



EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y DE DOS PROCESOS DE SECADO SOBRE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE UN NUCLEOPOLIEDROVIRUS DE *Spodoptera frugiperda*

EFFECT OF TEMPERATURE AND TWO DRYING PROCESSES ON THE INSECTICIDAL ACTIVITY OF A NUCLEOPOLYHEDROVIRUS OF *Spodoptera frugiperda*

J.E. Camacho^{1,2*}, M.I. Gómez³ y L.F. Villamizar³

¹Doctorado en Biociencias, Universidad de la Sabana. Puente del Común Km 7 Auto Norte, Bogotá, Colombia.

²Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Calle 28 No 6 - 02, Bogotá, Colombia.

³Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Bogotá, Colombia.

Recibido 9 de Mayo de 2013; Aceptado 2 de Julio de 2013

Resumen

La efectividad y uso potencial de los Baculovirus para el control de diferentes insectos plaga han sido demostrados en varios estudios. Sin embargo, su evaluación bajo condiciones de campo ha presentado resultados inconsistentes, posiblemente por el efecto deletéreo de condiciones ambientales como la temperatura. Teniendo en cuenta el potencial del aislamiento colombiano de nucleopoliedrovirus SfMNPV003 de *Spodoptera frugiperda* para el desarrollo de un bioplaguicida, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la temperatura y de dos procesos de secado sobre la actividad insecticida del virus, con miras a utilizar condiciones del proceso que permitan diseñar una formulación eficiente. El nucleopoliedrovirus, fue expuesto a temperaturas entre 30°C y 60°C durante 30, 45, 60, 120 y 180 minutos. Los procesos ensayados fueron secado en estufa y atomización en lecho fluido, evaluándose el pH, el contenido de humedad, el contenido de contaminantes, la concentración viral, el rendimiento y la actividad insecticida (CL₅₀) del virus seco. La actividad insecticida del virus disminuyó cuando éste se expuso a temperaturas mayores a 50°C. El proceso de secado en estufa fue seleccionado por presentar mayor rendimiento, además porque no afectó la patogenicidad del virus y permitió obtener un polvo seco con menor contenido de contaminantes microbianos, sin embargo su consumo energético podría ser mayor.

Palabras clave: baculovirus, temperatura, atomización en lecho fluido, secado en estufa, actividad insecticida.

Abstract

The effectiveness and potential use of Baculovirus for controlling different insect pests have been shown in several studies. However, their evaluation under field conditions has presented inconsistent results, possibly because of the deleterious effect of environmental conditions such as temperature. Considering the potential of a Colombian isolate of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus SfMNPV003 for developing a biopesticide, the objective of this study was to evaluate the effect of temperature and two drying processes over viral insecticidal activity, in order to use process conditions that allow to design efficient formulation. The nucleopolyhedrovirus, was exposed to temperatures between 30°C and 60°C for 30, 45, 60, 120 and 180 minutes. Processes tested were oven drying and spray drying in fluid bed, evaluating pH, moisture content, content of microbial contaminants, viral concentration, yield and insecticidal activity (LC₅₀) of dry virus. The insecticidal activity of the virus decreased when it was exposed to temperatures above 50°C. Oven drying process was selected for presenting the highest yield, also because it did not affect the virus pathogenicity and allowed to obtain a dry powder with a lower microbial contaminants content.

Keywords: baculovirus, temperature, spray drying in fluid bed, oven drying, insecticidal activity.

*Autora para la correspondencia. E-mail: jelenacamacho@hotmail.com

1 Introducción

Una de las familias de entomovirus más estudiada es la familia Baculoviridae a la cual pertenecen los nucleopoliedrovirus (NPV). Estos virus se caracterizan por presentar cuerpos de inclusión (CI) que los protegen contra algunos factores ambientales y por afectar sólo a invertebrados, especialmente insectos. Adicionalmente, no representan riesgos para otros organismos incluyendo el hombre, siendo por lo tanto adecuados para ser utilizados como agentes de control biológico (Burges, 1981). Estos virus han sido encontrados infectando numerosas especies de insectos, particularmente del orden Lepidoptera y debido a su restringido rango de hospederos y alta patogenicidad sobre varias especies de insectos plaga, han recibido considerable atención como insecticidas microbianos (Moscardi, 1999).

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), el gusano cogollero del maíz, es un hospedero natural de baculovirus, lo que ha permitido aislar varios NPVs (SfMNPVs) en diferentes regiones del norte, centro y sur de América. Algunos de estos aislamientos han sido evaluados bajo condiciones de campo, demostrando un alto potencial para el control de la plaga en cultivos de maíz (Williams y col., 1999; Moscardi, 1999). Tal es el caso de Brasil, donde se aislaron diferentes SfMNPV con alta actividad biocontroladora, los cuales se han caracterizado molecularmente y han sido producidos y aplicados masivamente (Moscardi, 1999). En otros trabajos se han realizado evaluaciones bajo condiciones de campo obteniendo mortalidades del cogollero del maíz entre el 89.3% y el 90.7% (Valicente y Da Costa, 1995).

Aislamientos de SfMNPV y del NPV de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) han demostrado su alto potencial para el control tanto de *S. frugiperda* como de *S. exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), respectivamente, alcanzándose en algunos casos niveles de control incluso superiores a los logrados con productos químicos (Guimarães y col., 2003).

En Colombia, tres aislamientos nativos de SfMNPV codificados como NPV003, NPV009 y NPV011, fueron caracterizados física, molecular y biológicamente demostrando su alta patogenicidad y virulencia, de los cuales se seleccionó el aislamiento NPV003 proveniente del departamento de Córdoba, por presentar mayor actividad insecticida y tolerancia a la radiación ultravioleta (Gómez y col., 2010).

A pesar de que los baculovirus son una herramienta eficiente para el control de diferentes

insectos (Batista y col., 2001; Tamez y col., 2002; Guimarães y col., 2003; Martínez y col., 2005; Tamez y col., 2006; Behle y col., 2006; Lasa y col., 2007; Villamizar y col., 2010), su eficacia en campo ha presentado resultados inconsistentes, posiblemente por el efecto deletéreo de condiciones ambientales como la temperatura (Young, 2005; Sporleder y col., 2008; Michalsky y col., 2008; Roberts y col., 2011), la radiación solar (Burges, 1998; Behle y col., 2000; Lacey y Arthurs, 2005; Villamizar y col., 2009; Behle y Pophman 2012), el pH (Silva y Moscardi, 2002; Michalsky y col., 2008; Roberts y col., 2011), el contenido excesivo de humedad y la presencia de contaminantes microbianos (Caballero y col., 2001; Lasa y col., 2008).

Una adecuada formulación del agente infeccioso puede brindarle protección frente a condiciones abióticas de estrés como la temperatura y la radiación solar y puede además asegurar una adecuada vida de anaquel (Winder y col., 2003). Sin embargo, la elaboración de un gran número de formulaciones requiere el uso de procesos de secado que involucran la remoción del agua debido a la transferencia de calor y masa entre el producto y una corriente de aire caliente (Viveros y col., 2013), mediante la manipulación de factores como la temperatura y la presión. En este sentido es importante tener en cuenta que la temperatura puede tener un efecto directo sobre las proteínas de los cuerpos de inclusión virales, desnaturalizándolas (Peng y col., 1999; Villamizar, 2011) y por tanto reduciendo su infectividad (Michalsky y col., 2008).

Dentro de las tecnologías de secado más utilizadas se destacan el lecho fluido, la liofilización, la atomización en lecho fluido y el secado directo con aire caliente, siendo la liofilización el método más utilizado para preservar microorganismos por décadas (Morgan y col., 2006; Ohtake y col., 2010; Jin y Custis, 2011). Sin embargo, es un proceso demorado que tiene varias limitantes como el alto costo de los equipos y el elevado consumo de energía.

La atomización en lecho fluido es otro proceso de secado comúnmente utilizado para secar partículas sólidas suspendidas en líquidos o solutos disueltos y presenta un bajo costo comparado con la liofilización. Esta tecnología tiene varias ventajas para el secado de microorganismos. Por ejemplo, puede controlar la temperatura interna de la cámara y minimizar el efecto de altas temperaturas de entrada sobre los microorganismos, mediante el ajuste de la velocidad de flujo, de la temperatura de entrada y de la presión

interna de la cámara, así como de la presión de ángulo de apertura. Además, el tiempo de proceso es relativamente corto con respecto a otras técnicas como el secado en estufa con aire, lo cual puede minimizar el daño que pueda causar la temperatura sobre el material biológico (Ohtake y col., 2010; Jin y Custis, 2011).

Otro método es el secado en estufa, en el cual se crean grandes interfaces aire-líquido, que incrementan el riesgo de bioadsorción del bioproducto a esta interfase y su subsecuente desnaturalización. Como ventajas de este método se destaca la posibilidad de trabajar a bajas temperaturas y que los equipos utilizados son variados, de bajo costo y de alta capacidad (Amorij y col., 2008).

La importancia del secado radica en que la conversión de macromoléculas biológicas activas o microorganismos, como los virus en formulaciones de polvos secos usando diferentes excipientes y procesos de secado, dan como resultado productos más estables, los cuales pueden ser almacenados a temperatura ambiente por largo tiempo, evitando la dependencia de una cadena de frío que aumenta los costos de transporte y distribución (Amorij y col., 2008).

Teniendo en cuenta el potencial del aislamiento de nucleopoliedrovirus SfMNPV003 para el desarrollo de un bioplaguicida y la necesidad de determinar las condiciones óptimas para mantener la estabilidad viral, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la temperatura y de dos procesos de secado sobre la actividad insecticida del virus, con miras a seleccionar condiciones de proceso que permitan diseñar y desarrollar una formulación estable y eficaz.

2 Materiales y métodos

2.1 Cría del insecto

Los insectos se obtuvieron de una colonia de *S. frugiperda* establecida a partir de larvas colectadas en cultivos de maíz en el municipio del Espinal (Tolima) Colombia. Los insectos se mantuvieron en un cuarto a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y 60% de humedad relativa, con un fotoperíodo de 12 horas. Las larvas se mantuvieron de manera individual en recipientes plásticos de 15 mL que contenían un fragmento de dieta artificial (Gómez y col., 2010).

2.2 Producción del virus

La producción del virus se realizó mediante la inoculación de larvas de *S. frugiperda* de tercer

estadio con suspensiones virales del aislamiento SfMNPV003 ajustadas a una concentración de 5×10^6 CI/mL, utilizando la metodología de la gota (Hughes y Wood, 1981). Las larvas inoculadas fueron individualizadas y alimentadas con dieta artificial hasta que murieron por causa de la infección. Las larvas muertas fueron colectadas, trituradas en agua destilada estéril y homogenizadas. La mezcla se filtró a través de una capa de tela para retirar el tejido del insecto y la concentración viral se determinó mediante recuento en cámara de Neubauer.

2.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad insecticida del virus

Se preparó una suspensión viral ajustada a una concentración de 2×10^7 CI/mL y se dispensaron muestras de 50 μL en tubos Eppendorf, las cuales fueron expuestas a las temperaturas de 30°C , 40°C , 50°C y 60°C , por 30, 45, 60, 120 y 180 minutos. Se utilizó un tubo por temperatura por tiempo.

Después de la exposición del virus a las diferentes temperaturas, la actividad insecticida de éste se evaluó mediante un bioensayo siguiendo la metodología de la gota (Hughes y Wood, 1981). Para tal fin, muestras de 200 μL de las suspensiones virales expuestas o sin exponer a la temperatura se mezclaron con 200 μL de una solución de sacarosa al 4% que contenía un colorante de alimentos Tuska® (Azul No 1 y Azul No 2) al 1%. Se dispensaron gotas de 2 μL de dichas mezclas, en forma circular en un disco plástico de color blanco y posteriormente se ubicaron 40 larvas neonatas de *S. frugiperda* en el interior del círculo y se esperó hasta que bebieran el tratamiento, lo que se evidenció por la coloración azul en el cuerpo de las mismas. La coloración se detectó mediante observación en un estereoscopio Olympus SZ40 (Japón), seleccionándose 30 larvas que se ubicaron individualmente en recipientes plásticos de 25 mL. Se suministró a cada larva un fragmento de dieta artificial y los recipientes se distribuyeron en grupos de 10 en tres cubetas plásticas (unidad experimental), que se incubaron a 28°C y 60% de humedad relativa. La mortalidad se determinó a los siete días después de la inoculación.

Se contó con un testigo positivo y un testigo absoluto. En el primer caso las larvas se inocularon con virus no expuesto a ninguna temperatura y para el segundo caso las larvas no se sometieron a ningún tratamiento. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial. Se trabajó con una unidad experimental de 10 larvas y

tres unidades experimentales por tratamiento. Los resultados de mortalidad se corrigieron con respecto al testigo absoluto estimando la eficacia mediante la ecuación de Schneider-Orelli (Ec. 1) (Zar, 1999):

$$Eficacia (\%) = \frac{A - B}{100 - B} \times 100 \quad (1)$$

Donde A es el porcentaje de mortalidad en el tratamiento y B es el porcentaje de mortalidad en el testigo absoluto.

La normalidad de los datos se evaluó mediante una prueba de Shapiro-wilk (95%) y la homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Barlett (95%). Posteriormente, las diferencias entre tratamientos se evidenciaron mediante un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias de Tukey (95%), con el programa Statistic 8.1.

El porcentaje de inactivación se obtiene al relacionar la pérdida de actividad insecticida del inoculo experimental con la actividad insecticida del inoculo estándar (suspensión viral no expuesta a la temperatura).

2.4 Efecto de dos procesos de secado sobre la actividad insecticida del virus

2.4.1 Preparación de la suspensión viral

Se tomaron 20 gramos de larvas infectadas, las cuales fueron homogenizadas con 260 mL de agua destilada estéril utilizando un dispersor Ultraturax IKA 40 (Alemania) a 10.000 rpm por un minuto. La mezcla se filtró a través de una capa de tela para retirar el tejido del insecto y la concentración viral se ajustó con agua a 3×10^9 CI/mL mediante recuento en cámara de Neubauer. Posteriormente se adicionó silicato de magnesio al 10% agitando vigorosamente, sólido insoluble utilizado como diluyente en el producto final.

2.4.2 Caracterización de la suspensión viral

Esta suspensión se caracterizó determinando su contenido de materia seca, humedad, pH y contenido de contaminantes. El contenido de materia seca y humedad se determinó tomando una muestra de 0,5 g que fue secada a 100 °C en un analizador de humedad KERN MLS 50 - 3 (Alemania), hasta peso constante. Los resultados se expresaron como porcentaje. El pH se realizó en un potenciómetro marca HANNA instruments (España), mezclando un gramo de muestra con 100 mL de agua y realizando la lectura directa. El contenido de contaminantes se determinó preparando a partir de la suspensión viral diluciones seriadas.

Se sembraron en superficie en cajas de Petri con los medios agar papa dextrosa PDA-Triton para hongos (5 días de incubación a $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), agar extracto de levadura y malta (YM) para levaduras (48 horas de incubación a $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) y agar nutritivo para bacterias (24 horas de incubación a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). Cada muestra se sembró por triplicado y los resultados fueron expresados como UFC/mL para la suspensión viral o UFC/gramo para los polvos secos. Cada característica se evaluó por triplicado a tres muestras diferentes del principio activo viral.

2.4.3 Procesos de secado

Para el proceso de secado por atomización en lecho fluido (*Spray drying*), se tomó un volumen de 250 mL de la suspensión viral ajustada a una concentración 3×10^9 CI/mL se atomizó en un equipo de lecho fluido marca Glatt GmbH D-01277t (Alemania), equipado con una boquilla de 1 mm. Durante el proceso se utilizó una presión interna de 1 bar, un flujo de 12 rpm que equivale a una velocidad de flujo 6.18 mL/minuto, una temperatura de entrada de 92°C y una presión de aleta expresada como ángulo de apertura de 25° al inicio del proceso y de 35° al final de éste. La temperatura interna de la cámara fue determinada mediante la introducción de un sensor dentro de la misma, el cual estuvo en contacto con el producto. La temperatura de entrada y de salida del aire también fueron registradas por el equipo durante todo el proceso. La velocidad de flujo se ajustó de tal forma que la temperatura interna de la cámara y la temperatura de salida fueran inferiores a 50°C . Para el proceso de secado en estufa con corriente de aire, se tomó la suspensión viral ajustada a una concentración 3×10^9 CI/mL se ubicó en bandejas metálicas (largo 21 cm x ancho 5,5 cm x profundidad 4 cm), dispensándose por bandeja un volumen de 30 mL, para un total de 10 bandejas. Las bandejas se cubrieron con toallas de papel y se ubicaron en una estufa con corriente de aire a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Las condiciones del aire utilizado en el proceso fueron: temperatura de bulbo húmedo 30°C , temperatura del bulbo seco 37.85°C , velocidad promedio de secado 1.83g agua/hora y humedad relativa 60%.

2.4.4 Caracterización del virus seco

Al polvo obtenido después de secar la suspensión viral por los dos métodos (atomización en lecho fluido y estufa) se le determinó el contenido de contaminantes

microbianos, el pH y el contenido de humedad siguiendo las metodologías previamente descritas.

Se determinó el rendimiento del proceso en términos de porcentaje de producto seco obtenido, el cual se calculó según la ecuación (Ec. 2):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{Pf}{Po} \times 100 \quad (2)$$

Donde: Pf es el peso seco del polvo obtenido y Po es el peso seco del virus (CI) más el diluyente adicionado a la suspensión viral.

También se determinó la concentración viral para lo cual se tomaron 0.1 g de cada muestra de virus seco y se reconstituyeron en 9.9 mL de tampón de fosfatos. Se realizaron diluciones seriadas y se determinó la concentración mediante recuento en cámara de Neubauer.

Para evaluar la actividad insecticida, muestras de los virus secos se reconstituyeron en agua destilada estéril y se ajustaron a cinco concentraciones correspondientes a 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 y 2×10^7 CI/mL. Con estas suspensiones se realizó un bioensayo utilizando la metodología previamente descrita (Hughes y Wood, 1981). El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento.

2.5 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado. La normalidad de los datos se evaluó mediante una prueba de Shapiro-wilk (95%). La homogeneidad de varianzas y la diferencia entre medias se evidenció mediante una prueba t-Student (95%), con el programa SAS 9.1.

Para evaluar la actividad insecticida, con los resultados de mortalidad se estimó la concentración letal media (CL_{50}) mediante un análisis Probit (Finney, 1952) utilizando el programa Polo Plus versión 1.0.

3 Resultados y discusión

3.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad insecticida del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* SfMNPV003

En términos generales se observó que al exponer las partículas virales a diferentes temperaturas durante diferentes tiempos, se produjo una reducción en la actividad insecticida del virus, la cual fue mayor a medida que aumentó el tiempo y la temperatura de exposición (Fig. 1).

La suspensión viral no expuesta a la temperatura, presentó una eficacia del 97.68%, y los tratamientos expuestos a las temperaturas de 30°C, 40°C y 50°C durante los tiempos de 30, 45, 60, 120 y 180 minutos, oscilaron entre el 65% y el 100% (Fig. 1). Estos valores de eficacia no presentaron diferencias significativas entre sí, lo cual indica que las temperaturas de 30°C, 40°C y 50°C no afectaron la actividad insecticida del virus durante tres horas de exposición.

A 60°C se detectaron diferencias significativas ($F = 7.43$, $gl = 19$, $P = 0.00001$) entre la eficacia obtenida a los tiempos 0, 30, 45 y 60 minutos con respecto a la eficacia del virus expuesto durante 120 y 180 minutos, tratamientos para los cuales la actividad insecticida fue del 49.99% y del 47.50%, con porcentajes de inactivación del 48.82% y del 51.37% respectivamente.

Estos resultados concuerdan con lo que reporta la literatura ya que la mayoría de los baculovirus se multiplican adecuadamente a temperaturas entre 24 y 29°C y no toleran temperaturas superiores a 60°C, inactivación que parece resultar de la descomposición de las macromoléculas (ADN y proteínas) (Miller, 1997; Caballero y col., 2001). Estudios en temperaturas altas indican que una temperatura mayor a 40°C puede causar una rápida inactivación, particularmente en suspensiones acuosas y a temperaturas de 60°C los virus pueden perder más del 50% de su actividad en aproximadamente 10 minutos (Lacey y Kaya, 2007). Sin embargo, el aislamiento SfMNPV003 objeto del presente trabajo, no mostró una inactivación significativa hasta después de una hora de exposición a 60°C, lo que podría deberse a diferencias genéticas con otros NPV aislados en diferentes regiones geográficas.

En un estudio similar realizado por Behle y col., (2006), se observó que el nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* AfNPV sin formular, fue tolerante durante dos horas a una temperatura de 68°C, mientras que al exponerse a 90°C por 30 minutos perdió más del 20% de su actividad. Otro trabajo realizado por Michlasky y col., (2008) determinó que la exposición del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* AcNPV a temperaturas mayores de 45°C por 120 minutos causó la disminución de su infectividad en dos unidades logarítmicas.

La pérdida de actividad que se evidencia en los baculovirus al exponerlos a condiciones abióticas de estrés puede deberse a que los cuerpos de inclusión,

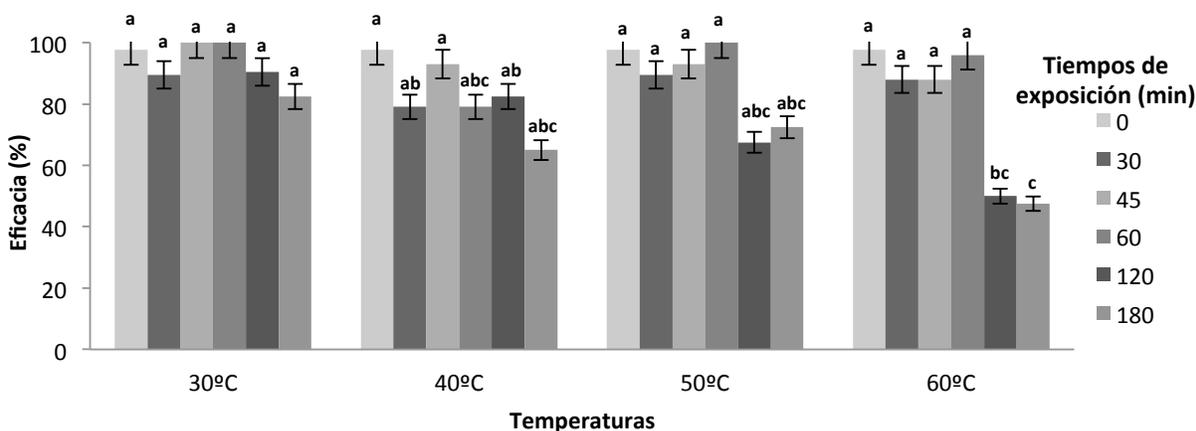


Fig. 1. Efecto de la temperatura sobre la eficacia del aislamiento viral SfMNPV003. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes, según prueba de Tukey (95 %).

los cuales ayudan a proteger a los viriones de factores ambientales, están constituidos por proteínas que pueden degradarse por efecto de la temperatura y la humedad (Peng y col., 1999).

El efecto deletéreo de la temperatura posiblemente se relaciona con que a medida que ésta se incrementa, aumenta la velocidad de hidrólisis y autooxidación de las moléculas debido a la exposición a radicales libres derivados de los lípidos de las larvas, los cuales no son totalmente removidos de la suspensión viral por filtración (Burgess, 1998), causando la desnaturalización de la cápside por cambios conformacionales de sus proteínas estructurales (Boshetti y col., 2003).

En este sentido, conocer los efectos de la temperatura sobre la estabilidad viral es crucial para desarrollar procesos de formulación de bioplaguicidas y para favorecer su eficacia en campo (Sporleder y col., 2008), ya que a pesar del gran potencial de estos microorganismos como insecticidas biológicos, su labilidad ha sido reconocida como un problema para su comercialización (Behle y col., 2006).

3.2 Efecto de dos procesos de secado sobre la actividad insecticida del virus

3.2.1 Caracterización de la suspensión viral

El pH promedio de la suspensión viral antes del secado fue de 6.52 (Tabla 1), valor que asegura la estabilidad física de los cuerpos de inclusión, que se afectan en medios alcalinos con valores de pH mayores a 9 y en medios ácidos con valores de pH menores a 4

(Caballero y col., 2001).

La suspensión viral presentó una contaminación bacteriana de 4.88×10^8 UFC/mL, no se detectaron levaduras y el recuento de mohos fue menor a 100 UFC/mL (Tabla 1), lo cual se debe a la producción *in vivo* de virus y corresponde a la contaminación generada a partir de los cadáveres de los insectos que mueren por la infección viral, ya que la producción viral *in vivo*, genera una carga importante de bacterias y hongos que naturalmente colonizan las dietas, la superficie del insecto, su intestino y sus heces (Quiroga y col., 2011).

Se puede decir que el SfMNPV003 producido según el método descrito anteriormente se encuentra dentro de los límites permitidos de contaminantes ya que se ha establecido que se considera como aceptable un total de contaminantes microbianos de 1×10^9 UFC/mL para baculovirus producidos *in vivo* (Jenkins y Grzywacz, 2003) y que deben estar libres de coliformes y bacterias patógenas para los humanos como por ejemplo las pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Vibrio*, *Shigella*, etc. (Shapiro 1986 en: Caballero y col., 2009).

Tales contaminantes pueden afectar la estabilidad física y las propiedades insecticidas de productos formulados o quizás puedan ser perjudiciales para la salud por el riesgo de encontrarse presentes algunos patógenos humanos. La gran mayoría de estos microorganismos son especies comunes de los géneros *Pseudomonas*, *Enterococcus* y especies coliformes de la familia Enterobacteriaceae (*Enterobacter faecalis* y *E. faecium*) y saprófagos oportunistas como *Bacillus cereus* y *Bacillus sphaericus*

(Jenkins y Grzywacz, 2000; Caballero y col., 2001). Es por esto que la concentración microbiana de contaminantes y la identificación de los mismos es importante para asegurar la calidad de este tipo de bioinsumos (Lasa y col., 2008).

El contenido de humedad fue del 93.57% y el de sólidos presente en la suspensión del 6.43% (Tabla 1), lo que indica una baja cantidad de partículas en suspensión y solutos disueltos en la muestra. Cabe destacar que esto es adecuado, ya que un contenido alto de sólidos en la suspensión podría generar un aumento en el tamaño de partícula y la necesidad de mayores tiempos de secado, provocando un aumento en el tiempo de contacto entre el aire caliente y el material biológico, que podría causar una inactivación térmica del agente biológico durante el proceso de secado (Peighambardoust y col., 2011).

Los resultados permitieron concluir que la suspensión viral elaborada contaba con las características adecuadas para su uso como principio activo de un bioplaguicida viral, por lo que fue utilizada para la evaluación de dos métodos de secado.

3.2.2 Procesos de secado

Durante el proceso de secado por atomización en lecho fluido se realizó el seguimiento de la temperatura de entrada, la temperatura interna de la cámara y la temperatura de salida (Tabla 2). Los rangos reportados corresponden a los valores en los cuales fluctuaron las diferentes temperaturas durante el proceso.

La temperatura interna de la cámara es la variable más importante y debe ser controlada en el proceso, ya que puede tener un impacto negativo sobre el principio activo cuando éste es termolábil. En este

sentido la temperatura interna de la cámara presentó un valor promedio de 38.52°C, el cual teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente sobre el efecto de la temperatura en la eficacia del aislamiento viral SfmNPV003, permite sugerir que el proceso no afectará negativamente la actividad insecticida del virus.

El desafío de usar el proceso de atomización en lecho fluido para estabilizar principios activos lábiles a la temperatura, requiere el control de las condiciones de atomización, las condiciones de secado y de las propiedades resultantes en el material seco, de manera que no se produzca la pérdida de la actividad biológica (bioactividad). Es así como en el estudio realizado para la atomización de virus atenuados de vacunas de sarampión, se pudo establecer que cuando la temperatura de producto durante el proceso se mantiene entre 40°C y 60°C, se mejora significativamente la estabilidad del producto durante el almacenamiento a temperaturas de 37°C por 8 semanas, confirmando la importancia de este factor (Ohtake y col., 2010).

Durante el proceso de secado en estufa con corriente de aire la temperatura osciló entre 37.1°C y 38.6°C y el tiempo total del mismo fue de 24 horas. Como en el caso anterior las condiciones de temperatura del proceso estuvieron dentro de los parámetros que se espera no afecten la actividad viral.

3.2.3 Caracterización de los polvos secos obtenidos

Para evaluar el efecto de los procesos de secado sobre el aislamiento SfmNPV003 se realizó la caracterización de los productos obtenidos con cada proceso (Tabla 3).

Tabla 1. Características de la suspensión viral del aislamiento SfmNPV003

Característica	Promedio	Límites	Referencia
pH	6.52	4 - 9	Ignoffo y García (1966) en:
Contenido de humedad (%)	93.57		Jenkins y Grzywacz (2003)
Contenido de materia seca (%)	6.43		
Total contaminantes microbianos (UFC/mL)	4.88×10 ⁸	1.00×10 ⁹	Jenkins y Grzywacz (2003)
Contaminación bacteriana (UFC/mL)	4.88×10 ⁸		
Contaminación fúngica (UFC/mL)	< 100		
Concentración viral (CI/mL)	3.00×10 ⁹		

Tabla 2. Temperaturas alcanzadas en el proceso de atomización en lecho fluido

Temperatura entrada (°C)	Temperatura interna de la cámara de secado (°C)	Temperatura de salida (°C)
85.0-106.0	33.0-42.5	31.0-44.0

La prueba de comparación de medias t-Student detectó diferencias altamente significativas entre los valores de pH de los dos tratamientos ($F = 1.00$, $gl = 4$, $P < 0.0001$), siendo el pH del producto obtenido por el proceso de atomización en lecho fluido significativamente menor al del polvo obtenido por el proceso de secado por estufa (Tabla 3). Esta diferencia podría deberse al mayor contenido de microorganismos contaminantes en el producto atomizado en lecho fluido, los cuales podrían haber degradado algunos componentes de la formulación, generando cambios químicos que afectaron el pH del medio (Burges, 1998). Otro factor pudo haber sido la mayor temperatura empleada en el proceso de atomización en lecho fluido, que podría haber acelerado reacciones químicas de los componentes repercutiendo en el pH. Sin embargo, los valores de pH obtenidos para los dos productos secos como se mencionó anteriormente, se encuentran en un rango adecuado para mantener la integridad de las partículas virales (Caballero y col., 2001; Silva y Moscardi, 2002).

Con el proceso de atomización en lecho fluido se obtuvo un producto con un contenido de humedad del $6.14 \pm 0.34\%$, valor que fue significativamente menor ($F = 2.82$, $gl = 4$, $P = 0.0169$) al obtenido en el producto secado en estufa con corriente de aire ($7.66 \pm 0.57\%$) (Tabla 3). Esta diferencia es debida posiblemente a que la atomización en lecho fluido involucra varios microprocesos y remueve la humedad de las gotas formando partículas secas bajo condiciones controladas de temperatura y flujo del aire (presión), produciendo fluidización de las partículas y un secado más rápido (Peighambardoust y col., 2011); por el contrario, el proceso de secado en estufa se realiza mediante el flujo de aire caliente dentro de la cámara sobre un sólido estacionario que hace que los ciclos de secado sean más largos (Salazar, 2003). Caber destacar que los contenidos de humedad para los dos productos fueron bajos y se consideran adecuados para bioplaguicidas a base de baculovirus, ya que aseguran la estabilidad física de los cuerpos de inclusión, reduciendo la probabilidad de crecimiento de microorganismos contaminantes que puedan afectar la calidad del producto final (Quiroga y col., 2011).

Al comparar el contenido de contaminantes microbianos (Tabla 3), se encontraron diferencias muy significativas entre los dos tratamientos para el contenido de bacterias ($t = 11.43$; $P = 0.0076$) y diferencias significativas para el contenido de hongos ($t = 9.21$; $P = 0.0116$). No se reporta

contenido de levaduras, solo de mohos y bacterias, siendo significativamente mayor la contaminación en el producto atomizado en lecho fluido, lo que posiblemente se debe a que este sistema no es cerrado y no incluye filtros en ningún punto. La cámara de atomización cuenta con puntos de entrada y salida para la alimentación de la suspensión viral y para la entrada y salida de aire, factor que puede facilitar el ingreso de microorganismos del ambiente al sistema; mientras que para el secado por estufa, el producto se ubicó en bandejas cubiertas con un material que permite la salida de la humedad, pero no la entrada de partículas, disminuyendo la posible entrada de microorganismos.

Para asegurar la calidad de estos bioinsumos se ha establecido que el conteo de bacterias totales no debe exceder de 5×10^8 UFC/g para productos secos formulados (Jenkins y Grzywacz, 2003), por lo tanto los polvos secos del SfMNPV obtenidos con los métodos de secado descritos anteriormente están dentro de los límites aceptables de contaminación.

Teniendo en cuenta el contenido de contaminantes de la suspensión viral 4.88×10^8 UFC/mL) (Tabla 1), la cantidad utilizada en cada proceso (300 mL para proceso de secado en estufa y 250 mL para secado por atomización en lecho fluido) y su correspondiente peso seco 51.0 g y 42.5 g, la concentración teórica de contaminantes bacterianos para el producto secado en estufa sería de 2.74×10^9 UFC/g y la del producto atomizado de 2.82×10^9 UFC/g, datos que fueron muy superiores a los encontrados experimentalmente en los polvos secos obtenidos (Tabla 3). Se pudo establecer que la contaminación bacteriana se redujo después del proceso de secado en un 94.26% para el producto atomizado en lecho fluido y en un 99.65% para el procesado en estufa, lo que indica que a pesar del proceso de concentración debido a la deshidratación, la concentración de contaminantes viables se redujo, posiblemente debido al efecto negativo que produjo cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática durante el proceso de deshidratación, evento crítico que puede generar la muerte celular (Jin y Custis, 2011) e induce perturbaciones drásticas en los sistemas biológicos, tales como cambios en la morfología celular (Casas y Cáez, 2011) y la transición de fases de los fosfolípidos y las variaciones del volumen celular, siendo la velocidad a la cual es removida el agua de las células, uno de los factores más determinantes (Mille y col., 2005).

Al comparar el efecto de los dos procesos de secado sobre la reducción de contaminantes bacterianos se determinó que el secado en estufa

causó la mayor reducción de la carga microbiana, posiblemente porque el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de los microorganismos depende entre otros factores del tiempo de exposición. En este sentido, el proceso en estufa tardó 24 horas, en comparación con el proceso de secado por atomización en lecho fluido que sólo tomó 52 minutos desde que se inició la atomización del líquido hasta que ésta terminó y se suspendió el flujo de aire. El secado en estufa es largo y su mecanismo de calentamiento es por circulación de aire caliente, lo que puede producir un daño estructural y fisiológico a los microorganismos por desnaturalización de proteínas, inactivación de enzimas y ruptura de oligonucleótidos de ADN y ARN (Mille y col., 2005; Fernández-Sandoval y col., 2012).

Se destaca que el contenido de contaminantes obtenido en los dos productos secos (Tabla 3) es similar al de algunos productos virales como la formulación del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) evaluada por Lasa y col. (2008), que mostró un contenido de microorganismos en promedio de 1.9×10^8 UFC/g. De igual forma el producto comercializado en Estados Unidos con el nombre comercial Elcar®, cuyo ingrediente activo es el nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850), presenta un contenido de contaminantes de 10^7 UFC/g (Shied 1989 en: Quiroga y col., 2011).

Las concentraciones virales de los polvos secos obtenidos por atomización en lecho fluido (2.09×10^9 CI/g) y secado en estufa (2.44×10^9 CI/g) no presentaron diferencias significativas entre sí ($F = 1.65$, $gl = 4$, $P = 0.0773$) según la prueba de comparación realizada, lo que sugiere la eficiencia de los dos procesos para la conservación de las partículas virales durante la remoción de agua.

El proceso de atomización en lecho fluido presentó un rendimiento de 44.28% y el proceso de secado en estufa de 95.00%, resultados que indican que se presentaron pérdidas de material en el lecho fluido, posiblemente por salida de polvos finos a través de las mangas o por depósitos de producto en los diferentes aditamentos de la cámara que no fueron recuperados (Johansen y col., 2000; Bürki y col., 2011). Por el contrario, para el secado en estufa las pérdidas fueron mínimas siendo muy fácil y eficiente la operación manual de recuperación de producto.

Para la evaluación de la actividad biológica se determinó la concentración letal media de los productos obtenidos después del secado de una suspensión viral del aislamiento SfmNPV003 por atomización y en estufa (Tabla 4).

Al comparar los límites fiduciales (95%) de las CL_{50} determinadas (Tabla 4), se observó que no existen diferencias significativas entre la patogenicidad del virus sometido a los dos procesos de secado y el virus sin secar. El análisis probit determinó que se cumplieron las hipótesis de igualdad y paralelismo para los dos productos secos ($P > 0.05$), lo cual permitió determinar las potencias relativas, entre estos dos tratamientos observándose que el virus sometido al proceso de atomización en lecho fluido es aproximadamente 3 veces menos potente que el virus secado en estufa. Esta menor potencia podría deberse a que en el proceso de atomización en lecho fluido la solución de alimentación se distribuye en gotas muy finas que se enfrentan a una corriente de aire caliente para su rápida deshidratación, procedimiento que puede ser muy drástico para materiales biológicos lábiles tales como los virus (Othake y col., 2010) y que pudo haber causado la inactivación del SfmNPV003.

Una de las características de los baculovirus, que permite su manipulación y formulación utilizando procesos que involucran el uso de solventes orgánicos o altas temperaturas, es la formación del cuerpo del inclusión proteico (Villamizar y col., 2010).

Tabla 3. Características de los productos obtenidos después del secado de una suspensión viral del aislamiento SfmNPV003 por los métodos de atomización en lecho fluido y estufa.

Característica	Proceso de atomización	Proceso de secado en estufa
pH	6.14***	6.33***
Contenido de humedad (%)	6.14*	7.66*
Contaminación bacteriana (UFC/g)	3.88×10^8 **	2.33×10^7 **
Contaminación fúngica (UFC/g)	1.97×10^4 *	1×10^3 *
Concentración viral (CI/g)	2.09×10^9	2.44×10^9

Prueba t-Student *Significativo ($P < 0.05$) ** Muy significativo ($P < 0.01$) *** Altamente significativo ($P < 0.0001$)

Tabla 4. Concentración letal media de los productos obtenidos después del secado de una suspensión viral del aislamiento SfMNPV003 utilizando los métodos de atomización en lecho fluido y de estufa.

Tratamiento	CL ₅₀ (CI/mL)	Límites de confianza 95% (CI/mL)		Potencia relativa ¹	Nivel de p	Heterogeneidad
		Inferior	Superior			
Virus secado por atomización	3.3×10 ⁵	8.1×10 ⁴	1.3×10 ⁶	0.30	0.46	4.10
Virus secado en estufa	1.0×10 ⁵	4.1×10 ⁴	2.4×10 ⁵	1.00	0.47	1.89
Virus sin secar (suspensión viral)	2.4×10 ⁵	1.4×10 ⁵	3.9×10 ⁵	-	2.38	0.52

¹La potencia relativa es una medida de la actividad insecticida del inoculo experimental (virus secado por atomización) comparado con el inoculo estándar (virus secado por estufa).

Esta estructura brinda protección a la unidad infecciosa o virión, efecto que ha sido comprobado por varios autores como Behle y col., (2000), quienes observaron que los cuerpos de inclusión (CIs) del nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* protegieron la actividad insecticida de los viriones de los efectos dañinos de altas temperaturas. En otro trabajo se observó que durante un proceso de atomización de dicho virus, éste no redujo su actividad insecticida causando mortalidades entre el 68.8% y el 96.6% en larvas de *Trichoplusia ni*, lo que se relacionó con la protección brindada por el cuerpo de inclusión (Tamez y col., 2002). Además, en otro trabajo, no hubo pérdida de la actividad insecticida en formulaciones del Granulovirus de *Cydia pomonella* CpGV, elaboradas por atomización, con las cuales se registró una mortalidad del 93.6% (Arthurs y col., 2006).

En cuanto al método de secado en estufa con corriente de aire, éste se ha utilizado para secar nucleopoliedrovirus como el de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV), mostrando que el virus no formulado secado a 68°C por dos horas no presentó pérdida de actividad, mientras que la exposición a 90°C por 30 minutos causó más del 20% en pérdida de actividad (Behle y col., 2006). Dicho método se ha utilizado también para secar el virus de la hepatitis A, obteniéndose una reducción de su infectividad después de 24 horas a 80°C y entre 2 horas y 6 horas a 90°C (Sofer y col., 2003).

Los diferentes resultados para los dos procesos de secado evaluados evidencian que las condiciones de cada uno afectan de diferente forma el producto final, como lo reporta el trabajo de Horaczek y Viernstein, (2004), en el cual se comparó el efecto de tres tecnologías de secado sobre la actividad y longevidad de los conidios de *Beauveria brongniartii* y *Metarhizium anisopliae*. En dicho trabajo se

estableció que el método de liofilización fue el más favorable para *B. Brongniartii* y el más destructivo para *M. Anisopliae* y que los métodos de secado por atomización y lecho fluido produjeron un daño severo al material fúngico, lo cual se reflejó en una baja y prolongada velocidad de germinación.

Los baculovirus son una alternativa efectiva para el control de plagas, por lo que los resultados encontrados en este trabajo sobre el efecto de la temperatura y el proceso de secado sobre la estabilidad viral del nucleopoliedrovirus SfMNPV003, serán de gran utilidad para el desarrollo de una formulación que tendría las ventajas de las preparaciones secas como su estabilidad en almacenamiento (Caballero y col., 2001), previo establecimiento de sus condiciones, lo cual contribuye a la mejora de su vida útil y su funcionalidad como producto seco (Carrillo y col., 2011), así como la facilidad de manejo y almacenamiento, ya que se reduce el peso y el tamaño del empaque (Seaman, 1990 En: Tamez y col., 2002)

Conclusiones

Se estableció que el aislamiento SfMNPV003 pierde patogenicidad cuando se expone a temperaturas superiores a 50°C y el producto seco obtenido con el proceso en estufa evidenció mejores características tecnológicas, razón por la que dicho método fue seleccionado como el más adecuado para la deshidratación del virus durante el proceso de formulación y manufactura de un bioplaguicida.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el apoyo financiero

para la realización del presente trabajo de investigación. A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por la Comisión de estudios otorgada a Judith Elena Camacho Kurmen para la realización de sus estudios de Doctorado.

Nomenclatura

CI	cuerpo de inclusión
CI/g	cuerpo de inclusión por gramo
CI/mL	cuerpo de inclusión por mililitro
CL ₅₀	concentración letal media, CI/mL
H	humedad, %
t	tiempo, minutos
T	temperatura, °C
UFC/g	unidades formadoras de colonia por gramo
UFC/mL	unidades formadoras de colonia por mililitro

Referencias

- Amorij, J., Huckriede, A., Wilschut, J., Frijlink, H. y Hinrichs, W. (2008). Development of Stable Influenza Vaccine Powder Formulations: Challenges and Possibilities. *Pharmaceutical Research* 25, 1256-1273
- Arthurs, S., Lacey, L. y Behle, R. (2006). Evaluation of spray dried lignin-based formulations and adjuvants as solar protectants for the granulovirus of the codling moth, *Cydia pomonella* (L). *Journal of Invertebrate Pathology* 93, 88-95
- Batista, A., Alves, S., Augusto, N., Pereira, R. y Alves, L. (2001). Stability and persistence of two formulations containig *Anticarsia gemmatalis* Nuclear polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotropical Entomology* 30, 411-416
- Behle, R. y Popham, H. (2012). Laboratory and field evaluations of the efficacy of a fast-killing baculovirus isolate from *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Invertebrate Pathology* 109, 194-200
- Behle, R., Tamez-Guerra, P. y Mcguire, M. (2006). Evaluating conditions for producing spray-dried formulations of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedroviruses (AfMNPV). *Biocontrol Science and Technology* 16, 941-952
- Behle, R., Tamez-Guerra, P. y Mcguire, M. (2000). Effect of Light Energy on Alkali-Released Virions from *Anagrapha falcifera* Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, 120-126
- Boschetti, N., Wyss, K., Mischler, A., Hostettler, T. y Kempf, C. (2003). Stability of minute virus of mice against temperature and sodium hydroxide. *Biologicals* 31, 181-185
- Burges, H. (1981). *Microbial Control of pest and plant diseases 1970-1980*. Academic Press. London.
- Burges, H. (1998). *Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Kluwer Academic Publishers. Holanda.
- Bürki, K., Jeon, I., Arpagaus, C. y Betz, G. (2011). New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. *International Journal of Pharmaceutics* 408, 248-256
- Caballero, P., Lopez Ferber, M. y Williams, T. (2001). *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Universidad pública de Navarra. Editorial Phytoma, España.
- Caballero, P., Murillo, R., Muñoz, D. y Williams, T. (2009). El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes en España. *Revista Colombiana de Entomología* 35, 105 - 115
- Carrillo, H., Gonzalez, D. H., Cruz, J., Barrera, J. F., Roman, A. y Perez, C. (2011). Storage stability and physicochemical properties of passion fruit juice microcapsules by spray-drying. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 421-430
- Casas, N. y Gáez G. (2011). Cambios morfométricos y de calidad por aplicación de tres fuentes de calcio bajo tratamiento térmico suave en melón (*Cucumis melo* L.) fresco precortado. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 431-444
- Finney, D. J. (1952). *Probit Analysis*. Cambridge University Press. Inglaterra.

- Fernandez-Sandoval, M.T., Ortiz-Garcia, M., Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. (2012). Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores. *Process Biochemistry* 47,186-194
- Gómez, J., Guevara, E.J., Barrera, G.P., Cotes, A.M. y Villamizar, L.F. (2010). Aislamiento, Identificación y Caracterización de Nucleopoliedrovirus Nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín* 63, 5511-5520.
- Guimarães, F.R. (2003). Patogenicidade do nucleopolyhedrovirus (NPV) (Baculoviridae) isolados em larvas de *Spodoptera exigua* e *S. littoralis* sobre larvas de *S. frugiperda*. *Manejo integrado de plagas y agroecología (Costa Rica)* 70,74-77
- Horaczek, A. y Viernstein, H. (2004). Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control* 31, 65-71
- Hughes, P. y Wood, H. A. (1981). A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 37, 154-159.
- Jin, X. y Custis, D. (2011). Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control* 56, 202-208
- Johansen, P.; Merkle, H.; Gander, B. (2000). Technological considerations related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 413-417
- Jenkins, N. y Grzywacz, D. (2003). Towards the standardization of Quality Control of fungal and viral Biocontrol Agents. En: *Quality Control and Production of Biological Control Agents. Theory and Testing Procedures*. (ed. J.C. Van Lenteren). Pp 247 - 263 .Wageningen University, Netherlands.
- Jenkins, N. y Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents- Assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology* 10, 753-777
- Lacey, L. y Arthurs, S. (2005). New method for testing solar sensitivity of commercial formulations of the granulovirus of codling moth (*Cydia pomonella*, Tortricidae: Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* 90, 85-90
- Lacey L. y Kaya H.K. (2007). Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and other Invertebrate Pest. 2a. Edición. Springer, Holanda.
- Lasa, R., Williams, T. y Caballero, P. (2008). Insecticidal Properties and Microbial Contaminants in a *Spodoptera exigua* Multiple Nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) Formulation Stored at Different Temperatures. *Journal of Economy Entomology* 101, 42-49
- Lasa, R., Ruiz, C., Alcazar, M., Belda, J., Caballero, P. y Williams, T.(2007). Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain. *Biological Control* 40, 89-96
- Lian, W., Hsiao, H. y Chou, Ch. (2002). Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology* 74, 79-86
- Martínez, A., Williams, T., López, M.F. y Caballero, P. (2005). Optical Brighteners Do Not Influence Covert Baculovirus Infection of *Spodoptera frugiperda*. *Applied and Environmental Microbiology* 71,1668-1670
- Michalsky, R., Pfromm, P., Czermak, P., Sorensen, C. y Passarelli, A.L. (2008). Effects of temperature and shear force on infectivity of the baculovirus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virological Methods* 153, 90-96
- Mille, Y., Girard, J., Beney, L. y Gervais, P. (2005). Air drying optimization of *Saccharomyces cerevisiae* through its water-glycerol dehydration properties. *Journal of Applied Microbiology* 99, 376-382
- Miller, L.K. (1997). *The Baculoviruses*. PLENUM PRESS, New York, London.
- Morgan, C., Herman, N., White, P.A. y Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods* 66, 183-193

- Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annual Review Entomology* 44, 257-289
- Ohtake, S., Martin, R., Yee, L., Chen, D., Kristensen, D., Lechuga-Ballesteros, D. y Truong-Le, V. (2010). Heat-stable measles vaccine produced by spray drying. *Vaccine* 28, 1275-1284
- Parikh, M. D. (2007). *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. Second Edition. Informa Health Care, New York.
- Peng, F., Fuxa, J.R., Richter, A. y Johnson, S. (1999). Effects of Heat-Sensitive Agents, Soil Type, Moisture, and Leaf Surface on Persistence of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) Nucleopolyhedrovirus. *Environmental Entomology* 28, 330-338
- Peighambardoust, S., Golshan, A. y Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review. *Trends in Food Science & Technology* 22, 215-224
- Quiroga, I., Gómez, A. M., Villamizar, L. (2011). Estabilidad de formulaciones a base de granulovirus para controlar *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en campo. *Revista Colombiana de Entomología* 37, 27-35.
- Roberts, P., More, J., Rott, J. y Lewin, D. (2011). Virus inactivation in albumin by a combination of alkali conditions and high temperature. *Biologicals* 39, 67-72
- Salazar, R. (2003). *Tecnología Farmacéutica Industrial. Fabricación y control de medicamentos sólidos de administración por vía oral*. Labortecnic, Barcelona.
- Simón, O., Williams, T., López, M. y Caballero, P. (2004). Genetic Structure of a *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus Population: High Prevalence of Deletion Genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5579-5588.
- Silva, M. y Moscardi, F. (2002). Field Efficacy of the Nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of Formulations, Water pH, Volume and Time of Application, and Type of Spray Nozzle. *Neotropical Entomology* 31, 075-083
- Sofer, G., Lister, D. y Boose, J. (2003). Virus Inactivation in the 1990s and into the 21st Century Part 6, Inactivation Methods Grouped by Virus. *BioPharm International* 42-68
- Sporleder, M., Zegarra, O., Rodriguez, E.M. y Kroschel, J. (2008). Effects of temperature on the activity and kinetics of the granulovirus infecting the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). *Biological Control* 44, 286-295
- Tamez, P., Zamudio, V., Carrillo, J., Rodríguez, C. y Gómez, R. (2006). Formulaciones granulares de Baculovirus en combinación con abillantadores ópticos para su empleo como Bioinsecticida. *Ciencia UANL* 9, 149-156
- Tamez, P., Mcguire, M., Behle, R., Shasha, B. y Pingel, R. (2002). Storage Stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray dried formulations. *Journal of Invertebrate Pathology* 79, 7-16
- Valicente, F. y Da costa E. (1995). Controle da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), como *Baculovirus spodoptera*, aplicado via água de irrigação. *Annual Society Entomology Brasil* 24, 61-67
- Villamizar, L. F. (2011). Virus entomopatógenos y cambio climático. 127-143p. En: Ed: Sociedad Colombiana De Entomología Socolen. Memorias Cambio Climático: Retos Y Oportunidades Para La Entomología. 38 Congreso Socolen. Colombia.
- Villamizar, L., Barrera, G., Cotes, A. y Martínez, F. (2010). Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical, characterization, photostability and *in vitro* virus release. *Journal of Microencapsulation* 27, 314-324
- Villamizar, L., Espinel, C. y Cotes, A. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología* 35, 116-121
- Viveros, R., Tellez, D. I., Perea, M.J., Alamilla, L., Cornejo, M., Beristain, C. I., Azuara E. y Gutierrez G.F. (2013). Encapsulation of ascorbic acid into calcium alginate matrices

through coacervation coupled to freeze-drying. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 29-39

Williams, T., Goulson, D., Caballero, P., Cisneros, J., Martínez, A., Chapman, J., Roman, D. y Cave, R. (1999). Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small-scale maize growers in Latin America. *Biological Control* 14, 67-75.

Winder, R. S., Wheeler, J. J., Conder, N., Otvos, I. S., Nevill, R. y Duan, L.

(2003). Microencapsulation: A Strategy for Formulation of Inoculum. *Biocontrol Science and Technology* 13,155-169

Young, S. (2005). Persistence of viruses in environment. Disponible en: <http://www.Agctr.isu.edu/s265/young.htm>. [Fecha revisión: 17 febrero 2012]

Zar, J. (1999). *Biostatistical analysis*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey.