 p.
- Fisher RA. 1971. The Design of the Experiments. Hafner Publishing Co. NY. 248 p.
- Little TM, Hills FJ. 1972. Statistical Methods in Agricultural Research. Agricultural Extension. Univ. California. 242 p.
- Raymond M. 1985. Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. ORSTOM Ser. Entomol. Méd. Parasitol. 22: 117-121.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1981. Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 2nd Ed. WH Freeman and Company. San Francisco. 859.
- Sokal RR. 1958. Probit Analysis on a digital computer. J Econ Entomol 51:738-739.
- Throne JE, Weaver DK, Baker JE. 1995. Probit Analysis: Assessing Goodness-of-fit based on backtransformation and residuals. J Econ Entomol 88(5):1513-1516.