EFECTO DE DOS FORMULACIONES EN LA FOTOESTABILIDAD Y EFICACIA DE UN GRANULOVIRUS PARA EL CONTROL DE TECIA SOLANIVORA

MARTHA LILIANA CHAPARRO RODRIGUEZ

22448

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTA D.C. JUNIO DE 2008

22448

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

Reg 55791
27 JUL. 2009

EFECTO DE DOS FORMULACIONES EN LA FOTOESTABILIDAD Y EFICACIA DE UN GRANULOVIRUS PARA EL CONTROL DE *Tecia solanivora*

MARTHA LILIANA CHAPARRO RODRÍGUEZ

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito para
Optar al título de

Microbióloga Industrial

LAURA FERNANDA VILLAMIZAR M.Sc
Directora

CARLOS ESPINEL
Codirector

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C., 23 DE JUNIO DE 2008

EFECTO DE DOS FORMULACIONES EN LA FOTOESTABILIDAD Y EFICACIA DE UN GRANULOVIRUS PARA EL CONTROL DE *Tecia solanivora*

MARTHA LILIANA CHAPARRO RODRÍGUEZ

APROBADO

LAURA VILLAMIZAR
Química Farmacéutica, Ph.D.
Directora

CARLOS ESPINEL
Biologo, M.Sc.
Coodirector

MAGDA XIOMARA GARCÍA
Jurado

DAVID GÒMEZ. M.Sc.
Jurado

EFECTO DE DOS FORMULACIONES EN LA FOTOESTABILIDAD Y EFICACIA DE UN GRANULOVIRUS PARA EL CONTROL DE *Tecia solanivora*

MARTHA LILIANA CHAPARRO RODRÍGUEZ

APROBADO

INGRID SCHULER, Ph.D.	**JANETH ARIAS, M.Sc.**
Decana Académica	**Directora de la Carrera**

A Dios por brindarme la oportunidad de realizar este maravilloso trabajo, a mi familia por brindarme todo su apoyo y sabiduría ,a mis amigos quienes me acompañaron en toda mi carrera y a Mauricio por su gran comprensión y dedicación

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alba Cotes Prado Directora del Laboratorio de Control Biológico del Centro del Biotecnología y Bioindustria CBB - Corpoica , por permitirme ingresar a su grupo de trabajo y por toda su colaboración y aporte.

A Laura Villamizar, Q.F. M.Sc., investigadora del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria CBB – Corpoica y directora de este trabajo, por toda su colaboración, dedicación y empeño puesto en todo el proceso.

A Carlos Espinel, B. M.Sc. investigador del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria CBB – Corpoica y codirector de este trabajo, por su colaboración y aporte.

A los auxiliares del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria CBB – Corpoica por toda su colaboración, apoyo y contribución en este trabajo.

A los investigadores del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria CBB – Corpoica por sus sugerencias, críticas constructivas que me permitieron crecer a nivel personal y profesional.

A todos los estudiantes del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria CBB – Corpoica por su amistad, apoyo incondicional, sugerencias y por compartir momentos tanto buenos como malos que me ayudaron a crecer y a forjarme como profesional.

RESUMEN

Teniendo en cuenta las importantes pérdidas económicas causadas por la polilla guatemalteca de la papa en este cultivo, el laboratorio de Control Biológico de Corpoica desarrolló dos formulaciones a base de un granulovirus nativo (aislamiento VG003), las cuales incluyen un protector UV del grupo de los abrillantadores ópticos, considerando que la luz ultravioleta del sol es el factor más deletéreo sobre la persistencia de los baculovirus bajo condiciones de campo. Para evaluar la fotoestabilidad brindada por el protector UV, éstas fueron expuestas a una fuente de luz ultravioleta artificial 2, 4, 6, 8 y 10 horas. Las formulaciones fueron aplicadas sobre tubérculos de papa pastusa, las cuales se expusieron a la radiación y posteriormente sobre cada una de ellas fueron colocadas 10 larvas neonatas de *T. sonalivora* y se midió el efecto de la luz UV, expresado como el nivel de inactivación del virus, con respecto a la mortalidad de las larvas. De igual manera se evaluó el efecto potenciador del fotoprotector sobre el aislamiento viral VG003 y su inocuidad sobre larvas de *T. solanivora*. Para determinar el efecto potenciador, se tomó el virus puro y se mezcló con el fotoprotector. Se utilizaron concentraciones virales desde $1x10^2$ hasta $1x10^6$ CI/mL, las cuales se mezclaron con el fotoprotector al 0,1% y al 0,5% y se realizó un bioensayo que permitió determinar las CL_{50} del virus puro y mezclado con el fotoprotector. Para evaluar la inocuidad del fotoprotector y de los excipientes de las formulaciones, éstos fueron aplicados sobre los tubérculos de papa y se realizó un bioensayo. Las dos formulaciones (concentrado emulsionable y granulado dispersable) protegieron eficientemente el virus del efecto de la radiación UV, obteniéndose una eficacia del 60% después de 10 horas de exposición para el concentrado emulsionable, del 46,6% para el granulado dispersable y del 23,3% para el virus puro. Con respecto al efecto potenciador de la actividad biocontroladora se observó que a medida que aumentó la concentración del fotoprotector, aumentó la eficacia del virus, obteniéndose una CL_{50} de $1,6x10^6$ CI/mL para el virus puro, de $3,0x10^5$ CI/mL para el virus con el fotoprotector al 0,1% y de $3,0x10^4$ CI/mL para el virus con el fotoprotector al 0,5. En el ensayo de inocuidad de los excipientes de las formulaciones y el abrillantador óptico utilizado como protector UV, se determinó que éstos no causan mortalidad de las larvas por lo que se puede concluir que la mortalidad causada por la formulaciones se debió al efecto del agente viral empleado como principio activo.

ABSTRACT

Taking into account, the important economic losses caused by the Guatemalan potato moth in this crop, the laboratory of Biological Control of Corpoica developed two formulations based on a native granulovirus (isolate VG003), which include a UV sunscreen of the group of optical brighteners, considering that UV radiation from sunlight is the most deleterious factor over the persistence of baculoviruses under field conditions. To evaluate the photostability given by the UV sunscreen, these were exposed to an artificial UV light source during 2,4,6,8 and 10 hours. The formulations were applied over potato tubers that were exposed to radiation and afterwards, 10 neonate larvae were placed on top of them. The effect of UV radiation was measured as viral inactivation in regards to larval mortality. In the same way the enhancing effect of the sunscreen over the viral isolation VG003 and its harmlessness over *T. solanivora* larvae were evaluated. For the enhancing effect, the pure virus was mixed with the sunscreen at viral concentrations from $1x10^2$ until $1x10^6$ CI/mL, these were mixed with the sunscreen at 0,1% and 0,5% and a bioassay was performed to determine the LD_{50} of the pure virus and the mixture with sunscreen. To evaluate the harmlessness of the sunscreen and the excipients over the larvae, a bioassay was performed. Both formulations (emulsifiable concentrate and dispersible granulate) efficiently protected the virus form UV radiation obtaining an efficacy of 60% for the emulsifiable concentrate and 46,6% for the dispersible granulate after 10 hours of exposure. In regards to the effect over biocontrol activity, it was observed that the efficiency of the virus increased proportionally to the increase on the sunscreen concentration, obtaining a LD_{50} of $1,6 x10^6$ CI/ mL for the virus with the sunscreen at 0,5%. In the harmlessness bioassay of the excipients and the brightener used as UV sunscreen, it was determined that these do not cause larval mortality, from which can be concluded that the mortality caused by the formulations is due to the viral agent used as active ingredient.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 8

2. MARCO TEÒRICO 10

2.1. *Tecia solanivora* 10

2.1.1 Importancia económica 10

2.1.2. Ciclo de Vida 11

2.1.2.1 Huevo 11

2.1.2.2 Larva 12

2.1.2.3 Pupa 13

2.1.2.4 Adulto 14

2.1.3. Manejo integrado de *Tecia solanivora* (POVOLNY) 14

2.1.3.1. Control Cultural 15

2.1.3.2. Control Etológico 16

2.1.3.3. Control Químico 16

2.1.3.4. Control Biológico 17

2.1.3.4.1. Virus entomopatógenos 17

2.2. Baculovirus 18

2.2.1. Estructura y Composición 19

2.2.1.1. Nucleocápside 19

2.2.1.2. Los viriones 19

2.2.1.3. Cuerpos de Inclusión 20

2.2.2. Clasificación de los Baculovirus 21

2.2.3 Modo de Acción 21

2.2.3.1. Infección Primaria 22

2.2.3.2. Infección Secundaria 23

2.2.4. Sintomatología de infección viral 24

2.2.5. Efecto de los factores ambientales sobre los baculovirus 25

2.2.5.1 Temperatura 25

2.2.5.2 pH 25

2.2.5.3. Humedad 26

2.2.5.4. Radiación solar 26

2.2.5.4.1 Radiación UV....26
2.2.5.4.1.1 Radiación UV tipo A....27
2.2.5.4.1.2 Radiación UV tipo B....27
2.2.5.4.1.3. Radiación UV tipo C....28
2.2.5.4.2 Efectos de la Radiación Solar sobre la persistencia de virus en el ambiente....28
2.3. Formulación de Baculovirus....29
2.3.1. Coadyuvantes....31
2.3.1.1.Surfactantes....32
2.3.1.2.Adherentes....32
2.3.1.3.Aglutinantes....32
2.3.1.4.Agentes de fluidez....33
2.3.1.5.Amortiguadores de pH....33
2.3.1.6.Los cebos y estimulantes alimenticios....33
2.3.1.7.Fotoprotectores....33
2.3.1.7.1.Absorbentes....34
2.3.1.7.2.Antioxidantes....36
2.3.1.7.3.Enzimas....37
2.3.1.7.4.Microencapsulación....37
2.3.1.8.Potenciadores....37
3. JUSTIFICACIÓN....39
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA....43
5. OBJETIVOS....44
5.1. OBJETIVO GENERAL....44
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS....44
6. MATERIALES Y MÈTODOS....45
6.1 Propagación Viral....45
6.2.Determinación del efecto fotoprotector de los dos prototipos de formulación....45
6.3. Determinación de la inocuidad de los auixiliares de formulación de cada prototipo de bioplaguicida sobre larvas de la polilla guatemalteca....48

6.4.Evaluación del efecto potenciador del filtro UV sobre la actividad del aislamiento de granulovirus VG003 49
7. RESULTADOS Y DISCUCIÓN 52
7.1.Determinación del efecto fotoprotector de los dos prototipos de formulación 52
7.2.Determinación de la inocuidad de los auxiliares de formulación de cada prototipo de bioplaguicida sobre larvas de la polilla guatemalteca 63
7.3.Evaluación del efecto potenciador del filtro UV sobre el aislamientode granulovirus VG003 66
8. CONCLUSIONES 74
9. RECOMENDACIONES 75
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 76
11. ANEXOS 85

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Eficacia, inactivación y actividad original remanente de las formulaciones a base del aislamiento de granulovirus VG003, expuestos a la radiación UV.....54

Tabla 2- Resultados del análisis probit del ensayo dosis – respuesta para el virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0,1% y al 0,5%. 69

Tabla 3. Efecto del fotoprotector CBUV05 sobre las larvas de *T. solanivora*. Tratamiento con la misma letra no son significativamente diferentes según el análisis DMS 95% 71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Huevo de *Tecia solanivora* (Villamizar *et al.*, 2006).....11
Figura 2. Larva de *T. solanivora* (Villamizar *et al.*, 2006).....12
Figura 3. (a) Pupa de *Tecia solanivora* (b) Pupa de *Tecia solanivora* en 13
la superficie del tubérculo de la papa (Villamizar *et al.*, 2006).....13
Figura 4. Adulto de *Tecia solanivora* (Villamizar *et al.*, 2006).....14
Figura 5. Estructura de los baculovirus (Wikpedia, 2008).....20
Figura 6. Esquema del ciclo de infección (Friesen & Miller, 2001). 22
Figura 7. Sintomatología de infección viral (Cuartas, 2007) 24
Figura 8. Formulaciones de baculovirus a base del aislamiento VG003 **a.** Granulado dispersable **b.** Concentrado emulsionable.....46
Figura 9. Ubicación de los tratamientos para la exposición a la 47
radiación ultravioleta.....47
Figura 10. Efecto de la radiación UV sobre la eficacia de dos formulaciones (granulado dispersable y concentrado emulsionable) a base del aislamiento VG003 de granulovirus. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).....52
Figura 11. Actividad original remanente del concentrado emulsionable expuesto a radiación UV. Tratamiento con la misma letra no son significativamente diferentes según el análisis de varianza (95%).....56
Fig 12. Actividad original remanente del granulado dispersable expuesto aradiación UV Tratamiento con la misma letra no son significativamente diferentes según el análisis de varianza (95%) 57
Fig 13. Actividad original remanente del virus puro sin formular expuesto a radiación UV. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de comparación de medias de Tukey (95%).....58
Figura 14. Efecto de excipientes de los dos prototipos de formulaciones incluyendo o no el filtro UV, sobre las larvas de *T. solanivora* .Tratameintos con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Kruskall wallis (95%) 64

Figura 15. Curvas de regresión obtenidas en la evaluación dosis- respuesta del aislamiento VG003 sobre larvas de *T. solanivora*. **a.** Virus puro sin fotoprotector. **b.** Virus puro con fotoprotector al 0.1%. **c.** Virus puro con fotoprotector al 0.5% 68

Figura 16. Eficacia del virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0.1% y al 0.5%. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de comparación de medios de Tukey (95%).....70

INDICE DE ANEXOS

11.1. ANEXO 1. Datos brutos de exposición a luz ultravioleta de las dos formulaciones evaluadas (granulado dispersable y concentrado emulsionable) 86

11.2. ANEXO 2. Análisis estadístico de exposición a luz ultravioleta de las dos formulaciones evaluadas (granulado dispersable y concentrado emulsionable) 88

11.3. ANEXO 3. Anova de Concentrado emulsionable expuesto a radiación UV 90

11.4. ANEXO 4. Anova de granulado dispersable expuesto a radiación UV91

11.5. ANEXO 5. Anova y tukey del virus puro expuesto a radiación UV.....92

11.6. ANEXO 6. Datos brutos del efecto de excipientes (sin virus) de los dos prototipos de formulaciones sobre las larvas sin filtro ultravioleta y con filtro ultravioleta 93

11.7. ANEXO 7. Kruskall Wallis de efecto de excipientes (sin virus) de los dos prototipos de formulaciones sobre las larvas sin filtro ultravioleta y con filtro ultravioleta 94

11.8. ANEXO 8. Datos brutos del ensayo eficacia del virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0.1% y al 0.5% 96

11.9. ANEXO 9. Analisis probit del ensayo dosis – respuesta para el virus puro 98

11.10 ANEXO 10. Analisis probit del ensayo dosis – respuesta para el virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0.1%..... 99

11.12. ANEXO 12. Anova y tukey del ensayo eficacia del virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0.1% y al 0.5% 101

11.13. ANEXO 13. Datos brutos de la eficacia del fotoprotector CBUV05 sin virus..... 102

11.14. ANEXO 14. DMS de la eficacia del fotoprotector CBUV05 sin virus103

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa es indudablemente uno de los más importantes en Colombia debido a la gran cantidad de hectáreas cultivadas (180.000 ha), a su utilización en la canasta familiar y a su generación de empleo. Sin embargo, éste se ve afectado por diferentes enfermedades e insectos plaga que provocan daños en el producto, generando grandes pérdidas para los agricultores (Echeverría, 1998).

Dentro de las plagas más importantes de este cultivo se destacan la polilla de la papa *Tecia solanivora*, que pertenece al complejo de polillas o palomillas que atacan el cultivo de papa en la región Andina, ocasionando daños tanto bajo condiciones de campo como de almacenamiento (Niño & Notz, 2000).

El control y manejo de este insecto plaga generalmente se ha basado en el uso indiscriminado de insecticidas químicos, los cuales no han sido eficientes y presentan problemas de contaminación ambiental (Herrera *et al.*, 2000). Esto ha llevado a desarrollar una estrategia de manejo integrado de plagas MIP, la cual está basada en la combinación del control químico, etológico, cultural y biológico, permitiendo que el cultivo de papa sea competitivo y sostenible (Herrera *et al.*, 2000).

El control biológico incluye la utilización de organismos patógenos, parasitoides y depredadores del insecto plaga, siendo los virus, una de las alternativas más promisorias para el control de *T. solanivora* (Rodríguez, 2000). Sin embargo, existen algunos factores que influyen en la eficacia de los virus entomopatógenos en campo, como la temperatura, la humedad, el pH, la composición del suelo, el follaje de la planta y la radiación solar (Young, 2005). Para algunos baculovirus se ha demostrado que los

principales factores limitantes son la exposición a altas temperaturas, a pH alcalino o ácido y a la luz solar (Ignoffo & García, 1992).

Dentro de estos factores ambientales, el que produce la mayor inactivación y afecta en mayor proporción la estabilidad de los virus entomopatógenos, es la radiación solar. La inactivación causada por la luz solar puede ser muy rápida y se debe principalmente a la porción del espectro de luz ultravioleta (UV) (Shapiro *et al.*, 1983), 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).

Se han realizado diferentes trabajos en búsqueda de herramientas que proporcionen protección a los virus, inhibiendo o retardando la fotoinactivación, para lo cual se han probado diferentes sustancias con efecto fotoprotector, como la adición de sustancias reflejantes o absorbentes de la luz UV, colorantes y abrillantadores ópticos entre otros (Caballero *et al.*, 2001).

Algunos de estos fotoprotectores empleados en la formulación de bioplaguicidas, 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).

1. MARCO TEÒRICO

2.1. *Tecia solanivora*

La "polilla guatemalteca" *Tecia solanivora* Povolny es un insecto que pertenece al orden Lepidóptera, familia Gelechiidae, que fue descrita por Dalibor Povolny en 1973 e inicialmente se llamó *Scrobipalposis solanivora* (Herrera *et al.*, 2000). El insecto es de hábito monófago, ya que se alimenta en su estado larval exclusivamente del tubérculo de la papa, esto hace que sus poblaciones se encuentren sujetas a la presencia de los tubérculos, ya sea en campo o en almacenamiento (Soriano, 1999).

2.1.1 Importancia económica

Tecia solanivora conocida como polilla grande o guatemalteca, por sus hábitos y las características de sus daños, es el insecto que representa una de las plagas con mayor potencial de daño para el cultivo de la papa en zonas productoras. El daño económico es básicamente producido por las larvas, las cuales tan pronto emergen, se dirigen al tubérculo, raspan la epidermis y penetran en él perforándolo. Luego, forman galerías superficiales y profundas, dejando excrementos que favorecen el desarrollo de patógenos secundarios y provocan la pudrición de la papa, la cual puede perder por completo su valor comercial (Soriano, 1999).

En varios países se han realizado investigaciones para el control de *T. solanivora*, insecto que ha sido reportado en Costa Rica, Guatemala, Panamá, Honduras, Venezuela, Colombia y Ecuador (Sotelo, 1997).

En nuestro país, la polilla guatemalteca es en la actualidad la principal plaga en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. El daño que generan las

larvas de este insecto tanto en campo como en almacenamiento, causa pérdidas que oscilan entre el 50% y el 100% (Villamizar *et al.*, 2006).

2.1.2. Ciclo de Vida

La polilla guatemalteca de la papa presenta una metamorfosis completa, es decir, que pasa por los estados de huevo, larva, pupa y adulto, ciclo que tiene una duración entre 65 y 93 días, lo cual depende básicamente de la temperatura ambiental (López & Espítia, 2000).

2.1.2.1 Huevo

Los huevos de *T. solanivora* son de forma ovalada (Fig.1), miden en promedio 0,53 mm de largo y 0,41 mm de ancho. Recién colocados son de color blanco aperlado, a medida que siguen la incubación se tornan de color amarillento y al acercarse el momento de la eclosión se van oscureciendo tomando un color marrón oscuro, proceso que ocurre de 9 a 15 después de la postura (Herrera *et al.*, 2000).

Figura 1. Huevo de *Tecia solanivora* (Villamizar *et al.*, 2006).

Los huevos generalmente son colocados en masa o en grupos sobre los tubérculos. En campo se encuentran en pequeños grupos en el cuello de la raíz, sobre las hojas bajas de la planta y en el área de tuberización. En

almacenamiento los huevos son colocados en los tubérculos o en cualquier cavidad o lugar protegido (Araque & García, 1999)

2.1.2.2 Larva

A partir del huevo emerge una larva de aproximadamente 1 mm de longitud, la cual es de tipo erusciforme o con forma de gusano con cabeza esclerotizada. (Fig.2). Tienen tres pares de patas toráxicas, cuatro pares de pseudopatas y un par de patas anales (Herrera *et al.*, 2000).

Figura 2. Larva de *T. solanivora* (Villamizar *et al.*, 2006).

Las larvas pasan por cuatro ínstares, los cuales transcurren dentro del tubérculo. Las larvas del primer ínstar penetran en el tubérculo a través de un pequeño orificio que abren con sus mandíbulas y comienzan a alimentarse de la pulpa. Estas se caracterizan por ser de color blanco transparente y su cabeza de color marrón oscuro. Las larvas de segundo ínstar se caracterizan por tener un color blanco crema y realizar minas superficiales en los tubérculos. Las del tercer ínstar son de color amarillo verdoso con puntos más visibles y se caracterizan por formar galerías profundas, siendo el estado más voraz. En el cuarto y último estado larval, los individuos alcanzan en promedio 14 mm de largo y 2,5 mm de ancho,

adquiriendo una coloración rosa en la parte dorsal y crema con visos verdes en la parte ventral (Sotelo, 1997).

Terminando el ciclo larval, éstas dejan de alimentarse y salen del tubérculo, ubicandose en un sitio cercano al suelo, como empaques, paredes de almacén o en la superficie del tubérculo, donde construyen un capullo con seda, al cual se adhieren partículas del sustrato presente (Sotelo, 1997).

2.1.2.3 Pupa

La pupa (Fig.3) se forma dentro del capullo elaborado por la larva, el cual es de tipo obtecta, de color marrón claro al principio y más oscura antes de la emergencia del adulto. Se presentan diferencias en tamaño entre las pupas que dan origen a hembras y las pupas que dan origen a machos, la pupa de la cual emerge una hembra mide en promedio 8,52 mm largo por 2,95 mm de ancho y de la que emerge un macho, 7,83 mm de largo por 2,42 mm de ancho. Esta fase dura de 15 a 23 días y de las pupas salen los adultos (Herrera *et al.*, 2000).

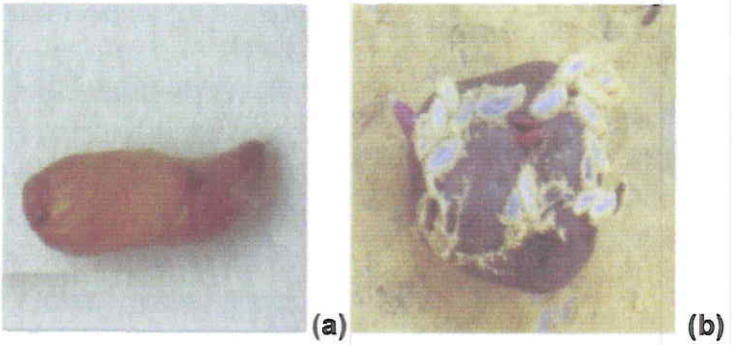


Figura 3. (a) Pupa de *Tecia solanivora* (b) Pupa de *Tecia solanivora* en la superficie del tubérculo de la papa (Villamizar *et al.*, 2006).

2.1.2.4 Adulto

El adulto es una pequeña polilla de color pardo a marrón claro (Fig.4), que presenta a lo largo de las alas anteriores bandas o líneas longitudinales de color marrón oscuro y abundantes flecos en las alas posteriores (Herrera *et al.*, 2000). Las hembras miden 12 mm de largo por 3,4 mm de ancho, mientras el macho mide 9,7 mm de largo por 2,9 mm de ancho, además de presentar diferencias en el tamaño, también presentan diferencias en las alas y en el abdomen. Las hembras presentan tres estigmas oscuros en cada ala, mientras que los machos tienen sólo dos y con respecto al abdomen, en el macho el abdomen es delgado mientras en la hembra es abultado (López & Espítia, 2000).

Figura 4. Adulto de *Tecia solanivora* (Villamizar *et al.*, 2006).

2.1.3. Manejo integrado de *Tecia solanivora*

El uso indiscriminado de plaguicidas químicos de alta toxicidad para controlar los insectos plaga de la papa como *Tecia solanivora*, han sido ineficientes, lo que ha llevado a desarrollar estrategias de manejo integrado

de plagas MIP, buscando que el cultivo de la papa sea sostenible y competitivo (Herrera *et al.*, 2000).

EL MIP opera teniendo en cuenta conceptos, como el control cultural, el control etológico, el control químico y el control biológico, los cuales al utilizarse de manera compatible con el agroecosistema y las condiciones socioeconómicas en los sistemas de producción del cultivo de papa, permiten reducir la contaminación ambiental, los niveles de población de la plaga y con ello las pérdidas económicas (Niño, 2004).

2.1.3.1. Control cultural

El control cultural incluye medidas como la recolección y correcta disposición de los residuos de cosecha (El correo de la papa, 2002).

Dichas prácticas están dirigidas esencialmente a destruir fuentes de infestación de la plaga, establecer condiciones desfavorables para su desarrollo e interrumpir la sucesión de generaciones de los insectos (Niño, 2004).

Existen varias prácticas culturales necesarias para el manejo de la plaga, tanto en campo como en almacenamiento. En campo se pueden encontrar varias como: la siembra adecuada, deshierba y aporque alto, riego por aspersión, eliminación de follaje, cosecha oportuna, remoción (Echeverría, 1998) y destrucción de residuos de cosecha y rotación de cultivos; en almacenamiento se recomienda la buena selección de la semilla, el tratamiento de la semilla y el almacenamiento bajo luz difusa (Herrera *et al.*, 2000).

2.1.3.2. Control etológico

Este control consiste básicamente en la utilización de la conducta instintiva de las plagas insectiles, para manipularlas y regular sus poblaciones (Echeverría, 1998).

Dentro de este manejo las feromonas cumplen un papel muy importante, ya que son sustancias químicas secretadas por el sistema exocrino, que producen una reacción específica entre individuos de la misma especie. Las feromonas para el manejo de *Tecia solanivora* permiten su detección, monitoreo, control directo e interrupción de la comunicación química en la cópula (Echeverría, 1998).

Estas feromonas producidas de forma sintética están siendo usadas para evaluar y determinar fluctuaciones poblacionales de la plaga, ubicar focos de infestación y también en trampas que se pueden emplear en almacenamiento y en campo (Echeverría, 1998).

2.1.3.3. Control químico

Dentro de un programa MIP para *T. solanivora*, el control químico se encuentra contemplado desde el almacenamiento, cuando se puede hacer manejo preventivo de la plaga mediante espolvoreo de productos sobre la semilla (Echeverría, 1998).

Aunque no existen insecticidas químicos específicos para la polilla guatemalteca de la papa, hasta el año 2002 en Colombia se tenían 10 insecticidas con licencia de uso provisional expedida por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Sin embargo, debido a pruebas en campo realizadas para evaluar la eficacia de estos productos químicos, los cuales mostraron bajos niveles de control, el (ICA) dejó vigentes sólo cinco

productos, Pirestar 38 EC, Orthene 75& SP, Lorsban 4 EC, Trapper EC y Curacron 500 EC (El correo de la papa, 2002).

2.1.3.4. Control Biológico

Este manejo cuenta con muy buenas alternativas para el control de *T.solanivora*, mediante la introducción o importación de enemigos naturales como depredadores generalistas, entre los cuales podemos encontrar, el parasitoide *Copidosoma Kchleri* (Hynebopter Encyrtida). Además existen en Colombia parasitoides nativos que constituyen nuevas alternativas en el control de esta plaga, como son *Apanieles gelechidiivoris* (Hymenoptera: Braconidae) y *Enytus sp.* (Echeverría, 1998).

Otra alternativa de control la constituyen los microorganismos entomopatógenos, como *Bacillus thurigiensis* y algunos aislamientos de hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* (Cuartas, 2006).

Sin embargo, los virus son la alternativa más promisoria entre todos los organismos causales de enfermedades en insectos, por la frecuencia de las epizootias que provocan, principalmente en especies de lepidópteros y por su alta especificidad (Rodríguez, 2000).

2.1.3.4.1. Virus entomopatógenos

Los virus entomopatógenos a diferencia de otros biocontroladores, si han mostrado un gran potencial para el control de la polilla guatemalteca, en especial el virus de la granulosis de *Phtorimaea operculella*, cuya actividad por lo menos a nivel de almacenamiento, está plenamente demostrada. Este es un patógeno que actúa como insecticida estomacal al ser ingerido por la larva. En pruebas de campo a nivel experimental, el patógeno ha

demostrado ser tan eficiente como muchos plaguicidas químicos, manteniendo su acción hasta por 60 días (Echeverría, 1998).

Las diferentes enfermedades causadas por virus se encuentran entre las infecciones de invertebrados más estudiadas. Actualmente se conocen más de 1.100 virus patógenos de invertebrados que afectan a un gran número de especies. Muchos de estos virus han sido clasificados en 15 familias y muchos otros no han sido clasificados. Algunas de estas familias son la Baculoviridae, la Polydnaviridae y la Ascoviridae, las cuales incluyen virus específicamente de artrópodos y principalmente de insectos (Friesen & Miller, 2001).

Dentro del grupo de los virus entomopatógenos, quizás los que más interés han generado son los baculovirus, debido a que poseen la capacidad de controlar varias especies de insectos plaga sin ocasionar daños a especies no blanco. Además, el daño ambiental que generan es mínimo y hasta el momento no existe ningún reporte de resistencia (Ojeda et al., 2002)

2.2. Baculovirus

Los virus de la gran familia especializada Baculoviridae, están siendo considerados como bioplaguicidas potenciales (Szewczyk *et al.*, 2006). Todos los virus de esta familia se caracterizan por tener un pequeño espectro de hospederos y una gran patogenicidad y virulencia, lo que les confiere características ideales para ser un bioinsecticida (Caballero *et al.*, 2001).

Los baculovirus poseen genoma circular de ADN de doble cadena superenrollado, que varía en tamaño de 88 a 200 Kpb. El ADN está encerrado en una cubierta de proteína, denominada cápside proteica que tiene la forma de un bastón. La cápside a su vez está cubierta por una

unidad de membrana denominada envoltura. Cuando ésta se encuentra con el ADN se denomina nucleocápside o virión y los viriones pueden estar a su vez embebidos en una matriz protéica llamada cuerpo de inclusión (Ojeda *et al.*, 2002).

2.2.1. Estructura y Composición

2.2.1.1. Nucleocápside

Es una estructura que consiste en una vaina o cápsida cilíndrica, con una serie de anillos apilados perpendicularmente que están formados por un número constante de subunidades proteicas, tapada en ambos extremos (base y tapa). En su interior se encuentra el ADN genómico enrollado y condensado, el cual contiene entre 100 y 200 genes. La nucleocápside tiene la función de transportar la información genética del virus, en una forma altamente compactada, al interior de las células del hospedero (Friesen & Miller, 2001).

2.2.1.2. Los viriones

Los viriones son unos de los principales elementos infecciosos de los baculovirus, tanto en la dispersión del virus entre los individuos de una población como en los tejidos y órganos de un mismo hospedero. El virión maduro se forma cuando éste adquiere una membrana que tiene una estructura trilaminar típica, compuesta por dos capas de proteínas y una de lípidos. Dependiendo el origen de la membrana y sus componentes, se da lugar a dos tipos de viriones diferentes. Aquellos en los cuales las nucleocápsidas permanecen en la misma célula en la que han sido formada adquiriendo una membrana sintetizada de novo, dan lugar a viriones que quedan incluidos en cuerpos o matrices de proteínas, los cuales se conocen como viriones derivados de cuerpos de inclusión (ODV). Los otros,

corresponden a las nueclocápsidas una vez han sido sintetizadas, abandonan la célula adquiriendo una envoltura proveniente de la membrana citoplasmática de la célula; estos viriones son llamados viriones brotados (Caballero et al., 2001).

2.2.1.3. Cuerpos de Inclusión

Los baculovirus se caracterizan por sintetizar cantidades muy altas de proteínas al final del proceso infeccioso, las cuales se cristalizan formando una matriz o cuerpo de inclusión (OB) con forma de gránulo para los granulovirus y de poliedro para los poliedrovirus. Los cuerpos de inclusión de los granulovirus tienen un largo de 300- 500nm, por 120 a 300 nm de ancho, los cuales contienen una sola nucleocápside, aunque ocasionalmente se pueden encontrar cápsulas con varias nucleocáspsides (Winstanley & Reilly´O, 1999).

Los OBs son insolubles en agua, resistentes a la putrefacción, a la desintegración por agentes químicos y a tratamientos químicos como la congelación, la desecación o la liofilización (Caballero *et al.*, 2001). Los OBs son solubles en soluciones alcalinas, como las que se producen en el tubo digestivo de algunos insectos (pH 9-11), lo que facilita la liberación de los viriones y a su vez de los OBs para que puedan iniciar una infección (Caballero *et al.*, 2001).

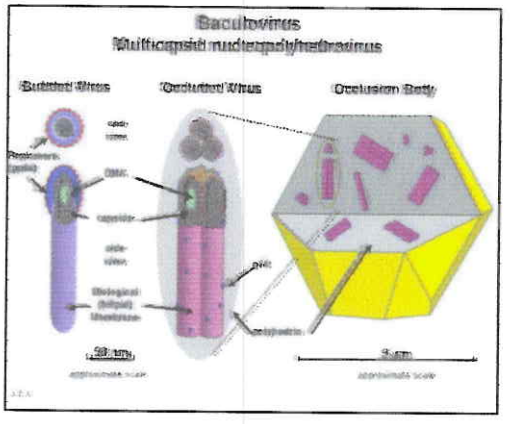


Figura 5. Estructura de los baculovirus (Wikipedia, 2008)

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

2.2.2. Clasificación de los Baculovirus

Los baculovirus son un grupo de virus patógenos de artrópodos que deben su nombre (baculo) a la forma de varilla o bastón (baculum = bastón) de sus viriones, además se caracterizan porque en un momento determinado del ciclo biológico, son incluidos en matrices de naturaleza proteica u OBs (Gutiérrez & López, 2004).

La familia está dividida en los géneros *Nucleopolyhedrovirus* (comúnmente denominados nucleopoliedrovirus o NPVs) y *Granulovirus* (comúnmente denominados granulovirus o GVs). Estos géneros presentan diferencias en la morfología de sus OBs (forma, tamaño y estructura) y también en algunos aspectos citopatológicos de interés taxonómico. Por ejemplo, en los NPVs la morfogénesis de los OBs tiene lugar en el núcleo de la célula infectada, mientras en los GVs tiene lugar una vez se ha producido la ruptura de la membrana nuclear de la célula infectada (Friesen & Miller, 2001).

En el género Granulovirus los OBs de las distintas especies suelen ser de tamaño bastante homogéneos, se encuentran entre 160-300nm de ancho por 300-500nm de largo, generalmente son de forma granular y contienen un solo virión de tipo simple, aunque existan algunas excepciones (Rodríguez, 2001).

2.2.3 Modo de Acción

El ciclo de infección del virus comienza cuando las larvas ingieren los cuerpos de inclusión al alimentarse, sigue con la dispersión dentro del insecto y culmina con su muerte, la cual genera la liberación de nuevos cuerpos de inclusión que contienen partículas infectivas (Ojeda *et al.*, 2002).

2.2.3.1. Infección Primaria

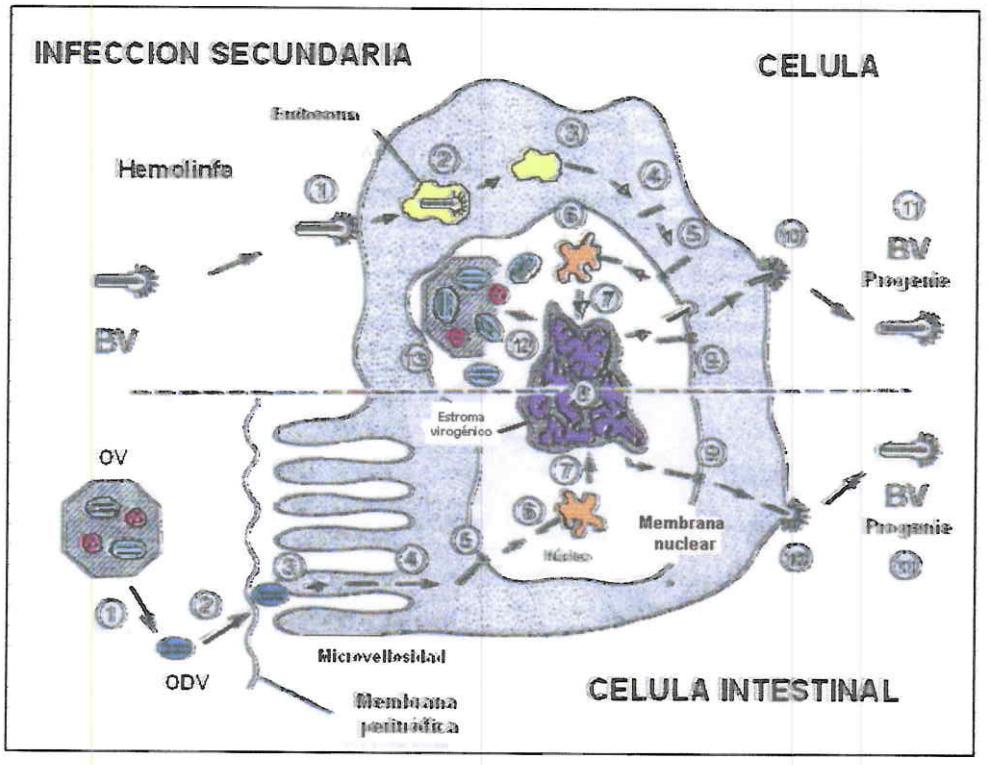


Figura 6. Esquema del ciclo de infección (Friesen & Miller, 2001).

El inicio de la infección es dado por la ingestión de los cuerpos de inclusión presentes como contaminantes en el alimento de las larvas. Otras vías de infección incluyen la contaminación superficial de los huevos al ovipositar hembras infectadas (transmisión transovórica), el paso a través de los espiráculos y el parasitismo (Gutiérrez & López, 2004).

Ingeridos los cuerpos de inclusión, debido al pH presente en los jugos intestinales del insecto hospedero (pH 9.5-11), se produce la hidrólisis de la granulina, la cual es facilitada por la acción de una proteasa alcalina, dando lugar a la liberación de los viriones. Una vez liberados, los viriones atraviesan la membrana peritrófica del intestino, mediante la ayuda de proteínas denominadas factores encadenantes del virus (FsEV), que se encuentran contenidas en los gránulos y operan alterando la integridad de la membrana peritrófica (Winstanley & Reilly´O, 1999).

Posteriormente, los viriones entran a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio por fusión a la membrana citoplasmática, después las nucleocápsides penetran en el citoplasma de las células y se dirigen al núcleo, en donde se desnudan y liberan el ADN a través de poros nucleares. Una vez en el núcleo, comienza la transcripción de genes virales y se genera una nueva progenie viral (Winstanley & Reilly´O, 1999).

De esta forma se da lugar a la generación de nuevas nucleocápsides, las cuales atraviesan la membrana nuclear adquiriendo una envoltura a partir de ésta; se alinean con la membrana plasmática en la base de la célula y emergen a través de ésta como viriones brotados (VB), que atraviesan la lámina basal circulando a través de la hemolinfa (Clem, 2005).

Al producirse la ruptura de la membrana nuclear, normalmente se observan las nucleocápsides en los componentes núcleo-citoplasmáticos resultantes de la mezcla de ambos contenidos a las 36 horas. Una vez que se produzca la primera progenie, se dispersa el virus hacia las células de otros tejidos, dando lugar a la infección secundaria (Caballero *et al.*, 2001).

2.2.3.2. Infección secundaria

La diseminación de la enfermedad dentro del hospedero es causada por la progenie de virus brotante (VB), los cuales infectan células vecinas y diversos tejidos, mediante dos vías principales de diseminación que son: los hemocitos y las células traqueales. Una vez producida la infección secundaria, desde cada sitio de infección inicial se produce la dispersión de la enfermedad por paso de los viriones célula a célula, mediante endocitosis (Gutiérrez *et al.*, 2004).

La infección da como resultado la muerte del insecto y en caso que se produzcan infecciones poliorganotrópicas en donde se ve afectada la epidermis, se produce una lisis del tegumento y la liberación de masas de cuerpos de inclusión, que darán origen a un nuevo ciclo y proceso de infección (Caballero *et al.*, 2001).

2.2.4. Sintomatología de infección viral

Las infecciones por granulovirus en Lepidópteros, como es el caso de la infección causada en *T. solanivora*, es de tipo poliorganotrópica en donde los tejidos se presentan más afectados incluyen el cuerpo graso y la matriz traqueal (Caballero *et al.*, 2001).

Las larvas infectadas por baculovirus exhiben un conjunto de síntomas característicso que empiezan a manifestarse uno o varios días después de haberse iniciado la infección. En general se observa un cambio de coloración, debido a la acumulación de cuerpos de inclusión en los tejidos afectados, que va desde amarillo a blanco (Fig. 5); además los insectos exhiben una menor movilidad, mayor flacidez, pérdida de apetito, retraso en el desarrollo y muerte de las larvas. Tras la muerte de las larvas los tejidos se desintegran, se produce la ruptura del tegumento larval y la liberación de masas de cuerpos de inclusión. (Caballero *et al.*, 2001).

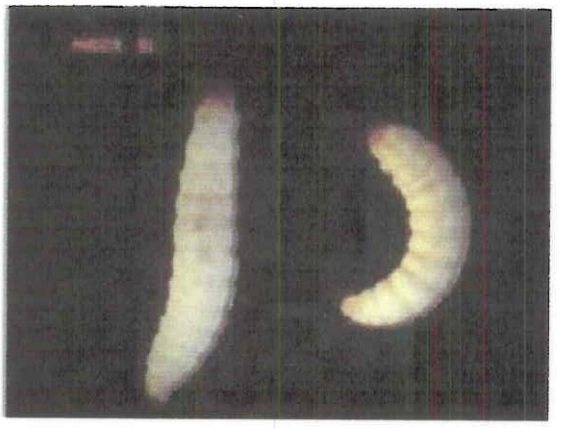


Figura 7. Sintomatología de infección viral (Cuartas, 2007)

2.2.5. Efecto de los factores ambientales sobre los baculovirus

La persistencia de los baculovirus en el ambiente, se refiere básicamente a la habilidad para estar activo a través del tiempo, pero esta habilidad depende fundamentalmente de las condiciones ambientales, entre las que podemos encontrar: la radiación solar, la temperatura y la humedad (Young, 2005).

2.2.5.1 Temperatura

Se ha demostrado que los insecticidas microbianos son inactivados por exposición a altas temperaturas (Ignoffo & García, 1992), como por ejemplo a temperaturas por encima de 50 °C, en las que se ha observado que la inactivación se produce en pocas horas , mientras a temperaturas entre 70 °C y 80 °C la inactivación se da en cuestión de pocos minutos (Harpaz & Raccah 1978; citado por Young, 20005).

En general, los virus entomopatógenos son muy estables a temperaturas bajas y los baculovirus pueden mantener su viabilidad por muchos años, si los cuerpo de inclusión se mantienen intactos, como cuando son almacenados en cadáveres de insectos y guardados a temperaturas de 0 °C a 4°C (Batista *et al.*, 2001). Por ejemplo, el nucleopolihedrovirus de *P. rapae* NPV no fue afectado cuando se almacenó a -32 °C. El granulovirus de *P. interpuntella*, tampoco perdió su actividad cuando se almacenó a -80 °C por 18 meses (Young, 2005).

2.2.5.2 pH

La estabilidad de los baculovirus puede ser afectada por el pH. Estos virus son estables a valores de pH cercanos a la neutralidad y a un pH de 8 a 9

pueden tener un período corto de persistencia. A valores de pH muy alcalinos, la inactivación de los virus puede ocurrir en minutos (Young, 2001). Es probable que esto ocurra debido a la disolución de los cuerpos de inclusión, como un resultado de un exceso de iones hidroxilo en soluciones básicas (Braga & Moscardi, 2002).

2.2.5.3. Humedad

La humedad tiene un bajo efecto en la persistencia de virus en el ambiente con respecto a otros patógenos. La desecación usualmente provee estabilidad a los virus (Young, 2005).

2.2.5.4. Radiación solar

Datos sobre la persistencia de insecticidas microbianos revelan que la radiación solar es el más destructivo de los factores ambientales (Burges, 1998). Los virus expuestos a la luz solar son rápidamente inactivados y tienen una vida media de horas, siendo el factor más limitante de la persistencia viral en el ambiente. La inactivación por luz solar principalmente se atribuye al efecto causado por la luz ultravioleta (UV) (Sporleder *et al.*, 2000).

2.2.5.4.1 Radiación UV

La luz ultravioleta es una radiación que comprende longitudes de onda desde 200 a 400 nm y se clasifica convencionalmente en tres tipos: UVA (315 a 400 nm), UVB (280 a 315 nm) y UVC (200 a 280 nm) (Velásquez *et al.*, 1998).

2.2.5.4.1.1 Radiación UV tipo A

Esta radiación no es absorbida por el ozono atmosférico, por lo tanto, penetra directamente a la biosfera. Con respecto a los tres tipos de radiación ultravioleta es la de menor energía, está presente en mayor intensidad en los rayos solares y puede ser absorbida por muchas proteínas (Niegel & Dylan, 2003). Esta radiación atraviesa la mayoría de los vidrios, tiene poder pigmentógeno tardío, acción bactericida débil y puede ser emitido por cualquier fuente (UV) (Velásquez *et al.*, 1998).

Causa lesiones indirectas en la molécula de ADN, al no ser absorbido directamente (Wakefield *et al.*, 2004). El daño indirecto se debe principalmente a la formación de especies reactivas de oxígeno (peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y radicales hidroxilo), que oxidan la pentosa presente en el ADN y rompen la hebra de la molécula (Devotto & Gerding, 2003).

2.2.5.4.1.2 Radiación UV tipo B

Es la radiación con más energía que tiene la propiedad de penetrar la biosfera, aunque es absorbida en parte por el ozono atmosférico (Niegel & Dylan, 2003). Son rayos medianos, absorbidos por los vidrios y tienen mayor poder bactericida a medida que disminuye su longitud de onda (Velásquez *et al.*, 1998).

La radiación ultravioleta tipo B es absorbida provocando lesiones directas y por muchas moléculas biológicas, incluyendo macromoléculas como el ADN. Este daño resulta de la formación de fotoproductos tales como dímeros de pirimidinas, hidratos de pirimidina y entrecruzamientos entre el DNA y las proteínas(Devotto & Gerding, 2003) . Este tipo de radiación se considera el

factor más importante que contribuye a la fotoinactivación de los baculovirus en el ambiente (Martignoni & Iwai, 1985).

2.2.5.4.1.3. Radiación UV tipo C

La luz ultravioleta tipo C está constituida por rayos cortos, que son absorbidos por las capas más altas de la atmósfera y estratosfera, por lo cual, llegan a la superficie terrestre en un bajo porcentaje (Velásquez *et al.*, 1998). Las reacciones más significativas que afectan la supervivencia celular son las que ocurren por la causa de la radiación UVC, ya que la interacción entre esta radiación y el ADN, resulta en un cambio en la estructura del material genético, impidiendo su replicación. Casi todos los seres vivos poseen la habilidad de reparar este daño mediante uno o más mecanismos de reparación. Sin embargo, a medida que la intensidad de la UVC aumenta, la velocidad de daño excede la capacidad de los sistemas de reparación (Lalimentaria, 2008)

2.2.5.4.2 Efectos de la Radiación Solar sobre la persistencia de virus en el ambiente

El mecanismo de la inactivación de los baculovirus por la luz no es conocido ampliamente, pero es probable que sea similar a los reportados para virus de mamíferos. Según esto, la inactivación se debe a la formación de dímeros de pirimidina, que impiden la replicación del ADN y la consecuente formación de nuevos viriones. Esto tal vez está relacionado con la formación de especies químicas con alto poder oxidativo como los radicales peróxido (Ignoffo & García, 1994). Sin embargo, también se sabe que esta radiación afecta directamente los ácidos nucleicos, modificándolos o denaturándolos (Batista *et al.*, 2001).

2.3. Formulación de Baculovirus

En toda formulación se distinguen dos tipos de componentes: el principio activo responsable de la actividad biocontroladora, en este caso el baculovirus y los excipientes. Estos últimos comprenden: el vehículo que puede ser sólido o líquido y los coadyuvantes que ayudan a mejorar o modificar la acción del ingrediente activo, todos los excipientes deben ser inertes frente al microorganismo y frente a las plagas (Gómez & Villamizar, 2000).

Existen varios tipos de formulaciones a base de baculovirus, como por ejemplo las emulsiones o suspensiones concentradas, los gránulos, los polvos y los polvos humectables (Morales, 1993).

- Tipos de formulación

Las formulaciones pueden ser líquidas y sólidas. Dentro de los productos sólidos se encuentran los polvos, gránulos y comprimidos. Dentro de las formulaciones líquidas se encuentran suspensiones en agua o aceite y emulsiones (Burges, 1998).

- Formulaciones líquidas

Suspensiones acuosas: son esencialmente suspensiones de organismos en líquidos (Burges, 1998).

Emulsiones: los líquidos emulsionables están constituidos por un principio activo suspendido en un vehículo oleoso acompañado de los coadyuvantes necesarios, de manera que al mezclar con agua se forme una emulsión estable (Gómez & Villamizar, 2000). Toda emulsión forma un sistema de dos fases; el agua o fase dispersante y el líquido emulsionable o fase dispersa.

Las emulsiones reducen la sedimentación de partículas durante el almacenamiento y en el tanque de aspersión, porque la flotabilidad del aceite contrarresta la alta densidad relativa de las partículas (Burges, 1998).

- Formulaciones sólidas

Polvos para espolvoreo: son aplicados directamente sobre las plantas o sobre el suelo, el principio activo se encuentra disperso en un vehículo inerte sólido (Gómez & Villamizar, 2000). Los polvos están basados en diluyentes inertes o vehículos, normalmente de baja capacidad absorbente, las partículas de polvo están en un rango de tamaño de 5 a 20 mm, los polvos típicamente contiene menos del 10% de un organismo por peso (Burges, 1998).

Polvos para reconstituir ó polvos mojables: son productos capaces de ser mojados y de mantenerse en suspensión en un vehículo líquido durante el período de tiempo requerido para su aplicación (Gómez & Villamizar, 2000). Cuando un polvo es puesto en un líquido, el líquido tiene que penetrar la superficie y sobrepasar la tensión superficial de la interfase líquida-sólida, los surfactantes ayudan a reducir esta tensión y permiten que el líquido desplace las partículas de aire alrededor (Galán & Támez, 1993).

Formulaciones encapsuladas: Las microcápsulas contienen los organismos y son comparadas con los gránulos, dentro de los materiales de encapsulación se encuentran la gelatina, al almidón, la celulosa y varios tipos de polímeros. (Burges, 1998).

Gránulos, Comprimidos (Pellets) y Cápsulas: este grupo de formulaciones se aplican directamente a las plantas o al suelo, los gránulos cuyo aspecto es de arenilla con tamaños de partícula que oscila entre 0.2 y 1.5 mm

contienen de un 5 a un 20% de principio activo, 80 a 95% de soporte y 1 a 5% de adherente (Galán & Támez, 1993). Hay tres tipos de gránulos:

1. Los organismos están unidos a la superficie externa de un transportador granular en un tambor rotativo por una etiqueta adhesiva (Burges, 1998).
2. Los organismos son asperjados en un transportador granular rotativo sin etiqueta adhesiva (Burges, 1998).
3. Los organismos son incorporados dentro de una pasta o polvo transportador puesto como una matriz. El tipo tres es el más común con microorganismos nitrificantes (Burges, 1998).

Gránulos dispersables en agua: La presentación comercial del producto es igual a la de los productos granulados, pero a diferencia de estos, los gránulos dispersables deben reconstituirse en agua para su aplicación, con un equipo común de aspersión (Higuera, 2003).

Dentro de las formulaciones los coadyuvantes cumplen funciones muy importantes.

2.3.1. Coadyuvantes

Los coadyuvantes se utilizan para facilitar la aplicación del producto y el depósito del patógeno en el sitio de alimentación del insecto plaga y para aumentar la persistencia del virus en la superficie de las plantas tratadas (Caballero *et al.*, 2001), así como para mejorar la estabilidad del principio activo durante el tiempo de almacenamiento y después de la aplicación (Gómez & Villamizar, 2000). Entre los coadyuvantes más utilizados encontramos los tensioactivos o surfactanes, los adherentes, los aglutinantes, los agentes de fluidez, los amortiguadores de pH, los estimulantes alimenticios y los fotoprotectores (Morales, 1993).

1.3.1.1. Surfactantes

Productos dotados de la propiedad de bajar la tensión superficial de líquidos, modificando la mojabilidad del producto, lo que permiten preparar suspensiones estables y mejorar las propiedades de extensibilidad de las formulaciones asegurando una aplicación más homogénea, además son indispensables en la formación de emulsiones. Dentro de los tensioactivos más utilizados en el desarrollo de bioplaguicidas encontramos el Tween (polisorbatos 20,40,60 y 80), el Span y algunos nonil-fenol-etoxiliados como el NFE (Gómez & Villamizar, 2000).

1.3.1.2. Adherentes

Los adherentes aseguran la permanencia del plaguicida una vez aplicado, evitando su arrastre por lluvia o rocío. Desde hace tiempo se emplean adherentes capaces de hincharse en agua, pero sin ser arrastrados por ella. A este grupo pertenecen la gelatina, dextrina, albúmina, caseína, gomas diversas, carragenos, etc. Actualmente se emplean una variedad de productos orgánicos como polímeros, terpenos, lignosulfitos y también aceites minerales y vegetales (Morales, 1993)

1.3.1.3. Aglutinantes

Se utilizan en los granulados para adherir el virus y los otros componentes de la formulación como el portador y ayuda a la formación correcta de los gránulos, entre estos podemos encontrar la hidroxietil - celulosa, la gelatina y el aceite de parafina (Caballero *et al.*, 2001).

1.3.1.4. Agentes de fluidez

Son utilizados para mejorar el flujo de los polvos y evitar la soldadura de las partículas durante largos períodos de almacenamiento. La composición de estos productos es variada, aunque por lo general pertenecen al tipo de los silicatos de aluminio y de sodio, como el talco (Gómez & Villamizar, 2000).

1.3.1.5. Amortiguadores de pH

Se usan en casos concretos para asegurar que el pH de la solución o del producto formulado se mantenga en los límites convenientes, evitando así la descomposición del principio activo debido a pH demasiado bajo o alto (Morales, 1993).

1.3.1.6. Los cebos y estimulantes alimenticios

Son utilizados para estimular el apetito del insecto plaga con el propósito de que éste consuma la dosis letal del virus en el menor tiempo posible. Una formulación con este tipo de sustancias, permite que se requiera menos inóculo en una aplicación para lograr el mismo grado de control (Caballero *et al.*, 2001).

1.3.1.7. Fotoprotectores

El principal objetivo de usar sustancias fotoprotectora en la formulación de los entomopatógenos, es maximizar la persistencia ambiental de los mismos, considerando que la radiación solar es el factor más limitante para los agentes de biocontrol. Diversos compuestos naturales y sintéticos han sido evaluados como protectores solares para entomopatógenos y por su modo

de acción, pueden ser divididos en absorbentes (colorantes y abrillantadores ópticos), antioxidantes y enzimas (Caballero *et al.*,2001).

1.3.1.7.1. Absorbentes

Estas sustancias se caracterizan por tener un amplio espectro de absorción, entre los que podemos encontrar la melanina, la cual es un polímero que tiene un alto grado de conjugación de la molécula y el oscurecimiento del pigmento, es el resultado de la gran absorción del espectro visible (Ballesteros, 2006) y también podemos encontrar el grupo de los colorantes y de los abrillantadores ópticos.

- Colorantes

Los colorantes también han demostrado tener un efecto fotoprotector, ya que la mayoría absorben la radiación UV, como se comprobó para los colorantes solubles como, el índigo, el carmín y el tinopal BRS200, los cuales fotoestabilizaron al NPV de *Spodoptera Litoralis* (Ragaei, 1999). Sin embargo, algunos colorantes inertes como la atapulgita y la montmorilonita revelaron ser más efectivos. Colorantes como el verde de lissamida, el amarillo de acridina, el azul alcalino y el mercurio cromo también han sido efectivos fotoprotectores, pues redujeron la inactivación del nucleopoliedrovirus de la polilla gitana (*Lymantria dispar)* (Shapiro & Robertson, 1990).

- Abrillantadores ópticos

Los blanqueadores o abrillantadores ópticos fueron descubiertos hace más de 50 años. Son un grupo de derivados del estilbeno, que por su capacidad de absorber la radiación UV y emitir luz en la región azul del espectro visible, se utilizan para dar brillo en muchas industrias (Caballero *et al.*, 2001), entre las que podemos encontrar, las industrias de detergentes, papel y plásticos (Shapiro, 1992).

Se ha reportado que la incorporación del abrillantador óptico estilbeno, dentro de formulaciones de baculovirus, puede proveer protección frente a la radiación UV y mejorar la patogenicidad viral (Martínez *et al.*, 2003).

A raíz de estos resultados se han efectuado varios estudios con blanqueadores ópticos bajo condiciones de laboratorio. Por ejemplo, la inclusión de Blankophor BBH en una formulación del nucleopolihedrovirus de *Lymantria dispar* LdNPV, produjo una persistencia del virus de 28 días bajo condiciones de campo (Argauer & Shapiro, 1997).

En estudios realizados con distintos blanqueadores pertenecientes a diferentes grupos químicos como estilbenos, oxazoles, pirazoles, ácido naftálico, lactona y coumarina, se encontró que la mejor protección se dio con los ácidos disulfónicos del estilbeno como son el Leucophor BS, Leucophor BSB, Phorwite AR, Phrowite BKL, Phrowite CL y Tinopal LPW, todos con efecto dosis dependiente, obteniéndose protección de hasta el 100 % frente a la radiación UV para el nucleopoliedrovirus de *Lymantria dispar* LdMNPV, después de 60 min de exposición bajo condiciones de laboratorio (Shapiro, 1992).

Además del efecto fotoprotector, se ha demostrado la capacidad que tienen estos compuestos de potenciar la actividad de algunos baculovirus, debido principalmente a su efecto sinergista (Burges, 1998). Este efecto ha sido confirmado para el nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugipeda* (SfMNPV), que incrementó su virulencia, cuando se utilizó mezclado con cinco abrillantadores ópticos, blankophor BBH, Calcofluor M2R, Leucophor AP, Leucophor SAC y Leucophor UO (Martínez *et al.*, 2003).

Estas sustancias también pueden potenciar la actividad de otros virus incluyendo los cipovirus (virus de la poliedrosis citoplamática) y

entomopoxvirus en hospederos homólogos y heterólogos (Shapiro & Dougherty, 1994).

Durante los últimos años han surgido hipótesis sobre el efecto potenciador de los blanqueadores ópticos, todas dirigidas hacia un efecto sobre el epitelio del intestino medio, sin embargo, también se ha reportado que puede ocasionar perturbaciones fisiológicas que incluyen disminución del pH intestinal y disminución del apetito (Goulson *et al.*, 2002).

1.3.1.7.2. Antioxidantes

Los radicales libres son producidos constantemente en pequeñas cantidades en situaciones normales y en grandes cantidades ante el daño celular causado por la radiación UV (Velásquez *et al.*, 1998). Un antioxidante es toda sustancia que previene el deterioro o daño provocado por la oxidación de una molécula como resultado del efecto de un compuesto con poder oxidante, como los radicales libres producidos por la luz ultravioleta (Ballesteros, 2006).

Los antioxidantes se oxidan rápidamente, impidiendo que otras moléculas sean oxidadas, ya que reaccionan rápidamente con los radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno (Ballesteros, 2006). Dentro de los antioxidantes que han sido evaluados para los baculovirus, se encuentra el propil galato, el ácido ascórbico y la fenil sulfocarbamida, los cuales presentaron algún nivel de protección de los cuerpos de inclusión del nucleopoliehedrovirus de *Heliothis zea* (Ragaei, 1999).

bórico se incorporó a una dieta semisintética, se obtuvieron valores de CL_{50} de 1.52 $x10^5$ OBs/mL para el virus solo y de 7.95 $x10^2$ OBs/mL para la mezcla que contenía virus y 0.045 g de ácido bórico por 100mL de dieta. A una concentración de 250 OBs/mL de dieta, el TL_{50} se redujo de 13,6 días con virus solo a 7,4 días con virus más ácido bórico (Morales *et al.*, 1997).

También se utilizan enzimas como las metaloproteasas, entre las que se destaca la enhancina, localizada en los cuerpos de inclusión de los granulovirus, la cual afecta la quitina que forma parte de la membrana peritrófica del insecto. Sin embargo, los estudios de campo utilizando mezclas de virus con la enzima son muy escasos (Wang & Granados, 1997).

La azadiractina (NIM) es otra sustancia potenciadora, presenta la ventaja de que la larva no puede evitar su consumo, debido a que los triterpenos pueden ser absorbidos por el tejido vegetal, este efecto se demostró cuando se obtuvo aumento de la mortalidad de las larvas de *H. armígera,* inoculadas con su NPV homólogo y estractos de la semilla de nim, que contiene azadiractina. (Murugan *et al.*, 1998; citado por Caballero *et al.*, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de papa es de gran importancia socioeconómica en Colombia, por la cantidad de hectáreas sembradas (15,6 toneladas), el número de personas vinculadas (aproximadamente 90.000 familias), el sustento que genera y la gran cantidad de insumos que demanda (Echeverría, 1998). La principal plaga de este cultivo es la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, insecto que produce pérdidas que oscilan entre el 50 y el 100% (Villamizar *et al.*, 2006).

Los agricultores para el control de esta plaga, acuden al uso de una gran cantidad de plaguicidas químicos, que son aplicados frecuentemente y en ocasiones sin justificación técnica. En el año 2002, diez productos químicos tenían licencia de uso provisional para el control de la polilla en campo, expedida por el Instituto Colombiano de Agricultura (ICA). Luego de realizar varios estudios en campo, se determinó que los niveles de control de algunos de estos productos eran muy bajos, por lo que se dejó la licencia a sólo cinco productos: Pirestar 38EC, Orthene 75, Lorsban 4EC, Trapper EC y Curacrom 500EC. Estos productos químicos además de incrementar los costos de producción, originan una serie de problemas colaterales como por ejemplo, la aparición cada vez más frecuente de resistencia de la plaga a los insecticidas, destrucción de los enemigos naturales, reducción cualitativa y cuantitativa de la fauna y la flora silvestre, desequilibrios ecológicos y alta contaminación ambiental. Frente a este problema surge la necesidad de desarrollar estrategias de manejo integrado de plagas (MIP), que además del control cultural, etológico y químico, incluyen herramientas de control biológico (Herrera *et al.*, 2000).

Dentro de las estrategias de control biológico implementadas para el manejo de *T. solanivora*, se encuentra el uso de virus entomopatógenos, como es el caso del granulovirus de *Phthorimea operculella*. Dicho virus fue producido

inicialmente en el Centro Internacional de la papa del Perú (CIP), utilizando una formulación artesanal. En el año 2000 CORPOICA adoptó, tecnificó y estandarizó, la tecnología de manufactura de dicho bioplaguicida, para responder a la emergencia sanitaria causada por la plaga en Colombia. En el año 2002 se construyó una planta de producción para este bioplaguicida, con una capacidad de producción de 15 toneladas al mes, la cual fue registrada ante el ICA. Actualmente, el bioplaguicida a base de este granulovirus cuenta con registro comercial en el país y es manufacturado y comercializado de manera conjunta entre CORPOICA y la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios (VECOL S.A.). Este bioplaguicida consiste en una formulación en polvo que se emplea para protección de semilla de papa en almacenamiento, es un producto natural, seguro tanto para las personas como para el medio ambiente y que no afecta los insectos benéficos del cultivo (Corpoica, 2004)

Sin embargo, el aislamiento viral utilizado para la elaboración del bioplaguicida, fue aislado de un hospedero diferente a la polilla guatemalteca y era una cepa foránea proveniente del Perú. Por estas razones en el año 2004, Corpoica realizó un muestreo de larvas de *T. solanivora* en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Norte de Santander, en búsqueda de virus nativos, posiblemente más adaptados a este hospedero y a las condiciones ambientales de Colombia y por tales razones probablemente más eficientes para el control de la plaga. De este muestreo se aislaron cinco granulovirus (VG001, VG002, VG003,VG004 y VG005), los cuales fueron caracterizados, evaluada su actividad biocontroladora y determinada su concentración letal (Villamizar *et al.*, 2006).

Con el aislamiento nativo seleccionado (VG003), se desarrollaron dos formulaciones (concentrado emulsionable y granulado dispersable), diseñadas para el control de la plaga en campo. Estas dos formulaciones fueron desarrolladas teniendo en cuenta que brindaran al virus, protección

frente a la radiación solar, considerando que ésta, es el factor ambiental más limitante en la estabilidad de los virus entomopatógenos en campo (Shapiro *et al.*, 1983). Dicho efecto ha sido demostrado en varios estudios en los que se ha evaluado la persistencia de algunos entomovirus expuestos a radiación solar, con inactivaciones entre el 44 y el 100%, dependiendo del tiempo de exposición y del aislamiento viral utilizado. Por ejemplo, uno de los virus más sensibles es el granulovirus de *Plodia interpuntella,* el cual después de tan solo 10 min de exposición presentó una inactivación del 100% (Young, 2005).

Con respecto al granulovirus de *Phthorimea operculla*, el cual fue utilizado para la elaboración de los dos productos para el control de *Tecia solanivora* en campo, en la actualidad solamente existe un estudio realizado en el Perú con respecto a su comportamiento frente a la luz solar, en el cual se determinó la inactivación del virus en diferentes meses del año y por tanto a diferentes niveles de energía. (Sporleder *et al.*, 2000)

La inactivación producida por la radiación solar se atribuye principalmente a la radiación UV, la cual produce daños indirectos en la molécula del ADN debido a la formación de especies reactivas de oxígeno, y directos como la formación de dímeros de pirimidina (Ignoffo & García, 1994).

Es por esto que las formulaciones a base de baculovirus desarrolladas por Corpoica, incluyen dentro de sus excipientes un protector UV que pertenece al grupo de los abrillantadores ópticos, el cual además de brindar fotoprotección, ha mostrado tener un efecto potenciador de la actividad biocontroladora de varios baculovirus (Caballero *et al.*, 2001).

Para continuar con las etapas tecnológicas de desarrollo de estos dos bioplaguicidas, es necesario evaluar la eficiencia de las formulaciones para proteger al virus de la radiación UV y el posible efecto del abrillantador óptico

cómo potenciador de la actividad biocontroladora, información que permitirá seleccionar la formulación más promisoria y continuar con la fase de optimización del prototipo de producto.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente CORPOICA cuenta con dos prototipos de bioplaguicida a base de un aislamiento nativo de granulovirus, diseñados para el control de la polilla guatemalteca de la papa en campo. Estas formulaciones incluyen un filtro ultravioleta, debido a la alta sensibilidad de estos virus a dicha radiación, el cual según la literatura, además de su efecto fotoestabilizador, podría tener un efecto potenciador de la actividad insecticida. Por tales razones, surge la necesidad de evaluar la eficacia de las formulaciones, su efecto fotoestabilizador del virus y el efecto potenciador del filtro UV con miras a realizar la selección del prototipo de formulación más promisoria desde el punto de vista de actividad biocontroladora y fotoestabilidad.

cómo potenciador de la actividad biocontroladora, información que permitirá seleccionar la formulación más promisoria y continuar con la fase de optimización del prototipo de producto.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente CORPOICA cuenta con dos prototipos de bioplaguicida a base de un aislamiento nativo de granulovirus, diseñados para el control de la polilla guatemalteca de la papa en campo. Estas formulaciones incluyen un filtro ultravioleta, debido a la alta sensibilidad de estos virus a dicha radiación, el cual según la literatura, además de su efecto fotoestabilizador, podría tener un efecto potenciador de la actividad insecticida. Por tales razones, surge la necesidad de evaluar la eficacia de las formulaciones, su efecto fotoestabilizador del virus y el efecto potenciador del filtro UV con miras a realizar la selección del prototipo de formulación más promisoria desde el punto de vista de actividad biocontroladora y fotoestabilidad.

4. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de dos formulaciones en la fotoestabilidad y eficacia de un granulovirus para el control de *Tecia solanivora*

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto fotoprotector de las dos formulaciones a base del aislamiento de granulovirus VG003
- Determinar la inocuidad de los auxiliares de formulación de cada prototipo de bioplaguicida sobre las larvas de la polilla guatemalteca de la papa
- Evaluar el efecto potenciador del filtro ultravioleta sobre la actividad biocontroladora del aislamiento de granulovirus VG003

6. MATERIALES Y MÈTODOS

6.1. Propagación Viral

Para contar con la cantidad requerida de inóculo viral, se tomaron huevos de *T. solanivora* provenientes de la cría de insectos ubicada en el Laboratorio de Entomología de Corpoica, los cuales fueron inoculados con el aislamiento nativo de granulovirus VG003 proveniente de Cundinamarca. 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 a temperatura ambiente.

Se tomaron cubetas de plástico de 4 litros, en las cuales se colocaron servilletas absorbentes en el fondo y encima 6 tubérculos de papa pastusa secos y previamente lavados con agua potable.

Luego de tener los tubérculos dispuestos en las cubetas, se tomaron los discos de papel toalla que contenían los huevos inoculados y se cortaron en pedazos (20 a 40 huevos), estos fueron ubicados individualmente sobre cada papa. Los recipientes fueron cerrados e incubados en el cuarto de bioensayos a una temperatura de 25°C por 20 días. Pasado este tiempo, las larvas fueron extraídas y clasificadas. Aquellas larvas con síntoma típico de la enfermedad, se colocaron en cajas de Petri estériles, las cuales fueron selladas y almacenadas a 4°C.

6.2. Determinación del efecto fotoprotector de los dos prototipos de formulación

Los dos prototipos de bioplaguicidas fueron elaborados por el grupo de tecnología del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria- CBB de Corpoica (Fig. 8). Éstos se reconstituyeron en agua y

se ajustaron a una concentración final de 10^6CI/mL. También se preparó una suspensión ajustada a la misma concentración de los prototipos de bioplaguicida reconstituidos utilizando virus puro sin formular. Estas suspensiones fueron utilizadas para inocular la superficie de los tubérculos de la papa. La aplicación se realizó con una brocha de 1 pulgada, aplicando 2 mL por cada cara del tubérculo.

a. b.

Figura 8. Formulaciones de baculovirus a base del aislamiento VG003 **a.** Granulado dispersable **b.** Concentrado emulsionable

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.

Una vez inoculadas las papas, éstas fueron ubicadas en una cabina de flujo laminar a 60 cm de la fuente de luz UV, utilizando un diseño de bloques como se indica en la figura 9. Las filas comprendieron los diferentes tiempos de exposición y las columnas 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 (UVA y UVB) y los tiempos de exposición fueron de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas. Cada dos horas se cubrió una fila de tubérculos con papel aluminio, correspondiente a cada tiempo se exposición. El testigo absoluto consistió en tubérculos no tratados y no expuestos a la radiación UV.

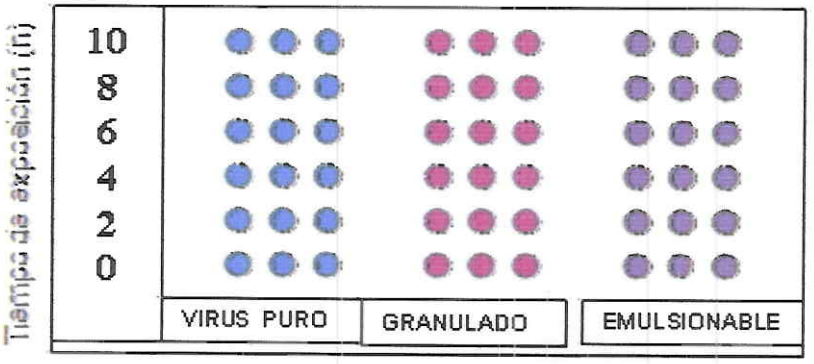


Figura 9. Ubicación de los tratamientos para la exposición a la radiación ultravioleta

Cada unidad experimental consistió en un recipiente plástico, en el fondo del cual se colocó arena estéril y sobre ella el tubérculo de papa pastusa aplicado o no con el tratamiento y expuesto o no a la radiación UV.

Sobre cada tubérculo se colocaron 10 larvas neonatas de *T. solanivora.* Los recipientes se taparon e incubaron en el cuarto de bioensayos a una temperatura promedio de 25ºC durante 30 días. Pasado este tiempo se realizó un muestreo destructivo de los tubérculos en busca de todas las larvas presentes en los mismos. Se contó el número de larvas muertas o desaparecidas, de larvas sanas, de larvas vivas con síntomas y el número de pupas y se clasificarón como muertas (larvas vivas con síntomas de infección, larvas muertas y larvas desaparecidas) y vivas (pupas y larvas sanas). Los resultados de mortalidad se corregieron con respecto al tratamiento testigo absoluto, determinando el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider Orelli (Zar, 1999):

$$\% \text{ eficacia} = \frac{b - k}{100 - k} \times 100$$

En 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 original de actividad remanente (%OAR), mediante la fórmula (Martignoni & Iwai, 1985):

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

$$\% \text{ OAR} = \frac{\% \text{ mortalidad del virus expuesto}}{\% \text{ mortalidad del virus no expuesto}} \times 100$$

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa SAS 9.1 mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey (α=0.05). El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo y contó con tres repeticiones por tratamiento.

6.3. Determinación de la inocuidad de los auxiliares de formulación de cada prototipo de bioplaguicida sobre larvas de la polilla guatemalteca

Se elaboraron cuatro formulaciones sin incluir el principio activo, una que comprende los excipientes del concentrado emulsionable con el fotoprotector, otra que comprende los mismos excipientes pero sin fotoprotector, otra que comprende los excipientes del granulado dispersable con el fotoprotector y otra que comprende los mismos excipientes pero sin fotoprotector. Estas mezclas fueron utilizadas para inocular la superficie de tubérculos de la papa pastusa previamente lavados con agua y la aplicación se realizó con una brocha de 1 pulgada aplicando 2 mL sobre cada cara del tubérculo.

Posteriormente, los tubérculos de papa pastusa tratados se colocaron en el interior de recipientes plásticos de 16 onzas (unidad experimental) con arena cernida y autoclavada en el fondo. Sobre cada tubérculo se colocaron 10 larvas neonatas de *T. solanivora* y las tazas se taparon e incubaron en el cuarto de bioensayos a una temperatura promedio de 25°C durante 30 días.

Este experimento contó con 3 tratamientos que consistieron en las dos formulaciones sin el principio activo y un testigo absoluto, donde los tubérculos no fueron tratados. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento.

Pasados 30 días se realizó un muestreo destructivo de los tubérculos, en busca de todas las larvas presentes en los mismos. Se contó el número de larvas muertas, vivas infectadas, larvas desaparecidas, larvas sanas y se clasificaron como se mencionó anteriormente. Los resultados se analizaron con el programa Statistic 1.0 mediante un análisis de Kruskall Wallis (α=0,05).

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

Se tomaron larvas obtenidas de la propagación viral y se maceraron con 10 mL de tampón Tris 0.1M. El macerado se filtró por una tela para eliminar el tejido larval. El líquido obtenido se mezcló con 5 mL de SDS al 0.5% y se incubó durante 30 minutos a 25°C. Después de la incubación, el líquido se centrifugó en una centrífuga SERIAL Biofuge con rotor de ángulo fijo a 100 *g* durante siete minutos, descartando el sedimento y recuperando el sobrenadante. Posteriormente se leyó la concentración viral de éste mediante la determinación de la densidad óptica a 450nm, con un espectrofotómetro Spectronic 601 Milton Roy Company. La concentración se calculó mediante la ecuación determinada previamente por Gómez (2005):

$$\text{Concentración (CI/ mL)} = \frac{\text{absorbancia} - 0.0071}{10^{-6}}$$

Con esta suspensión viral de concentración conocida, se prepararon diluciones ajustadas a las concentraciones: $2x10^2$, $2x10^3$, $2x10^4$, $2x10^5$ y

$2x10^6$ CI/mL. Éstas fueron mezcladas en relación 1:1 (V/V) con dos soluciones del filtro ultravioleta (CBUV05), ajustadas al 1% y al 0.2%.

Se tomaron 5 mL de cada suspensión viral y se mezclaron con 5 mL de la solución del filtro ultravioleta al 0.2% y otros 5 mL de cada suspensión se mezclaron con la solución del filtro al 1%. Las suspensiones quedaron finalmente a una concentración viral de $1x10^2$, $1x10^3$. $1x10^4$.$1x10^5$, $1x10^6$ CI/mL y con el fotoprotector al 0.1% y 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 cual los tubérculos fueron tratados con las soluciones del filtro ultravioleta pero sin ser éste mezclado con el virus.

Los tubérculos previamente lavados fueron inoculados con los diferentes tratamientos, utilizando una brocha de 1 pulgada y aplicando 2 mL sobre cada cara del tubérculo. Estos fueron colocados en cubetas plásticas de 16 onzas (unidad experimental) sobre arena cernida y autoclavada. Sobre cada tubérculo se colocaron 10 larvas neonatas de *T.solanivora* y las tazas se taparon e incubaron en el cuarto de bioensayos a una temperatura promedio de 25°C durante 30 días. Pasados 30 días se realizó un muestreo destructivo de los tubérculos en busca de todas las larvas presentes en las unidades experimentales. Se contó el número de larvas muertas, larvas vivas infectadas larvas desaparecidas, larvas sanas, larvas infectadas y el número de pupas se consideraron vivas.

Este experimento tuvo un diseño completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento. Los porcentajes de mortalidad fueron corregidos con el testigo utilizando la fórmula de Schneider Orelli mencionada en el numeral 6.3 (Zar, 1999). Estos resultados se analizaron con el programa SAS 9.1 mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias

de Tukey (α=0.05), también se realizó un análisis Probit para determinar el efecto del filtro UV sobre la concentración letal media del virus

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Determinación del efecto fotoprotector de los dos prototipos de formulación

Cuando se aplica un virus entomapatógeno en campo, el factor más limitante es la radiación solar y en especial la luz UV (Sporleder *et al.*, 2000, Caballero *et al.*, 2001, Young, 2005). Por esta razón, en el presente estudio se evaluó el efecto fotoprotector de dos prototipos de formulaciones (concentrado emulsionable y granulado dispersable), desarrolladas para el control de *Tecia solanivora* en campo. Esta evaluación se realizó con miras a determinar, en términos de las variables de eficacia y actividad original remanente, la formulación más eficiente en cuanto a la fotoprotección del virus.

En la figura 10 se presentan los porcentajes de eficacia obtenidos con las dos formulaciones y el virus puro, antes y después de ser irradiados con una fuente artificial de luz UV (0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas) (Anexo 1).

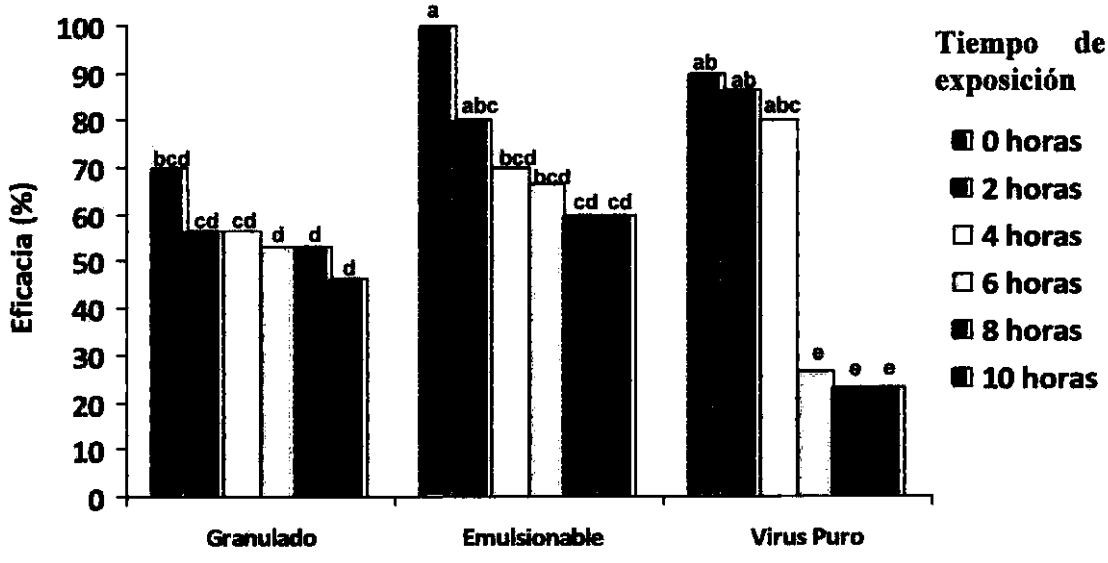


Figura 10. Efecto de la radiación UV sobre la eficacia de dos formulaciones (granulado dispersable y concentrado emulsionable) a base del aislamiento VG003 de granulovirus. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%)

Como se puede observar en dicha figura, la eficacia para el virus puro sin irradiar fue del 90%, a las 2 horas de irradiación del 86,6%, a las 4 horas del 80%, a las 6 horas del 26.6%, a las 8 horas del 23,3%, y a las 10 horas del 23.3%. El concentrado emulsionable presentó una eficacia del 100% antes de ser expuesto a la luz UV, valor que se redujo al 70% después de 2 horas de exposición, al 66.6% después de 4 horas, al 60% después de 6 horas y se mantuvo en el 60% hasta las 10 horas de exposición. Finalmente, la eficacia obtenida con el granulado dispersable, fue del 70%, del 56.6%, del 56.6%, del 53.3%, del 53,3% y del 46,6%, después de 2, 4, 6, 8 y 10 horas de exposición a la radiación respectivamente.

Se puede observar para todos los tratamientos, que hay una disminución en el porcentaje de eficacia, a medida que aumentó el tiempo de exposición. Este resultado indica que la radiación emitida por la lámpara Repti glo (UVA y UVB), inactivó el virus formulado y sin formular.

La eficacia obtenida con el concentrado emulsionable y el virus puro sin formular después de 6, 8 y 10 horas de exposición, fue significativamente menor ($p< 0,05$) que la eficacia inicial de cada tratamientos, lo que sugiere que la radiación ultravioleta causó una inactivación significativa del virus a partir de las 6 horas de exposición. Por el contrario, el granulado dispersable no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las eficacias obtenidas en todos los tiempos de exposición, lo que indica que esta formulación no fue significativamente inactivada por la irradiación durante 10 horas y fue el prototipo más eficiente para proteger el virus de la radiación UV. Sin embargo, el concentrado emulsionable también brindó protección al virus, a pesar de haber presentado una reducción significativa de la eficacia, ya que después de 10 horas de exposición, ésta fue significativamente mayor que la obtenida con el virus puro (Anexo 2).

El granulado dispersable fue la formulación más eficiente para proteger al virus de la radiación UV, sin embargo, éste fue el tratamiento que presentó la menor eficacia inicial como se observa en la tabla 1. Los resultados obtenidos para tratamientos no expuestos a la radiación fueron el 70% de eficacia para el granulado dispersable, el 90% para el virus puro el 100% para el concentrado emulsionable. La eficacia del granulado no fue significativamente diferente de la obtenida con el virus puro, ni de la obtenida con el concentrado emulsionable, lo que sugiere que las formulaciones no afectaron la actividad del agente biocontrolador. Sin embargo, la eficacia inicial del concentrado emulsionable fue mayor que la del virus sin formular y significativamente mayor que la del granulado, lo que sugiere que dicha formulación posiblemente potenció la actividad del agente biocontrolador.

Tabla 1. Eficacia, inactivación y actividad original remanente de las formulaciones a base del aislamiento de granulovirus VG003, expuestos a la radiación UV

Tratamiento	Tiempo (h)	Eficacia (%)	SD	Inactivación (%)	OAR (%)
Granulado	0	70,0	10,0	0,0	100,0
dispersable	2	56,6	5,8	19,0	80,9
	4	56,6	5,8	19,0	80,9
	6	53,3	5,8	23,8	76,1
	8	53,3	5,8	23,8	76,1
	10	46,6	5,8	33,3	66,6
Concentrado	0	100,0	0,0	-	-
emulsionable	2	80,0	10,0	20,0	80,0
	4	70,0	10,0	30,0	70,0
	6	66,6	5,8	33,3	66,6
	8	60,0	17,0	40,0	60,0
	10	60,0	10,0	40,0	60,0
Virus puro	0	90,0	10,0	-	-
	2	86,6	12,0	3,7	96,2
	4	80,0	10,0	11,1	88,8
	6	26,6	5,8	70,3	29,6
	8	23,3	5,8	70,0	25,9
	10	23,3	5,8	70,0	25,9

Dicho comportamiento podría deberse a que la composición del granulado incluye proteínas, carbohidratos y azúcares, los cuales se solidifican o cristalizan sobre los cuerpos de inclusión cuando el producto es deshidratado. En el trabajo de Tamez *et al.* (2006) se utilizaron este tipo de sustancias, ya que se introdujeron polímeros de uso comestible como el almidón, la harina de maíz y el gluten en formulaciones granulares del nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera*. La utilización de dichos materiales se basó en que durante su producción, éstos quedan en estado de pregelatinización y al mezclarse con agua caliente, los azúcares que forman la cadena polimérica pasan a ser insolubles. Este proceso hace que el virus quede atrapado en la matriz polimérica, que les brindará protección cuando sean aplicados en el cultivo y de esta manera permanecerán y serán atractivos a la plaga, en el intestino de la cual, se podría disolver el granulado después de la ingestión y de esta forma liberar el virus.

Para el caso del granulado evaluado en el presente trabajo, es posible que los compuestos poliméricos utilizados en la formulación (proteínas y carbohidratos), hayan formado matrices de difícil disolución en el intestino del insecto, que afectaron la liberación del virus en el sitio de acción. Por esta misma razón, es posible que el prototipo de formulación de granulado dispersable haya presentado una muy buena protección frente a la radiación ultravioleta, ya que podría haberse encapsulado, adquiriendo una cubierta que los protegió del efecto de la luz.

Un comportamiento similar obtuvieron Ignoffo & Batzer (1971), quienes microencapsularon el nucleopoliedrovirus de *Heliothis zea* con celulosa. El virus microencapsulado produjo una mortalidad del 60%, en comparación con el 10% de mortalidad obtenido con el virus sin formular. Este comportamiento posiblemente se debió al uso de polímeros o carbohidratos

para la formación de las microcápsulas, que pudieron formar matrices insolubles como las anteriormente mencionadas.

Con respecto a la otra variable evaluada, correspondiente a la actividad original remanente (OAR%), se puede observar en la Tabla 1 y la Fig 11, que a medida que aumentó la exposición a la radiación UV, se presentó una disminución numérica en el porcentaje de actividad original remanente para la formulación concentrado emulsionable. Sin embargo, el análisis de varianza (95%) no detectó diferencias significativas ($p>0,05$) entre los valores de dicha variable, en los diferentes tiempos de irradiación. Este resultado confirma que la luz ultravioleta simulada, no causó una inactivación significativa de esta formulación.

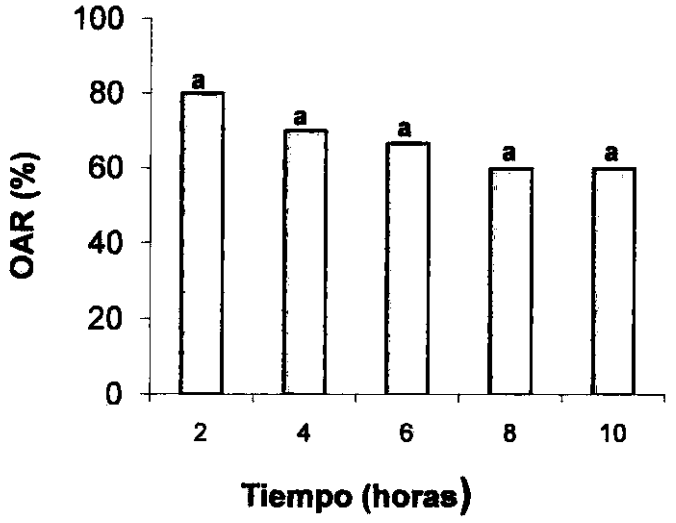


Figura 11. Actividad original remanente del concentrado emulsionable expuesto a radiación UV. Tratamiento con la misma letra no son significativamente diferentes según el análisis de varianza (95%)

El granulado dispersable presentó el mismo comportamiento que el concentrado emulsionable (Tabla 1, Fig. 12). Se observó una disminución numérica en el porcentaje de actividad original remanente del granulado,

pero no se presentaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para cada tiempo de exposición según el análisis de varianza (95%) (Anexo 3). Dicho comportamiento confirmó que para esta formulación, tampoco se produjo una inactivación significativa del virus.

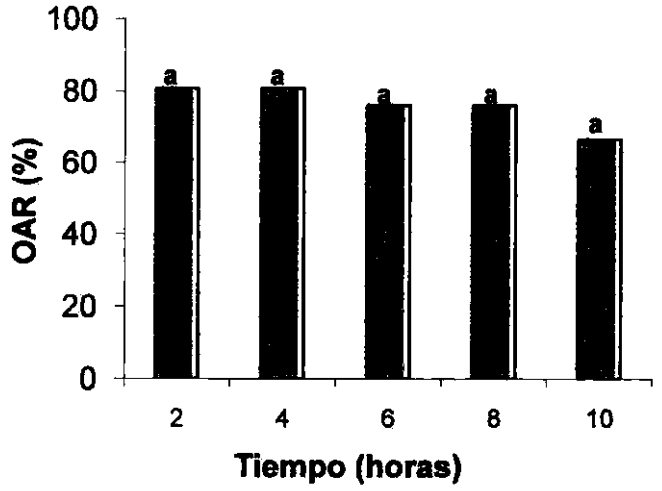


Fig 12. Actividad original remanente del granulado dispersable expuesto a radiación UV Tratamiento con la misma letra no son significativamente diferentes según según el análisis de varianza (95%)

Tanto con la variable porcentaje de eficacia como con la variable actividad original remanente, se observó que las dos formulaciones brindaron al virus protección frente a la radiación UV (Anexo 4). Sin embargo, el granulado dispersable presentó una mayor actividad original remanente después de 10 horas de irradiación, con un 66.66%, con respecto a un 60% del concentrado emulsionable.

En un estudio similar realizado por Batista *et al.* (2001), se evaluó la tolerancia a la radiación UV, de dos formulaciones del nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis*. Los tratamientos evaluados fueron una formulación en concentrado emulsionable y el virus sin formular. El porcentaje de mortalidad de larvas obtenido con el virus formulado expuesto a luz UV por 5

minutos, fue mayor que el obtenido para el virus sin formular, con un 37% y un 19% respectivamente. En dicho trabajo el concentrado emulsionable protegió al virus de la radiación, posiblemente debido a la adición de aceites vegetales, que actúan como fotoestabilizadores y mantienen de esta forma, la actividad de los agentes de biocontrol. Dicho efecto fotoestabilizador de los aceites vegetales, podría haberse presentado en el presente estudio, para la formulación oleosa del granulovirus de *Phthorimea operculella*.

Con respecto al virus sin formular (Tabla 1 y en la Fig. 13) se observó tanto con la variable eficacia, como con la variable actividad original remanente, una inactivación significativa del virus a partir de las 6 horas de exposición (Anexo 5), lo que sugiere que este es el tiempo crítico de exposición del aislamiento viral VG003 a la luz ultravioleta tipo A y B.

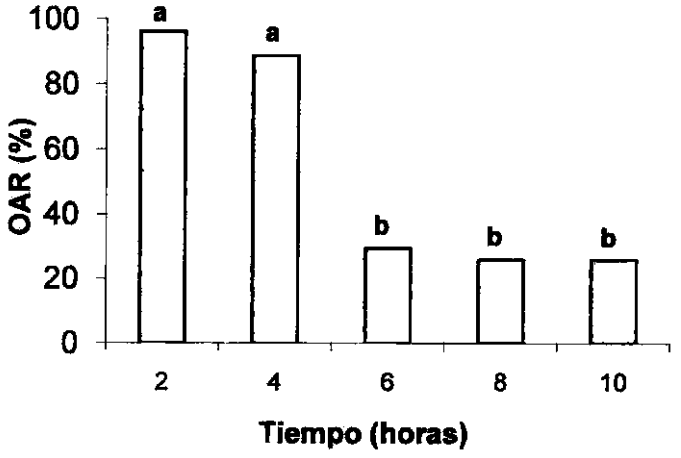


Fig 13. Actividad original remanente del virus puro sin formula expuesto a radiación UV. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de comparación de medios de Tukey (95%)

La suceptibilidad a la radiación ultravioleta de otro aislamiento del granulovirus de *Phthorimea operculella* también fue estudiado por Sporleder *et al.* (2000). En dicho trabajo se determinó el tiempo de inactivación de este granulovirus sin formular, expuesto a la radiación solar natural en Perú.

Después de la exposición a luz solar en diferentes meses del año, el virus se inactivó alrededor del 99% en un rango de 2.56 min a 4.53 min, dependiendo del mes de exposición y del incremento de la energía. Este resultado sugiere que posiblemente el aislamiento viral VG003 evaluado en el presente trabajo, es más resistente frente a la luz solar que el aislamiento Peruano, ya que el aislamiento VG003 sin formular, se inactivó en un 70,3% después de 6 horas de exposición a una fuente de luz solar simulada y no en cuestión de minutos.

La inactivación causada por la luz solar sobre los virus entomopatógenos no se ha evidenciado solamente para el granulovirus de *P. operculella*, sino para una gran cantidad de especies y aislamientos virales. Tal es el caso del nucleopoliedrovirus de *Heliothis virescens,* el cual después de una exposición de 16 horas a la luz solar simulada, presentó una actividad original remanente del 26% (Ignoffo, 1989). De igual manera ocurrió para el nuclepoliedrovirus de *Lymantria dispar*, el cual después de 210 min de exposición a un fuente de luz solar simulada, redujo su porcentaje de actividad original remanente a un 22.2%.

En el presente trabajo se observó que las dos formulaciones fotoestabilizaron el granulovirus de *P. operculella* , como ha sido demostrado en otros trabajos para otros virus. Tal es el caso de Ignoffo *et al.* (1997), quienes evaluaron diferentes formulaciones del nucleopoliedrovirus de *Heliothis zea*, versus el virus puro sin formular. Después de 4 horas de exposición a la radiación solar, las formulaciones virales presentaron un porcentaje de actividad original remanente que osciló entre 23.4% y el 100%, mientras que el virus puro sin formular, mantuvo sólo el 12.8% de su actividad original, lo que indica que con algunas formulaciones se obtuvo una protección eficiente y en algunos casos completa, de las partículas virales.

Las formulaciones evaluadas por Ignoffo *et al.* (1997) incluían diferentes excipientes como protectores UV (abrillantador amarillo, benzopurpurina y carbón) polímeros y carbón. Las formulaciones evaluadas en el presente estudio incluían carbohidratos, silicatos, aceites vegetales, proteínas, tensioactivos y un protector ultravioleta que hace parte del grupo de los abrillantadores ópticos, cada uno de los cuales pudo contribuir a la fotoestabilización del virus

Dentro de los protectores ultravioleta, podemos encontrar una serie de sustancias que según su modo de acción, pueden dividirse en enzimas, antioxidantes y absorbentes; y dentro de los absorbentes encontramos los colorantes y los abrillantadores ópticos (Caballero *et al.*, 2001).

Ignoffo & García (1994). evaluaron antioxidantes como la feniltiocarbamida, el ácido ascórbico, el n-propil galato y enzimas oxidativas como la catalasa, la peroxidasa y la superoxido dismutasa. Los autores observaron que los tres antioxidantes protegieron al nucleopoliedrovirus de *Heliothis zea* del efecto nocivo de la radiación UV. El compuesto que presentó la mejor fotoestabilización, fue el propil galato con un protección del 90% y de las enzimas oxidativas destacandose la catalasa con una protección del 50%.

La protección que brindan los absorbentes a los virus, también fue demostrada en un trabajo realizado por Martignoni & Iwai (1985). En dicho estudio se evaluaron siete absorbentes para la protección del nucleopoliedrovirus de *Lymantria dispar,* obteniéndose una protección entre el 59,39% al 100% cuando el virus fue mezclado con el lignosulfonato, a una concentración del 6,28%.

Dentro de los absorbentes se encuentran los colorantes, que también han sido evaluados como protectores UV. Se demostró la protección que brindaron los colorantes como el amarillo brillante, el negro búfalo, el azul de

metileno y la safranina para la protección frente a la radiación ultravioleta simulada del virus de la poliedrosis nuclear (NPV) del gusano falso medidor (*Trichoplusia ni)*. También han encontrado que colorantes solubles como el índigo y el carmín, proveían alguna protección al nucleopoliedrovirus de *Spodoptera litorales*. Sin embargo, materiales inertes como la atapulgita y la montmorilonita han demostrado ser más efectivos (Ragaei, 1999).

El potencial de los colorantes también fue demostrado por Shapiro & Robertson (1990), quienes evaluaron 18 compuestos y determinaron que el verde de lissamida, el amarillo de acridina, el azul alcalino y el mercurio cromo, protegieron efectivamente al nucleopoliedrovirus de la polilla gitana (*L. dispar)*.

En otro trabajo realizado por Shapiro (1989), se determinó que el rojo congo a una concentración del 1%, logró una protección total del nulcleopoliedrovirus de *L. dispar*, con un porcentaje de actividad original remanente del 100%, después de 60 min de exposición a una fuente de luz artificial.

Otros productos también pueden brindar protección frente a la radiación UV, como es el caso de los óxidos de hierro, ampliamente utilizados en la industria farmacéutica. Asano (2005), determinó que estos compuestos pueden reducir la fotoinactivación del granulovirus de *Homona mugnanina*. Los amino ácidos, como el triptófano también han demostrado su potencial fotoestabilizador, proveiendo una completa protección al nucleopoliedrovirus de *Heliothis zea* y la fenilalanina, la histidina y la prolina una protección < 50%, después de 24 horas de exposición a una fuente artificial de luz ultravioleta (Ignoffo & Garcia, 1995). Las proteínas fluorescentes también fueron estudiadas por Mcintosh *et al.*, (2004), quienes comprobaron que éstas, protegían al nuclepoliedrovirus de *Autographa californica* después de 20 min de exposición una fuente de luz ultravioleta tipo B.

El filtro ultravioleta utilizado en las formulaciones evaluadas en el presente estudio, pertenece al grupo de los abrillantadores ópticos. La protección que brindan los derivados del estilbeno frente a radiación solar, más específicamente frente a la radiación UV, se debe a la capacidad que tienen estos compuestos de absorber el espectro que comprende la luz UV y emitir luz en la región azul del espectro visible (Caballero *et al.*, 2001).

Es posible que el filtro UV haya sido el excipiente que le brindó protección al granulovirus frente a la radiación ultravioleta, en la formulaciones evaluadas en el presente trabajo, ya que se ha comprobado en diferentes experimentos, que la incorporación de abrillantadores ópticos del grupo de los estilbenos, dentro de formulaciones de baculovirus, puede proveer este tipo de protección y además mejorar la patogenicidad viral (Martínez *et al.*, 2003). Sin embargo, es posible también que otros componentes de las dos formulaciones como los aceites vegetales o los carbohidratos formadores de red, hayan brindado alguna protección a los cuerpos de inclusión virales.

El efecto de los abrillantadores ópticos fue demostrado por Shapiro (1992), quien evaluó 23 abrillantadores pertenecientes a diferentes grupos químicos (estilbenos, oxazoles, pirazoles y ácido natálico), encontrando que la mejor protección se consiguió con los estilbenos: Leucophor BSB, Phorwithe AR, Intrawite CF, Leucophor BS, Phorwite BRU, Phorwite BKL, Phorwite CL, y Tinopal LPW. Estas sustancias fueron eficientes a una concentración del 1%, proporcionando protección total, con un porcentaje de actividad original remanente del 100% .

En otro estudio realizado por Dougherty *et al.*, (1996), se evaluó el efecto fotoestabilizador de un abrillantador fluorescente a una concentración del 1%, para los nucleopoliedrovirus de *A. californica* y de *L. dispar.* Se utilizó una fuente de luz UV simulada por 30 minutos, confirmando que este

compuesto brindó efectiva protección a los dos nucleopoliedrovirus evaluados.

7.2. Determinación de la inocuidad de los auxiliares de formulación de cada prototipo de bioplaguicida sobre larvas de la polilla guatemalteca

Con el fin de determinar si las mezclas de los excipientes de cada una de las formulaciones evaluadas (granulado dispersable y concentrado emulsionable) con y sin el fotoprotector utilizado en éstos tenían algún efecto en la mortalidad de larvas de *Tecia solanivora,* se llevó a cabo un bioensayo en el cual, el sustrato de alimentación del insecto fue aplicado con los excipientes de cada prototipo de bioplaguicida o con el abrillantador óptico sin incluir el virus.

Como se puede observar en la figura 14 (Anexo 6), la mortalidad de las larvas cuando el sustrato de alimentación se inoculó con la mezcla de excipientes del granulado con y sin el filtro ultravioleta fue del 3,3%. La mezcla de excipientes del concentrado emulsionable sin filtro ultravioleta causa una mortalidad del 0% y la misma mezcla de excipientes incluyendo el filtro ultravioleta produjo una mortalidad del 3,3%. Para el testigo absoluto la mortalidad fue del 0%. Los resultados obtenidos no presentaron homogenidad de varianzas por lo que fueron analizados con la prueba no paramétrica de Kruskall Wallis (95%) (Anexo 7). Este análisis no detectó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en los que se inocularon los excipientes con y sin filtro UV ($p>0,005$), ni entre éstos y el testigo absoluto. Estos resultados indican que las mezclas de excipientes de las dos formulaciones con y sin filtro, no causaron una mortalidad significativa de las larvas lo que sugiere que fueron inocuas para las larvas de la polilla guatemalteca.

El abrillantador óptico utilizado puede causar perturbaciones en la membrana peritrofica del insecto, según lo menciona la literatura (Caballero *et al.*, 2001). Sin embargo, este efecto no se evidenció en el presente trabajo, ya que no se observaron diferencias entre el efecto de los excipientes cuando se utilizaron con y sin el fitlro UV

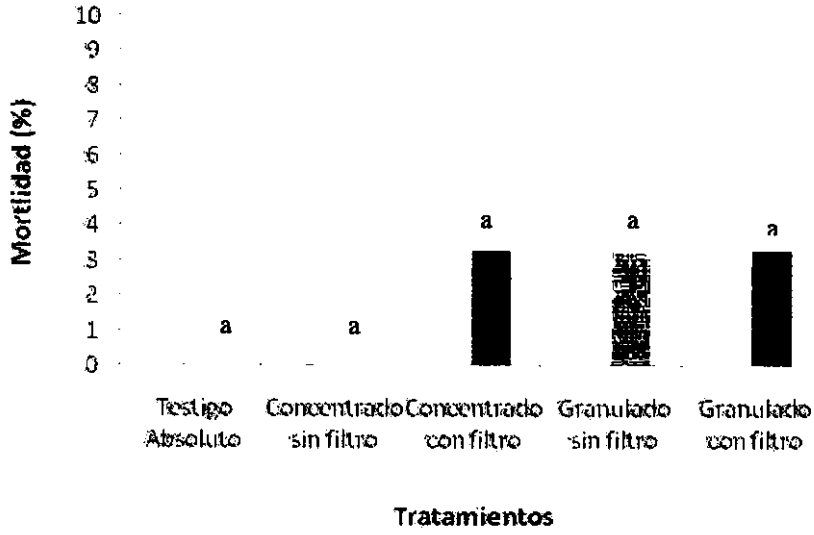


Figura 14. Efecto de excipientes de los dos prototipos de formulaciones incluyendo o no el filtro UV, sobre las larvas de T. solanivora .Tratameintos con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Kruskall wallis (95%)

El concentrado emulsionable, es una formulación que está constituida por el principio activo (baculovirus) suspendido en un vehículo oleoso a base de aceite vegetal y varios coadyuvantes (Gómez & Villamizar, 2000). Dentro de los componentes de esta base oleosa podemos encontrar aceites vegetales ampliamente utilizados en la industria alimenticia. Un empleo de aceite vegetal es el aceite de maíz, que está compuesto por una gran cantidad de ácidos grasos y algunas vitaminas (A y D) (Wikipedia, 2008) y es un producto que no tiene restricciones específicas y no tiene manifestaciones tóxicas después de su ingestión oral (Boylan *et al.*, 1986). Otro ejemplo de aceite vegetal es el aceite de algodón, un producto obtenido de las semillas de las variedades de *Gasspium herbaceum*, el cual es de color amarillo

pálido y aceitoso (Smith *et al.*,1996) y tampoco tiene restricciones específicas de manejo (Boylan *et al.*, 1986).

Dentro de los coadyuvantes están los tensioactivos como el Span, que son ésteres parciales de ácidos grasos y anhídridos sacados del sorbitol (Smith *et al.*,1996). Estas sustancias son bien toleradas cuando se toman oralmente y sus niveles de toxicidad para animales superiores son muy bajos (Boylan *et al.*, 1986). Otros tensioactivos son los polisorbatos, que hace parte de los surfactantes no iónicos y son obtenidos comercialmente por esterificación de ácidos grasos con óxido de etileno o con polietileno (Smith *et al.*,1996); estos polisorbatos no son irritantes y tienen muy baja toxicidad (Boylan *et al.*, 1986).

Esta formulación además tiene un filtro ultravioleta que es del grupo de los abrillantadores ópticos, los cuales se han demostrado que tienen un efecto sobre el epitelio del intestino medio de las larvas, y pueden ocasionar otras perturbaciones fisiológicas en las larvas que incluyen la disminución del pH intestinal y la disminución del apetito (Goulson *et al.*, 2002). Por ejemplo, para el Calcofluor uno de los abrillantadores ópticos, se ha demostrado que causa la degradación de la mucina del intestino de las larvas (Caballero *et al.*, 2001). Sin embargo, la mezcla de excipientes utilizada en el presente trabajo, a pesar de incluir un abrillantador óptico, no causó un efecto sobre las larvas. Es posible que al mezclarse dicho compuesto con los otros excipientes, alguno de éstos haya minimizado o interferido con el mencionado efecto de los derivados del estilbeno.

Con respecto a la otra formulación consistente en un granulado dispersable, éste está constituida por el principio activo (baculovirus) acompañado de varios coadyuvantes como diluentes, desintegrantes, aglutinantes y el mismo filtro ultravioleta (Higuera, 2003).

Dentro de los excipientes de la formulación encontramos algunos carbohidratos. Los carbohidratos muy utilizados en la industria se destaca el almidón, el cual es extraído de granos maduros y es la mezcla de dos polímeros, amilasa y aminopectina (Smith *et al.*,1996). Es una sustancia comestible, registrada para el empleo general (Boylan *et al.*, 1986). También podemos encontrar la sacarosa, un disacárido de glucosa y fructosa que se sintetiza en plantas, pero no en animales superiores (Wikpedia, 2008), es una sustancia comestible y no tóxica para el ser humano (Boylan *et al.*, 1986).

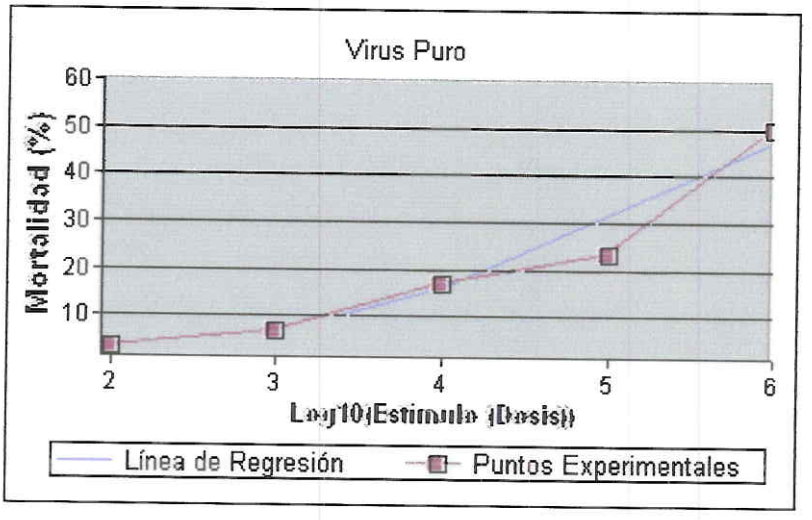
Como diluente en el desarrollo de formulaciones en la industria farmacéutica se utilizan los silicatos, como el silicato de magnesio Esta sustancia no es tóxica, ni irritante y no presenta ningún problema toxicológico (Boylan *et al.*, 1986). Es un polvo blanco o amarillento, sacado de la porcelana de arcilla de China (Smith *et al.*,1996). Este compuesto administrado oralmente es inofensivo y no tiene en este sentido ningún tipo de restricciones (Boylan *et al.*, 1986). Como podemos observar, los grupos de excipientes utilizados en las dos formulaciones son seguros, no tóxicos y no presentan ningún tipo de restricción de manejo, por esta razón, es posible que no hayan sido tóxicos para las larvas de *T. solanivora* y se espera que tampoco presente problemas de toxicidad para el entorno, para aves, peces, invertebrados, mamíferos y el hombre.

7.3 Evaluación del efecto potenciador del filtro UV sobre el aislamiento de granulovirus VG003

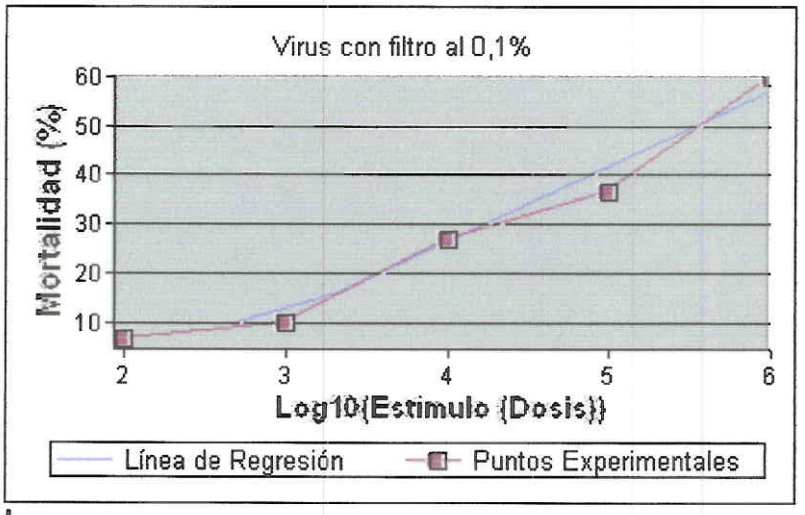
Se ha demostrado que los abrillantadores ópticos (grupo al que pertenece el filtro ultravioleta utilizado en las dos formulaciones evaluadas en el presente estudio), pueden proteger el virus frente a la radiación UV y además tienen la capacidad de potenciar su actividad biocontroladora (Caballero *et al.*,

2001). Por esta razón, se realizó un bioensayo para determinar si el filtro ultravioleta empleado (CBUV05) tiene un efecto potenciador de la actividad biocontroladora de el aislamiento de grunulovirus de *Phthorimea operculella* VG003

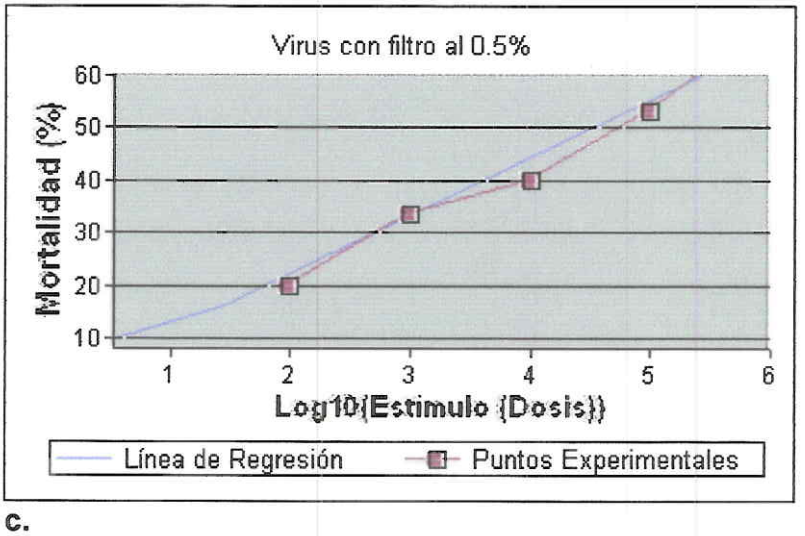
Los resultados de mortalidad (Anexo 8) fueron sometidos a un análisis Probit con el programa Bioestat 2007(Anexo 9,10 y 11). Para todos los tratamientos, el valor de P fue mayor a 0,05, lo que permite aceptar la hipótesis propuesta, que sugiere que existe una correlación lineal entre la dosis y la respuesta evaluada, correspondiente a la mortalidad de las larvas. En la figura 15 se observa, que a medida que aumentó la concentración o la dosis viral, aumentó también la mortalidad del insecto.



a.



b.



c.

Figura 15. Curvas de regresión obtenidas en la evaluación dosis- respuesta del aislamiento VG003 sobre larvas de *T. solanivora*. **a.** Virus puro sin fotoprotector. **b.** Virus puro con fotoprotector al 0.1%. **c.** Virus puro con fotoprotector al 0.5%

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 x 10^6, 3,0 x 10^5 y 3,0 x 10^4 CI/ mL (Tabla 2). Estos valores no fueron diferentes entre sí según los límites de confianza estimados por el programa estadístico, lo que sugiriría que el fotoprotector CBUV05 no tuvo un efecto potenciador del aislamiento VG003 de granulovirus. Sin embargo, 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%, ésta fue dos exponentes menor que la CL_{50} del virus puro y un exponente menor con respecto a la CL_{50} del virus mezclado con el fotoprotector al 0,5%. Este comportamiento sugiere que si hay un efecto potenciador del filtro, aunque en el presente trabajo, éste no fue estadísticamente significativo.

Tabla 2- Resultados del análisis probit del ensayo dosis – respuesta para el virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0,1% y al 0,5%.

TRATAMIENTO	CL_{50}	Límite de confianza inferior	Límite de confianza superior	χ^2	Valor P
VIRUS PURO	$1,6 \times 10^6$	$3,41 \times 10^5$	$4,16 \times 10^7$	0,505	0,917
VIRUS CON FOTOPROTECTOR AL 0.1%	$3,0 \times 10^5$	$9,87 \times 10^4$	$3,36 \times 10^6$	0,418	0,936
VIRUS CON FOTOPROTECTOR AL 0.5%	$3,0 \times 10^4$	$8,32 \times 10^3$	$3,16 \times 10^5$	0,173	0,981

Con respecto a la variable eficacia (Fig.16), se observó un aumento de la misma a medida que aumentó la concentración viral, pero también fue incrementada a medida que aumentó la concentración del filtro ultravioleta. Sin embargo, la prueba de comparación de medias Tukey (95%) (Anexo 12) no detecto diferencias significativas ($p>0,05$) entre la eficacia obtenida para los tres tratamientos con cada concentración viral, lo que sugeriría que el filtro ultravioleta utilizado no presentó un efecto potenciador significativo. Cabe destacar que al igual que con las concentraciones letales, existió una tendencia numérica a obtener mayor mortalidad de las larvas, cuando el virus se mezció con el filtro CBUV05, lo que podría sugerir que éste si tiene

alguna actividad potenciadora, que posiblemente requiere el uso de concentraciones mayores para ejercer un efecto significativo.

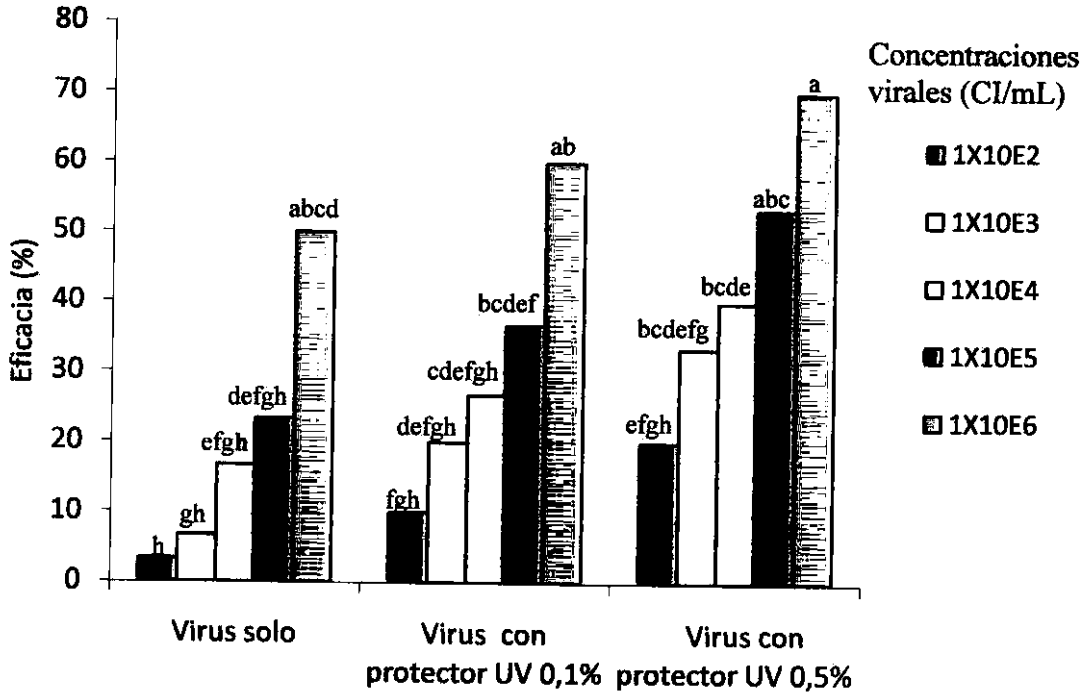


Figura 16. Eficacia del virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0.1% y al 0.5%. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de comparación de medios de Tukey (95%)

Cuando los tubérculos se inocularon solo con el fotoprotector sin el virus a una concentración del 0,1%, se obtuvo un porcentaje de mortalidad del 6.66%, con una concentración de 0,5% se obtuvo un porcentaje de mortalidad del 16,6% y con el testigo absoluto del 0% (Tabla 3) (Anexo 13). Se observó que la mortalidad obtenida con los tratamientos fue significativamente mayor que la obtenida con el testigo absoluto, lo que indica que el abrillantador óptico empleado causó una mortalidad significativa de las larvas, lo que podría deberse a su efecto sobre la membrana peritrófica o el pH intestinal (Caballero *et al.*, 2001). Sin embargo este efecto no fue evidenciado cuando se evaluó la inocuidad de la mezcla de excipientes, lo que podría atribuirse a una interferencia de estos en el

efecto fisiológico del abrillantador óptico sobre las larvas. La mortalidad se incrementó directamente con la concentración del filtro, sugiriendo que el abrillantador óptico en estudio, podría causar mayor mortalidad si se aumenta su concentración. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre estos tratamientos según el análisis de diferencias mínimas significativas (DMS) al 95% (Anexo 14), lo que sugiere que el efecto del fotoprotector sobre las larvas no aumentó significativamente al incrementar, la concentración del 0.1% al 0.5%.

El efecto de los abrillantadores ópticos fue comprobado por Shapiro, 1992 cuando evaluó 23 compuestos de este grupo mezclados con el nucleopoliedrovirus de *L. dispar* a diferentes concentraciones como 0.1%, 0.25%, 0.5%, y 1%. Evidenciando que a una concentración del 1% presentó el mejor porcentaje de mortalidad hasta del 99.3%.

Tabla 3. Efecto del fotoprotector CBUV05 sobre las larvas de *T. solanivora*. Tratamiento con la misma letra no son significativamente diferentes según el análisis DMS 95%

Tratamiento	Mortalidad (%)	SD	Grupos Homogéneos (Tukey 95%)
Fotoprotector sin virus 0,10%	6,66	5.77	A
Fotoprotector sin virus 0,50%	16,66	5.77	A
Testigo Absoluto	0	0	B

Este grupo de filtros UV ha demostrado tener la capacidad de aumentar la actividad biocontroladora de algunos virus como el nucleopoliedrovirus de *L. dispar*, para el cual aumentó dos mil veces su actividad (Shapiro & Robertson, 1992 citado por Caballero *et al.*,2001). De igual forma, en otro

estudio realizado por Argauer & Shapiro (1997), en el cual se evaluó el efecto de varios abrillantadores ópticos sobre este mismo nucleopoliedrovirus, se confirmó esta actividad, ya que la CL_{50} del virus puro fue de 26.500 CI/mL y con el uso de abrillantadores ópticos como el Blankophor BBH al 1%, está disminuyó a 76 CI/mL.

En un estudio realizado por Martínez *et al.* (2003), para el nucleopoliedrovirus de *Spodopetera frugiperda*, se evaluó el efecto potenciador de diez abrillantadores ópticos del grupo de los estilbenos. Las larvas fueron tratadas con el virus solo, obteniéndose un porcentaje de mortalidad del 66,3% y cuando el virus se mezcló con dos de estos abrillantadores ópticos (Blankophor BBH y Calcofluor M2R) se obtuvo el 100% de mortalidad.

En otro estudio realizado por Lasa *et al.* (2006), se aplicó el nucleopolihedrovirus de *Spodoptera exigua* solo sin formular y mezclado con el abrillantador óptico Leucophor AP a plantas ubicadas en un invernadero. Los valores de CL_{50} fueron reducidos de 57.3 CI/mm2 cuando el virus se aplicó solo, a valores de CL_{50} de 2.29 y 0.01 CI/ mm2 cuando se incluyó el Leucophor AP.

Durante la última década han surgido diferentes hipótesis sobre el modo de acción de los abrillantadores ópticos, todas dirigidas hacia el intestino medio del insecto. En estudios con el NPV de *L. dispar*, se encontró que 48 h después del consumo del virus mezclado con Tinopal LPW, se produjeron perturbaciones fisiológicas que incluyeron la disminución del pH intestinal, la disminución en la alimentación y una reducida ganancia de peso (Caballero *et al.*, 2001).

Los abrillantadores ópticos incrementan la probabilidad de infección del el virus por inhibición de la síntesis de la quitina, incrementando la

permeabilidad de la membrana peritrófica, reduciendo el volumen necesario de virus para causar infección y muerte en la larvas (Okuno *et al.*, 2002)

Este efecto se ha comprobado para ciertos abrillantadores ópticos como el Calcofluor, el cual se une fuertemente a las β- glucanasas y de esta forma afecta la biosíntesis de la quitina. La membrana peritrófica, que es una estructura quitinosa que representa una barrera crucial para la infección de los baculovirus y en larvas lepidópteras, se ve afectada por este compuesto. El consumo del Calcofluor M2R causa la disociación de proteínas del marco quitinoso de la membrana peritrófica, resultando en un aumento marcado de su porosidad (Martínez *et al*, 2003)

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 demás proteínas de la membrana. Sin embargo, también se ha observado un efecto debido a la degradación de la mucina del intestino, principalmente con el uso de Calcofluor M2R (Wang & Granados, 2000)

Los resultados permiten concluir que el abrillantador óptico evaluado en este estudio si podría tener un efecto potenciador sobre el aislamiento viral VG003, el cual es dependiente de la dosis, pero se ve reducido por la combinación con los excipientes de la formulación. Para aprovechar dicho efecto, podría considerarse un aumento en la concentración del filtro dentro del producto, sin que éste altere la sostenibilidad del proceso de manufactura y de su aplicación en campo, desde el un punto de vista ambiental.

8. CONCLUSIONES

- Las dos formulaciones brindaron al virus protección frente a la radiación UV durante 10 horas de exposición.

- El granulado dispersable fue más fotoestable que el concentrado emulsionable pero presentó una menor actividad biocontroladora.

- Los excipientes utilizados en las dos formulaciones no fueron tóxicos para las larvas de *T. solanivora*.

- El abrillantador óptico tiene un efecto sobre las larvas de *T. solanivora*, el cual es dependiente de la dosis y se ve influenciado por la combinación con los demás excipientes de la formulación.

- No se evidenció un efecto potenciador significativo del abrillantador óptico sobre la actividad del virus, pero se detectó una tendencia numérica en una reducción en la CL_{50} a medida que se incrementa la concentración del filtro UV.

9. RECOMENDACIONES

- Optimizar las dos formulaciones para mejorar su eficacia y fotoestabilidad.

- Estudiar la estabilidad de las dos formulaciones bajo condiciones de almacenamiento.

- Evaluar la eficacia de las formulaciones optimizadas bajo condiciones de campo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ARAQUE, C. T.; GARCÍA, J. 1999. Manejo integrado de la polilla guatemalteca de la papa "*Tecia solanivora* Povolny". En Memorias de 5 seminario Técnico Regional Corpoica Regional Siete. Editorial Produmedios. Pág 21-22.

ARGAUER, R.; SHAPIRO, M. 1997. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the *Gypsy moth* (Lepidoptera: Lymantriidae) Baculovirus. *Journal Ecnonomic Entomology.* 90 (2). Pág. 416-420.

ASANO, S. 2005. Ultraviolet protection of a granulovirus product using iron oxide. *Journal Applied Entomology.* 40(2). Pág. 359-364.

BALLESTEROS, J. 2006. Productos para protección solar con extracto de zanahoria: estado del arte. Programa de especialización en ciencia y tecnología cosmética. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D. C., Colombia. Pág. 13-23.

BATISTA, A.; ALVES, S.; AUGUSTO, N.; PEREIRA, R.; ALVES, L. 2001. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatalis* Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotropical Entomology.* 30 (3). Pág. 411-416.

BOYLAN, J.; COOPER, J.; CHOWHAN Z.; LUND, W.; WADE, A.; WEIR, R.; YATES, B. 1986. Handbook of pharmaceutical excipients. American Pharmaceutical Association. USA. Pág 328

BRAGA, M.; MOSCARDI, F. 2002. Field efficacy of the Nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera:

Noctuidae): Effect of formulations, water pH, volume and time of application, and type of spray nozzle. *Neotropical Entomology*. 3 (1). Pág. 75-83.

BURGES, H. D. 1998. Formulation of microbial biopesticides beneficial, microorganisms, nematodes and seed treatments. Publisher Clower Academic. Cáp. 2.

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.I. Pág. 518.

CLEM, R. 2005. The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in Insects. CTMI. 289. Pág. 113-130

CORPOICA. 2007. [On line]. http://www.corpoica.org.co/. [Consulta15 febrero 2008]

CUARTAS, P. 2006. Estudio del desarrollo de la infección y el efecto de la formulación de aislamientos de granulovirus sobre *Tecia solanivora* (Povolony) *Phthorimaea operculella* (Zeller). Tesis de Pregrado. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D. C, Colombia. Pág. 5-15.

DEVOTTO, L.; GERDING, M. 2003. Respuesta de dos aislamientos chilenos de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin a la adición de un protector solar. *Agricultura Técnica* (Chile). 63 (4). Pág. 339-346.

DOUGHERTY, E.; GUTHRIE, K.; SHAPIRO, M. 1996. Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection. *Biological Control*. 7. Pág. 71-74.

ECHEVERRÍA, C. 1998. Aspectos biolològicos, comportamiento y manejo integrado de la polilla guatemalteca de la papa "*Tecia solanivora*". Segundo curso, manejo sanitario del cultivo de la papa. Editorial Produmedios. Nariño Pág 26-31.

EL CORREO DE LA PAPA. 2002. [On line]. http://www.agrocadenas.gov.co/papa/documentos/sinaipa_boletin9.pdf. [Consulta: febrero 5 de 2008]

EL CORREO DE LA PAPA. 2002. [On line]http://www.agrocadenas.gov.co/papa/documentos/sinaipa_boletin11.pdf [Consulta: febrero 5 de 2008]

FRIESEN, P.; MILLER, L. 2001. General Virology. Capítulo 20. Insect virases. Cuarta edición. Lippincott Williams y Wilkins. Pág. 599-621.

GALÁN, L., TÁMEZ, R. 1993. Estado actual y perspectivas de bioinsecticidas microbianos. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*, Universidad Autónoma de México. México. Pág. 85-89.

GÓMEZ, J. 2005. Búsqueda y selección de aislamientos nativos de granulovirus para el control de *Tecia solanivora* (povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) en cultivos de Papa en Cundinamarca. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogota. Pág. 139.

GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L. 2000. Producción másiva, separación, secado y fromulación de microorganismos biocontroladores. En Memorias de I Taller de Control Biológico- MIP. Corpoica. Bogotá D.C. Colombia. Pág. 108-112.

GOULSON, D.; DERWEN, L.; PENAGOS, D.; WILLIAMS, T. 2002 .Effects of optical brighteners included biopesticide formulations on the growth of crops. *Elsevier Science.* Pág. 235-240.

GUTIÉRREZ, S.; LÓPEZ – FERBER. M. 2004. Les strategies stratègies des baculovirus pour franchir l'intestin des insectes. Virolology. Vol.8, No 4, Pág. 311-321.

HERRERA, C.; FIERRO, L.; MORENO, J. 2000. Manejo integrado del cultivo de la papa. Manual técnico. Editorial Produmedios. Colombia, Pág. 112-116.

HIGUERA, N. 2003. Caracterización y determinación de la estabilidad biocontroladora de un bioplaguicida a base de la levadura *Pichia onychis* para el control de *Rhizopus stolonifer* en la postcosecha del tomate. Tesis de Pregrado. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. Colombia. Pág. 48-60.

IGNOFFO, C.; BATZER, O. 1971. Microencapsulatión and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. *Internatioanl Minerals & Chemical Corporation*, Pág. 212-215.

IGNOFFO, C.; GARCIA, C. 1992. Combinations of Environmental Factors and Simulated Sunlight Affecting of Inclusion Bodies of the *Heliothis* (Lepidptera: Noctuidae) Nucleopolyhedrosis Virus. *Environmental Entomology.* 38. Pág. 210- 213.

IGNOFFO, C.; GARCIA, C. 1994. Antioxidant and oxidative enzyme effect on the inactivation of inclusión bodies of the *Heliothis* baculovirus by simulated sunlight –UV. *Environmental Entomology.* 23 (4). Pág. 1025-1029.

IGNOFFO, C.; GARCIA, C.; SAATHOFF, S. 1997. Sunlight stability and rain-fatness of formulations of Baculovirus *heliothis*. *Environmental Entomology*. 26(6). Pág. 1470-1474.

IGNOFFO, C.; RICE, W.; McINTOSH. A. 1989. Inactivation of nonoccluded an occluded baculoviruses and baculoviruses – DNA exposed to simulated sunlight. *Environmental Entomology*. 18(1). Pág. 177-183.

Lalimentaria.http::/www.ialimentaria.com/publicaciones/ia/articulos/IA68_S7.pdf'
www.ialimentaria.com/publicaciones/ia/articulos/IA68_S7.pdf. [Consulta: febrero 8 de 2008]

LASA, R.; RUIZ, C.; ALCAZAR, M.; BELDA, J.; CABALLERO, P.; TREVOR, W. 2006. Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain. 2006. Biological Control. 40. Pág. 89-96.

LÓPEZ, A.; ESPÍTIA, E. 2000. Plagas y beneficios en el cultivo de la papa en Colombia. Boletín Técnico Dibulgativo. Editorial Produmedios. Colombia, Pág. 11-12.

MARTIGNONI, M.; IWAI, P. 1985. Laboratoy evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of douglas-fir tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Baculovirus. *Journal Economic Entomology*. 78. Pág. 982-987.

MARTINEZ, A. ; OIHANE, S.; WILLIAMS. T.; CABALLERO, P. 2003. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. *The Netherlands Entomomological Society*. 109. Pág. 139-146.

MCINTOSH, A.; GRASELA, J.; LUA, L.; BROUNAGEL, S. 2004. Demostration of the protective effects of fluorescent proteins in baculovirus exposed to ultraviolet light inactivation. *Journal of Insects Science*. 4(31). Pág.1-9.

MORALES, L.1993. Formulación de bioinsecticidas, Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*, Universidad Autónoma de México. México. Pág. 85-89.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; SOSA, D.; PARO, F.; SOLDORIO, I. 1997. Enhanced Activity of *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) Nuclear Polyhedrosis Virus by Boric Acid in the Laboratory. *Society Entomology Brasil*. 26 (1). Pág. 115-120.

NIEGEL, D.; DYLAN, G. 2003. Ecological roles of solar UV radiation: Towards and integrated approach (Review). *TRENDS in Ecology and Evolution*. Elservier. Vol. 18, No. 1. Pág. 48-54.

NIÑO, L. 2004. Revisión sobre la polilla de papa Tecia solanivora en Centro y Surámerica. Suplemente Revista Latinoamericana de la Papa. Pág. 1-18.

NIÑO, L.; NOTZ, A. 2000. Patogenicidad del virus Granulosis de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) 1973 (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado de Mérida, Venezuela. Boletín Entomológico Venezolano. Vol. 15 No. 1. Pág. 39-48.

OJEDA, Z.; ROCHA, P.; CALVACHE, H. 2002. Baculovirus como insecticida biológico. Palmas. 23 (4). Pág. 27-37.

OKUNO, S.; TAKATSUKA, J.; NAKAI, M.; OTOTAKE, S; MASUI, A.; KUNIMI, Y. 2001. Viral-enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodopetera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. Biological Control. 26. Pág. 146-152.

RAGAEI, M. 1999. Radiation protection of microbial pesticides. *Journal Applied Entomology*. 123. Pág. 381-384.

RODRIGUÉZ, D. 2000. Los entomopatógenos en el Manejo Integrado de Plagas. En Memorias de I Taller de Control Biológico- MIP. Corpoica. Bogotá D.C. Colombia. Pág. 152-160.

SHAPIRO, M. 1989. Congo red as an ultraviolet protectant for the Gypsy Moth (Lepidoptera: *Lymantridae*) nuclear Polyhedrosis virus. *Economic Entomology*. 82(2). Pág. 548-550.

SHAPIRO, M. 1992. Use of optical brighteners as radiation portectants for Gypsi Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Nuclear polyhedrosis virus. Journal *Economic Entomology*. 85 (5). Pág.1682-1686.

SHAPIRO, M.; DOUGHERTY, E. 1994. Enhancement in activity of homologous and heterologous viruses against the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by an optical brightener. *Journal of Economic Entomology*. 87. 361– 365.

SHAPIRO, M.; AGIN, P.; BELL, R. 1983. Ultraviolet potectasnts of the *Gypsy moth* (Lepidoptera: *Lymantridae*) Nucleopolyhedrosis Virus. Environmental Entomology. Pág. 982-985

SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J. 1990. Laboratory evaluationof dyes as ultraviolet screens for the gypsy moth "Lepidoptera Lymantriidae" nuclear

polyhedrosis virus. *Economic Entomology*. 72. Pág. 57- 61

SMITH, A.; BUDAVARI, S.; O'NEIL,M.; HECKELMAN, P.; KINEARY, J. The merk Index an enciclopedia of chemicalis, drugs, and biologicals. 1996. Merk Research Laboratories. USA. Pág 299 -5603

SORIANO, J. 1999. Algunos aspectos para una major comprensión de *Tecia solanivora* (polilla guatemalteca. Memorias del xxvi congreso "Los insectos patrimonio natural y actividad de Colombia". *Sociedad colombiana de Entomología*. Editorilal Guadalupe Ltda. Bogotá. Pág. 239-247.

SOTELO, G. 1997. La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) y su control con baculovirus. II curso –taller: Manejo integrado de plagas de la papa. CRECED, Valle de Ubaté y Chiquinquirá. Colombia. Pág. 133-128

SPORLEDER, M.; ZEGARRA, O.; KROSCHEL, J.; HUBER, J.; LAGNAOUI, A. 2000. Assesment of the inactivation time of *Phtorimaea operculella* granulovirus (*Po*GV) at different intensities of natural irradiation. CIP. Lima, Perú. Pág. 123-127.

SZEWCZYK, B.; HOYOS. L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I.; LOBO, M. 2006. Baculoviruses re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*. 24. Pág. 143–160.

TAMEZ, P.; ZAMUDIO, V.; MARTÍNEZ, J.; RODRIGUEZ, C.; TAMEZ, R.; GOMEZ, R. 2006. Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida. *Ciencia UANL*. 10(2) Pág. 149-156.

VELÁSQUEZ, Z. G.; URIBE, D. C.; ZULUAGA, A. 1998. Fundamentos de

Medicina. Terapia dermatológica. Corporación para investigaciones biológicas CIB. Medellín, Colombia. Pág. 30-36.

VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; GÓMEZ, J.; COTES, A. 2006. Reconocimiento, selección y evaluación de aislamientos nativos de virus de la granulosis para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa. Boletín técnico divulgativo. Editorial Produmedios. Colombia. Pág. 5-9.

WAKEFIELD, G.; GREEN, M.; LIPSCOMB, S.; FLUTTER, B. 2004. Modified titania nanomaterials for sunscreen applications – reducing free radical generation and DNA damage. *Material science and technology*. 20 (8). Pág. 985-988.

WANG, P.; GRANADOS, R. 1997. An intestinal mucin is the target for a baculovirus enhancin. *Proc Natl Acad Sci U S A* .94. Pág. 6977–6982

WANG, P.; GRANADOS, R. 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30(2). Pág. 135-143.

WIKIPEDIA. http://en.wikipedia.org/wiki/Baculovirus [Consulta: Marzo 8 de 2008]

WINSTANLEY, D.; REILLY´O, D. 1999. Baculoviruses (Baculoviridae). Granuloviruses in: Encyclopedia of Virology. Pág. 140-146

YOUNG, S. 2005. Persistence of virases in environment. http://www.agctr.isu.edu/s265/young.htm. (Consulta : Febrero 8 de 2005).

ZAR, J. 1999. Biostatistical analysis. Cuarta edición. Prentice Hall. New Jersey. Pág. 663.

11. ANEXOS

11.1. ANEXO 1. Datos brutos de exposición a luz ultravioleta de las dos formulaciones evaluadas (granulado dispersable y concentrado emulsionable)

PRODUCTO GRANULADO

	MUERTAS			VIVAS		
	REPETICIONES			REPETICIONES		
Testigo Absoluto	0	0	0	10	10	10
0 horas	6	8	7	4	2	3
2 horas	5	6	6	5	4	4
4 horas	6	6	5	4	4	5
6 horas	6	5	5	4	5	5
8 horas	6	5	5	4	5	5
10 horas	5	5	4	5	5	6

PRODUCTO EMULSIONABLE

	MUERTAS			VIVAS		
	REPETICIONES			REPETICIONES		
Testigo Absoluto	0	0	0	10	10	10
0 horas	10	10	10	0	0	0
2 horas	7	9	8	3	1	2
4 horas	6	7	8	4	3	2
6 horas	6	7	7	4	3	3
8 horas	4	7	7	6	3	3
10 horas	6	7	5	4	3	3

VIRUS PURO

	MUERTAS			VIVAS		
	REPETICIONES			REPETICIONES		
Testigo Absoluto	0	0	0	10	10	10
0 horas	8	9	10	2	1	0
2 horas	8	8	10	2	2	0
4 horas	7	8	9	3	2	1
6 horas	2	3	3	8	7	7
8 horas	2	3	2	8	7	8
10 horas	3	2	2	7	8	8

11.2. ANEXO 2. Análisis estadístico de exposición a luz ultravioleta de las dos formulaciones evaluadas (granulado dispersable y concentrado emulsionable)

ANALISIS DE VARIANZA

TATISTIX FOR WINDOWS 11/28/07, 14:22
ONE-WAY AOV FOR: A B C D E F G H I J K L N O P Q R S

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	17	25016.7	1471.57	20.91	0.0000
WITHIN	36	2533.33	70.3704		
TOTAL	53	27550.0			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.
COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 467.066
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
A	70.000	3	10.000
B	56.667	3	5.7735
C	56.667	3	5.7735
D	53.333	3	5.7735
E	53.333	3	5.7735
F	46.667	3	5.7735
G	100.00	3	0.0000
H	80.000	3	10.000
I	70.000	3	10.000
J	66.667	3	5.7735
K	60.000	3	17.321
L	66.667	3	5.7735
N	90.000	3	10.000
O	86.667	3	11.547
P	80.000	3	10.000
Q	26.667	3	5.7735
R	23.333	3	5.7735
S	23.333	3	5.7735
TOTAL	61.667	54	8.3887

CASES INCLUDED 54 MISSING CASES 0

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
G	100.00	I
N	90.000	I I
O	86.667	I I
H	80.000	I I I
P	80.000	I I I
A	70.000	.. I I I
I	70.000	.. I I I
J	66.667	.. I I I
L	66.667	.. I I I
K	60.000	.... I I
B	56.667	.... I I
C	56.667	.... I I
D	53.333	 I
E	53.333	 I
F	46.667	. ..... I I
Q	26.667	 I
R	23.333	 I
S	23.333	 I

THERE ARE 5 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 5.301 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 25.676
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 6.8493

11.3. ANEXO 3. Anova de Concentrado emulsionable expuesto a radiación UV

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: ___OAR OAR

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	826.666667	206.666667	1.63	0.2413
Error	10	1266.666667	126.666667		
Total correcto	14	2093.333333			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	___OAR Media
0.394904	16.71480	11.25463	67.33333

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TIEMPO__HORAS_	4	826.6666667	206.6666667	1.63	0.2413

11:52 Friday, March 12, 2008 3

11.4. ANEXO 4. Anova de granulado dispersable expuesto a radiación UV

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: ___OAR OAR

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	403.853640	100.963410	1.50	0.2750
Error	10	674.443733	67.444373		
Total correcto	14	1078.297373			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	___OAR Media
0.374529	10.77674	8.212452	76.20533

Fuente	DF	Cuadrado Anova SS	la media	F-Valor	de Pr > F
TIEMPO__HORAS_	4	403.8536400	100.9634100	1.50	0.2750

11:52 Friday, March 12, 2008 6

11.5. ANEXO 5. Anova y tukey del virus puro expuesto a radiación UV

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para ___OAR

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	10
Error de cuadrado medio	57.63869
Valor crítico del rango estudentizado	4.65429
Diferencia significativa mínima	20.401

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIEMPO__ HORAS_
A	96.293	3	T2
A			
A	88.883	3	T4
B	29.627	3	T6
B			
B	25.923	3	T10
B			
B	25.923	3	T8

11.6. ANEXO 6. Datos brutos del efecto de excipientes (sin virus) de los dos prototipos de formulaciones sobre las larvas sin filtro ultravioleta y con filtro ultravioleta

	MUERTAS			VIVAS		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetción 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetción 3
Testigo Absoluto	0	0	0	10	10	10
Emulsionable sin filtro	0	0	0	10	10	10
Emulsionable con filtro	0	0	1	10	10	9
Granulado sin filtro	0	1	0	10	9	10
Granulado con filtro	0	0	1	10	10	9

11.7. ANEXO 7. Kruskall Wallis de efecto de excipientes (sin virus) de los dos prototipos de formulaciones sobre las larvas sin filtro ultravioleta y con filtro ultravioleta

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV

VARIABLE	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
EMULCON	9.0	3
EMULSIN	6.5	3
GRACON	9.0	3
GRANSIN	9.0	3
TESTIGO	6.5	3
TOTAL	8.0	15

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 2.3333
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.6747

PARAMETRIC AOV APPLIED TO RANKS

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	4	22.5000	5.62500	0.50	0.7368
WITHIN	10	112.500	11.2500		
TOTAL	14	135.000			

TOTAL NUMBER OF VALUES THAT WERE TIED 15
MAX. DIFF. ALLOWED BETWEEN TIES 0.00001

CASES INCLUDED 15 MISSING CASES 0

COMPARISONS OF MEAN RANKS

VARIABLE	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
EMULCON	9.0000	I
GRACON	9.0000	I
GRANSIN	9.0000	I
EMULSIN	6.5000	I
TESTIGO	6.5000	I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL Z VALUE	2.81
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	10.250

11.8. ANEXO 8. Datos brutos del ensayo eficacia del virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0.1% y al 0.5%

	MUERTAS			VIVAS		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
TESTIGO ABSOLUTO	0	0	0	10	10	10

CONTROLVIRUS SOLO

	MUERTAS			VIVAS		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1X102	0	0	1	10	10	9
1X103	1	0	1	9	10	9
1X104	2	2	1	8	8	9
1x105	3	2	2	7	8	8
1X106	4	5	6	6	5	4

PROTECTOR 0.1% Y VIRUS

	MUERTAS			VIVAS		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1X102	10	2	1	0	8	9
1X103	2	3	1	8	7	9
1X104	3	3	2	7	7	8
1X105	3	5	3	7	5	7
1X106	6	6	6	4	4	4

PROTECTOR 0.5% y VIRUS

	MUERTAS			VIVAS		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1X102	2	3	1	8	7	9
1X103	3	4	3	7	6	7
1X104	5	5	2	5	5	8
1X105	5	6	5	5	4	5
1X106	7	6	8	3	4	2

11.9. ANEXO 9. Analisis probit del ensayo dosis – respuesta para el virus puro

Análisis Probit (Método Finney [Distribución Lognormal])

Log10 [Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Probit (Y)	Peso (Z)	X*Z	X*X*Z	Y*Z	X*Y*Z
2	0,03	3,18	4,35	6,33	13314	4,22	421,46
3	0,07	3,50	8,29	10,50	1997230	6,99	6987,54
4	0,17	4,03	12,99	16,13	356527374	14,38	143774,54
5	0,23	4,28	17,06	21,36	40446911112	17,28	1728031,81
6	0,5	5,00	19,04	30,00	5E+12	25,00	25000000,00
		Suma	61,71400938	285,0023292	1411,475297	263,4018611	0

Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
2	0,03	0,03	30	1	0,79	0,21	0,06
3	0,07	0,07	30	2	2,09	-0,09	0,00
4	0,17	0,16	30	5	4,64	0,36	0,03
5	0,23	0,29	30	7	8,68	-1,68	0,32
6	0,50	0,46	30	15	13,87	1,13	0,09
Chi cuadrado	0,51	*Grados de Libertad*	3	*nivel p*	0,917658398		

Percentil de Dosis (Estímulo)

Percentil	Probit (Y)	Log10 [Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar
1	2,67	1,16	1,00	14,44	70,86
5	3,36	2,64	0,62	434,14	860,38
10	3,72	3,43	0,45	2665,78	3265,23
20	4,16	4,38	0,31	24017,89	18879,70
25	4,33	4,74	0,31	55366,48	42725,86
30	4,48	5,07	0,33	117198,25	98075,52
40	4,75	5,66	0,42	453650,13	507831,36
50	5,00	6,21	0,53	1603966,51	2495681,59
60	5,25	6,75	0,66	5671129,39	12364193,85
70	5,52	7,34	0,81	21951765,86	68654665,77
75	5,67	7,67	0,89	46466900,91	177414409,24
80	5,84	8,03	0,98	107116364,23	510725905,36
90	6,28	8,99	1,24	965085223,95	8269041283,55
95	6,65	9,77	1,45	5925995169,42	82570375601,34
99	7,33	11,25	1,84	178124313274,68	6210335454326,19

Log10[LD50]	6,21	*Log10[LD16]*	4,036740891	*Log10[LD84]*	8,374		
LD50	1603966,51	*LD16*	10882,8061	*Beta*	0,461	*Error Estándar Log10[LD50]*	0,53
Error Estándar LD50	2495681,59	*LD84*	236401214,3	*Alfa*	2,138		
LD50 LCL	341420,97	*LD100*	353799838,2	*Error Estándar Beta*	0,102		
LD50 UCL	41634474,29	*Nivel de Significación*	0,05				

11.10 ANEXO 10. Analisis probit del ensayo dosis – respuesta para el virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0.1%

Análisis Probit (Método Finney [Distribución Lognormal])

Log10 [Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Probit (Y)	Peso (Z)	X*Z	X*X*Z	Y*Z	X*Y*Z
2	0,07	3,51	7,07	7,00	19972,30	6,99	698,75
3	0,10	3,73	11,59	11,16	2654813,70	9,87	9871,32
4	0,27	4,38	15,93	17,51	425482490,40	18,63	186251,24
5	0,37	4,66	18,67	23,30	46597482110,40	21,71	2171325,34
6	0,60	5,25	18,82	31,52	4747066732173,40	24,94	24936024,76
		Suma	72,08	318,89	1531,70	323,64	0,00

Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
2	0,07	0,05	30	2	1,60	0,38	0,09
3	0,10	0,12	30	3	3,70	-0,73	0,14
4	0,27	0,24	30	8	7,20	0,76	0,08
5	0,37	0,40	30	11	12,00	-1,04	0,09
6	0,60	0,58	30	18	17,40	0,60	0,02
Chi cuadrado	0,42	*Grados de Libertad*	3	*nivel p*	0,90		

Percentil de Dosis (Estímulo)

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar
1	2,67	0,41	1,00	2,54	12,54
5	3,36	1,91	0,66	81,78	179,01
10	3,72	2,72	0,50	520,98	732,98
20	4,16	3,69	0,33	4907,74	4144,24
25	4,33	4,06	0,30	11506,58	8480,20
30	4,48	4,39	0,28	24729,89	17326,77
40	4,75	4,99	0,31	98386,91	77590,05
50	5,00	5,55	0,39	356886,09	366311,75
60	5,25	6,11	0,49	1294559,20	1802121,96
70	5,52	6,71	0,62	5150353,38	9976536,55
75	5,67	7,04	0,69	11069116,81	25706107,79
80	5,84	7,41	0,77	25952402,61	73662124,02
90	6,28	8,39	0,99	244478232,61	1172166989,59
95	6,65	9,19	1,17	1557446807,90	11500015421,51
99	7,33	10,70	1,52	50157361626,68	834426092633,30

Log10[LD50]	5,55	*Log10[LD16]*	3,34	*Log10[LD84]*	7,77		
LD50	356886,09	*LD16*	2188,36	*Beta*	0,45	*Error Estándar Log10[LD50]*	0,39
Error Estándar LD50	366311,75	*LD84*	58202339,97	*Alfa*	2,49		
LD50 LCL	98724,37	*LD100*	87125066,91	*Error Estándar Beta*	0,09		
LD50 UCL	3361162,57	*Nivel de Significación*		0,05			

11.11. ANEXO 11. Analisis probit del ensayo dosis – respuesta para el virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0.5%

Análisis Probit (Método Finney [Distribución Log normal])

Log10 [Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Probit (Y)	Peso (Z)	X*Z	X*X*Z	Y*Z	X*Y*Z
2	0	4,16	14,78	8,32	38170,87	15,87	1587,35
3	0	4,57	17,37	13,71	4569708,24	20,88	20882,23
4	0	4,75	18,86	18,99	474706673,22	22,54	225346,43
5	1	5,08	18,97	25,42	49165541267,34	24,99	2499303,68
6	1	5,52	17,66	33,14	4451996259234,64	24,59	24592835,66
		Suma	87,65	357,94	1627,30	424,39	0,00

Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
2	0	0,20	30	6	6,08	-0,08	0,00
3	0	0,31	30	10	9,16	0,84	0,08
4	0	0,43	30	12	12,80	-0,80	0,05
5	1	0,56	30	16	16,65	-0,65	0,03
6	1	0,68	30	21	20,34	0,66	0,02
Chi cuadrado	0	*Grados de Libertad*	3	*nivel p*	0,98		

Percentil de Dosis (Estímulo)

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar
1	2,67	-2,62	2,10	0,00	0,15
5	3,36	-0,51	1,47	0,31	4,50
10	3,72	0,61	1,13	4,09	27,74
20	4,16	1,97	0,75	93,81	256,11
25	4,33	2,49	0,62	308,28	602,46
30	4,48	2,95	0,51	897,23	1318,38
40	4,75	3,79	0,39	6169,99	6210,71
50	5,00	4,57	0,40	37294,17	39805,13
60	5,25	5,35	0,54	225422,75	359658,88
70	5,52	6,19	0,75	1550164,69	4217594,76
75	5,67	6,65	0,88	4511630,97	16680433,41
80	5,84	7,17	1,02	14827006,18	77473762,53
90	6,28	8,53	1,42	339729837,10	4480466997,56
95	6,65	9,65	1,76	4508142751,32	129181792363,04
99	7,33	11,76	2,40	574781914137,07	71683324392574,90

Log10[LD50]	4,60	*Log10[LD16]*	1,48	*Log10[LD84]*	7,66		
LD50	37294,20	*LD16*	30,37	*Beta*	0,32	*Error Estándar Log10[LD50]*	0,40
Error Estándar LD50	39805,10	*LD84*	45795461,34	*Alfa*	3,52		
LD50 LCL	8323,80	*LD100*	68674544,93	*Error Estándar Beta*	0,08		
LD50 UCL	316596,30	*Nivel de Significación*	0,05				

11.12. ANEXO 12. Anova y tukey del ensayo eficacia del virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0.1% y al 0.5%

TATISTIX FOR WINDOWS 03/11/08, 11:26

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
O	70.000	I
J	60.000	I I
N	53.333	I I I
E	50.000	I I I I
P	40.000	.. I I I I
I	36.667	.. I I I I I
L	33.333	.. I I I I I I
H	26.667	.... I I I I I I
G	26.667	..... I I I I I
D	23.333	..... I I I I I
K	20.000	..... I I I I
C	16.667	..... I I I I
F	10.740	..... I I I
B	6.6667	..... I I
A	3.3333	 I

THERE ARE 8 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 5.210 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 28.268
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 7.6735

11.13. ANEXO 13. Datos brutos de la eficacia del fotoprotector CBUV05 sin virus

	MUERTAS			VIVAS		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
TESTIGO ABSOLUTO	0	0	0	10	10	10

	MUERTAS			VIVAS		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Protector 0.1%	1	1	0	9	9	10
Protector 0,5%	2	1	2	8	9	8

11.14. ANEXO 14. DMS de la eficacia del fotoprotector CBUV05 sin virus

TATISTIX FOR WINDOWS 05/22/08, 10:56

LSD (T) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
FOT5	16.667	I
FOT1	6.6667	I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL T VALUE 2.776 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 13.088
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 4.7140

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

EFECTO DE DOS FORMULACIONES EN LA FOTOESTABILIDAD Y EFICACIA DE UN GRANULOVIRUS PARA EL CONTROL DE *Tecia solanivora*

RESUMEN

Teniendo en cuenta las importantes pérdidas económicas causadas por la polilla guatemalteca de la papa en este cultivo, el laboratorio de Control Biológico de Corpoica desarrolló dos formulaciones a base de un granulovirus nativo (aislamiento VG003), las cuales incluyen un protector UV del grupo de los abrillantadores ópticos, considerando que la luz ultravioleta del sol es el factor más deletéreo sobre la persistencia de los baculovirus bajo condiciones de campo. Para evaluar la fotoestabilidad brindada por el protector UV, éstas fueron expuestas a una fuente de luz ultravioleta artificial 2, 4, 6, 8 y 10 horas. Las formulaciones fueron aplicadas sobre tubérculos de papa pastusa, las cuales se expusieron a la radiación y posteriormente sobre cada una de ellas fueron colocadas 10 larvas neonatas de *T. sonalivora* y se midió el efecto de la luz UV, expresado como el nivel de inactivación del virus, con respecto a la mortalidad de las larvas. De igual manera se evaluó el efecto potenciador del fotoprotector sobre el aislamiento viral VG003 y su inocuidad sobre larvas de *T. solanivora*. Para determinar el efecto potenciador, se tomó el virus puro y se mezcló con el fotoprotector. Se utilizaron concentraciones virales desde $1x10^2$ hasta $1x10^6$ CI/mL, las cuales se mezclaron con el fotoprotector al 0,1% y al 0,5% y se realizó un bioensayo que permitió determinar las CL_{50} del virus puro y mezclado con el fotoprotector. Para evaluar la inocuidad del fotoprotector y de los excipientes de las formulaciones, éstos fueron aplicados sobre los tubérculos de papa y se realizó un bioensayo. Las dos formulaciones (concentrado emulsionable y granulado dispersable) protegieron eficientemente el virus del efecto de la radiación UV, obteniéndose una eficacia del 60% después de 10 horas de exposición del para el concentrado emulsionable, del 46,6% para el granulado dispersable y del 23,3% para el virus puro. Con respecto al efecto potenciador de la actividad biocontroladora se observó que a medida que aumentó la concentración del fotoprotector, aumentó la eficacia del virus, obteniéndose una CL_{50} de $1,6x10^6$ CI/mL para el virus puro, de $3,0x10^5$ CI/mL para el virus con el fotoprotector al 0,1% y de $3,0x10^4$ CI/mL para el virus con el fotoprotector al 0,5. En el ensayo de inocuidad de los excipientes de las formulaciones y el abrillantador óptico utilizado como protector UV, se determinó que éstos no causan mortalidad de las larvas por lo que se puede concluir que la mortalidad causada por la formulaciones se debió al efecto del agente viral empleado como principio activo.

Palabras claves. Baculovirus, granulovirus, fotoestabilidad, formulación, bioplaguicida, potenciador

ABSTRACT

Taking into account, the important economic losses caused by the Guatemalan potato moth in this crop, the laboratory of Biological Control of Corpoica developed two formulations based on a native granulovirus (isolate VG003), which include a UV sunscreen of the group of optical brighteners, considering that UV radiation from sunlight is the most deleterious factor over the persistence of baculoviruses under field conditions. To evaluate the photostability given by the UV sunscreen, these were exposed to an artificial UV light source during 2,4,6,8 and 10 hours. The formulations

were applied over potato tubers that were exposed to radiation and afterwards, 10 neonate larvae were placed on top of them. The effect of UV radiation was measured as viral inactivation in regards to larval mortality. In the same way the enhancing effect of the sunscreen over the viral isolation VG003 and its harmlessness over *T. solanivora* larvae were evaluated. For the enhancing effect, the pure virus was mixed with the sunscreen at viral concentrations from $1x10^2$ until $1x10^6$ CI/mL, these were mixed with the sunscreen at 0,1% and 0,5% and a bioassay was performed to determine the LD_{50} of the pure virus and the mixture with sunscreen. To evaluate the harmlessness of the sunscreen and the excipients over the larvae, a bioassay was performed. Both formulations (emulsifiable concentrate and dispersible granulate) efficiently protected the virus form UV radiation obtaining an efficacy of 60% for the emulsifiable concentrate and 46,6% for the dispersible granulate after 10 hours of exposure. In regards to the effect over biocontrol activity, it was observed that the efficiency of the virus increased proportionally to the increase on the sunscreen concentration, obtaining a LD_{50} of $1,6 x10^6$ CI/ mL for the virus with the sunscreen at 0,5%. In the harmlessness bioassay of the excipients and the brightener used as UV sunscreen, it was determined that these do not cause larval mortality, from which can be concluded that the mortality caused by the formulations is due to the viral agent used as active ingredient.

Key words: Baculovirus, granulovirus, photostability, formulation, bioplaguicida.

INTRODUCCIÓN

La principal plaga del cultivo de la papa es la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, insecto que produce pérdidas que oscilan entre el 50 y el 100% (Villamizar *et al.*, 2006).

Los agricultores para el control de esta plaga, acuden al uso de una gran cantidad de plaguicidas químicos, que son aplicados frecuentemente y en ocasiones sin justificación técnica. Frente a este problema surge la necesidad de desarrollar estrategias de manejo integrado de plagas (MIP), que además del control cultural, etológico y químico, incluyen herramientas de control biológico (Herrera *et al.*, 2000).

Dentro de las estrategias de control biológico implementadas para el manejo de *T. solanivora*, se encuentra el uso de virus entomopatógenos, como es el caso del granulovirus de *Phthorimea operculellla.*

Sin embargo la preservación de la actividad original de un virus o algún otro entomopatógeno usado como insecticida microbiano y aplicado en campo, se ha querido incrementar ya que existen diferentes factores que pueden inactivarlo (Ignoffo & García, 1997).

Dentro de los factores ambientales, el que produce la mayor inactivación y afecta en mayor proporción la estabilidad de los virus entomopatógenos, es la radiación solar. La inactivación causada por la luz solar puede ser muy rápida y se debe principalmente a la porción del espectro de luz ultravioleta (UV) (Shapiro *et al.*, 1983), 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).

Es por esto que se han realizado diferentes trabajos en búsqueda de herramientas que proporcionen protección a los virus, inhibiendo o retardando la fotoinactivación, para lo cual se han probado diferentes

sustancias 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).

Es por esto que Copoica desarrolló dos formulaciones a base del aislamiento viral nativo VG003 del granulovirus de *Phthorimea operculella*, un concentrado emulsionable y un granulado dispersable, los cuales incluyen dentro de sus excipientes un protector UV que pertenece al grupo de los abrillantadores ópticos, el cual además de brindar fotoprotección, ha mostrado tener un efecto potenciador de la actividad biocontroladora de varios baculovirus (Caballero *et al.*, 2001).

En el presente estudio se pretendió evualuar el efecto de dos formulaciones en la fotoestabilidad y eficacia de un granulovirus para el control de *Tecia solanivora*

MATERIALES Y MÉTODOS

Propagación viral
Para contar con la cantidad requerida de inoculo viral, se tomaron huevos de *T. solanivora* provenientes de la cría de insectos ubicada en el Laboratorio de Entomología de Corpoica, los cuales fueron inoculados con el aislamiento nativo de granulovirus VG003 proveniente de Cundinamarca. 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 a temperatura ambiente.

Se tomaron cubetas de plástico de 4 litros, en las cuales se colocaron servilletas absorbentes en el fondo y encima 6 tubérculos de papa pastusa secos y previamente lavados con agua potable.

Luego de tener los tubérculos dispuestos en las cubetas, se tomaron los discos de papel toalla que contenían los huevos inoculados y se cortaron en pedazos (20 a 40 huevos), estos fueron ubicados individualmente sobre cada papa. Los recipientes fueron cerrados e incubados en el cuarto de bioensayos a una temperatura de 25°C por 20 días. Pasado este tiempo, las larvas fueron extraídas y clasificadas. Aquellas larvas con síntoma típico de la enfermedad, se colocaron en cajas de Petri estériles, las cuales fueron selladas y almacenadas a 4°C.

Exposición a luz UV artificial Los dos prototipos de bioplaguicidas fueron elaborados por el grupo de tecnología del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria- CBB de Corpoica (Figura 8). Éstos se reconstituyeron en agua y se ajustaron a una concentración final de 10^6CI/mL. También se preparó una suspensión ajustada a la misma concentración de los prototipos de bioplaguicida reconstituidos utilizando virus puro sin formular. Estas suspensiones fueron utilizadas para inocular la superficie de los tubérculos de la papa. La aplicación se realizó con una brocha de 1 pulgada, aplicando 2 mL por cada cara del tubérculo.
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.

Una vez inoculadas las papas, éstas fueron ubicadas en una cabina de flujo laminar a 60 cm de la fuente de luz UV, utilizando un diseño de bloques.

Las filas comprendieron los diferentes tiempos de exposición y las columnas 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 (UVA y UVB) y los tiempos de exposición fueron de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas. Cada dos horas se cubrió una fila de tubérculos con papel aluminio, correspondiente a cada tiempo se exposición. El testigo absoluto consistió en tubérculos no tratados y no expuestos a la radiación UV.

Sobre cada tubérculo se colocaron 10 larvas neonatas de *T. solanivora*. Los recipientes se taparon e incubaron en el cuarto de bioensayos a una temperatura de 25°C durante 30 días. Pasado este tiempo se realizó un muestreo destructivo de los tubérculos en busca de todas las larvas presentes en los mismos. Se contó el número de larvas muertas o desaparecidas, de larvas sanas, de larvas vivas con síntomas y el número de pupas. 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):

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

En 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 original de actividad remanente (%OAR), mediante la fórmula (Martignoni & Iwai, 1985):

$$OAR(\%) = \frac{\text{mortalidad del virus expuesto (\%)}}{\text{mortalidad del virus no expuesto(\%)}} \times 100$$

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa SAS 9.1 mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey (α=0.05). El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo y contó con tres repeticiones por tratamiento.

Determinación de la inocuidad de los auxiliares de formulación de cada prototipo de bioplaguicida sobre larvas de *T. solanivora*

Se elaboraron las dos formulaciones sin incluir el principio activo, utilizando o no el fotoprotector. Las cuatro formulaciones elaboradas se reconstituyeron en agua a la dosis recomendada para cada una. Estas mezclas fueron utilizadas para inocular la superficie de tubérculos de la papa pastusa previamente lavados con agua y la aplicación se realizó con una brocha de 1 pulgada aplicando 2 mL sobre cada cara del tubérculo.

Con estos tubérculos se desarrolló un bioensayo siguiendo la metodología mencionada anteriomente.

Este experimento contó con 5 tratamientos que consistieron en las dos formulaciones sin el principio activo y con el fotoprotector, las dos formulaciones sin el principio activo y sin el fotoprotector y un testigo absoluto, donde los tubérculos no fueron tratados. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento.

Pasados 30 días se realizó un muestreo destructivo de los tubérculos, en busca de todas las larvas presentes en los mismos. Con el número de larvas muertas por tratamiento se calculó el porcentaje de mortalidad. Los resultados se analizaron con el programa Stadistic 1.0 mediante una prueba de Kruskall Wallis (α=0.05).

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

Se prepararon suspensiones ajustadas a las concentraciones desde $2x10^2$ hasta $2x10^6$ CI/mL. Éstas fueron mezcladas en relación 1:1 (V/V) con dos soluciones del filtro ultravioleta (CBUV05), ajustadas al 1% y al 0.2%.

Las suspensiones quedaron finalmente a una concentración viral de $1x10^2$ a $1x10^6$ CI/mL y con el fotoprotector al 0.1% y 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 cual los tubérculos fueron tratados con las soluciones del filtro ultravioleta pero sin ser éste mezclado con el virus.

Los tubérculos previamente lavados fueron inoculados con los diferentes tratamientos, utilizando una brocha de 1 pulgada y aplicando 2 mL sobre cada cara del tubérculo con los tubérculos inoculados se realizó un bioensayo siguiendo la metodología presente descrita.

.

Este experimento contó con un diseño completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento. Los porcentajes de mortalidad fueron corregidos con el testigo utilizando la fórmula de Schneider Orelli mencionada anteriormente (Zar, 1999). Estos resultados se analizaron con el programa SAS 9.1 mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey (α=0.05), también se realizó un análisis Probit para determinar el efecto del filtro UV sobre la concentración letal media del virus

Resultados y Discusión

Exposición a luz UV artificial

En la figura 1. se presentan los porcentajes de eficacia obtenidos con las dos formulaciones y el virus puro, antes y después de ser irradiados con una fuente artificial de luz UV (0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas).

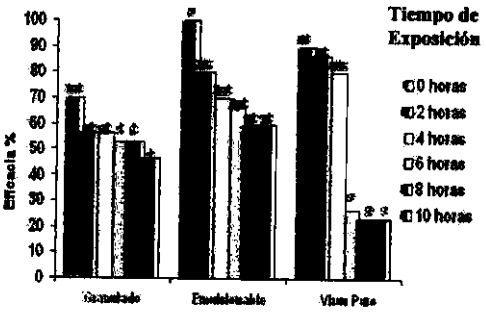


Figura 1. Efecto de la radiación UV sobre la eficacia de dos formulaciones (granulado dispersable y concentrado emulsionable) a base del aislamiento VG003 del granulovirus de *P. Operculella*. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%)

Se puede observar para todos los tratamientos, que hay una disminución en el porcentaje de eficacia, a medida que aumentó el tiempo de exposición. Este resultado indica que la radiación emitida por la lámpara Repti glo (UVA y UVB), inactivó el virus formulado y sin formular. La suceptibilidad a la radiación ultravioleta de otro aislamiento del granulovirus de *Phthorimea operculella* también fue estudiado por Sporleder *et al.* (2000). En dicho trabajo se determinó el tiempo de inactivación de este granulovirus sin formular, expuesto a la radiación solar natural en Perú.

La eficacia obtenida con el concentrado emulsionable y el virus puro sin formular después de 6, 8 y 10 horas de

exposición, fue significativamente menor ($p< 0,05$) que la eficacia inicial de cada tratamientos, lo que sugiere que la radiación ultravioleta causó una inactivación significativa del virus a partir de las 6 horas de exposición. Por el contrario, el granulado dispersable no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las eficacias obtenidas en todos los tiempos de exposición, lo que indica que esta formulación no fue significativamente inactivada por la irradiación durante 10 horas y fue el prototipo más eficiente para proteger el virus de la radiación UV. Sin embargo, el concentrado emulsionable también brindó protección al virus, a pesar de haber presentado una reducción significativa de la eficacia, ya que después de 10 horas de exposición, ésta fue significativamente mayor que la obtenida con el virus puro.

Tratamiento	Tiempo (h)	Eficacia (%)	SD	Inactivación (%)	OAR (%)
Granulado dispersable	0	70,0	10,0	-	-
	2	56,6	5,8	19,0	80,9
	4	56,6	5,8	19,0	80,9
	6	53,3	5,8	23,8	76,1
	8	53,3	5,8	23,8	76,1
	10	46,6	5,8	33,3	66,6
Concentrado emulsionable	0	100,0	0,0	-	-
	2	80,0	10,0	20,0	80,0
	4	70,0	10,0	30,0	70,0
	6	66,6	5,8	33,3	66,6
	8	60,0	17,0	40,0	60,0
	10	60,0	10,0	40,0	60,0
Virus puro	0	90,0	10,0		-
	2	86,6	12,0	3,7	96,2
	4	80,0	10,0	11,1	88,8
	6	26,6	5,8	70,3	29,6
	8	23,3	5,8	70,0	25,9
	10	23,3	5,8	70,0	25,9

El granulado dispersable fue la formulación más eficiente para proteger al virus de la radiación UV, sin embargo, éste fue el tratamiento que presentó la menor eficacia inicial como se observa en la tabla 1.

Dicho comportamiento podría deberse a que la composición del granulado incluye proteínas, carbohidratos y azúcares, los cuales se solidifican o cristalizan sobre los cuerpos de inclusión cuando el producto es deshidratado (Tamez *et al.*, 2006). Es posible que estos compuestos poliméricos utilizados en la formulación, hayan formado matrices de difícil disolución en el intestino del insecto, que afectaron la liberación del virus en el sitio de acción. Por esta misma razón, es posible que el prototipo de formulación de granulado dispersable haya presentado una muy buena protección frente a la radiación ultravioleta, ya que podría haberse encapsulado, adquiriendo una cubierta que los protegió del efecto de la luz.

Tabla 1. Eficacia, inactivación y actividad original remanente de las formulaciones a base del aislamiento viral VG003, expuestos a la radiación UV.

Con respecto a la otra variable evaluada, correspondiente a la actividad original remanente (OAR%), se puede observar en la Tabla 1, que a medida que aumentó la exposición a la radiación UV, se presentó una disminución numérica en el porcentaje de actividad original remanente para la formulación concentrado emulsionable y para el granulado dispersable. Sin embargo, el análisis de varianza (95%) no detectó diferencias significativas ($p>0,05$) entre los valores de dicha variable, en los diferentes tiempos de irradiación. Este resultado confirma que la luz ultravioleta simulada, no causó una inactivación significativa de estas formulaciones.

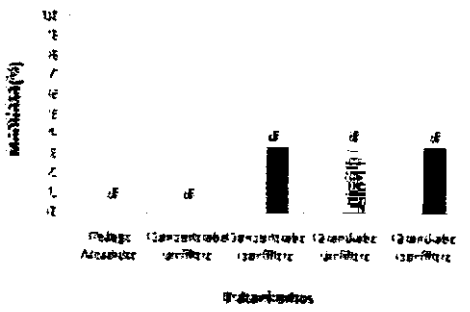
El filtro ultravioleta utilizado en las formulaciones evaluadas en el presente

estudio, pertenece al grupo de los abrillantadores ópticos. La protección que brindan los derivados del estilbeno frente a radiación solar, más específicamente frente a la radiación UV, se debe a la capacidad que tienen estos compuestos de absorber el espectro que comprende la luz UV y emitir luz en la región azul del espectro visible (Caballero *et al.*, 2001).

Es posible que el filtro UV haya sido el excipiente que le brindó protección al granulovirus frente a la radiación ultravioleta, en la formulaciones evaluadas en el presente trabajo, ya que se ha comprobado en diferentes experimentos, que la incorporación de abrillantadores ópticos del grupo de los estilbenos, dentro de formulaciones de baculovirus, puede proveer este tipo de protección y además mejorar la patogenicidad viral (Martínez *et al.*, 2003). Sin embargo, es posible también que otros componentes de las dos formulaciones como los aceites vegetales o los carbohidratos formadores de red, hayan brindado alguna protección a los cuerpos de inclusión virales.

Determinación de la inocuidad de los auxiliares de formulación de cada prototipo de bioplaguicida sobre larvas de *T. solanivora*

Los resultados obtenidos con los tratamientos que corresponden a los excipientes sin virus de las dos formulaciones evaluadas, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí (Tukey 95%, p>0,005)) , ni fueron diferentes del testigo absoluto. Estos resultados indican que las mezclas de excipientes de las dos formulaciones fueron inocuos para las larvas de la polilla guatemalteca.



El concentrado emulsionable, es una formulación que está constituida por el principio activo (baculovirus) suspendido en un vehículo oleoso a base de aceite vegetal y varios coadyuvantes (Gómez & Villamizar, 2000). Dentro de los componentes de esta base oleosa podemos encontrar aceites vegetales ampliamente utilizados en la industria alimenticia y tensioactivos, los cuales son productos que no tiene restricciones específicas y no tiene manifestaciones tóxicas después de su ingestión oral (Boylan *et al.*, 1986).

Con respecto a la otra formulación consiste en un granulado dispersable, éste está constituido por el principio activo (baculovirus) acompañado de varios coadyuvantes como diluentes, desintegrantes, aglutinantes (Higuera, 2003). No tiene tampoco ningún tipo de restricciones (Boylan *et al.*, 1986).

Además estas formulaciones tiene un filtro ultravioleta que es del grupo de los abrillantadores ópticos, los cuales se han demostrado que tienen un efecto sobre el epitelio del intestino medio de las larvas y pueden ocasionar otras perturbaciones fisiológicas en las larvas que incluyen la disminución del pH intestinal y la disminución del apetito (Goulson *et al.*, 2002). Sin embargo, la mezcla de excipientes utilizada en el presente trabajo, a pesar de incluir un abrillantador óptico, no causó un efecto sobre las larvas. Es posible que al mezclarse dicho compuesto con los otros excipientes, alguno de estos haya

minimizado o interferido con el mencionado efecto, de los derivados del estilbeno.

Como se puede observar los excipientes utilizados en las dos formulaciones son excipientes que la mayoría son seguros, no tóxicos y que no presentan ningún tipo de restricción de manejo, por esta razón, es posible que no hayan sido tóxicos para las larvas de *T. solanivora* y se espera que tampoco presente problemas de toxicidad para el entorno, para aves, peces, invertebrados, mamíferos y el hombre.

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

Se ha demostrado que los abrillantadores ópticos (grupo al que pertenece el filtro ultravioleta utilizado en las dos formulaciones evaluadas en el presente estudio), pueden proteger el virus frente a la radiación UV y además tienen la capacidad de potenciar su actividad biocontroladora (Caballero *et al.*, 2001).

TRATAMIENTO	CL_{50}	Límite de confianza inferior	Límite de confianza superior	X^2	Valor P
VIRUS PURO	$1,6 \times 10^6$	$3,41 \times 10^5$	$4,16 \times 10^7$	0,5 05	0,9 17
VIRUS CON FOTOPROTECTOR AL 0.1%	$3,0 \times 10^5$	$9,87 \times 10^4$	$3,36 \times 10^6$	0,4 18	0,9 36
VIRUS CON FOTOPROTECTOR AL 0.5%	$3,0 \times 10^4$	$6,32 \times 10^3$	$3,16 \times 10^5$	0,1 73	0,9 81

Los resultados de mortalidad obtenidos en este estudio, fueron sometidos a un *análisis Probit* con el programa Bioestat 2007. Para todos los tratamientos, el valor de P fue mayor a 0,05, lo que permite aceptar la hipótesis propuesta, que sugiere que existe una correlación lineal entre la dosis y la respuesta evaluada ya que a medida que aumenta la concentración o la dosis viral, aumenta también la mortalidad de las larvas.

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% (Tabla 2). No fueron diferentes entre sí según los límites de confianza estimados por el programa estadístico, lo que sugeriría que el fotoprotector CBUV05 no tuvo un efecto potenciador del aislamiento VG003 de granulovirus. Sin embargo, 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%, ésta fue dos exponentes menor que la CL_{50} del virus puro y un exponente menor con respecto a la CL_{50} del virus mezclado con el fotoprotector al 0,1%. Este comportamiento sugiere que si hay un efecto potenciador del filtro, aunque en el presente trabajo, éste no fue estadísticamente significativo.

Tabla 2- Resultados del análisis probit del ensayo dosis – respuesta parael virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0,1% y al 0,5%.

Con respecto a la variable eficacia (Fig.3), se observó un aumento de la misma a medida que aumentó la concentración viral, pero también fue incrementada a medida que aumentó la concentración del filtro ultravioleta. Sin embargo, la prueba de comparación de medias Tukey (95%) no detecto diferencias significativas entre la eficacia obtenida para los tres tratamientos con cada concentración viral, lo que sugeriría que el filtro ultravioleta utilizado no presentó un efecto potenciador significativo. Cabe destacar que al igual que con las concentraciones letales, existió una tendencia numérica mayor de

mortalidad de las larvas, cuando el virus se mezcló con el filtro CBUV05, lo que podría sugerir que éste si tiene alguna actividad potenciadora, que posiblemente requiere el uso de concentraciones mayores para ejercer un efecto significativo.

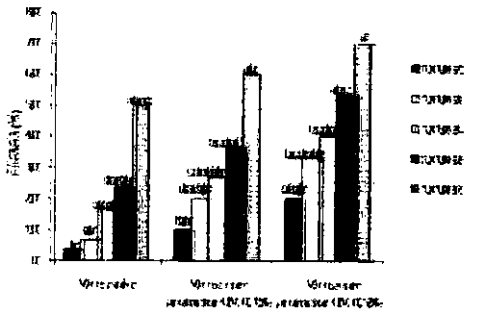


Figura 3. Eficacia del virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0.1% y al 0.5%

Esto se puede deber a que los abrillantadores ópticos incrementan la probabilidad de infección del virus por inhibición de la síntesis de la quitina, incrementando la permeabilidad de la membrana peritrófica, reduciendo el volumen necesario de virus para causar infección y muerte en las larvas (Okuno *et al.*, 2002).

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 demás proteínas de la membrana. Sin embargo, también se ha observado un efecto debido a la degradación de la mucina del intestino, principalmente con el uso de Calcofluor M2R (Wang & Granados, 2000)

CONCLUSIONES

- Las dos formulaciones brindaron al virus protección frente a radiación UV durante 10 horas de exposición, el granulado dispersable presentó una mejor fotoprotección que el concentrado emulsionable.
- Los excipientes utilizados en las dos formulaciones no fueron tóxicos para las larvas de *T. solanivora*
- El abrillantador óptico tiene un efecto sobre las larvas de *T. solanivora,* el cual es dependiente de la dosis y se ve influenciado por la combinación con los demás excipientes de la formulación.
- No se evidenció un efecto potenciador significativo del abrillantador óptico sobre la actividad del virus, pero se observó una tendencia numérica a una reducción en la CL_{50} a medida que se incrementa la concentración del filtro

BIBLIOGRAFÍA

BOYLAN, J.; COOPER, J.; CHOWHAN Z.; LUND, W.; WADE, A.; WEIR, R.; YATES, B. 1986. Handbook of pharmaceutical excipients. American Pharmaceutical Association. USA. Pág 328

BURGES, H. D. 1998. Formulation of microbial biopesticides beneficial, microorganisms, nematodes and seed treatments. Publisher Clower Academic. Cáp. 2.

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. Pág. 518.

GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L. 2000. Producción másiva, separación, secado y fromulación de microorganismos biocontroladores. En Memorias de I Taller de Control Biológico- MIP. Corpoica. Bogotá D.C. Colombia. Pág. 108-112.

GOULSON, D.; DERWEN, L.; PENAGOS, D.; WILLIAMS, T. 2002 .Effects of optical brighteners included in biopesticide formulations on the growth of crops *Elsevier Science*. Pág. 235-240.

HERRERA, C.; FIERRO, L.; MORENO, J. 2000. *Manejo integrado del cultivo de la papa.* Manual técnico. Editorial Produmedios. Colombia, Pág. 112-116.

IGNOFFO, C.; GARCIA, C.; SAATHOFF, S. 1997. Sunlight stability and rain-fatness of formulations of *Baculovirus heliothis*. *Environmental Entomology*. 26(6). Pág. 1470-1474.

MARTINEZ, A. ; OIHANE, S.; WILLIAMS. T.; CABALLERO, P. 2003. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. *The Netherlands Entomomological Society*. 109. Pág. 139-146.

OKUNO, S.; TAKATSUKA, J.; NAKAI, M.; OTOTAKE, S; MASUI, A.; KUNIMI, Y. 2001. Viral–enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a Spodopetera litura (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. *Biological Control*. 26. Pág. 146-152.

SHAPIRO, M.; AGIN, P.; BELL, R. 1983. Ultraviolet potectasnts of the *Gypsy moth* (Lepidoptera: Lymantridae) Nucleopolyhedrosis Virus. *Environmental Entomology*. Pág. 982-985

SPORLEDER, M.; ZEGARRA, O.; KROSCHEL, J.; HUBER, J.; LAGNAOUI, A. 2000. Assesment of the inactivation time of *Phtorimaea operculella* granulovirus (*PoGV*) at different intensities of natural irradiation. *CIP. Lima, Perú. Pág. 123-127.*

TAMEZ, P.; ZAMUDIO, V.; MARTÍNEZ, J.; RODRIGUEZ, C.; TAMEZ, R.; GOMEZ, R. 2006. Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida. *Ciencia UANL*. 10(2) Pág. 149-156.

VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; GÓMEZ, J.; COTES, A. 2006. Reconocimiento, selección y evaluación de aislamientos nativos de virus de la granulosis para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa. Boletín técnico divulgativo. Editorial Produmedios. Colombia. Pág. 5-9.

WANG, P.; GRANADOS, R. 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30(2). Pág. 135-143

ZAR, J. 1999. Biostatistical analysis. Cuarta edición. Prentice Hall. New Jersey. Pág. 663.