

CAPÍTULO 2.

Estabilidad frente a la luz ultravioleta y en almacenamiento de dos formulaciones a base de granulovirus para el control de *T. solanivora* en campo

Martha Chaparro, BSc; Isabel Quiroga, BSc; Carlos Espinel, PhD;
Martha Gómez, PhD; Laura Villamizar, PhD.

INTRODUCCIÓN

Para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *T. solanivora* se ha utilizado el granulovirus de *P. operculella*, un virus de la familia Baculoviridae que es patógeno también de *T. solanivora* (Espinel *et al.*, 2009b). A pesar del alto potencial de este y otros entomopatógenos empleados como insecticidas microbianos, su uso se ha visto limitado debido a que la actividad se ve afectada por diferentes factores ambientales, como la luz ultravioleta y la temperatura (Ignoffo *et al.*, 1997). La mayor inactivación de los virus entomopatógenos en campo se debe al efecto de la radiación solar y principalmente a la porción del espectro correspondiente a la luz ultravioleta (UV) (Shapiro *et al.*, 1983).

La porción de la radiación ultravioleta que llega a la superficie terrestre corresponde a ultravioleta tipo A y tipo B (290 a 400 nm), que causa la inactivación principalmente por la formación de dímeros de pirimidina, que impiden la replicación del ADN y la consecuente formación de nuevos viriones (Burges, 1998).

Para solucionar esta limitante causada por la exposición de los virus a la luz solar, se han evaluado diferentes sustancias con potencial fotoestabilizador como los abrillantadores ópticos, los cuales no solamente permiten proteger los virus de la radiación UV, sino que simultáneamente tienen un efecto potenciador y permiten aumentar hasta más de dos mil veces la actividad de un virus (Caballero *et al.*, 2001). Con base en esta información, Corpoica desarrolló dos formulaciones a base del granulovirus colombiano VG003 aislado de *T. solanivora* y que, según el trabajo de Barrera *et al.* (2009), corresponde a un granulovirus de *P. operculella* (PhopGV). Una formulación pertenece a un concentrado emulsionable (EC) y otra a un granulado dispersable (WG), las que incluyen dentro de sus excipientes un protector UV que pertenece al grupo de los abrillantadores ópticos (Chaparro *et al.*, 2010); este grupo de compuestos, aparte de brindar fotoprotección, ha



mostrado tener un efecto potenciador de la actividad insecticida de varios baculovirus (Caballero *et al.*, 2001).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las dos formulaciones sobre la fotoestabilidad del virus expuesto a una fuente artificial de luz ultravioleta y determinar el posible efecto del abrillantador óptico incluido en las formulaciones sobre la actividad insecticida del virus. Además, teniendo en cuenta que las características fisicoquímicas, microbiológicas y la actividad insecticida de los formulados pueden afectarse negativamente durante el almacenamiento y que la estabilidad de los productos puede verse influenciada por la temperatura y el tipo de formulación, se realizó un estudio de estabilidad acelerada para determinar características susceptibles de optimización en los dos productos que permitan avanzar en el desarrollo de los prototipos y seleccionar las condiciones óptimas de almacenamiento para los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Propagación viral

Se tomaron huevos de *T. solanivora* y se inocularon con el aislamiento de PhopGV VG003 proveniente de Cundinamarca y previamente seleccionado por presentar alta actividad insecticida contra *T. solanivora* (Espinel *et al.*, 2009a). Los huevos ubicados sobre un disco de papel toalla (aproximadamente 400-500 huevos/disco) fueron inoculados con un pincel aplicando la suspensión viral y dejándolos secar (Chaparro *et al.*, 2010).

En cubetas de plástico de 4 litros de capacidad se ubicaron seis tubérculos de papa pastusa secos y previamente lavados. Sobre los tubérculos se pusieron trozos de papel, cada uno con aproximadamente 40 huevos inoculados. Los recipientes fueron cerrados e incubados a 25 °C por 20 días. Pasado este tiempo, las larvas fueron extraídas y clasificadas en larvas sanas y en larvas con síntomas típicos de la enfermedad viral (color blanco) (Chaparro *et al.*, 2010).

Purificación y cuantificación viral

El virus utilizado para los ensayos y para la elaboración de los prototipos fue obtenido a partir de un proceso de purificación mediante centrifugaciones diferenciales. Para tal fin, las larvas infectadas se maceraron en SDS al 0,1% y la suspensión obtenida se filtró por una tela, para una posterior centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y centrifugó a 15.000 rpm durante 1 hora, y el sedimento se resuspendió en 2 mL de tampón Tris-HCl (pH 6,0) y se centrifugó nuevamente sobre un gradiente de glicerol de 30% - 80% (v/v) a 15.000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó la banda blanca que contenía el virus y esta se lavó dos veces en tampón Tris-HCl (Chaparro *et al.*, 2010).

Para determinar la concentración de todas las suspensiones de virus purificado utilizadas para todos los ensayos, los CI fueron cuantificados mediante la lectura de la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro, extrapolando el resultado en una curva

de calibración previamente estandarizada mediante una modificación de la metodología descrita por Matthiessen *et al.* (1978).

Evaluación del efecto potenciador del filtro UV sobre la actividad del aislamiento de granulovirus VG003

Se prepararon suspensiones virales ajustadas a concentraciones desde 2×10^2 hasta 2×10^6 CI/mL; estas fueron mezcladas en relación 1:1 (V/V) con dos soluciones del filtro ultravioleta (CBUV05) ajustadas al 1% y al 0,2%. Las suspensiones finalmente quedaron ajustadas a cinco concentraciones virales de 1×10^2 a 1×10^6 CI/mL y con el fotoprotector al 0,1% o al 0,5% respectivamente. El control positivo consistió en el virus puro mezclado con agua destilada y ajustado a las mismas concentraciones virales mencionadas anteriormente. De igual forma, se contó con un testigo absoluto, en el cual los tubérculos no fueron tratados y un testigo relativo en el que los tubérculos fueron tratados con las soluciones del filtro ultravioleta, pero sin estar este mezclado con el virus (Chaparro *et al.*, 2010).

Tres tubérculos de tamaño parejo (180 ± 20 g por papa) se inocularon con cada tratamiento utilizando una brocha de 1 pulgada y aplicando 2 mL sobre cada cara del tubérculo, sobre el cual se colocaron 10 larvas neonatas de *T. solanivora* (30 larvas por tratamiento) y se ubicaron individualmente en un recipiente plástico de 16 onzas (unidad experimental). Los recipientes se incubaron a 25 °C durante 30 días y se realizó un muestreo destructivo en busca de todas las larvas presentes. Se consideró como el número de larvas muertas la suma de los individuos muertos, los desaparecidos y las larvas vivas con síntomas evidentes de infección viral (Chaparro *et al.*, 2010).

Este experimento contó con un diseño completamente al azar con tres repeticiones (10 larvas por repetición) por tratamiento. Los resultados se sometieron a un análisis Probit con el programa BioStat 2008, para determinar el efecto del filtro UV sobre la concentración letal media del virus (Chaparro *et al.*, 2010).

Elaboración de las formulaciones

Las formulaciones fueron preparadas con virus purificado y diferentes componentes como aceites vegetales y tensioactivos no iónicos para el EC, y silicatos, almidón y azúcares para el WG. Además, los dos productos incluyeron un filtro ultravioleta del grupo de los brillantadores ópticos (Chaparro *et al.*, 2010).

Determinación del efecto fotoestabilizador de las formulaciones

Teniendo en cuenta que la concentración de los dos prototipos de bioplaguicidas es 1×10^9 CI por g o mL respectivamente, estos se reconstituyeron en agua destilada utilizando 1 g o mL en 1.000 mL para una concentración final de 1×10^6 CI/mL. También se preparó una suspensión de virus puro sin formular ajustada a la misma concentración de los prototipos de bioplaguicida reconstituidos. Estas suspensiones se utilizaron para inocular



la superficie de tubérculos de papa de tamaño parejo (180 ± 20 g por papa), aplicando, con una brocha de 1 pulgada, un volumen de 2 mL por cada cara del tubérculo (Chaparro *et al.*, 2010).

El experimento contó con 19 tratamientos, que consistieron en los tubérculos inoculados con los dos prototipos de bioplaguicidas y el virus puro sin formular expuestos durante diferentes tiempos a la radiación UV, y un testigo absoluto que consistió en tubérculos no tratados y no expuestos a la radiación UV (Chaparro *et al.*, 2010).

Una vez inoculadas las papas, estas fueron ubicadas en una cabina de flujo laminar a 60 cm de la fuente de luz UV, utilizando un diseño de bloques que contó con 9 columnas de 6 tubérculos cada una, tres columnas para cada tratamiento. Las filas comprendieron los diferentes tiempos de exposición y las columnas correspondieron a las formulaciones y el virus sin formular. Para realizar la irradiación se utilizó una lámpara Repti Glo 20, que simula la radiación UV del sol y emite un 33% de UVA y un 8% de UVB, ubicada a 10 cm de altura, de manera que las muestras se expusieron a una intensidad de radiación ultravioleta tipo B de 250 W/cm^2 . Los tiempos de exposición fueron de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas, y cada dos horas se cubrió con papel aluminio la fila de tubérculos correspondiente al respectivo tiempo de exposición (Chaparro *et al.*, 2010).

Terminada la irradiación, los tubérculos se utilizaron para un bioensayo siguiendo la metodología previamente descrita. Los resultados de mortalidad se corrigieron con respecto al tratamiento testigo absoluto, determinando el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Zar, 1999):

$$\text{Eficacia (\%)} = (b - k) / (100 - k) \times 100$$

Donde b es el porcentaje de mortalidad en el tratamiento y k es el porcentaje de mortalidad del testigo absoluto. Posteriormente, se calculó el porcentaje de mortalidad original remanente (%MOR) mediante la fórmula Martignoni e Iwai (1985):

$$\text{MOR (\%)} = (f / n) \times 100$$

Donde f es el porcentaje de mortalidad obtenido con el tratamiento expuesto a la radiación UV y n es el porcentaje de mortalidad obtenido con el tratamiento no expuesto.

El diseño experimental fue completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo, y contó con tres repeticiones por tratamiento. Los resultados se analizaron con el programa SAS 9.1. Estos cumplieron los principios de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias de Tukey (95%).

Preparación de las muestras para el estudio de estabilidad

Muestras de 3 kg de producto formulado como WG se empaquetaron en bolsas metalizadas, que fueron selladas al calor. Por otra parte, se almacenaron muestras de 140 mL del EC en recipientes plásticos con tapa a rosca de color blanco, con una capacidad de 150 mL.

Como tratamiento control para utilizar en los bioensayos se empacaron muestras de 0,1 mg de virus liofilizado (sin formular) en bolsas metalizadas de 1 g de capacidad (Quiroga *et al.*, 2011).

Estudio de estabilidad en almacenamiento

Dos muestras de cada tratamiento (WG, EC y virus liofilizado) se almacenaron en un cuarto frío a 6 ± 2 °C; el mismo número de muestras se almacenaron en una incubadora digital a 20 ± 2 °C y otro grupo igual de muestras se almacenó en otra incubadora digital a 28 ± 2 °C. Antes de iniciar el almacenamiento y pasados dos, cuatro y seis meses, se analizaron tres submuestras de cada bolsa o frasco de cada prototipo almacenado a las tres temperaturas, determinando el contenido de contaminantes y las características fisicoquímicas. Adicionalmente, la actividad insecticida se determinó antes y después de los seis meses de almacenamiento (Quiroga *et al.*, 2011).

El estudio contó con un diseño experimental completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo (todas las mediciones se realizaron por triplicado). Los resultados del estudio de estabilidad de las características fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas fueron sometidos a un análisis de varianza y posteriormente a comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey (95%). En el caso de la estabilidad de la densidad apisonada, los resultados se analizaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, ya que los datos no cumplieron con los principios de normalidad y homogeneidad de varianzas (Quiroga *et al.*, 2011).

Estabilidad fisicoquímica

Tamaño de partícula por granulometría: una muestra de 100 g de WG se adicionó en un tamiz con un tamaño de poro de 2,8 mm, el cual fue ensamblado en una columna de tamices con orificios de 2 mm, 850, 500, 150 y 38 μ m. La máquina tamizadora se encendió durante 10 minutos y, una vez finalizado el tamizaje, se pesó el material retenido en cada uno de los tamices. Los resultados se expresaron como el porcentaje de material, con un tamaño entre el del poro del tamiz anterior y el del poro del tamiz en el que quedó retenida la mayor cantidad de producto (Villamizar *et al.*, 2005).

pH: muestras de 10 g de granulado o 10 mL de EC se mezclaron con 100 mL de agua destilada desionizada. El pH se midió con ayuda de un potenciómetro previamente calibrado (Villamizar *et al.*, 2005).

Humedad: en una balanza de humedad halógena OHAUS MB 45 se ubicaron 0,5 g de WG en el plato de la misma y se inició el secado de la muestra a 100 °C. Después de 10 minutos se leyó el porcentaje de humedad en la pantalla del equipo (Quiroga *et al.*, 2011).

Mojabilidad: 100 mL de agua destilada se vertieron en un vaso de precipitado de 250 mL, y 5 g del WG fueron adicionados sin ningún tipo de agitación. Inmediatamente con



un cronómetro se inició el conteo del tiempo (segundos) necesario para que todo el producto se humedeciera completamente (Voight y Bornschein, 1982).

Densidad apisonada: se pesaron 40 g del producto granulado y se introdujeron en una probeta de 250 mL ubicada dentro de un soporte de madera. La probeta fue levantada 5 cm y se dejó caer lentamente sobre la base del soporte, repitiendo 50 veces. Al finalizar, se registró el volumen (V) de la muestra apisonada y se determinó la densidad apisonada (D), aplicando la fórmula correspondiente (Voight y Bornschein, 1982):

$$D = 40 \text{ g} / V$$

Estabilidad de la suspensión del WG reconstituido en agua basado en la norma MT 168 (CIPAC 1989, citado por Quiroga *et al.*, 2011): se pesaron 2,5 g del producto WG y se vertieron en un vaso de precipitado de 200 mL que contenía 50 mL de agua destilada a 30 ± 1 °C, mezclando durante dos minutos a 120 rpm con un agitador magnético. La suspensión se llevó a un volumen de 250 mL con agua destilada en una probeta y se selló con un tapón de caucho. La probeta fue invertida 30 veces (180°) durante un minuto y se ubicó en un baño termostataado a 30 ± 1 °C durante 30 minutos. Con una pipeta de 10 mL sostenida en un soporte universal a la altura de la marca de 25 mL de la probeta y conectada a una bomba peristáltica, se extrajeron 225 mL de la suspensión a 600 rpm. El sedimento fue transferido a una caja de Petri previamente tarada y esta se secó hasta lograr un peso constante a 90 °C en un horno; con el peso final de la muestra se determinó la estabilidad (E) de la suspensión, aplicando la fórmula:

$$E = 111 \times (1 - (a / 2,5 \text{ g}))$$

Estabilidad de la emulsión formada con el EC basado en la norma MT 20 (CIPAC 1989, citado por Quiroga *et al.*, 2011): se vertieron 70 mL de agua destilada a 25 ± 1 °C en un vaso de precipitado de 250 mL y se adicionaron gota a gota con una bureta 5 mL del producto oleoso. El sistema fue mezclado con una barra de cristal dirigiendo el flujo hacia el centro y no contra las paredes del vaso de precipitado. Posteriormente, el líquido se transfirió a una probeta de 250 mL y se completó el volumen con agua. La emulsión se mantuvo en reposo durante una hora y se observaron los cambios del sistema relacionados con el volumen y la presencia de material separado.

Estabilidad microbiológica

Este parámetro se determinó mediante el recuento de microorganismos contaminantes. Para tal fin, muestras de cada prototipo y el virus liofilizado sin formular fueron reconstituidas en agua a una concentración de 1×10^6 CI/mL. Se realizaron diluciones seriadas en agua estéril, las cuales se sembraron por triplicado en cajas de Petri con Agar Nutritivo para cuantificar bacterias, y en Agar Sabouraud con Rosa de Bengala para el recuento de mohos y levaduras. Los medios fueron incubados a 37 ± 2 °C durante 48

horas y a 25 ± 2 °C durante 8 días respectivamente; así mismo, se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) (Quiroga *et al.*, 2011).

Estabilidad de la actividad insecticida

Los prototipos de bioplaguicida y el virus liofilizado sin formular se reconstituyeron en agua estéril a una concentración de 1×10^6 CI/mL. Con cada suspensión se inocularon tres tubérculos de papa pastusa con ayuda de un nebulizador (Carrera *et al.*, 2008), aplicando 2 mL de suspensión por cada lado de estos. Sobre los tubérculos ubicados individualmente en vasos plásticos de 16 onzas se ubicaron 10 larvas neonatas de *T. solanivora* y se siguió el bioensayo como se describió anteriormente. Con los resultados de mortalidad en los tratamientos y el testigo se calculó el porcentaje de eficacia según la fórmula de Schneider-Orelli (Quiroga *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del efecto potenciador del filtro UV

En el tratamiento testigo no se presentó mortalidad, por lo que los resultados de los tratamientos restantes no fueron corregidos. Los resultados de mortalidad fueron entonces sometidos a un análisis Probit, y para todos los tratamientos el valor de P fue mayor a 0,05, lo que permitió aceptar la hipótesis propuesta que sugiere que existe una correlación lineal entre la dosis y la mortalidad de las larvas (Chaparro *et al.*, 2010).

Las concentraciones letales medias obtenidas para el virus puro, el virus con el fotoprotector al 0,1% y el virus con el fotoprotector al 0,5% fueron de $1,6 \times 10^6$, $3,0 \times 10^5$ y $3,0 \times 10^4$ CI/mL, observándose que la CL_{50} del virus con el fotoprotector al 0,1% fue un exponente menor que la del virus puro, y cuando el virus se mezcló con el fotoprotector al 0,5% esta fue dos exponentes menor que la CL_{50} del virus puro y un exponente menor que la del virus mezclado con el fotoprotector al 0,1% (Tabla 2) (Chaparro *et al.*, 2010).

Al comparar las potencias relativas y sus respectivos límites de confianza (Tabla 2) se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, evidenciándose que el fotoprotector CBUV05 tuvo un efecto potenciador del virus, que se incrementó cuando aumentó la concentración.

Este efecto de los abrillantadores ópticos fue demostrado por Shapiro (1992), quien evaluó 23 compuestos de este grupo mezclados con el nucleopoliedrovirus de *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) en concentraciones de 0,1%, 0,25%, 0,5%, y 1,0%, observando una reducción de las concentraciones letales medias. En otro trabajo con dicho virus, este grupo de filtros UV aumentó dos mil veces la actividad insecticida (Caballero *et al.*, 2001). Argauer y Shapiro (1997) con este mismo nucleopoliedrovirus confirmaron esta actividad, ya que la CL_{50} del virus puro fue de 26.500 CI/mL, y con el uso de Blankophor BBH al 1% esta disminuyó a 76 CI/mL.

En cuanto al modo de acción de los abrillantadores, algunos estudios con el NPV de *L. dispar* mezclado con Tinopal LPW permitieron detectar que se produjeron perturbaciones



fisiológicas como la disminución del pH intestinal, la disminución en la alimentación y una disminución de peso (Caballero *et al.*, 2001). Okuno *et al.* (2002) demostraron que los abrillantadores ópticos aumentan la probabilidad de que el virus cause infección, porque inhiben la síntesis de quitina y de esta forma aumentan la permeabilidad de la membrana peritrófica.

Tabla 2. Resultados del análisis Probit del ensayo concentración-mortalidad para el virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0,1% y al 0,5% (Chaparro *et al.*, 2010)

TRATAMIENTO	CL ₅₀ (CI/ml)	Potencia relativa	Límite de confianza inferior	Límite de confianza superior	χ^2	P
Virus puro	1,6 x 10 ⁶	1,0	-	-	0,505	0,917
Virus con fotoprotector al 0,1%	3,0 x 10 ⁵	5,3	3,4	12,4	0,418	0,936
Virus con fotoprotector al 0,5%	3,0 x 10 ⁴	53,3	40,9	131,6	0,173	0,981

Dicho efecto sobre la quitina se considera el principal modo de acción de estas sustancias, ya que la quitina en la membrana peritrófica actúa como un andamio para las proteínas (Wang y Granados, 2000). También se ha observado que los abrillantadores causan la degradación de la mucina del intestino, efecto principalmente observado con el uso de Calcofluor M2R (Wang y Granados, 2000).

El abrillantador óptico evaluado en este estudio mostró un efecto potenciador sobre el aislamiento VG003 de PhopGV, el cual fue dependiente de la dosis. Dicho efecto podría mejorar la eficacia de un producto formulado a base de este virus, pero es necesario considerar el costo de esta tecnología en una línea de producción comercial (Chaparro *et al.*, 2010).

Determinación del efecto fotoestabilizador de las formulaciones

La eficacia o mortalidad corregida con respecto al testigo (mortalidad del 6,6%), se redujo significativamente ($P < 0,05$) cuando el virus sin formular fue irradiado con luz UV a partir de 6 horas de exposición. La mortalidad causada por el virus puro sin irradiar fue del 90%, mientras que el virus irradiado por 6 horas causó una mortalidad del 26,6%, a las 8 horas del 23,3% y a las 10 horas del 23,3% (Tabla 3) (Chaparro *et al.*, 2010).

El concentrado emulsionable presentó una reducción significativa de la eficacia a partir de 4 horas de exposición, debido a que antes de ser expuesto a la luz UV presentó una eficacia del 100%, que se redujo al 66,6% después de 4 horas de irradiación. No obstante, esta formulación brindó protección al virus a pesar de haber presentado una reducción de su eficacia, pues después de 10 horas de exposición su actividad insecticida fue significativamente mayor que la obtenida con el virus puro (Tabla 3) (Chaparro *et al.*, 2010).

Por el contrario, con el granulado dispersable no se detectaron diferencias significativas entre la actividad insecticida del virus antes y después de 10 horas de irradiación, sugiriendo

Tabla 3. Efecto de la radiación UV sobre la eficacia, inactivación y mortalidad original remanente de las dos formulaciones a base del granulovirus VG003 (Chaparro *et al.*, 2010).

Tratamiento	Tiempo (h)	Eficacia (%)	Inactivación (%)	MOR (%)	Grupos homogéneos (95%)
Granulado dispersable	0	70,0	0,0	100,0	bcd
	2	56,6	19,0	80,9	cd
	4	56,6	19,0	80,9	cd
	6	53,3	23,8	76,1	d
	8	53,3	23,8	76,1	d
	10	46,6	33,3	66,6	d
Concentrado emulsionable	0	100,0	0,0	100,0	a
	2	80,0	20,0	80,0	abc
	4	70,0	30,0	70,0	bcd
	6	66,6	33,3	66,6	bcd
	8	60,0	40,0	60,0	cd
	10	60,0	40,0	60,0	cd
Virus puro	0	90,0	0,0	100,0	ab
	2	86,6	3,7	96,2	ab
	4	80,0	11,1	88,8	abc
	6	26,6	70,3	29,6	e
	8	23,3	70,0	25,9	e
	10	23,3	70,0	25,9	e

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de Tukey (95%).

que la formulación granular fue más eficiente para la fotoestabilización del virus. En términos generales, la mortalidad disminuyó en todos los tratamientos con el aumento del tiempo de exposición, resultado que indica que la radiación ultravioleta artificial utilizada (UVA y UVB) inactivó el virus formulado y sin formular; pero en los dos casos (WG y EC) el virus formulado se inactivó más lentamente que el no formulado, posiblemente por efecto de los auxiliares de formulación utilizados (Chaparro *et al.*, 2010).

Con respecto a la mortalidad original remanente (MOR%), se observó que a medida que aumentó la exposición a la radiación UV se presentó una disminución significativa en el valor de esta variable para todos los tratamientos (Tabla 3), confirmándose el efecto deletéreo de la radiación UV, el cual es directamente proporcional al tiempo de exposición (Chaparro *et al.*, 2010).

Batista *et al.* (2001) evaluaron también la tolerancia de dos formulaciones del nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) frente a la radiación UV. Los tratamientos evaluados fueron el virus sin formular y formulado como un concentrado emulsionable. El virus formulado expuesto a luz UV por 5 minutos causó una mayor mortalidad que el virus sin formular, con un 37% y un 19% respectivamente. El concentrado emulsionable fotoestabilizó al virus, posiblemente por la adición de aceites vegetales, efecto que podría también haberse producido con el concentrado emulsionable del granulovirus VG003 evaluado en el presente estudio, cuyo vehículo es una mezcla de ácidos grasos de origen vegetal (Chaparro *et al.*, 2010).



Sporleder *et al.* (2000) también estudiaron la susceptibilidad de otro aislamiento de PhopGV –como el evaluado en el presente trabajo– frente a la radiación ultravioleta, determinando el tiempo de inactivación de este granulovirus sin formular y expuesto a la radiación solar natural en Perú. Este virus se inactivó alrededor del 99% en un intervalo de 2,56 min a 4,53 min, dependiendo del mes de exposición a luz solar durante un año.

Las dos formulaciones evaluadas en el presente estudio incluían un protector ultravioleta del grupo de los derivados del estilbena, que podría haber jugado un papel fundamental en los resultados de fotoestabilidad. Sin embargo, los demás componentes utilizados como carbohidratos, silicatos, aceites vegetales, proteínas y tensioactivos, posiblemente también contribuyeron en alguna proporción en la protección del virus frente a la radiación UV. Los resultados del trabajo evidenciaron que el fotoprotector CBUV05 incluido en las dos formulaciones tiene un efecto potenciador de la actividad insecticida del virus, el cual podría ser útil para reducir las dosis de aplicación en campo, haciendo más rentable el producto. También se observó que las dos formulaciones con el filtro CBUV05 fotoestabilizaron al virus, lo que se evidenció en una reducción de la velocidad de inactivación durante la irradiación (Chaparro *et al.*, 2010).

Estabilidad fisicoquímica del granulado WG en almacenamiento

Tamaño de partícula: el WG recién manufacturado presentó el mayor porcentaje de material retenido en el tamiz de 850 μm , con un valor del 94,5%; esto permite concluir que la mayoría del material tiene un tamaño de partícula que oscila entre 850 y 2.000 μm . No hubo diferencias significativas ($F=5,31$; $df=11$; $P=0,153$) entre el porcentaje de granulado retenido en el tamiz de 850 μm antes y después del almacenamiento del producto a las tres temperaturas evaluadas, lo que sugiere que esta característica se mantuvo estable cuando el producto se almacenó durante seis meses y no fue afectado por la temperatura (Quiroga *et al.*, 2011).

pH: el WG presentó un pH inicial de 7,32, y durante los seis meses de almacenamiento a 6 °C, 20 °C y 28 °C se obtuvieron valores que oscilaron entre 6,56 y 7,50. La prueba de comparación de medias de Tukey detectó diferencias significativas entre los tratamientos ($F=34,1$; $df=11$; $P<0,005$). El pH del producto recién manufacturado no fue diferente de los valores obtenidos a los dos meses de almacenamiento a 6 °C y 20 °C; sin embargo, en el cuarto y sexto mes de almacenamiento a 6 °C y 20 °C el pH obtenido fue significativamente menor al inicial. Este cambio podría deberse al crecimiento de microorganismos contaminantes que podrían haber degradado algunos componentes de la formulación (Quiroga *et al.*, 2010), generando cambios químicos que afectaron el pH del medio (Borges, 1998).

El WG almacenado a 28 °C redujo significativamente su pH desde los dos meses de almacenamiento; es decir que, a mayor temperatura el cambio químico se evidenció más rápido. No obstante, el pH del producto durante todo el almacenamiento a las tres temperaturas se mantuvo entre 5 y 8, rango adecuado para el granulovirus utilizado como ingrediente activo (Quiroga *et al.*, 2010). De esta forma se asegura la estabilidad física

de los cuerpos de inclusión, ya que se ha establecido que valores de pH mayores a 9 y menores a 4 afectan la integridad de los baculovirus (Caballero *et al.*, 2001).

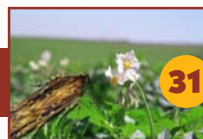
Humedad: el WG recién manufacturado presentó un porcentaje de humedad del 4%, y cuando este se almacenó a 6 °C presentó humedades promedio del 4,75%, 4,97% y 5,97% a los dos, cuatro y seis meses respectivamente. Para el producto almacenado a 20 °C, el porcentaje de humedad obtenido fue del 4,60% al segundo mes, del 4,99% al cuarto mes y del 5,69% al sexto mes. Finalmente, cuando el prototipo fue almacenado a 28 °C la humedad fue del 4,35%, 4,69% y 2,40% al segundo, cuarto y sexto mes de almacenamiento respectivamente. El producto solo presentó un incremento significativo ($F=16,9$; $df=11$; $P<0,005$) de la humedad a los seis meses de almacenamiento a 6 °C y 20 °C (Quiroga *et al.*, 2010).

Cuando el almacenamiento se realizó a 28 °C no hubo diferencias significativas entre el porcentaje de humedad del producto antes de ser almacenado y el valor obtenido a los dos y cuatro meses de almacenamiento, pero la humedad obtenida a los seis meses fue significativamente inferior a la inicial. Estos resultados podrían sugerir que el sello al calor con el cual se cerraron los empaques no fue totalmente hermético y permitió la entrada de humedad ambiental a las dos temperaturas más bajas y la salida de esta en la temperatura más alta (Quiroga *et al.*, 2010).

Cuando el almacenamiento se realizó a 6 °C y 20 °C, la humedad de los prototipos sobrepasó el valor máximo del 5% (Quiroga *et al.*, 2010), valor recomendado para este tipo de productos (Lawrie *et al.*, 2001), ya que humedades altas dan lugar a la compactación de los gránulos, la aparición de grumos y aglomerados de difícil dispersión y facilitan el crecimiento de microorganismos contaminantes (Salazar, 2003).

Mojabilidad: esta característica fisicoquímica osciló entre 56 y 62 segundos para todos los tratamientos durante seis meses a las tres temperaturas. No se detectaron diferencias significativas entre los valores de mojabilidad obtenidos cuando el producto fue almacenado a 6 °C y 20 °C, lo que sugiere que esta característica fue estable bajo dichas condiciones. No obstante, el producto almacenado a 28 °C presentó un incremento significativo ($F=2,14$; $df=11$; $P=0,048$) del tiempo de mojabilidad a partir del segundo mes (Quiroga *et al.*, 2010); esto podría deberse a que las altas temperaturas favorecen la compactación de las partículas y por lo tanto el tiempo de mojabilidad (Aulton, 2004). La estabilidad de esta característica a 6 °C y 20 °C podría sugerir que el producto no presentó cambios representativos en su porosidad (Vargas, 2003).

Densidad apisonada: la densidad del WG osciló entre 606,70 y 631,72 g/L y no se detectaron diferencias significativas a través el tiempo, ni entre temperaturas de almacenamiento ($F=1,93$; $df=11$; $P=0,086$). La estabilidad de esta característica sugiere un adecuado proceso de granulación y una correcta formulación (Quiroga *et al.*, 2010), considerando que los cambios en la densidad están asociados con modificaciones en el tamaño y la porosidad de las partículas, que podrían deberse al empleo de una cantidad inadecuada del agente aglutinante (Aulton, 2004). Una cantidad insuficiente del mismo



genera fragilidad en los gránulos, los cuales pueden romperse y compactarse aumentando su densidad; del mismo modo, el empleo de una gran cantidad de aglutinante produce un granulado muy duro, que no cambia su densidad pero es de difícil desintegración (Montalvo, 1989). La densidad durante todo el almacenamiento fue similar a la de algunos productos virales registrados ante la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OECD), que presentan valores entre 600 y 800 g/L (OECD, 2005).

Estabilidad de la suspensión: la estabilidad de la suspensión formada por el producto almacenado durante seis meses a tres temperaturas osciló entre 67,80% y 78,88%. Se observó que esta característica no cambió significativamente durante los cuatro primeros meses de almacenamiento a las tres temperaturas evaluadas; sin embargo, al sexto mes se observó una reducción significativa ($F=3,52$; $df=11$; $P=0,048$) de la estabilidad de la suspensión del producto almacenado a 6 °C, 20 °C y 28 °C (Quiroga *et al.*, 2010).

El porcentaje de estabilidad del producto recién manufacturado (78,88%) y terminado el almacenamiento fue superior al límite mínimo recomendado para estos productos, correspondiente al 60% (Senasa, 2002; Chemical Regulation Directorate, 2009).

Estabilidad fisicoquímica del concentrado emulsionable (EC) en almacenamiento

pH: el pH del EC se mantuvo entre 5,49 y 6,67 durante los seis meses de almacenamiento a las tres temperaturas evaluadas. Los prototipos almacenados a 6 °C, 20 °C y 28 °C mostraron una reducción significativa del pH a partir del segundo mes de almacenamiento ($F=22,2$; $df=11$; $P<0,005$) con respecto al valor presentado por el producto recién manufacturado. Los resultados mostraron que la temperatura de almacenamiento no tuvo un efecto sobre la estabilidad del pH del producto, mientras que el tiempo de almacenamiento sí afectó significativamente el pH de la formulación (Quiroga *et al.*, 2010). La reducción del pH del EC podría deberse al aumento en la concentración de microorganismos contaminantes durante el tiempo de almacenamiento (Quiroga *et al.*, 2010); estos pueden promover la producción de gas, cambios de color y olor, la hidrólisis de grasas y aceites y cambios de pH, entre otros (Aulton, 2004).

A pesar de estos resultados, el EC durante los seis meses de almacenamiento a 6 °C, 20 °C y 28 °C presentó valores de pH dentro del rango recomendado para los granulovirus (Quiroga *et al.*, 2010), el cual está entre 5 y 8 para proteger la integridad de los cuerpos de inclusión (Caballero *et al.*, 2001).

Estabilidad de la emulsión diluida: la estabilidad de la emulsión formada por el EC no se afectó por el tiempo ni por la temperatura de almacenamiento ($F=2,26$; $df=11$; $P<0,056$) (Quiroga *et al.*, 2010).

La prueba cualitativa también mostró que la emulsión obtenida al reconstituir el EC fue estable, ya que no se presentaron separación de fases ni formación de flóculos en los ensayos realizados al prototipo almacenado a 6 °C, 20 °C y 28 °C durante seis meses (Quiroga *et al.*, 2010).

El producto reconstituido presentó un cremado de 6 mL fácilmente dispersable (Quiroga *et al.*, 2010). Dicha inestabilidad normalmente es reversible con una pequeña

agitación y se presenta con más frecuencia en emulsiones de agua en aceite (O/W) que en emulsiones de aceite en agua (W/O) (Nehal *et al.*, 1999).

Estabilidad microbiológica en almacenamiento

El WG recién manufacturado presentó un contenido de contaminantes 17 veces mayor que el del EC (Tabla 4). Esta mayor contaminación podría darse por diferencias en la carga microbiana de los auxiliares de formulación empleados en la elaboración de los dos productos, ya que estos no fueron esterilizados antes de la manufactura. Cabe destacar que el contenido de contaminantes inicial en los dos formulados fue bajo ($3,00 \times 10^3$ UFC/g para el WG y $1,77 \times 10^2$ UFC/mL para el EC), en comparación con los descritos en la literatura para otros productos virales (Quiroga *et al.*, 2010). Por ejemplo, el producto Elcar, comercializado en Estados Unidos a base del nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850), presenta un contenido de contaminantes de 10^7 UFC/g (Shied, 1989), valor más de 1.000 veces mayor al obtenido en el presente estudio.

No se detectaron diferencias significativas entre el contenido de contaminantes del producto recién manufacturado y el de dicho producto durante los seis meses de almacenamiento a 6 °C ($F=2,56$; $df=3$; $P=0,071$), lo que indica que no hubo crecimiento microbiano a temperatura de refrigeración (Quiroga *et al.*, 2010).

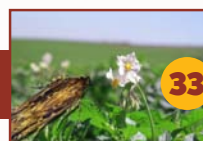
Cuando la temperatura de almacenamiento fue de 20 °C y 28 °C, se observó un aumento significativo ($F=9,66$; $df=11$; $P<0,005$) en la concentración de contaminantes del WG a partir del cuarto y el segundo mes respectivamente, frente al producto almacenado a 20 °C, lo cual pudo verse favorecido por el incremento de la humedad del producto. Sin embargo, el incremento de la contaminación fue mayor cuando el bioplaguicida se almacenó a 28 °C (Quiroga *et al.*, 2010), esto posiblemente porque dicha temperatura es adecuada para el crecimiento bacteriano (Burges, 1998).

Tabla 4. Comportamiento del contenido de contaminantes del WG y del EC (UFC/g) almacenados durante seis meses a tres temperaturas (Quiroga *et al.*, 2010).

Formulación	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)			
		0	2	4	6
WG	6 ± 2	3,00x10 ³ c	2,67x10 ³ c	1,67x10 ³ c	4,33x10 ³ bc
	20 ± 2		7,33x10 ³ bc	9,00x10 ³ a	9,93x10 ³ a
	28 ± 2		8,33x10 ³ ab	6,67x10 ³ b	7,33x10 ³ b
EC	6 ± 2	1,77x10 ² d	4,43x10 ² d	7,93x10 ² d	8,20x10 ² d
	20 ± 2		7,50x10 ² d	1,37x10 ² d	2,40x10 ² c
	28 ± 2		1,23x10 ² d	2,10x10 ² d	2,93x10 ² c

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de Tukey (95%).

Para el EC, la temperatura y tiempo de almacenamiento no afectaron el contenido de contaminantes a 6 °C. Sin embargo, el análisis estadístico detectó diferencias significativas



entre la cantidad de contaminantes presentada por el EC almacenado a 20 °C y 28 °C después de seis meses de almacenamiento con respecto al contenido de contaminantes presentado por el producto recién manufacturado ($F=35,9$; $df=11$; $P<0,005$) (Quiroga *et al.*, 2010).

Según Quiroga *et al.* (2010), dicho comportamiento sugiere que estas temperaturas favorecieron el crecimiento microbiano, posiblemente debido a que algunos componentes de la formulación oleosa podrían ser utilizados como sustrato por bacterias con actividad lipolítica (Pinto *et al.*, 2007).

Durante todo el tiempo de almacenamiento a las tres temperaturas, los dos prototipos de bioplaguicida (WG y EC) presentaron una concentración de microorganismos contaminantes que estuvo por debajo del límite máximo de calidad establecido previamente en el Laboratorio de Control de Calidad Biotécnica de Corpoica, que exige que la concentración de contaminantes sea inferior a 1×10^6 UFC/g o mL (Quiroga *et al.*, 2010).

Estabilidad biológica en almacenamiento: en todos los casos se encontraron larvas con síntomas de la infección (Quiroga *et al.*, 2010) (coloración blanca y con pérdida de la turgencia debido a la desintegración de los tejidos y órganos (Caballero *et al.*, 2001)).

No se detectaron diferencias significativas ($F=1,38$; $df=5$; $P=0,2663$) entre el porcentaje de eficacia que presentó el WG antes y después de seis meses de almacenamiento (Tabla 5). Santos *et al.* (2009) encontraron resultados similares al evaluar la actividad biocontroladora del producto comercial registrado en Colombia “Baculovirus Corpoica” después de almacenarlo a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante tres meses (Quiroga *et al.*, 2010).

Tabla 5. Eficacia biológica (%) del WG, del EC y del virus liofilizado durante seis meses de almacenamiento a tres temperaturas (Quiroga *et al.*, 2010).

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)	
		0	6
WG	6 ± 2	67,2 a	59,3 a
	20 ± 2		56,6 a
	28 ± 2		58,3 a
EC	6 ± 2	63,3 a	56,6 ab
	20 ± 2		53,3 ab
	28 ± 2		43,3 b
Virus liofilizado sin formular	6 ± 2	63,3 a	56,7 a
	20 ± 2		53,3 ab
	28 ± 2		56,7 a

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de Tukey (95%).

La alta estabilidad de la actividad insecticida de las formulaciones de granulovirus puede deberse a que los baculovirus toleran en algún grado la temperatura debido a

la protección brindada por el cuerpo de inclusión. Algunos estudios demuestran su tolerancia a condiciones de congelamiento por varios años y a temperaturas de hasta 50 °C por varias horas (Ignoffo y García, 1992).

La estabilidad del granulovirus formulado como un WG sugiere que los excipientes utilizados en la formulación fueron adecuados y mantuvieron la integridad viral durante el almacenamiento; no obstante, es necesario mejorar el sistema de sellado y tomar medidas para reducir la concentración de contaminantes desde el inicio de la producción (Quiroga *et al.*, 2010), ya que la presencia de microorganismos saprófagos puede afectar severamente la viabilidad del virus a largo plazo (Gipson y Scott, 1975). Lo anterior facilitará el almacenamiento del producto a temperatura ambiente y por lo tanto ahorrará costos de producción y transporte, evitando un costo adicional por el uso de una cadena de frío (Quiroga *et al.*, 2010).

En cuanto al EC, no se detectaron diferencias significativas entre la eficacia del producto recién manufacturado y la presentada después de seis meses de almacenamiento a 6 °C y 20 °C (Tabla 5), mientras que a 28 °C se presentó una reducción significativa del 20% ($F=5,77$; $df=5$; $P=0,006$). Este comportamiento podría estar relacionado con el aumento en la concentración de contaminantes que se evidenció desde el segundo mes del estudio en el EC almacenado a 28 °C (Quiroga *et al.*, 2010). Los contaminantes pudieron inactivar el virus por efectos de proteólisis de los cuerpos de inclusión o por la producción de radicales libres altamente oxidantes (Jones y Burges, 1997). Adicionalmente, esta menor actividad insecticida del EC almacenado a 28 °C podría también deberse a la formación de torta o 'caking' (sedimento compacto de difícil dispersión) que se produjo en dicho tratamiento. Este sedimento posiblemente aglomeró las partículas virales impidiendo su homogénea distribución y, en consecuencia, afectando la dosis aplicada (Quiroga *et al.*, 2010).

Para el virus liofilizado sin formular no se detectaron diferencias significativas entre los valores de eficacia obtenidos antes y después de seis meses a las tres temperaturas evaluadas ($F=1,77$; $df=5$; $p=0,1943$) (Tabla 5) (Quiroga *et al.*, 2010).

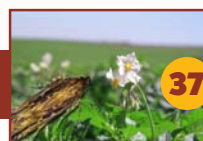
Para muchos autores, los baculovirus son considerados los mejores agentes biológicos para desarrollar bioplaguicidas, ya que pueden ser almacenados en preparaciones secas en oscuridad a temperaturas ambientales de 20 °C y 25 °C durante varios años (Quiroga *et al.*, 2010). Por ejemplo, el producto comercial llamado TM Biocontrol-1 tiene una vida útil de 5 años a temperaturas ambientales (Martignoni, 1978). Por tal razón, es recomendable hacer un estudio de vida útil por un período más largo de tiempo (de 12 a 48 meses) con el prototipo de formulación que se seleccione, para pasar a la fase de escalamiento y comercialización.



Bibliografía

- Argauer, R.; Shapiro, M.** (1997). Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Baculovirus. *Journal of Economic Entomology* 90 (2): 416-420.
- Aulton, M.** (2004). *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. España: Elsevier. 681 p.
- Barrera, G.; Cuartas, P.; Villamizar, L.** (2009). Comparative analysis of a granulin fragment of Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes*. Pamplona: IOBC wprs Bulletin. 45: 129-132.
- Batista, A.; Alves, S.; Augusto, N.; Pereira, R.; Alves, L.** (2001). Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatilis* Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotropical Entomology* 30 (3): 411-416.
- Burges, H. D.** (1998). *Formulation of microbial biopesticides beneficial, microorganisms, nematodes and seed treatments*. Netherland: Kluwer Academic Publishers. 412 p.
- Caballero, P.; López-Ferber, M.; Williams, T.** (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial M.V. Phytoma. España, S.l. 518 p.
- Carrera, M.; Zeddám, J.; Pollet, A.; Léry, X.; López-Ferber, M.** (2008). Evaluation of the *per os* insecticidal activity of baculoviruses by a nebulization method. *IOBC/WPRS Bull.* 31: 40-43.
- Chaparro, M.; Espinel, C.; Cotes, A.; Villamizar, L.** (2010). Fotoestabilidad y actividad insecticida de dos formulaciones de granulovirus sobre larvas de *Tecia solanivora*. *Revista Colombiana de Entomología*. 36 (1): 25-30.
- Chemical Regulation Directorate.** (2009). *Data Requirements Handbook*. York, UK: Mallard House. 3: 24-25.
- Espinel, C.; Gómez, J.; Villamizar, L.; Cotes, A.; Léry, X.; López-Ferber, M.** (2009a). Biological activity and compatibility with chemical pesticides of a Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes*. Pamplona: IOBC wprs Bulletin. 45: 145-148.
- Espinel, C.; Léry, X.; Villamizar, L.; Zeddám, J.; Cotes, A.; López-Ferber, M.** (2009b). A *Phthorimaea operculella* granulovirus (phopGV) containing several genotypes is highly efficient on *Tecia solanivora* *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes*. Pamplona: IOBC wprs Bulletin. 45: 83-86.
- Gipson, A.; Scott, C.** (1975). Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 62: 478-484.
- Ignoffo, C.; García, C.** (1992). Combinations of environmental factors and simulated sunlight affecting inclusion bodies of the Heliothis (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. *Environmental Entomology* 21: 210-213.

- Ignoffo, C.; García, C.; Saathoff, S.** (1997). Sunlight stability and rain-fatness of formulations of *Baculovirus Heliothis*. *Environmental Entomology* 26 (6): 1470-1474.
- Jones, K.; Burges, H.** (1997). Microbial insecticides: novelty or necessity. *British Crop Protection Council Symposium Proceedings* 68: 163-171.
- Lawrie, J.; Down, J. M.; Greaves, M. P.** (2001). Effects of storage on viability and efficacy of granular formulations of the microbial herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola*. *Biocontrol Science and Technology* 11: 283-295.
- Martignoni, M.** (1978). Virus in biological control: production, activity, and safety. *USDA Forest Service Technology Bulletin* 30: 140-145.
- Martignoni, M.; Iwai, P.** (1985). Laboratory evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of douglas-fir tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) *Baculovirus*. *Journal of Economic Entomology* 78: 982-987.
- Matthiessen, J.; Christian, R.; Grace, T.; Filshie, K.** (1978). Large-Scale field propagation and the purification of the granulosis virus of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bulletin of Entomological Research* 68: 385-391.
- Montalvo, E.** (1989). Introducción a la tecnología farmacéutica. Quito, Ecuador: Editorial Universidad Central de Quito. 92 p.
- Nehal, A.; Amal, N.; Nael, Z.; Hussein, K.** (1999). Stability and rheology of heavy Crude oil-in-water emulsion stabilized by an anionic-nonionic surfactant mixture. *Petroleum Science and Technology* 17 (6): 553-576.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development.** (2005). Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OECD Countries. Disponible en: <http://www.oecd.org/dataoecd/18/0/1900785.pdf> [Consulta: 7 de abril de 2011].
- Okuno, S.; Takatsuka, J.; Nakai, M.; Ototake, S.; Masui, A.; Kunimi, Y.** (2002). Viral-enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. *Biological Control* 26: 146-152.
- Pinto, A.; Uribe, L.; Blanco, J.; Fontecha, G.; Rodríguez, C.; Mora, M.; Janzen, D.; Chavarría, F.; Díaz, J.; Sittenfeld, A.** (2007). Actividades enzimáticas en aislamientos bacterianos de tractos digestivos de larvas y del contenido de pupas de *Automeris zugana* y *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera: Saturniidae). *Revista de Biología Tropical* 55 (2): 32-39.
- Quiroga, I.; Gómez, M.; Villamizar, L.** (2011). Estabilidad de formulaciones a base de *granulovirus* para controlar *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en campo. *Revista Colombiana de Entomología* 37 (1): 27-35.
- Salazar, R.** (2003). Tecnología farmacéutica industrial. Fabricación y control de medicamentos sólidos de administración por vía oral. España: Editorial Acribia. 34 p.
- Santos, A.; Villamizar, L.; García, M.; Beltrán, C.; Cotes, A.** (2009). Caracterización de un prototipo de bioplaguicida mixto para la protección de semilla de papa en almacenamiento. *Memorias VI Seminario Latinoamericano de Uso y Comercialización de la Papa*. Mar del Plata, Argentina: Asociación Latinoamericana de la Papa. 475-476.
- Senasa - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.** (2002). Resolución 489. Disponible en: <http://www.ambiente.bioetica.org/normas/02-489.htm>. [Consulta: 07 de abril de 2011].



- Shapiro, M.; Poh, P.; Bell, R.** (1983). Ultraviolet protection of the Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus. *Environmental Entomology* 12: 982-985.
- Shapiro, M.** (1992). Use of optical brighteners as radiation protectants for Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economic Entomology* 85 (5): 1682-1686.
- Shied, T.** (1989). Industrial production of viral pesticides. *Advances in Virus Research*. 36: 315-343.
- Sporleder, M.; Zegarra, O.; Kroschel, J.; Huber, J.; Lagnaoui, A.** (2000). Assessment of the inactivation time of *Phthorimaea operculella* granulovirus (PoGV) at different intensities of natural irradiation. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa. pp. 123-127.
- Támez, P.; Zamudio, V.; Martínez, J.; Rodríguez, C.; Reyes, S.; Gómez, R.** (2006). Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida. *Ciencia UANL* 4 (2): 149-156.
- Vargas, R.** (2003). Evaluación preliminar del método utilizado en la determinación de la fotoestabilidad de alimentos piscícolas. *Agronomía Mesoamericana* 14 (2): 193-199.
- Villamizar, L.; Zeddám, J. L.; Espinel, C.; Cotes, A.** (2005). Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV. *Revista Colombiana de Entomología* 31 (2): 127-132.
- Voight, R.; Bornschein, M.** (1982). Tratado de tecnología farmacéutica. España: Editorial Acribia. 297 p.
- Wang, P.; Granados, R.** (2000). Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30(2): 135-143.
- Zar, J.** (1999). Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice Hall. 4ta. edición. 663 p.