

CAPÍTULO 5.

Estabilidad de un bioplaguicida a base de granulovirus (VG003) formulado como un concentrado emulsionable (EC) bajo condiciones de almacenamiento

Liz Alejandra Uribe, BSc; Adriana Marcela Santos, cMSc; Laura Villamizar, PhD.

INTRODUCCIÓN

La estabilidad en almacenamiento es la capacidad de una formulación de permanecer durante determinado tiempo con unas propiedades físicas, químicas y microbiológicas inalterables (Gennaro; 1995); es un factor indispensable que se debe tener en cuenta en el desarrollo de un bioplaguicida para que en un futuro dicho producto pueda ser comercializado, garantizando su calidad y su efectividad durante su distribución y uso.

La evaluación de la estabilidad del bioplaguicida es un requisito de calidad, ya que durante el almacenamiento el principio activo puede sufrir alteraciones debido a factores del proceso de manufactura como el medio de cultivo utilizado para la producción masiva del microorganismo, el proceso de separación, el proceso de formulación y el embalaje del producto. Además, el microorganismo también puede ser afectado por la interacción de éste con los auxiliares de formulación y por las condiciones abióticas de almacenamiento, que incluyen la temperatura, la exposición a la luz, la atmósfera, la humedad relativa e incluso el material y el tipo de envase utilizado (Abadías *et al.*, 2001).

Para el caso de los bioproductos a base de baculovirus, es necesario tener en cuenta que la estabilidad microbiológica, fisicoquímica y biológica del producto es principalmente influenciada por el sistema de producción del agente viral que normalmente se realiza en el hospedero, lo que genera contaminación microbiana en la suspensión viral, proveniente de la microflora normal de los cadáveres de los insectos (Lasa *et al.*, 2008).

Dentro de las características más sensibles durante el almacenamiento de un bioplaguicida las de mayor importancia son la viabilidad y la actividad biocontroladora. Varios estudios han demostrado que el tiempo y la temperatura de almacenamiento afectan de forma negativa la viabilidad de los microorganismos y por tanto la actividad biocontroladora, generando disminución de la calidad del producto y depreciación de su valor comercial (Chiou y Wu, 2003). Sin embargo, se ha establecido que el almacenamiento



a bajas temperaturas y en un ambiente libre de humedad son condiciones que previenen la acumulación de metabolitos tóxicos y la utilización de nutrientes por parte de los microorganismos, logrando mantener durante el almacenamiento la estabilidad de las características microbiológicas, biológicas y fisicoquímicas del bioproducto (Sabaratnam y Traquair, 2002).

Quiroga *et al.* (2011) evaluaron la estabilidad microbiológica, biológica y fisicoquímica de un prototipo de formulación (concentrado emulsionable E) a base del granulovirus VG003 almacenado durante seis meses a tres temperaturas. A 6 °C y a 20 °C el prototipo fue estable, con eficacias de alrededor del 60%; comportamiento diferente al presentado en la temperatura de almacenamiento de 28 °C, en donde el producto fue inestable, puesto que se evidenció una reducción en la eficacia del 20%. Esta reducción fue atribuida a la formación de torta o 'caking', la cual posiblemente atrapó y aglomeró algunas partículas virales impidiendo su homogénea distribución en el momento de la reconstitución y, en consecuencia, afectó la dosis aplicada. Con el fin de aumentar la estabilidad bajo condiciones de almacenamiento y garantizar una buena eficacia en campo, dicha formulación se optimizó adicionando un agente viscosante para evitar la formación de 'caking'.

Considerando que la estabilidad de los bioplaguicidas en almacenamiento es un parámetro determinante para su registro y comercialización, y que la formulación original fue modificada para mejorar su vida útil, el objetivo del presente estudio fue evaluar la estabilidad microbiológica y biológica del concentrado emulsionable (EC) optimizado a base del aislamiento VG003 de granulovirus, almacenado a tres temperaturas diferentes durante 10 meses.

MATERIALES Y MÉTODOS

Treinta muestras de 1 mL de producto formulado como concentrado emulsionable (EC) se dispensaron en recipientes plásticos estériles de 2 mL de capacidad y se almacenaron a 8 ± 2 °C, 18 ± 2 °C y 28 ± 2 °C durante 10 meses. Antes de iniciar el almacenamiento y durante cada dos meses se evaluó el contenido de contaminantes y la actividad biológica de las muestras almacenadas.

El diseño del estudio de estabilidad fue completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo y tres repeticiones por tratamiento. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y posteriormente a comparaciones de medias de Tukey al 95% de confianza.

Estabilidad microbiológica

Este parámetro se determinó mediante el recuento de microorganismos contaminantes. Para tal fin, en cada tiempo de evaluación se reconstituyó una muestra del producto almacenada a cada temperatura evaluada, en 9 mL de Tween 80 al 0,1% (v/v), siendo esta la dilución 10^{-1} . A partir de esta dilución se prepararon las diluciones seriadas 10^{-3} y 10^{-4} . Posteriormente, se realizó una siembra en superficie en cajas de Petri con medio Agar

PDA + Tritón para la evaluación de hongos, en medio Agar Extracto de Levadura y Malta (YM) para la cuantificación de levaduras y en medio Agar Nutritivo para el recuento de bacterias contaminantes. Cada dilución se sembró por triplicado. El resultado se expresó como el recuento de unidades formadoras de colonia de contaminantes por mililitro de producto (UFC/mL).

Actividad biológica

Una muestra de producto almacenado a cada temperatura se reconstituyó y ajustó 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. Los tubérculos se dejaron secar e individualmente se ubicaron en un vaso plástico de 16 onzas con 60 g de arena estéril en el fondo. Posteriormente, con ayuda de un pincel se ubicaron 15 larvas neonatas de *T. solanivora* sobre cada tubérculo. Los recipientes se taparon e incubaron en oscuridad constante a 25 ± 1 °C durante 30 días.

Se contó con un testigo absoluto, en el que los tubérculos no recibieron ningún tratamiento. Terminado el tiempo de incubación se realizó un análisis destructivo de los tubérculos, recuperando todos los individuos y clasificando las larvas en vivas o muertas. Con los resultados de mortalidad en los tratamientos y el testigo se calculó el porcentaje de eficacia según la fórmula de Schneider-Orely (Gómez *et al.*, 2005).

$$\text{Eficacia (\%)} = ((B - K) / (100 - K)) \times 100$$

Donde K es el porcentaje de mortalidad del testigo y B es el porcentaje de mortalidad en el tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estabilidad microbiológica

El concentrado emulsionable (EC) recién manufacturado presentó un contenido de contaminantes de $2,2 \times 10^5$ UFC/mL, valor que fue inferior al límite máximo de calidad establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica para este producto, el cual es de 1×10^6 UFC/mL. La baja contaminación podría deberse a la oportuna recolección de las larvas infectadas, las que fueron cosechadas antes de morir evitando la proliferación de bacterias contaminantes que generalmente se encuentran en el intestino del insecto o de saprófagos oportunistas (Caballero *et al.*, 2001). Dicha concentración de contaminantes es inferior a la descrita para algunos productos virales, como la formulación del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) evaluada por Lasa *et al.* (2008), que recién manufacturada mostró un contenido de bacterias de $1,4 \times 10^7$ UFC/mL.

Cuando el bioplaguicida formulado como concentrado emulsionable (EC) fue almacenado durante los 10 meses del estudio, se evidenció una disminución progresiva en el contenido de contaminantes a las tres temperaturas evaluadas. A 8 °C



y 18 °C el concentrado emulsionable presentó un contenido final de contaminantes significativamente inferior al presentado por el producto recién manufacturado, con una concentración final de $1,33 \times 10^3$ UFC/mL (Figura 17).

Después de dos meses de almacenamiento a 28 °C, el contenido de contaminantes presentado por el producto EC ($1,33 \times 10^5$ UFC/mL) no fue significativamente diferente ($P > 0,05$) del valor presentado inicialmente. No obstante, a partir del cuarto mes de almacenamiento dicho valor disminuyó hasta una concentración final de $3,67 \times 10^3$ UFC/mL (Figura 17).

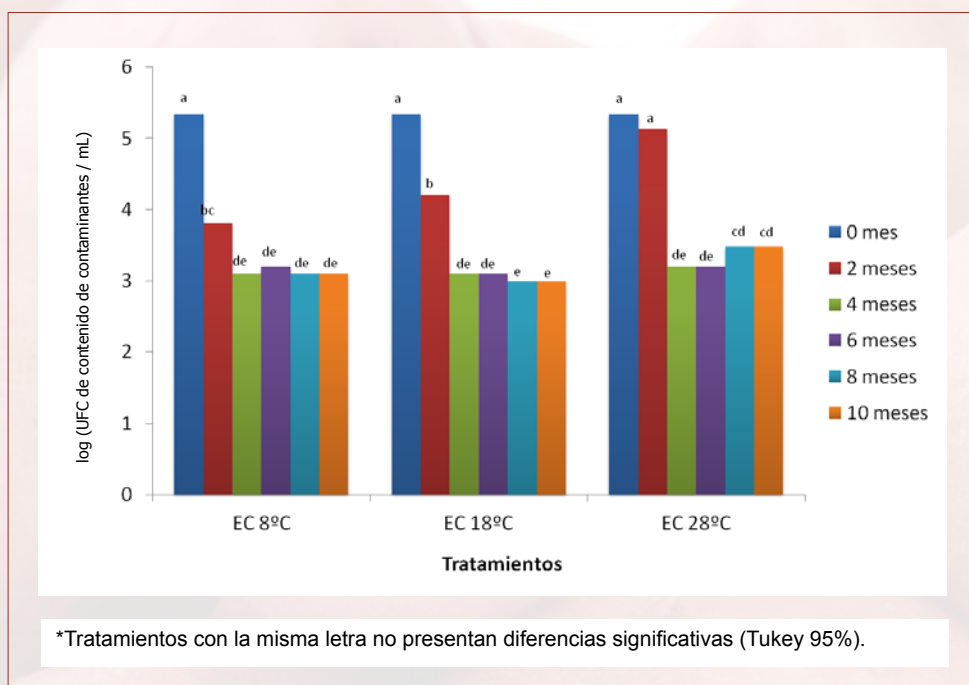


Figura 17. Comportamiento del contenido de contaminantes en el concentrado emulsionable (EC) a base de granulovirus VG003 almacenado a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante 10 meses.

A bajas temperaturas de almacenamiento (8 °C y 18 °C) se observó que el contenido de contaminantes disminuyó rápidamente desde el segundo mes de almacenamiento, mientras que a 28 °C se presentó una disminución significativa de este valor a partir del cuarto mes.

La contaminación microbiana inicial del concentrado emulsionable (EC) pudo ser aportada por el ingrediente activo viral, cuya producción se realiza *in vivo*, lo que genera una carga importante de bacterias y hongos saprofitos que colonizan las dietas, la superficie del insecto, el intestino y las heces del mismo. La gran mayoría de estos microorganismos son generalmente especies comunes de *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp. y especies coliformes de la familia Enterobacteriaceae (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Jenkins y Grzywacz (2000) sugirieron que las formulaciones a base de baculovirus que presentan un nivel de contaminación superior a 10^8 UFC/g podrían igualmente presentar una pérdida de la virulencia durante el almacenamiento debido a la actividad metabólica de las bacterias contaminantes, ya que puede existir un proceso de proteólisis de los cuerpos de inclusión. Cabe destacar que el producto evaluado en el presente trabajo mostró contaminantes 1.000 veces por debajo de ese valor, por lo que se esperará que el producto mantenga estable su actividad insecticida durante los 10 meses de almacenamiento.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el bioplaguicida formulado como concentrado emulsionable (EC) a base del granulovirus VG003 fue microbiológicamente estable durante 10 meses de almacenamiento a 8 °C, 18 °C y 28 °C, ya que mantuvo una concentración de contaminantes inferior al límite de máximo 1×10^6 UFC/mL (Quiroga *et al.*, 2011), lo que sugiere que ni la temperatura, ni el tiempo de almacenamiento afectaron la calidad microbiológica del producto.

Estabilidad biológica

El concentrado emulsionable (EC) optimizado presentó una eficacia del 100% inmediatamente después de ser manufacturado, siendo este valor igual al presentado por el virus liofilizado sin formular (datos no mostrados). Asimismo, es necesario resaltar que dicho valor es superior al obtenido por Quiroga *et al.* (2011), quienes evaluaron el prototipo de formulación sin optimizar y obtuvieron una eficacia inicial del 63,3%. Este resultado sugiere que la adición del agente viscosante mejoró el desempeño de la formulación, como lo sugirieron Ballard *et al.* (2000), quienes mencionan que la selección adecuada de excipientes contribuye al aumento de la actividad insecticida, a la estabilidad en almacenamiento y a la persistencia de los virus en condiciones de campo, siendo esto un criterio para la selección y optimización de formulaciones.

Cuando el bioplaguicida EC fue almacenado a 8 °C, no se evidenció una disminución significativa de la eficacia ($P > 0,05$) durante 8 meses de almacenamiento. En el décimo mes se obtuvo una eficacia final del 81,5%, valor significativamente inferior al presentado recién manufacturado el producto (Figura 18). Sin embargo, estos valores son superiores al límite establecido para esta característica (80%) por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica, el cual se encuentra registrado ante el ICA y cuenta con el aval para realizar esta prueba (Resolución 003174 de 2010).

A las temperaturas de almacenamiento de 18 °C y 28 °C, el concentrado emulsionable (EC) a base de baculovirus presentó eficacias superiores al 80% durante ocho meses de almacenamiento. A partir del décimo mes del estudio, las eficacias fueron significativamente inferiores a las presentadas inicialmente con valores del 74,1% y del 53,7% respectivamente. Jenkins y Grzywacz (2000) argumentan que la pérdida de la actividad insecticida puede ser el resultado de una autocatálisis de las proteínas o los lípidos presentes en el producto y que son remanentes del sistema de producción viral, el cual se realiza *in vivo*. Este mecanismo puede inactivar el virus debido a una proteólisis de los cuerpos de inclusión o por la producción de radicales libres (Grzywacz *et al.*, 1997).



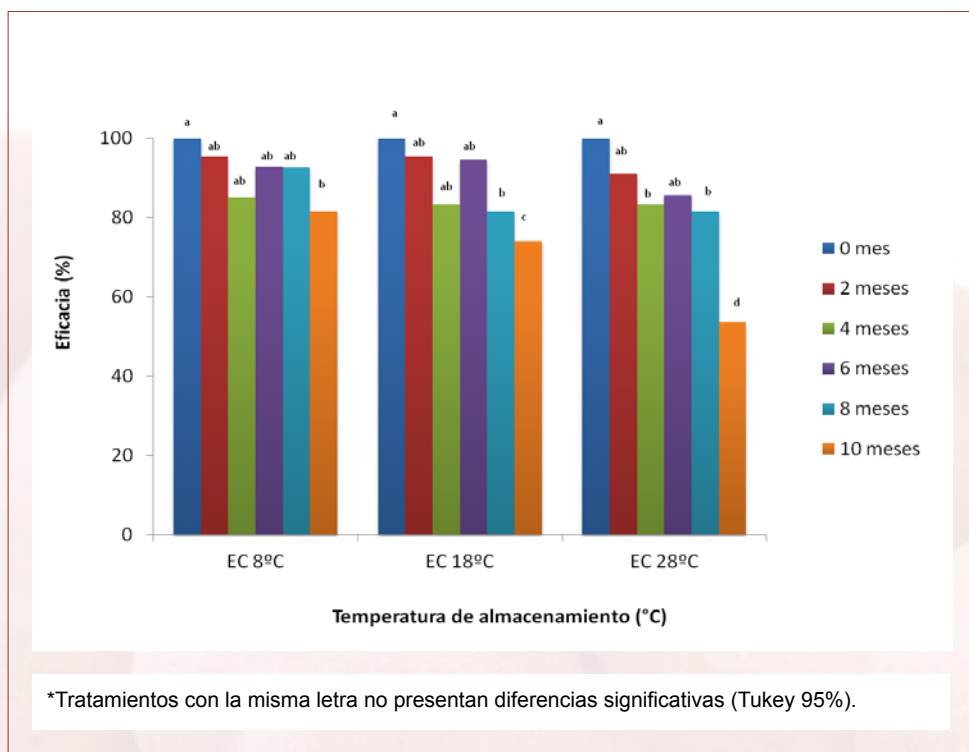


Figura 18. Comportamiento de la eficacia del concentrado emulsionable (EC) a base de baculovirus almacenado a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante 10 meses.

Así, los resultados obtenidos en el presente estudio son superiores a los presentados por Quiroga *et al.* (2011), quienes evaluaron la actividad biocontroladora del prototipo de formulación EC sin optimizar almacenado a 6 ± 2 °C, 20 ± 2 °C y 28 ± 2 °C. Los autores evidenciaron que en las temperaturas de refrigeración (6 °C) y ambiente (20 °C) el producto no presentó una pérdida significativa de eficacia, siendo estable durante seis meses de almacenamiento. A 28 °C el producto almacenado presentó una disminución del 20% en la eficacia, lo que se atribuyó a la formación de torta en el fondo del recipiente.

El bioplaguicida EC optimizado, objeto del presente trabajo, no presentó la formación de torta durante el tiempo de almacenamiento a las diferentes temperaturas evaluadas, lo que indica que la adición del agente viscosante redujo la sedimentación de las partículas, incrementando la vida útil del producto. Por ejemplo, a 8 °C el concentrado emulsionable (EC) optimizado presentó una estabilidad de 10 meses, cuatro meses más comparado con el valor obtenido por Quiroga *et al.* (2011). A las temperaturas de 18 °C y 28 °C, el EC fue estable durante 8 meses, siendo estos valores superiores al presentado por el prototipo de bioplaguicida sin optimizar.

La disminución de la actividad biológica a través del tiempo de almacenamiento ha sido evidenciada por diferentes autores como Támez *et al.* (2006), quienes observaron una reducción significativa en la eficacia de una formulación granulada a base del

NPV de *Anagrapha falcifera* (Kirby, 1837), almacenada durante ocho meses a 25 °C, comportamiento que se atribuyó a un incremento en la concentración de contaminantes debido a un aumento de la humedad desde el tercer mes de almacenamiento. Lacey *et al.* (2008), al evaluar la estabilidad de una formulación a base del granulovirus de *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) almacenada durante 12 meses a -20 °C, 2 °C, 25 °C y 35 °C, evidenciaron que las temperaturas bajas estabilizaron el producto, mientras que la temperatura de 35 °C causó una disminución en la actividad insecticida. Lo anterior posiblemente se debió a que temperaturas altas (>35 °C) pueden causar la denaturación del ADN o de las proteínas del virus, y por lo tanto se inactiva disminuyendo su actividad bicontroladora.

CONCLUSIÓN

Dado que el EC fue microbiológicamente estable durante los diez meses del estudio a las tres temperaturas de almacenamiento, y que la actividad insecticida del producto se mantuvo por encima del límite mínimo del 80% durante 8 meses de almacenamiento a 18 °C y 28 °C, se establece que la vida útil del bioproducto es de 8 meses cuando se almacena a temperaturas inferiores a 28 °C, no requiriéndose cadena de frío para su distribución y comercialización.



Bibliografía

- Abadías, M.; Teixidó, N.; Usall, J.; Benabarre, A.; Viñas, I.** (2001). Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agente *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of food protection*. 64(6): 856-861.
- Ballard, J.; Ellis, D.; Payne, C.** (2000). The role of formulation additives in increasing the potency of *Cydia pomonella* granulovirus for codling moth larvae, in laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and technology*. 10: 627-640.
- Caballero, P.; López-Ferber, M.; Williams, T.** (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Navarra, España: Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. 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.
- Chiou, A. L.; Wu, W. S.** (2003). Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for Control of Lily Grey Mould (*Botrytis elliptica*). *Journal of Phytopathology*. 151: 13-18.
- Gennaro, A.** (1995). Remington Pharmacy. Editorial University of the Sciences in Philadelphia. 650-680.
- Gómez, J.; Villamizar, L.; Espinel, C.; Grijalba, E.; Torres, L.; Cotes, A.** (2005). Reconocimiento, selección y evaluación de aislamientos nativos de virus de la granulosis para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. Bogotá, Colombia: Produmedios. 24 p.
- Grzywacz, D.; McKinley, D.; Jones, K. A.; Moawad, G.** (1997). Microbial contamination in *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus produced in insects in Egypt. *Journal of Invertebrate Pathology*. 69: 151-156.
- Jenkins, N.; Grzywacz, D.** (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents- Assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology* 10: 753-777.
- Lacey, L.; Headrick, H.; Arthurs, S.** (2008). Effect of Temperature on Long-Term Storage of Codling Moth Granulovirus Formulations. *Journal of economic entomology*. 101 (2): 288-294.
- Lasa R.; Williams, T.; Caballero, P.** (2008). Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) formulation stored at different temperatures. *Journal of Economic Entomology* 101: 42-49.
- 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.
- Sabaratnam, S.; Traquair, J.** (2002). Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of rhizoctonia damping-off in tomato transplants. *Biological Control*. 23: 245-253.
- Támez, P.; Zamudio, V.; Martínez, J.; Rodríguez, C.; Támez, R.; Gómez, R.** (2006). Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida. *Ciencia UANL*. 10(2). 149-156.