

## Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le de crédito al documento y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

**BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA**  
UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
Chía - Cundinamarca

**TESIS DOCTORAL**

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE MICROENCAPSULACIÓN  
DE BACULOVIRUS POR ATOMIZACIÓN**

**JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DOCTORADO EN BIOCENCIAS  
Bogotá, Junio de 2014**

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE MICROENCAPSULACIÓN  
DE BACULOVIRUS POR ATOMIZACIÓN**

**JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN**

**DIRECTOR  
MARTHA ISABEL GÓMEZ Ph.D.**

**CODIRECTOR  
LAURA FERNANDA VILLAMIZAR Ph.D.**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DOCTORADO EN BIOCENCIAS  
Bogotá, Junio de 2014**

***A la Santísima Trinidad por su iluminación  
A mis padres, hermanas y a Santiago  
Quienes me brindaron su afecto y  
apoyo.***

***A mi Tia Angelina, Tio Rodrigo y Tio Alberto  
Quienes me brindaron toda su colaboración.***

***Y a todos aquellos que de una u otra  
manera me colaboraron en la  
realización de este trabajo.***

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Dra Laura Fernanda Villamizar por su apoyo y por brindarme toda la oportunidad de realizar esta Tesis doctoral en Corpoica. Agradezco toda su colaboración, guía, tiempo y conocimientos brindados.
- A la Dra Martha Isabel Gómez por permitirme trabajar mi tesis doctoral en la planta de Bioplaguicidas de Corpoica, así como le agradezco todo su apoyo, guía, compañía y conocimientos brindados.
- A la Dra Alba Marina Cotes por permitirme trabajar mi tesis doctoral en la planta de Bioplaguicidas y el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica Tibaitata.
- A la Universidad de la Sabana por permitirme realizar el Doctorado en Biociencias y a sus Docentes por los conocimientos brindados.
- A la Dra Carmenza Duque, Directora del Doctorado de Biociencias de la Universidad de la Sabana, por su apoyo y colaboración.
- Al Dr. Luis Eduardo Díaz, profesor de la Universidad de la Sabana, por su apoyo y colaboración como parte de mi Comité Tutorial.
- A Claudia Mesa, Javier Pulido, Oscar Cubillos, Consuelo Rojas, Juan Carlos Campos, auxiliares de Corpoica, por su colaboración en la realización de bioensayos y su buena disposición.
- A la Dra. Gloria Barrera, investigadora de Corpoica, por su colaboración en la toma de fotografías por microscopía electrónica de barrido.
- A Adriana Santos, Juliana Gómez, Paola Santos, Carlos Andrés Moreno, Dr. Carlos Espinel, Mauricio Cruz, Andrés Díaz, Karen Malagón, investigadores de Corpoica, por su colaboración en algunos procedimientos desarrollados y a todos aquellos funcionarios de Corpoica que me brindaron su colaboración.
- Al Dr. Robert Behle por permitirme realizar mi pasantía de investigación en su laboratorio y por compartirme sus conocimientos.
- A Röhm GmbH, a Almapal Colombia y especialmente al Dr. Alberto Botero por su aporte del polímero para la realización del primer objetivo de mi Tesis.
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por concederme Comisión de estudios para realizar el Doctorado.

***Esta Tesis Doctoral ha sido desarrollada en el Laboratorio de Control Biológico y en la Planta de Bioplaguicidas de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA)- Tibaitatá, Colombia y ha sido financiada por Corpoica y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Colombia.***

## **TABLA DE CONTENIDO**

	Pág.
Título	1
Resumen	1
Palabras clave	1
Justificación	2
<b>Capítulo I. Objetivos</b>	<b>5</b>
1. Objetivo general	6
2. Objetivos específicos	6
<b>Capítulo II. Aspectos teóricos</b>	<b>7</b>
1. Familia <i>Baculoviridae</i>	8
1.1. Clasificación de los Baculovirus	9
1.2. Ciclo de infección	12
2. Efectos de los factores ambientales sobre los Baculovirus	15
3. Baculovirus como bioinsecticidas	17
4. Formulaciones de Baculovirus	19
4.1. Tipos de formulación	20
5. Técnica de microencapsulación	20
5.1. Métodos de microencapsulación	22
5.2. Atomización (Spray drying)	23
5.2.1. Clases de atomización	27
5.2.2. Parámetros del proceso de atomización	28
6. Materiales de encapsulación	30
6.1. Lípidos	31
6.2. Proteínas	31
6.3. Polímeros	31
7. Eudragit	34
8. Experiencias de la atomización en la microencapsulación de biocontroladores	37
<b>Capítulo III. Materiales y métodos</b>	<b>40</b>
1. Ajuste de las condiciones del proceso de atomización	41
1.1. Determinación del efecto de la temperatura sobre el NPV003 de <i>Spodoptera frugiperda</i>	41
1.2. Selección del sistema de atomización (superior e inferior) y de las condiciones del proceso para la adecuada formación de micropartículas	42

	Pág.
1.3. Selección de las condiciones óptimas para el proceso de microencapsulación por atomización superior	45
2. Validación del proceso de microencapsulación para el aislamiento nativo de nucleopoliedrovirus de <i>S. frugiperda</i> NPV003	48
2.1. Contenido de humedad (%)	48
2.2. Concentración de las micropartículas y eficiencia de la encapsulación	49
2.3. Contenido residual de solventes	49
2.4. Actividad insecticida	50
3. Determinación de la fotoestabilidad y la dosis mínima efectiva del virus microencapsulado por atomización bajo condiciones de invernadero	50
3.1. Fotoestabilidad del virus microencapsulado por atomización	50
3.2. Selección de la dosis mínima efectiva del virus microencapsulado por atomización bajo condiciones de invernadero	51
<b>Capitulo IV. Análisis y discusión de resultados</b>	<b>53</b>
1. Ajuste de las condiciones del proceso de atomización	54
1.1 Efecto de la temperatura sobre el nucleopoliedrovirus de <i>Spodoptera frugiperda</i> NPV003	54
1.2. Selección del sistema de atomización (superior e inferior) y de las condiciones del proceso para la adecuada formación de micropartículas	56
1.2.1. Elaboración de micropartículas por atomización inferior	56
1.2.2. Elaboración de micropartículas por atomización superior	60
1.2.3. Selección del sistema de atomización	65
1.3. Selección de las condiciones óptimas para el proceso de microencapsulación por atomización superior	65
2. Validación del proceso de microencapsulación para el aislamiento nativo de nucleopoliedrovirus de <i>S. frugiperda</i> NPV003	74
2.1. Caracterización de los lotes de micropartículas y del proceso de microencapsulación desarrollado	74
2.1.1. Tamaño y frecuencia de tamaño de micropartículas del NPV003 de <i>S. frugiperda</i>	74
2.1.2. Morfología de las micropartículas	75
2.1.3. Contenido de humedad de las micropartículas	78
2.1.4. Contenido residual de solventes	79
2.1.5. Rendimiento	81
2.1.6. Eficiencia de microencapsulación y concentración de las MPs	83
2.1.7. Actividad insecticida de las micropartículas (MPs)	85

	Pág.
3. Determinación de la fotoestabilidad y la dosis mínima efectiva del virus microencapsulado por atomización bajo condiciones de invernadero	89
3.1. Fotoestabilidad del virus microencapsulado por atomización	89
3.2. Selección de la dosis mínima efectiva del virus microencapsulado por atomización bajo condiciones de invernadero	93
<b>Capítulo V. Conclusiones</b>	97
<b>Capítulo VI. Recomendaciones</b>	99
<b>Capítulo VII. Producción científica</b>	101
1.Publicaciones científicas	102
2.Participación en eventos científicos	102
<b>Bibliografía</b>	103
<b>Anexos</b>	120
<b>Anexos. Producción científica</b>	147

## **LISTADO DE TABLAS**

	Pág.
Tabla 1. Géneros de los Baculoviridae	11
Tabla 2. Principales Baculovirus comercializados como Bioinsecticidas	19
Tabla 3. Microorganismos microencapsulados por varios métodos	24
Tabla 4. Materiales de encapsulación	32
Tabla 5. Variables y niveles evaluados para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 por sistema de atomización inferior	44
Tabla 6. Variables y niveles evaluados para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 por sistema de atomización superior	44
Tabla 7. Tratamientos evaluados para la formación de micropartículas utilizando atomización inferior	45
Tabla 8. Tratamientos evaluados para la formación de micropartículas utilizando atomización superior	45
Tabla 9. Tabla de Factores y Niveles	46
Tabla 10. Tratamientos para la formación de micropartículas. Atomización superior	47
Tabla 11. Temperatura de entrada, interna y de salida en el proceso de atomización inferior	56
Tabla 12. Matriz de decisión del proceso de microencapsulación en el sistema de atomización inferior (Bottom spray)	58
Tabla 13. Temperatura de entrada, interna y de salida en el proceso de atomización superior	61
Tabla 14. Matriz de decisión del proceso de microencapsulación en el sistema de atomización superior (Top spray)	62
Tabla 15. Parámetros fisicoquímicos y resultados de las variables de respuesta durante el proceso de microencapsulación	66

	Pág.
Tabla 16. Resultados y valores óptimos del análisis multicriterio	73
Tabla 17. Tamaño y frecuencia de tamaño de micropartículas del nucleopoliedrovirus NPV003 de <i>S. frugiperda</i> con Eudragit® S100 obtenidas por atomización	74
Tabla 18. Contenido de humedad de las micropartículas del NPV de <i>S. frugiperda</i> con Eudragit® S100	79
Tabla 19. Rendimiento del proceso de microencapsulación del NPV de <i>S. frugiperda</i> con Eudragit® S100	82
Tabla 20. Eficiencia del proceso de microencapsulación del NPV de <i>S. frugiperda</i> con Eudragit® S100	83
Tabla 21. Concentración letal media del nucleopoliedrovirus de <i>S. frugiperda</i> NPV003 microencapsulado con Eudragit®S100 por atomización	87
Tabla 22. Concentraciones letales medias del virus microencapsulado, el virus seco sin microencapsular y el virus puro sin secar	87
Tabla 23. Eficacia (%), actividad original remanente (%) e inactivación (%) de los lotes microencapsulados y del aislamiento viral NPV003 seco sin microencapsular	91
Tabla 24. Eficacia del virus microencapsulado por atomización utilizando diferentes dosis en condiciones de invernadero	94

## **LISTADO DE FIGURAS**

	Pág.
Figura 1. (A) Estructura de los Baculovirus (B) Virión con matrices terminales que contiene la glicoproteína (C) MNPV	8
Figura 2. Estructura de los Nucleopoliedrovirus y Granulovirus	10
Figura 3. Clasificación de baculovirus de acuerdo al árbol filogénico	11
Figura 4. Esquema del ciclo de Infección	12
Figura 5. Esquema de la infección primaria del intestino medio y de la infección secundaria del sistema traqueal en el insecto por Baculovirus	13
Figura 6. Modelo de infección secundaria y replicación viral	14
Figura 7. Larvas infectadas	15
Figura 8. Tipos de estructura de microcápsulas	21
Figura 9. Modelo esquemático de interacciones que ocurren en un proceso de microencapsulación por atomización	26
Figura 10. Diagrama presión-temperatura	27
Figura 11. Sistema de atomización (A) Superior o top Spray; (B) Inferior o bottom spray	28
Figura 12. Parámetros del proceso de atomización	30
Figura 13. (A) Estructura química del Eudragit®S100 (Evonik, 2011) (B) fotografía de microscopía electrónica de una microesfera recubierta con Eudragit® S100	35
Figura 14. Liberación del principio activo por coefecto de hinchazón y disolución del polímero	37
Figura 15. Equipo de lecho fluido Glatt GmbHHD-01277	43
Figura 16. Mapa del experimento para determinar la dosis mínima efectiva del virus microencapsulado por atomización bajo condiciones de invernadero	52

	Pág.
Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la eficacia del aislamiento viral NPV003	54
Figura 18. Micropartículas obtenidas por el sistema de atomización inferior (Bottom spray)	59
Figura 19. Fotografías de la micropartículas obtenidas por atomización inferior observadas al microscopio de luz	60
Figura 20. Micropartículas obtenidas por el sistema de atomización superior (Top Spray)	63
Figura 21. Fotografías de la micropartículas obtenidas con atomización superior observadas al microscopio de luz	64
Figura 22. (A), (B) y (C) Superficies de respuesta de los diámetros medios de partícula en función de la presión, concentración de polímero y de núcleo, para la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 (D) Diagrama de Pareto	68
Figura 23. (A), (B) y (C) Superficie de respuesta de la variable frecuencia de tamaño 10 – 40 µm en función de la presión, concentración de polímero y de núcleo, para la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 (D) Diagrama de Pareto	70
Figura 24. Micropartículas obtenidas por atomización superior observadas por microscopía de luz	71
Figura 25. (A), (B) y (C) Superficie de respuesta de la variable rendimiento en función de la presión, concentración de polímero y de núcleo, para la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 (D) Diagrama de Pareto	72
Figura 26. Distribución de rango de frecuencias de tamaños de partícula de los tres lotes obtenidos al microencapsular el nucleopoliedrovirus de <i>S. frugiperda</i> NPV003 con Eudragit® S100	75
Figura 27. Micropartículas obtenidas al encapsular el nucleopoliedrovirus de <i>S. frugiperda</i> NPV003 con Eudragit® S100 observadas al microscopio de luz	76

	Pág.
Figura 28. Fotografías de las micropartículas obtenidas al encapsular el nucleopoliedrovirus de <i>S. frugiperda</i> NPV003 con Eudragit® S100 observadas al microscopio electrónico de barrido Lote 2	77
Figura 29. Cromatograma del Lote 3 con adición de etanol	80
Figura 30. Cromatogramas de los Lotes microencapsulados de virus	80
Figura 31. Líneas de regresión obtenidas en la evaluación dosis mortalidad del aislamiento NPV003 de nucleopoliedrovirus sobre larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i>	86
Figura 32. Efecto de la radiación UVB sobre la eficacia del nucleopoliedrovirus de <i>S. frugiperda</i> NPV003 microencapsulado con Eudragit® S100 por atomización	89
Figura 33. Daño fresco producido por <i>S. frugiperda</i> en plantas de maíz	93
Figura 34. Larvas de <i>S. frugiperda</i> tomadas de las plantas de maíz	94

## **LISTADO DE ANEXOS**

	Pág.
Anexo 1. Comparación múltiple de medias de Tukey (95%) para los porcentajes de eficacia vs temperatura	121
Anexo 2. Análisis Probit	122
Anexo 3. Comparación de medias DMS (95%) para eficacia, actividad original remanente y % de inactivación para los lotes microencapsulados de NPV003 y el virus seco sin microencapsular	126
Anexo 4. Análisis de varianza (95%) para las dosis 750 g/ha, 1000 g/ha y 1250 g/ha del virus NPV003 microencapsulado por atomización y el bioplaguicida convencional a sus dosis de 1000 g/ha	140

**Título.** Desarrollo de un sistema de microencapsulación de Baculovirus por atomización

### **Resumen**

Los aspectos negativos del control de plagas agrícolas con plaguicidas químicos ha motivado el desarrollo de productos amigables con el medio ambiente, como es la utilización de agentes de control biológico, dentro de los cuales los *Baculovirus*, han sido muy estudiados debido a su alta patogenicidad para un gran número de especies de insectos considerados como plagas. Sin embargo, una de sus limitantes es su pérdida de actividad bajo condiciones de campo, debido a la inactivación causada principalmente por la luz ultra violeta, por lo que se hace necesario el desarrollo de formulaciones que reduzcan dicha inactivación, siendo la microencapsulación, una técnica promisoría para la obtención de formulaciones fotoestables.

Teniendo en cuenta el potencial del aislamiento colombiano de nucleopoliedrovirus NPV003 de *Spodoptera frugiperda* para el desarrollo de un bioplaguicida y los resultados promisorios de fotoestabilización obtenidos previamente mediante un proceso de microencapsulación utilizando la técnica de evaporación de solventes, el objetivo del presente estudio fue desarrollar un sistema de microencapsulación del virus por el método de atomización utilizando el polímero Eudragit® S100. Se determinó el efecto de la temperatura sobre el virus, se seleccionó el sistema de atomización y las condiciones óptimas del proceso, se validó el proceso de microencapsulación, se determinaron las propiedades físicas de las micropartículas obtenidas, su fotoestabilidad y actividad insecticida.

El proceso de microencapsulación desarrollado no afectó la actividad insecticida del virus y brindó una protección eficiente al aislamiento viral frente a la radiación UVB con una inactivación entre el 10 y el 17% para el virus microencapsulado y para el virus sin microencapsular del 77%. Las micropartículas obtenidas por el proceso de atomización superior utilizando una temperatura de entrada de 80°C, una velocidad de flujo de 4,12 mL/minuto, una presión interna de la cámara de 2,23 bares, una concentración de polímero del 6% y una concentración de núcleo del 1,35% presentaron formas variables, con tamaños entre 17,64 y 19,47  $\mu\text{m}$ . El contenido de humedad fue de  $10,38 \pm 0,87\%$ , la eficiencia de encapsulación fue de  $84,61 \pm 13,09\%$  y el rendimiento fue de  $91,20 \pm 6,40\%$ . Los resultados muestran la factibilidad tecnológica del proceso de atomización para ser usado como proceso de formulación del bioplaguicida basado en el aislamiento NPV003 de *Spodoptera frugiperda*.

**Palabras clave:** Baculovirus, microencapsulación, atomización, fotoestabilidad, Eudragit® S100, actividad insecticida

## Justificación

El maíz es un producto que debido a sus grandes bondades y variedad de usos se ha convertido en el cereal más importante a nivel mundial por el volumen de producción, el número de países que lo cultivan y las cantidades que se comercializan en el mercado internacional. En el periodo 2012/2013, la producción mundial de maíz fue de 913 millones de toneladas (FAO, 2012). En Colombia en la actualidad el cultivo del maíz se caracteriza por su gran dispersión, ya que se cultiva a lo largo y ancho de la geografía Colombiana en 250 municipios del país (Fenalce, 2011).

La plaga de mayor importancia económica en los cultivos de maíz de América, es el "gusano cogollero del maíz" *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera, Noctuidade), el cual actúa como gusano tierrero, trozador o gusano ejército y como cogollero que es su hábito más característico en el maíz (Negrete y Morales, 2003).

En Colombia, este insecto es plaga también de otros cultivos como sorgo, arroz, caña de azúcar, algodón y pastos. Su amplia distribución geográfica y la gran cantidad de hospederos alternos (García *et al.* 2002) han dificultado su control eficiente, siendo el control químico la práctica más empleada, utilizándose agroquímicos de alta toxicidad como insecticidas organofosforados carbamatos o piretroides, que en algunos casos han generado resistencia, además de interferir en la actividad de agentes naturales de control, lo que causa un impacto negativo para la entomofauna y un alto riesgo de intoxicaciones y residualidad en los alimentos (Armenta *et al.* 2003).

El control biológico de esta plaga surge como una alternativa promisoriosa y ambientalmente sostenible, mediante el uso de enemigos naturales, como los parásitos, nemátodos, bacterias, hongos y virus; siendo estos últimos debido a su alta especificidad y virulencia, la herramienta con mayor potencial para el desarrollo de bioplaguicidas (Valicente y Costa, 1995).

Los virus entomopatógenos son parte de los ecosistemas e inciden en las poblaciones naturales de los insectos, como un factor de mortalidad que contribuye a regular su densidad (Moscardi, 1999), pero son susceptibles a condiciones ambientales como la luz solar, la temperatura y la humedad. Por tal razón, su adopción e inclusión en Programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), depende del incremento de su estabilidad prolongando su persistencia y vida útil, lo cual se logra con una apropiada formulación (Caballero *et al.* 2009).

Dentro de los virus entomopatógenos se destacan los baculovirus, los cuales forman una cápsula de proteína llamada "cuerpode inclusión" (CI) que tiene la

función de protegerlos en el medio ambiente. Cuando un insecto de una especie susceptible consume alimento contaminado con los cuerpos de inclusión (CIs), éstos se disuelven en el intestino medio liberando los viriones que infectan a las células del intestino y después pasan a infectar casi todos los tejidos del insecto. La infección causa la muerte del individuo, el tegumento se degrada y se liberan millones de nuevos CIs al ambiente (Caballero *et al.* 2001).

Los bioinsecticidas basados en baculovirus, a diferencia de los plaguicidas químicos, actúan exclusivamente por ingestión (Caballero *et al.* 2009). El uso comercial de los baculovirus requiere el desarrollo de un producto formulado de fácil manejo y alta eficacia. Para facilitar esto, una formulación correcta debe: (1) aumentar la actividad insecticida del patógeno, (2) optimizar la aplicación y la ingestión del virus por el fitófago, (3) maximizar la persistencia ambiental del mismo, (4) estabilizar el virus durante su almacenamiento, y (5) facilitar el manejo del producto por parte del agricultor (Jones y Burges, 1998).

El laboratorio de Control Biológico de Corpoica cuenta con una colección de tres aislamientos nativos del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* SfNPV (NPV003, NPV009 y NPV011), los cuales han sido caracterizados física, molecular y biológicamente demostrando su alta patogenicidad y virulencia. Además, en un trabajo previo realizado en dicho laboratorio, los cuerpos de inclusión del virus de *S. frugiperda* NPV001 fueron formulados mediante su microencapsulación con el polímero Eudragit® S100 por el método de evaporación de solventes. En este trabajo se obtuvo una baja eficiencia del proceso 53,43% y se detectaron residuos de n-hexano en la formulación. Además las micropartículas presentaron un tamaño promedio de 198  $\mu\text{m}$ , las cuales no pueden ser ingeridas por las larvas neonatas de *S. frugiperda*, ya que su abertura bucal es posiblemente de 70  $\mu\text{m}$ . Sin embargo la microencapsulación fotoestabilizó eficientemente el virus demostrando el potencial de este tipo de formulación (Villamizar *et al.* 2010).

Una alternativa para microencapsular el virus con el mismo polímero aumentando la eficiencia del proceso, reduciendo el tamaño de las microcápsulas y eliminando el uso de solventes orgánicos como la acetona y el n-hexano, es la elaboración de las microcápsulas utilizando la técnica de atomización en un equipo de lecho fluido, proceso que además es fácilmente escalable y validable, lo que no es posible cuando se utiliza la técnica de evaporación de solventes.

La atomización como método de encapsulación ofrece ventajas como la obtención de microcápsulas en un solo paso, de bajo costo, en un proceso continuo y con altos porcentajes de eficiencia. Sin embargo, existen desafíos asociados con el proceso de atomización, como son la sobrevivencia de los organismos a las temperaturas del proceso y a la velocidad de secado, así

como el establecimiento de condiciones como la presión de la cámara y el flujo, para realizar un óptimo proceso.

Teniendo en cuenta el potencial del núcleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003 para el desarrollo de un bioinsecticida eficiente en campo y considerando los resultados promisorios de fotoestabilización obtenidos mediante la microencapsulación del virus, surge la necesidad de continuar con el desarrollo de la formulación evaluando otras técnicas más eficientes, económicas y sostenibles, para la formación de las microcápsulas, como es el proceso de atomización en lecho fluido.

# ***Capítulo I.***

## ***Objetivos***

## **1. Objetivo general**

Desarrollar un sistema de microencapsulación del aislamiento nativo de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003 por el método de atomización.

## **2. Objetivos específicos**

Estandarizar las condiciones para la elaboración de micropartículas por atomización.

Validar el proceso de microencapsulación para el aislamiento nativo de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003

Determinar la actividad insecticida y la fotoestabilidad del virus microencapsulado.

## ***Capítulo II.***

### ***Aspectos teóricos***

El control biológico es la utilización de competidores biológicos como por ejemplo insectos, microorganismos (bacterias, hongos y virus) y/o metabolitos microbianos para luchar contra ácaros, insectos, fitopatógenos y organismos considerados plagas (Fisher, 1999). El control biológico se ha utilizado con éxito en algunos casos y su uso tiene considerables ventajas, ya que no da lugar a residuos tóxicos, la resistencia de las plagas es baja y la resurgencia de plagas secundarias es reducida (Scragg, 2001).

## 1. Familia *Baculoviridae*

La familia *Baculoviridae* comprende un grupo de virus que son patógenos de invertebrados y se caracterizan por un genoma ADN circular, de doble cadena superenrollado, que varía en tamaño de 88 a 200 Kpb (Figura 1).

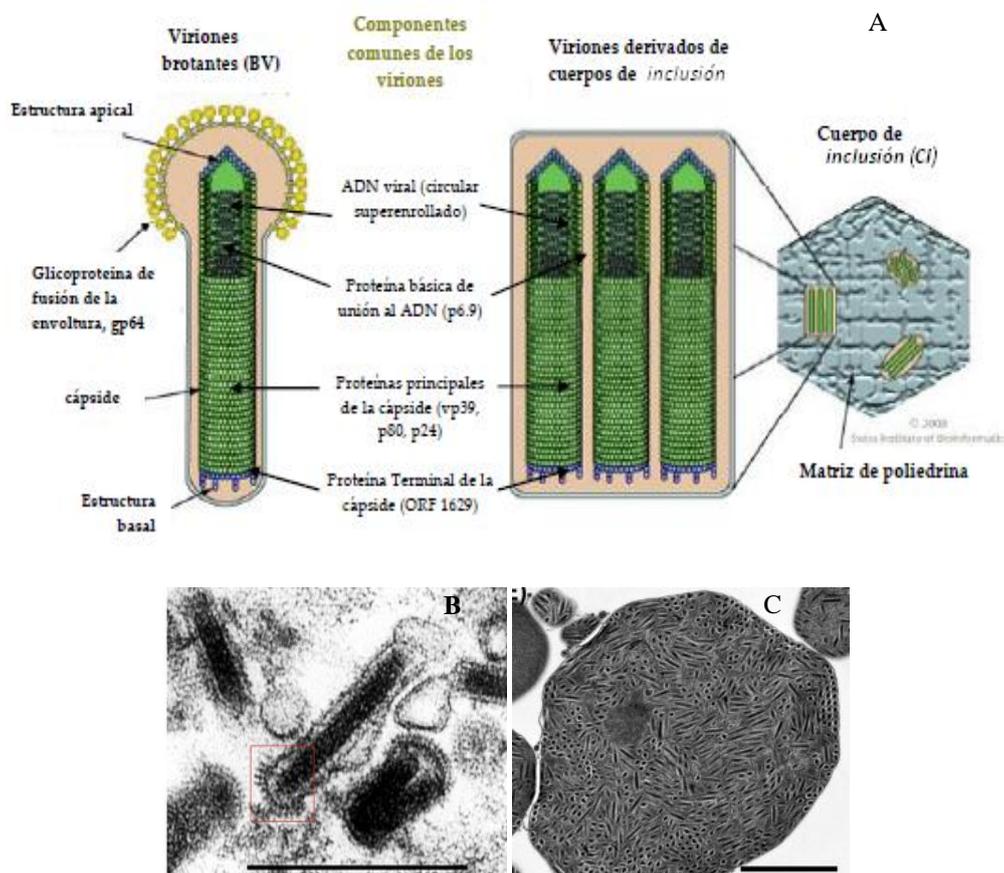


Figura 1. (A) Estructura de los Baculovirus (B) Virión con matrices terminales que contiene la glicoproteína (C) Nucleopoliedrovirus múltiples (MNPV). Barras de escala: 250 nm (Harrison y Hoover, 2012).

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 proteica llamada cuerpo de inclusión (Simón *et al.* 2004). Los genomas de más de 50 baculovirus han sido secuenciados (NCBI) y algunos han sido analizados y publicados (Moscardi *et al.* 2011).

Los baculovirus se caracterizan por tener dos tipos de viriones diferentes: los viriones brotados (VB), que pasan la infección de célula a célula en un insecto hospedero y los viriones derivados de los cuerpos de inclusión (VCI), los cuales se ensamblan en el núcleo de las células infectadas y se incluyen en una gran matriz de proteína formando los cuerpos de inclusión (CI) (Oers, 2011). Estos dos fenotipos difieren tanto en su estructura como en su composición de lípidos, ácidos grasos y proteínas de membrana (Braunagel *et al.* 2003 en Moscardi *et al.* 2011), lo que afecta a su capacidad infectiva. Mientras que los VCI son principalmente infectivos para las células columnares del intestino, los VB son capaces de infectar prácticamente el resto de células (Blissard, 1996 en: Moscardi *et al.* 2011).

Los Baculovirus han sido descritos en aproximadamente 600 especies de insectos hospederos, de las cuales la mayoría pertenecen a los órdenes Lepidoptera y en menor proporción a los órdenes Diptera e Himenoptera (Herniouet *et al.* 2004), encontrándose más de 700 baculovirus aislados de invertebrados y reportados en la literatura (Moscardi, 1999). Estos virus normalmente son denominados según el hospedero del cual fueron aislados por primera vez. Debido a su alta virulencia, especificidad a insectos y estabilidad ambiental, ellos han sido ampliamente utilizados como bioplaguicidas para el control de numerosas plagas agrícolas y forestales (Moscardi *et al.* 2011).

### **1.1. Clasificación de los Baculovirus**

La familia *Baculoviridae* según su morfología se divide en los géneros *Nucleopoliedrovirus* (NPVs) y *Granulovirus* (GVs). Estos géneros presentan diferencias en las conformaciones de sus cuerpos de inclusión (forma, tamaño y estructura) (Friesen y Miller, 2001). Los cuerpos de inclusión están compuestos principalmente por una proteína llamada poliedrina en los NPVs y por granulina en los GVs (Figura 2), los cuales son altamente estables y facilitan la sobrevivencia y dispersión del virus en el ambiente (Moscardi *et al.* 2011).

Los *Granulovirus* presentan unos cuerpos de inclusión de forma granular (ovocilíndrica) y su tamaño es más reducido (0,3-0,5  $\mu\text{m}$ ) y bastante homogéneo, además presentan solamente un único virión de tipo simple en cada cuerpo de

inclusión, con algunas excepciones. Los granulovirus muestran un espectro de hospederos más restringido que los nucleopoliedrovirus, ya que normalmente se reduce a un pequeño número de especies (*género betabaculovirus*) (Oers, 2011).

Los *Nucleopoliedrovirus* presentan numerosos viriones en cada cuerpo de inclusión y cada virión puede contener varios nucleocápsides (Figura 2), o sea que un virión puede contener múltiples genomas, que pueden ser idénticos o no (Simón *et al.*2004). Los nucleopoliedrovirus tienen cuerpos de inclusión de forma poliédrica cuyo tamaño es mayor (0,5-15µm). Dentro de los nucleopoliedrovirus se pueden distinguir dos grupos: aquellos que presentan varias nucleocápsides por virión son los nucleopoliedrovirus múltiples (MNPV) (Figura 1C), y los que poseen una única nucleocápside por virión, se les denomina nucleopoliedrovirus simples (SNPV) (Caballero *et al.* 2001), e incluyen los géneros *Alphabaculovirus*, *Gammabaculovirus* y *Deltabaculovirus* (Oers, 2011).

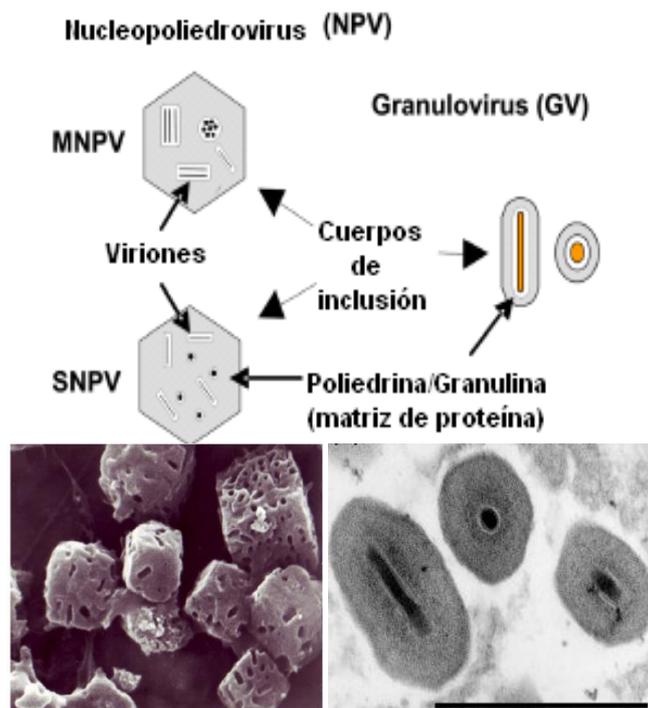


Figura 2. Estructura de los Nucleopoliedrovirus y Granulovirus Adaptado de Oers,2011.  
Fotos: Rohrmann, 2008

Debido a la proliferación reciente de secuencias de genomas de baculovirus se ha propuesto que los miembros de los Baculoviridae se dividen en cuatro grupos (Tabla 1) (Rohrmann, 2008). En esta nueva clasificación se observa una evidente distinción en cuanto al orden del insecto hospedero al que infectan (Figura 3). *Alphabaculovirus*, que comprende los nucleopoliedrovirus específicos para lepidopteros, *Betabaculovirus*, que comprende los

granulovirus específicos para lepidopteros, *Gammabaculovirus*, que comprende los nucleopoliedrovirus específicos para himenopteros fitófagos y *Deltabaculovirus*, que comprende los nucleopoliedrovirus específicos para dípteros (Jehle *et al.*2006).

Los NPVs de Lepidopteros se han clasificado en dos grupos I y II. La diferencia entre estos dos grupos es la naturaleza de la glicoproteína del virión, la cual interviene cuando se forma el virion brotado de la célula, así como en la fusión entre las membrana celular y viral para permitir la entrada de las nucleocápsides en el citoplasma (Oers, 2011).

Tabla 1. Géneros de los Baculoviridae (Rohrmann, 2008).

Género	Miembros
Alfabaculovirus	Lepidoptera NPVs
Betabaculovirus	Lepidoptera GVs
Gamabaculovirus	Hymenoptera NPVs
Deltabaculovirus	Diptera NPVs

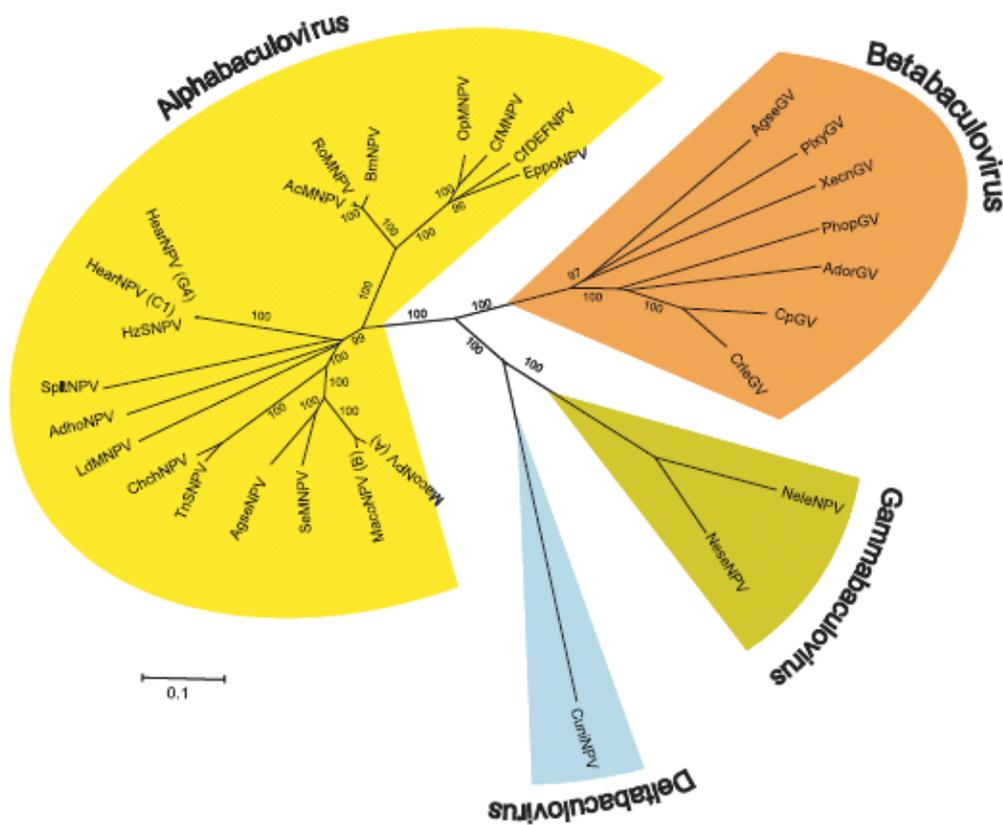


Figura 3. Clasificación de baculovirus de acuerdo al árbol filogenético (Jehle *et al.* 2006).

## 1.2. Ciclo de infección

El ciclo de infección del virus comienza cuando las larvas ingieren los cuerpos de inclusión al alimentarse (A), seguido por la liberación de los viriones por efecto del pH alcalino en el intestino del insecto. Éstos entran a las células epiteliales (B) donde se replican y pasan a la hemolinfa, medio utilizado para diseminarse por todos los tejidos del insecto (C). En las fases tardías de la infección, se forman cuerpos de inclusión que son liberados al ambiente (D) cuando la larva muere y se revienta (Figura 4) (Caballero *et al.* 2001).

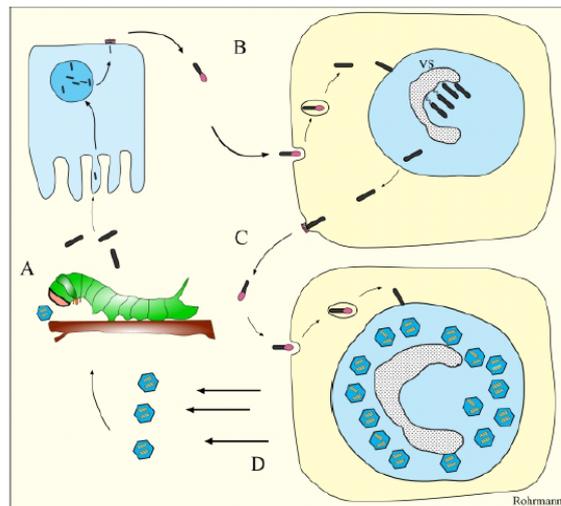


Figura 4. Esquema del ciclo de Infección (A) cuerpos de inclusión ingeridos por un insecto (B) Los viriones brotantes que inician una infección sistémica (C) Viriones brotantes que difunden la infección por todo el insecto (D) Liberación de cuerpos de inclusión cuando el insecto muere (Rohrmann, 2008).

### Infeción primaria

Además de 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 transovárica), el paso a través de los espiráculos y el parasitismo (Gutiérrez y López, 2004).

Ingeridos los cuerpos de inclusión y por acción del pH presente en los jugos intestinales del insecto hospedero (pH 9.5 – 11), se produce la hidrólisis de la proteína (1), 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 (2), 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 (Figura 5) (Winstaley y Reilly`O, 1999).

Posteriormente, los viriones entran a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio por fusión a la membrana citoplasmática (3), después las nucleocápsides penetran en el citoplasma de las células (4) 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 (Figura 5) (Winstaley y Reilly`O,1999).

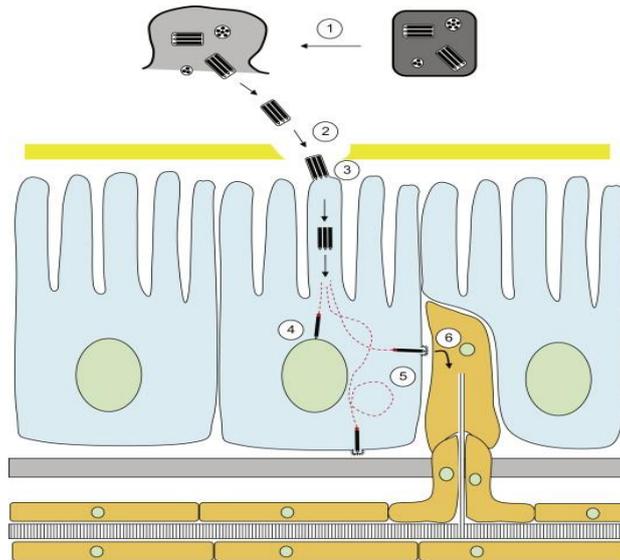


Figura 5. Esquema de la infección primaria del intestino medio y de la infección secundaria del sistema traqueal en el insecto por baculovirus (Harrison y Hoover, 2012).

De esta forma se da lugar a la liberación de nuevas nucleocápsides, las cuales atraviesan la membrana nuclear adquiriendo una envoltura y se alinean con la membrana plasmática en la base de la célula y emergen a través de ésta como viriones brotados (VB) (5) (Simón *et al.* 2004), los cuales atraviesan la lámina basal circulando a través de la hemolinfa (Clem, 2005). La expresión de un factor de crecimiento de fibroblastos viral conduce a la rotación de la membrana basal circundante de los traqueoblastos, que facilita su infección con viriones brotados de las células epiteliales del intestino medio (6). La infección se propaga a través de la tráquea y luego de las células epidérmicas a otros tejidos más allá del intestino medio (Harrison y Hoover, 2012).

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

## Infección secundaria

La diseminación de la enfermedad dentro del hospedero es causada por la progenie de virus brotante (VB) (Simón *et al.* 2004), 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 (Figura 6) (Gutiérrez y López, 2004).

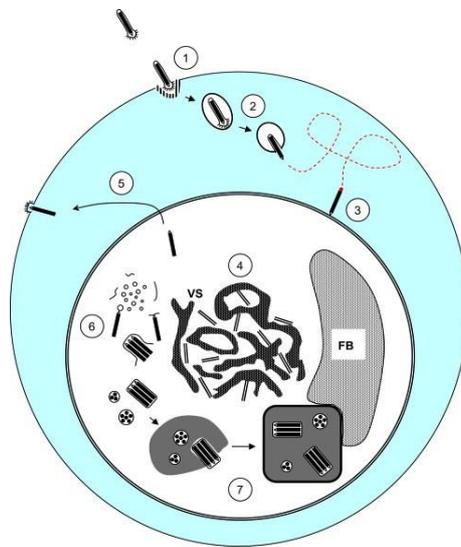


Figura 6. Modelo de infección secundaria y replicación viral (Harrison y Hoover, 2012).

Al unirse los viriones brotantes (VBs) a un receptor de la superficie celular (Figura 6), se internalizan a través de endocitosis (1). Los endosomas que contienen el VB se acidifican, provocando una fusión entre la membrana celular y la envoltura del VB (2), que libera la nucleocápside en el citoplasma. Las Nucleocápsides se mueven a través del citoplasma por la polimerización de actina y se translocan al núcleo (3). El ADN se libera en el núcleo y se inicia la expresión de los genes virales. Las ondas del núcleo y las formas virogénicas del estroma (VS), acompañan la replicación del ADN y el ensamblaje de la progenie de nucleocápsides (4). Inicialmente, las nucleocápsides al salir del núcleo se alinean a la membrana plasmática para convertirse en Viriones brotados (5). Posteriormente durante la infección, las nucleocápsides se envuelven dentro de la región peristromal del núcleo para formar los viriones derivados de cuerpos de inclusión (VCI) (6). La Poliedrina cristaliza alrededor de los Viriones para formar los cuerpos de inclusión (7). La superficie de los cuerpos de inclusión maduros se cubre con la envoltura, posiblemente con la participación de los cuerpos fibrilares (FB) y son liberados

por lisis celular quedando disponibles para iniciar un nuevo ciclo de infección (Figura 6) (Harrison y Hoover, 2012).

Los síntomas producidos por infección de baculovirus se manifiestan cuando la enfermedad está ya avanzada. Los síntomas más evidentes son la mayor flacidez de los cuerpos de las larvas (Figura 7A), retraso en el desarrollo, una mayor movilidad y, en el caso de lepidópteros, las larvas de éstos tienden a migrar a las partes altas de las plantas donde mueren colgadas (Figura 7B). Posteriormente a la muerte, los tejidos de la larva se desintegran y se libera gran cantidad de virus al medio, que serán ingeridos por otras larvas comenzando así de nuevo el ciclo de infección (Figura 7C) (Caballero *et al.* 2001).



Figura 7. Larvas infectadas(A) Autora (B) y (C) Williams, 2010

## 2. Efectos de los factores ambientales sobre los Baculovirus

En la dinámica de la infección por baculovirus influyen factores abióticos como la radiación solar, la lluvia, la temperatura, las propiedades fisicoquímicas del suelo, entre otros y como factores bióticos influyen las características de la planta huésped, la actividad de los microorganismos saprófagos, etc (Caballero *et al.* 2001).

### Temperatura

Las temperaturas extremadamente elevadas pueden inactivar los baculovirus antes de que estos alcancen el huésped (Fuxa, 1995 en: Caballero *et al.* 2001) o reducir la susceptibilidad del insecto a la infección probablemente por disminuir la actividad de la larva o por ocasionar una menor adsorción o penetración del virus en la célula (Benz, 1987 en: Caballero *et al.* 2001). Las temperaturas altas tienden a acelerar la muerte del insecto infectado y con ello la productividad del virus en el huésped es reducida, disminuyendo el inóculo disponible para la transmisión posterior (Entwistle y Evans, 1985 en: Caballero *et al.* 2001). Al aumentar la temperatura a 50°C ó 60°C puede presentarse la inactivación del virus (Young, 2000).

Los virus entomopatógenos son muy estables a temperaturas bajas y los baculovirus pueden mantener su viabilidad por muchos años, si los cuerpos 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). Los virus purificados pueden ser conservados en refrigeración (4°C) o congelación (-20°C) por más de 20 años (Shieh, 1989 en Caballero *et al.* 2001).

## **pH**

Los cuerpos de inclusión del virus se afectan en medios alcalinos con valores de pH mayores a 9 y en medios ácidos con valores de pH menores a 4 (Caballero *et al.* 2001). Los Baculovirus son estables a valores de pH cercanos a la neutralidad, ya que a este pH se inhibe la proteasa alcalina (presente en el insecto) asociada con el cultivo del insecto y capaz de atacar los cuerpos de inclusión (Burges, 1998). A valores de pH muy alcalinos, la inactivación de los virus puede ocurrir en minutos (Young, 2000).

## **Radiación solar**

La luz ultravioleta es una radiación que comprende longitudes de onda de 100 a 400 nm y se clasifica en tres tipos UVA (315 a 400 nm), UVB (280 a 315 nm) y UVC (100 a 280 nm). Cuando la luz solar atraviesa la atmósfera, el ozono, el vapor de agua, el oxígeno y el dióxido de carbono absorben toda la radiación UVC y aproximadamente el 90% de la radiación UVB. La atmósfera absorbe la radiación UVA en menor medida. En consecuencia, la radiación UV que alcanza la superficie terrestre se compone en su mayor parte de rayos UVA, con una pequeña parte de rayos UVB (OMS,2003).

La radiación solar ultravioleta es el factor que tiene mayor efecto destructivo sobre la actividad de los baculovirus (Caballero *et al.* 2009) y especialmente la radiación UVB (280 nm-310 nm) (Lasa *et al.* 2007). La radiación ultravioleta tipo B es absorbida provocando lesiones directas sobre muchas moléculas biológicas incluyendo macromoléculas como el ADN. Este daño se da por la formación de fotoproductos tales como dímeros de pirimidinas (aparición de enlaces covalentes entre bases pirimidínicas adyacentes: citosina-citosina o citosina-timina), hidratos de pirimidinas y entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas (Diffey 1991 en: Devotto y Gerding, 2003).

La radiación UVA (320-400 nm) puede ser crítica en la disminución de la actividad de los baculovirus. Causa daño indirecto en la molécula de ADN, debido principalmente a la formación de especies reactivas de oxígeno (peróxido de hidrógeno, singletes de oxígeno, radicales de hidroxilo), que oxidan la pentosa presente en el ADN y rompen la hebra de la molécula (Diffey 1991 en: Devotto y Gerding, 2003, Moscardi *et al.* 2011).

Todas las lesiones directas o indirectas interfieren en la replicación normal del ADN, si superan los mecanismos de reparación de la célula y producen mutaciones o la muerte celular, dependiendo de la cantidad de energía recibida (Cerdeira-Olmedo *et al.* 1996 en: Devotto y Gerding, 2003). La inactivación que la radiación ultravioleta causa en los baculovirus depende de la especie viral y se han descrito reducciones de la actividad del 50% en 14 horas de exposición a la radiación solar para el NPV de *Galleria mellonella* y de hasta el 98% en 4 minutos para el GV de *Plodia interpunctella* (Young, 2000).

## Humedad

Los envases que contienen los productos a base de baculovirus deben garantizar hermeticidad para mantener la humedad lo más baja posible, ya que de lo contrario se favorecerá el crecimiento de microorganismos, lo que puede causar oxidación de los componentes de la formulación y la formación de radicales libres que inactivan el virus (Jones y Burges, 1998) o que reducen su viabilidad (Jenkins y Grzywacz, 2003).

## 3. Baculovirus como bioinsecticidas

Todos los virus de esta familia se caracterizan por tener un estrecho espectro de hospedero y una elevada patogenicidad y virulencia que son las características ideales en un microorganismo entomopatógeno para que pueda ser desarrollado como bioinsecticida (Caballero *et al.* 2009). Éstos presentan cuerpos de inclusión (CI) que los protegen contra algunos factores ambientales y por afectar sólo a invertebrados, especialmente insectos, no representan riesgos para otros organismos incluyendo el hombre, siendo por lo tanto adecuados para ser utilizados como agentes de control microbiano (Moscardi, 1999). Es así como la Agencia Ambiental de los Estados Unidos, EPA, registra actualmente seis NPVs como ingredientes activos de bioinsecticidas (EPA, 2013), siendo importante destacar que ninguno de los virus registrados es el de *S. frugiperda*.

Actualmente en varios países se están utilizando virus de la poliedrosis para el control de diferentes plagas de importancia agrícola. Tal es el caso de Brasil en donde se emplea masivamente un virus de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) AgMNPV para el control de este insecto en cultivos de soya, tanto así que este virus ha sido aplicado en aproximadamente 1,5 millones de hectáreas. Este virus ha sido también usado en Argentina, Colombia, Bolivia, Paraguay y México (Moscardi 1999; Rohrmann 2008).

En Brasil se han seleccionado aislamientos nativos del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* (SfNPV), los cuales se han usado para controlar el insecto en cultivos de maíz y fueron aplicados en aproximadamente 20000 hectáreas.

Estos virus fueron también caracterizados molecularmente y se estandarizó un sistema de producción a escala; para realizar evaluaciones bajo condiciones de campo obteniendo mortalidades del insecto entre el 89% y 90% (Valicente y Costa, 1995; Moscardi, 1999).

En otro trabajo desarrollado en Brasil, durante la evaluación de aislamientos de NPV para el control tanto de *S. frugiperda* como de *S. exigua* Hübner, 1808 (familia: Noctuidae), se obtuvieron resultados altamente significativos en cuanto a la mortalidad de las dos especies del insecto con valores de control incluso superiores a los obtenidos con productos químicos (Guimarães *et al.* 2005). Actualmente, el NPV de *S. exigua*, bajo diferentes nombres comerciales, se usa para controlar esta especie en Estados Unidos, Europa, China y Tailandia (Moscardi *et al.* 2011). Los principales baculovirus que han sido utilizados como bioinsecticidas se presentan en la Tabla 2.

La efectividad y alto potencial de los baculovirus para el control de diferentes insectos plaga han sido demostrados en diferentes trabajos (Fihlo *et al.* 2001; Batista *et al.* 2001; Tamez *et al.* 2002; Guimarães *et al.* 2005; Martínez *et al.* 2005; Tamez *et al.* 2006, Behle *et al.* 2006, Lasa *et al.* 2007; Villamizar *et al.* 2010). Sin embargo, a pesar de que estos virus son una herramienta eficiente para el control de diferentes insectos plaga, su evaluación a nivel de condiciones de campo ha presentado resultados inconsistentes, posiblemente por el efecto dañino de condiciones ambientales como la temperatura y la radiación solar sobre las partículas virales (Caballero *et al.* 2001).

En Colombia, Corpoica cuenta con reconocida experiencia en control biológico y el uso de Baculovirus como bioinsecticida. En este sentido Corpoica tiene una colección de tres aislamientos nativos codificados como NPV003, NPV009 y NPV011, para el control del gusano cogollero del maíz (*S. frugiperda*), de los cuales se seleccionó el NPV003 proveniente del Departamento de Córdoba, por presentar la mayor virulencia y tolerancia a la radiación ultravioleta (Gómez *et al.* 2010).

La mayor limitante para el desarrollo comercial de los NPVs es la actividad residual, siendo menos de un día después de su aplicación en campo. Además así como otros agentes de control biológico, estos pueden ser inactivados por la radiación solar, por tal razón, las formulaciones que encapsulan el virus han sido usados para minimizar esta pérdida de actividad (Tamez *et al.* 2002).

Tabla 2. Principales Baculovirus comercializados como bioinsecticidas. Adaptado de Moscardi *et al.* 2011

<b>Insecto Hospedero</b>	<b>Baculovirus</b>	<b>Nombre del producto comercial</b>	<b>Cultivo donde se aplica</b>
<i>Adoxophyes honmai</i>	GV	-	Te
<i>Adoxophyes orana</i>	GV	Capex 2	Manzana
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	NPV	Baculovirus Nitral, Coopervirus, Baculovirus AEE	Soya
<i>Buzura suppressaria</i>	NPV	-	Te
<i>Cydia pomonella</i>	GV	Madex, Virosoft, Capex, Carpovirusine, Granupon, Virin Cyap, Cyd-X	Manzana, pera
<i>Helicoverpa zea</i>	NPV NPV NPV	Elcar, GemStar Gemstar Elcar, GemStar	Algodón, vegetales Algodón
<i>Homona magnanima</i>	GV	-	
<i>Lymantria dispar</i>	NPV	Gypcheck	Bosques forestales
<i>Neodiprion abietis</i>	NPV	Abietiv	Abeto Balsamo
<i>Neodiprion lecontei</i>	NPV	Lecontvirus	Pino
<i>Neodiprion sertifer</i>	NPV	Neocheck-S, Virox	Bosques forestales
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	NPV	TM Biocontrol	Abeto Douglas
<i>Phthorimaea operculella</i>	GV	PTM Baculovirus, Matapol, Baculovirus (Corpoica)	Papas en campo, semilla en almacenamiento
<i>Spodoptera exigua</i>	NPV	Spod-X, Ness-A, Ness-E	Hortalizas en campo y en invernadero

NPV: nucleopoliedrovirus; GV: granulovirus.

#### 4. Formulaciones de Baculovirus

La formulación de agentes microbianos es el paso clave en el desarrollo de bioplaguicidas comerciales, puesto que otorga al agente infeccioso protección frente al efecto negativo que algunas condiciones ambientales tales como la radiación ultravioleta, la humedad y la temperatura. Dicho efecto posiblemente ha sido la causa de diferentes resultados inconsistentes de control al utilizar agentes biológicos bajo condiciones de campo (Caballero *et al.* 2001).

Los ingredientes de una formulación de bioplaguicidas deben asegurar la estabilidad de éste durante su producción, uso y almacenamiento, así como proteger al principio activo de las condiciones ambientales desfavorables y promover su actividad como bioplaguicida. Las formulaciones incluyen (Hynes y Boyetchko, 2006):

- Principio activo responsable de la acción biocontroladora: microorganismos como el baculovirus.
- Excipientes: comprenden el vehículo que puede ser sólido o líquido y los coadyudantes que ayudan a mejorar o modificar la acción del principio activo, todos los excipientes deben ser inertes frente al microorganismo y frente a las plagas y deben mejorar la aplicación y dispersión del producto.

#### **4.1. Tipos de Formulación**

##### **Formulaciones líquidas**

- Suspensiones acuosas, concentrados emulsionables, emulsiones.

##### **Formulaciones sólidas**

- Polvos para espolvoreo, polvos para reconstituir o polvos mojables, gránulos, comprimidos (pellets) y cápsulas, gránulos dispersables en agua.
- Microcápsulas: Es una forma sólida en la que el ingrediente activo (núcleo) se encuentra encapsulado dentro de un material secundario (material de encapsulación) formando microcápsulas que pueden tener un tamaño entre 1,0-5000  $\mu\text{m}$  (Jafari *et al.* 2008). La microencapsulación de virus, bacterias y hongos usados como bioplaguicidas es muy útil ya que contempla la utilización materiales no tóxicos, resistentes a la lluvia y al rocío que pueden ser fácilmente dispersados en el aire, para luego ser consumidos por larvas de insectos, en los casos en los que necesitan ser ingeridos para causar infección (Winder *et al.* 2003).

#### **5. Técnica de Microencapsulación**

La encapsulación es un proceso mediante el cual, ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas o aceites esenciales, materiales biológicos, principios activos) son introducidas en una matriz o sistema pared con el objetivo de impedir su pérdida, protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en la formulación o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado

se puede liberar gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado obteniendo productos con mejores características sensoriales, de estabilidad y/o nutricionales (Gennaro, 2003).

Los procesos de encapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por The National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante, mediante un proceso de coacervación (Yañez *et al.* 2002).

Se utiliza también el término microencapsulación en la industria alimentaria o farmacéutica, cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades. Los dos términos, encapsulación y microencapsulación, se usan indistintamente (Poncelet, 2006). Los productos resultantes de este proceso tecnológico reciben el nombre de “micropartículas”, “microcápsulas” o “microesferas”, las cuales se diferencian en su forma y estructura interna; sin embargo todas presentan como característica común el poseer un tamaño de partícula inferior a 1 mm (Villamizar y Martínez, 2008).

Dos tipos de estructura de microcápsulas se pueden producir, una con un solo núcleo y otra con varios núcleos (Figura 8). El primer tipo de estructura se puede producir por métodos como la coacervación, extrusión e inclusión molecular, mientras el segundo tipo de estructura se produce principalmente por atomización (Jafari *et al.* 2008).

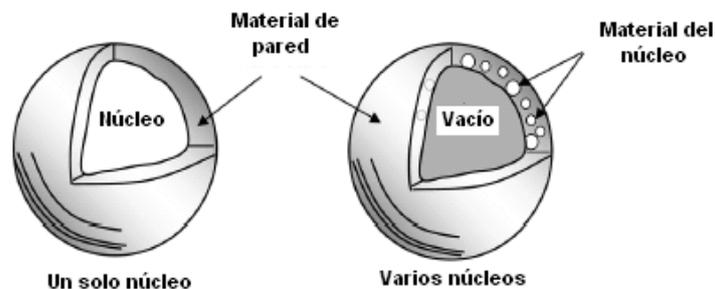


Figura 8. Tipos de estructura de microcápsulas (Jafari *et al.* 2008).

Un proceso de encapsulación puede ser dividido generalmente en tres pasos (Poncelet, 2006):

- El primer paso consiste en la incorporación del ingrediente activo dentro de la matriz o núcleo de la microcápsula. Éste puede estar en forma de solución, emulsión o suspensión, resultando en un sistema líquido o sólido disperso. Ésto podría envolver procesos de mezcla o dispersión, secado, molienda y/o tamizaje.
- El segundo paso es la operación mecánica. En este paso se pueden aplicar diversos métodos (físicos, fisicoquímicos y químicos), que hacen que el

revestimiento se deposite sobre la sustancia a encapsular o que se deposite el polímero líquido cubriendo el material (Gennaro, 2003).

- El último paso implica la estabilización y/o solidificación de las gotas o la solución de revestimiento por un proceso químico (polimerización), físicoquímico (gelación, coacervación) o físico (secado, solidificación).

Las microcápsulas han sido utilizadas en una amplia gama de campos como la eliminación controlada de sabores (Krishnan *et al.* 2005; Madene *et al.* 2006), la industria de los colores, aromas, perfumes, fármacos (Oliveira *et al.* 2005) y fertilizantes entre otras.

La microencapsulación también se ha usado para microorganismos, como *Lactobacillus lactis*, que fue encapsulado en alginato (Yañez *et al.* 2002) y *Lactobacillus reuteri* microencapsulado para el desarrollo de probióticos con actividad hidrolasa salina de bilis (BSH) (Martoni *et al.* 2008). Las técnicas comunes para la microencapsulación de células son la gelación iónica, la precipitación interfacial, la atomización y la coacervación, pero actualmente se están evaluando otros métodos con el uso de atomizadores ultrasónicos (Yeo y Kinam, 2004).

En Corpoica, la microencapsulación ha sido evaluada para la formulación de *Baculovirus*, es así como en el trabajo de Villamizar y Martínez (2008), se determinó la condiciones de microencapsulación de un SfNPV mediante coacervación con el copolímero del ácido metacrílico Eudragit® S100.

En el 2010 en Corpoica se microencapsuló el aislamiento NPV001 de *S. frugiperda* por el método de evaporación de solventes utilizando como polímero de recubrimiento Eudragit® S100. Las micropartículas obtenidas presentaron un tamaño promedio de  $198 \pm 62 \mu\text{m}$ , una eficiencia de encapsulación del 53,43% y el virus microencapsulado presentó una inactivación frente a la radiación ultravioleta del 18%, mientras que el virus sin microencapsular presentó una inactivación del 52%. En este trabajo se demostró que el recubrimiento de las partículas virales con el polímero evaluado, protegió eficientemente al virus del efecto nocivo de la luz ultravioleta (Villamizar *et al.* 2010).

### **5.1. Métodos de microencapsulación**

Diversos métodos han sido propuestos para la producción de microcápsulas. En general, estos métodos pueden ser divididos en tres grupos (Yañez *et al.* 2002):

- Procesos físicos: microencapsulación por atomización, extrusión y recubrimiento por aspersión.
- Procesos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas.
- Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.

La selección del proceso de encapsulación para una determinada aplicación depende del tamaño medio de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante, la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo del proceso (Yañez *et al.* 2002).

En la Tabla 3 se presentan algunos microorganismos microencapsulados por los métodos de atomización, coacervación, gelación, extrusión, evaporación de solventes, proceso de soluciones saturadas de gas (PGSS)- fluido supercrítico utilizando diferentes materiales de encapsulación como gelatina, agar, leche descremada, lignina, quitosano, dextrina, alginato, Eudragit y polivinilpirrolidona.

## **5.2. Atomización (*Spray drying*)**

El proceso de atomización se ha utilizado en diferentes aplicaciones farmacéuticas. Es utilizada en manufactura de excipientes, ingeniería de partículas pulmonares y medicamentos, en el secado de principios activos y en procesos de encapsulación. La atomización de formulaciones incluye generalmente polímeros que son usados para incrementar la estabilidad y la solubilidad efectiva de los fármacos. En la práctica común el proceso de atomización es desarrollado de manera empírica y experimental (Dobry *et al.* 2009).

Este proceso se realiza en un equipo denominado lecho fluido y presenta ventajas tales como ser rápido y en un solo paso, aplicable a materiales sensibles al calor y fácil de escalar industrialmente (Beck *et al.* 2004; Yu *et al.* 2007; Liu y Liu, 2009). Además es posible controlar el tamaño de las partículas y su morfología por variación de los parámetros del proceso y de la formulación (Bürki *et al.* 2011). Permite controlar la liberación de los constituyentes funcionales de una formulación y brinda protección frente a condiciones ambientales (Winder *et al.* 2003; Fini *et al.* 2008; Ronsse *et al.* 2009).

El proceso consiste en una atomización de la solución, la cual consiste de principios activos y de un polímero disuelto en un solvente común, el cual pasa a un atomizador dentro de una cámara concurrente con aire de secado caliente. La solución se atomiza en gotas usando una boquilla para atomizar. Cuando las gotas de la solución entran en contacto con el aire caliente, el solvente se evapora, dejando partículas secas en la cámara de secado junto

con el aire de secado. Estas partículas son colectadas y después separadas del aire usualmente por un separador (ciclón) (Dobry *et al.*2009).

Tabla 3. Microorganismos microencapsulados por varios métodos

Microorganismo	Material de encapsulación	Método de encapsulación	Objetivo de la encapsulación	Referencia
Rhizobacterias <i>Pseudomonas fluorescens</i> - <i>Pseudomonas putida</i>	Eudragit® RS30D	Atomización ( <i>spray-drying</i> )	Biofertilizante	Charpentier <i>et al.</i> 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	Alginato de sodio	Coacervación	Formular bioplaguicida	Bregni <i>et al.</i> 2000
<i>Aspergillus flavus</i>	Alginato de sodio	Gelación	Protección rayos UV	Daygle y Cotty, 1997
NPV <i>Anagrapha falcifera</i>	Harina de maíz, lignina y sucrosa	Atomización ( <i>spray-drying</i> )	Formular bioplaguicidas	Tamez <i>et al.</i> 2002
<i>Fusarium avenaceum</i>	Alginato de sodio	Gelación	Formular Bioplaguicidas	Winder <i>et al.</i> 2003
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Gelatina y agar	Microencapsulación	Protección rayos UV	Winder <i>et al.</i> 2003
NPV <i>Anagrapha falcifera</i>	Lignina sódica (PC-1307), lignina potásica, harina de maíz pregelatinizada, dióxido de titanio, azúcar y cloruro de calcio	Atomización ( <i>spray-drying</i> )	Formular bioplaguicidas	Behle <i>et al.</i> 2003
<i>Beauveria brongniartii</i>	Leche descremada (SM), Kollidon y polivinilpirrolidona (PVP K90)	Atomización ( <i>spray-drying</i> )	Protección rayos UV	Horaczek y Viernstein, H. 2004
NPV <i>Anagrapha falcifera</i>	Lignina sódica (PC-1307), harina de maíz pregelatinizada, óxido de titanio y cloruro de calcio	Atomización ( <i>spray-drying</i> )	Protección rayos UV	Behle <i>et al.</i> 2006
<i>Granulovirus Cydia pomonella</i>	Lignina. Dióxido de titanio y azúcar	Atomización ( <i>spray-drying</i> )	Formular bioplaguicida	Arthurs <i>et al.</i> 2006
<i>Beauveria bassiana</i>	Hidroxiopropil metil celulosa [HPMC], quitosano, dextrina, leche descremada (SM) y polivinilpirrolidona (PVP K90)	Atomización ( <i>spray-drying</i> )	Protección rayos UV	Liu y Liu, 2009
NPV001 <i>Spodoptera frugiperda</i>	Eudragit® S100	Método de evaporación de solventes	Protección rayos UV	Villamizar <i>et al.</i> 2010
GV <i>Cydia pomonella</i>	Aceite de palma (grasa), lecitina (surfactante), óxido de titanio (Aeroxide TiO2 T805) y derivado de benzofenona (Eusolex 4360)	Proceso de soluciones saturadas de gas (PGSS) fluido supercrítico	Formular bioplaguicida	Pemsel <i>et al.</i> 2010
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Alginato, quitosano y carboximetilquitosano	Método de extrusión	Protección de condiciones adversas del tracto G.I.	Li <i>et al.</i> 2011
<i>Trichoderma harzianum</i>	Sucrosa, glicerol	Atomización ( <i>spray-drying</i> )	Prolongar Viabilidad	Jin y Custis, 2011
NPV <i>Spodoptera frugiperda</i>	Lignina sódica (PC-1307) y cloruro de calcio	Atomización ( <i>spray-drying</i> )	Protección rayos UV	Behle y Pohman, 2012
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato de calcio y almidón de maíz	Extrusión	Protección de condiciones adversas del tracto G.I.	Mirzaei <i>et al.</i> 2012
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Ácido poliláctico glicólico (PLGA)	Tecnología supercrítica para extracción de emulsiones (SEE)	Protección de condiciones adversas del tracto G.I.	Della Porta <i>et al.</i> 2012

UV: ultravioleta  
G.I: gastrointestinal

Diferentes tipos de boquillas pueden ser utilizadas como las de doble fluido, las de fluido ultrasónico, rotatorio y boquillas hidráulicas. Las boquillas hidráulicas son a menudo preferidas debido a su simplicidad, escalabilidad y facilidad de lograr pequeños tamaños de gota (Dobry *et al.*2009). Dependiendo del diseño de las boquillas de atomización diferentes procedimientos de atomización son posibles. El más común es la atomización de dos fluidos, la atomización de presión y la atomización electrostática o ultrasónica.

El tamaño de gota y el subsecuente tamaño de partícula son dependientes de la boquilla utilizada, la tensión superficial y la viscosidad de la suspensión o solución que alimenta el sistema, su velocidad de flujo y la relación flujo de masa del aire/líquido. Es así como un incremento en la velocidad de flujo de la solución que alimenta el sistema a una constante velocidad de flujo de aire de atomización produce gotas grandes y por lo tanto partículas grandes (Wiggenhorn, 2007). Las características de las micropartículas atomizadas presentan una correlación con parámetros fisicoquímicos como la solubilidad, tensión superficial e interfacial y la presión de vapor del solvente (Gander *et al.*1996).

Cuando se procesan materiales lábiles al calor, el atomizado podría ser operado de manera tal que la atomización y el paso de aire seco hacia la cámara de secado sean en la misma dirección. Así, las gotas permanecerán a bajas temperaturas con una alta velocidad de evaporación de la humedad (Wiggenhorn, 2007).

La microencapsulación por atomización generalmente involucra tres componentes el polímero, el principio activo a microencapsular y el solvente (o mezcla de solventes). Las características del producto tales como la eficiencia de encapsulación del principio activo, su liberación y el solvente residual dependen de las interacciones moleculares entre los componentes. Estas interacciones pueden ilustrarse gráficamente por medio de un modelo esquemático triangular, como se puede ver en la Figura 9.

La energía de interacción  $\Delta_{int}E_1$  entre el solvente A y el polímero B, donde el polímero es disuelto puede ser expresada por la ecuación propuesta por Ho (1994) en Gander *et al.* (1996):

$$\Delta_{int}E = -2^A V^A \delta_d^B \delta_d - 2^A V^A \delta p^B \delta p - ({}^A E^B E + {}^A C^B C)$$

Donde  ${}^A V$  es el volumen molar del solvente en  $\text{cm}^3/\text{mol}$ ,  $\delta_d$  y  $\delta p$ , son los parámetros de solubilidad parcial de Hansen en  $\text{MPa}^{1/2}$  para fuerzas dispersas y polares respectivamente.  $E$  y  $C$ , son los parámetros de Diago dados en  $\text{kJ}^{1/2}/\text{mol}^{1/2}$  para contribuciones electrostáticas y covalentes, respectivamente.

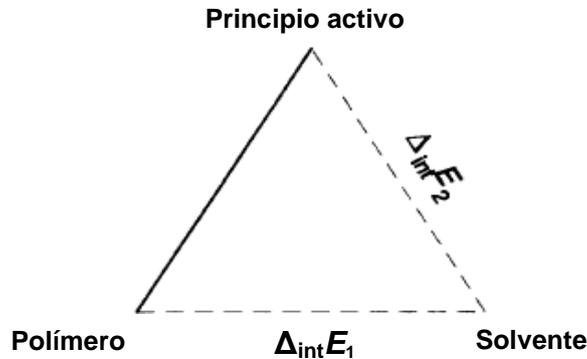


Figura 9. Modelo esquemático de interacciones que ocurren en un proceso de microencapsulación por atomización. Un buen proceso ocurre si la interacción principio activo-polímero (línea continua) prima sobre la interacción polímero-solvente y principio activo-solvente (líneas no continuas) (Gander *et al.*1996).

En el caso de una mezcla insuficiente entre dos componentes como ocurre entre el agua y polímeros insolubles en agua ó entre agua y solventes orgánicos, los cuales son parcialmente miscibles en agua, un tipo de interacción como la adsorción puede ser considerada y la correspondiente energía de interacción  $\Delta_{int}E_2$  es calculada por:

$$\Delta_{int}E = -{}^A V^A \delta_d^B \delta_d - {}^A V^A \delta_p^B \delta_p - ({}^A E^B E + {}^A C^B C)$$

Si la suma de las energías de interacción  $\Delta_{int}E_1$  y  $\Delta_{int}E_2$  es baja la eficiencia de la encapsulación podría ser alta. Cuando se trabaja con una mezcla de solventes para disolver el polímero, la interacción de las energías no puede ser calculada con las anteriores ecuaciones. En estos casos se utiliza el parámetro de solubilidad de Hildebrand para la mezcla,  $\delta_{mix}$  de acuerdo a:

$$\delta_{mix} = \phi_A \delta_A + \phi_B \delta_B$$

Donde  $\phi_A$  y  $\phi_B$  son las fracciones molares de los componentes A y B, respectivamente y  $\delta_A$  y  $\delta_B$ , son los correspondientes parámetros de solubilidad de Hildebrand (Gander *et al.*1996). Durante la atomización, la formación de partículas y el secado son logrados en un solo paso continuo. La fuerza del secado la da la diferencia de la presión de vapor entre el aire de secado y la superficie de la gota. El proceso consta de una **atomización** del líquido de alimentación, seguido por la **evaporación** de la humedad por parte del aire atomizado y finalmente, la separación de las partículas secas del aire (Figura 10) (Wiggenhorn, 2007).

En esencia, el recubrimiento por lecho fluido es un proceso complejo de transferencia de calor y masa que involucra diversos microprocesos, tales como la producción de gotas, la evaporación del solvente, la transferencia de calor y la dispersión de las gotas. Sin embargo, es muy poco lo conocido sobre las interacciones entre estos microprocesos y como ellos se relacionan con el rendimiento del proceso, la uniformidad del recubrimiento y la ocurrencia de efectos sobre la superficie (Ronsse *et al.* 2009).

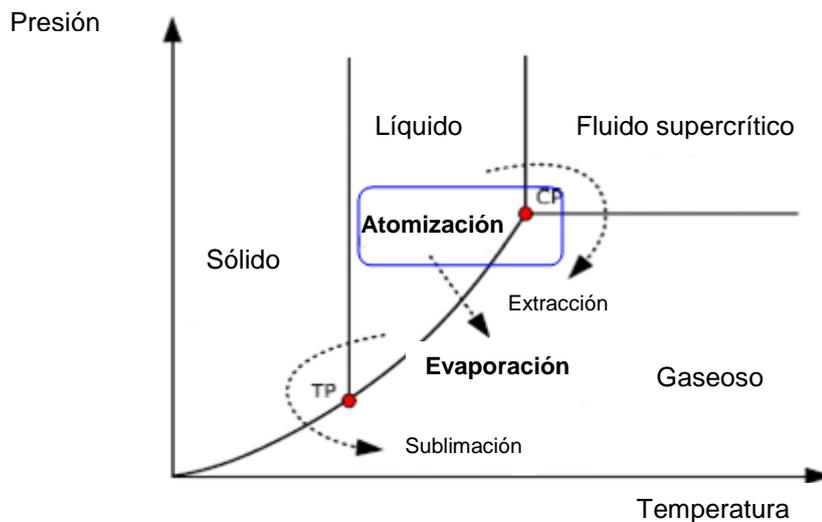


Figura 10. Diagrama presión- temperatura TP: punto triple, CP: punto crítico (Wiggenhorn, 2007).

### 5.2.1. Clases de atomización

La atomización puede ser superior o inferior (Figura 11) y el uso de cada una de éstas depende de diferentes criterios como el proceso de granulación o encapsulación a realizar, las propiedades físicas de las materias primas a utilizar, los requerimientos del producto final, la productividad, el nivel de encapsulación o recubrimiento requerido y la capacidad requerida. La atomización superior es utilizada en granulación y atomización. La atomización inferior es utilizada en procesos de granulación, encapsulación con liberación controlada y atomización (Srivastava y Mishra, 2010).

Para la atomización superior o top spray el polímero de recubrimiento usualmente está en solución acuosa y es rociado continuamente en forma descendente sobre la superficie del lecho fluidizado, como se observa en la Figura 11A. Cada partícula recibe una pequeña cantidad de material de recubrimiento y pasa hacia la región de rociamiento, en la cual coexisten las partículas fluidizadas y las gotas rociadas. Movimientos repetidos de y hacia la región de rociamiento producen una construcción gradual de una capa de

recubrimiento relativamente uniforme circundante a cada partícula (Ronsse *et al.* 2008; Ronsse *et al.* 2009).

En la atomización inferior o bottom spray la solución polimérica es rociada en un movimiento ascendente desde una boquilla localizada sobre el plato distribuidor en el fondo del inserto y hacia la tolva (Figura 11B). Las partículas secas caen por fuera del tubo divisorio luego fluyen en forma ascendente dentro de éste. La circulación de las partículas se repite hasta que la cantidad de recubrimiento deseado es depositado en la superficie de las partículas sólidas. Este proceso involucra la relación estrecha de la humedad y del secado con el movimiento de las partículas (Mafadi *et al.* 2003; Fitzpatrick *et al.* 2003).

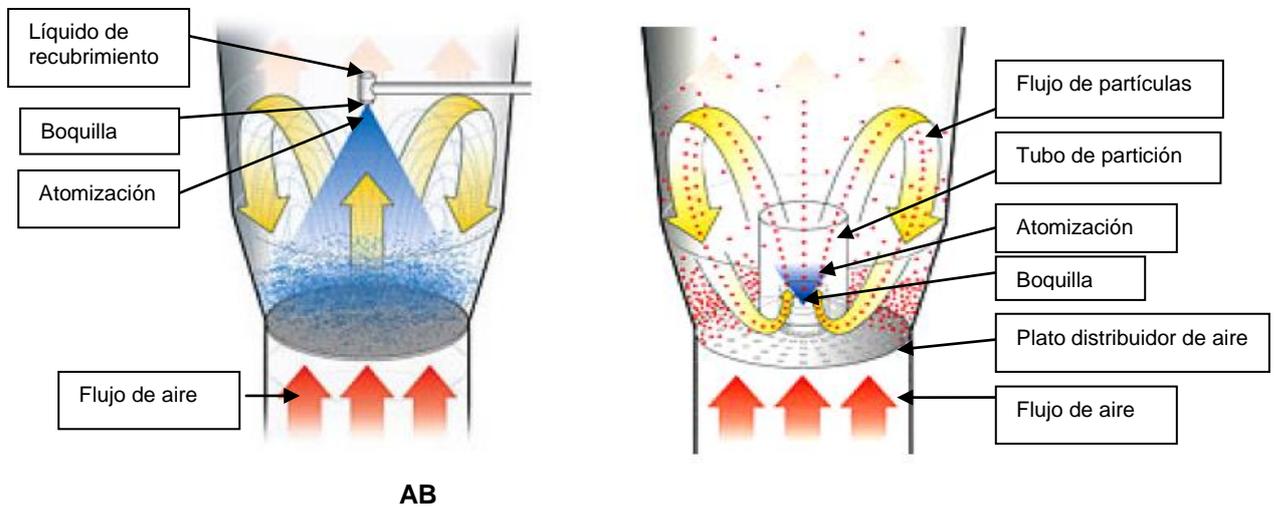


Figura 11. Sistema de atomización (A) Superior o top Spray; (B) Inferior o bottom spray ([http://www.glatt.com/e/01\\_tecnologien/01\\_04\\_09.htm](http://www.glatt.com/e/01_tecnologien/01_04_09.htm))

### 5.2.2. Parámetros del proceso de atomización

Los parámetros del proceso como la velocidad y la temperatura del aire de entrada, la velocidad del líquido atomizado, el tamaño de la boquilla, la presión y la temperatura de la cámara entre otros, afectan el rendimiento del proceso y la morfología de las partículas (Cheow *et al.* 2010). En algunos estudios sobre la producción de partículas por atomización se identificó la temperatura de secado y la velocidad de flujo, como los dos parámetros que determinan la morfología de las partículas producidas por atomización (Tajber *et al.* 2009; Kho y Hadinoto 2010a,b).

El control del volumen macroscópico del proceso de atomización, como se ve en la Figura 12, lo da la cámara de atomización, la cual define el espacio

termodinámico para el monitoreo de los parámetros del proceso de atomización. Cálculos del balance de masa y energía pueden ser realizados usando los parámetros de entrada y salida de la cámara de atomización (Dobry *et al.* 2009), lo que permite definir y caracterizar la operación del proceso de atomización. Los parámetros del proceso y las condiciones de salida son: (Figura 12):

- Velocidad de flujo de la solución de alimentación ( $M_{soln}$ )
- Velocidad de flujo del aire de secado ( $M_{gas}$ )
- Temperatura de entrada ( $T_{in}$ )
- Temperatura de salida ( $T_{out}$ )
- Saturación relativa (o humedad) del solvente a las condiciones de salida de atomización ( $\%RS_{out}$ ).

A continuación se presentan ecuaciones simplificadas para la conservación de masa y energía relacionando todos los parámetros del proceso termodinámico.

La temperatura de salida ( $T_{out}$ ), se puede determinar como:

$$T_{out} = T_{in} - \frac{M_{soln} \times (1 - \phi_{sólidos}) \times \Delta H_{vap}}{M_{gas} \times c_p}$$

$$Y: T_{out} = f(M_{soln}, M_{gas}, T_{in}).$$

Donde:  $\Delta H_{vap}$  es el calor de vaporización,  $\phi_{sólidos}$  es la fracción de sólidos en la solución y  $c_p$  es la capacidad calorífica del gas de secado.

La saturación relativa (o humedad) del solvente a las condiciones de salida de atomización ( $\%RS_{out}$ ) se puede determinar como:

$$\%RS_{out} = 100 \times (P_{cámara} / P^*_{T_{out}}) \times \frac{M_{soln} (1 - \phi_{sólidos}) / MW_{solvente}}{[M_{soln} (1 - \phi_{sólidos}) / MW_{solvente} + M_{gas} / MW_{gas}]}$$

Donde:  $MW$  solvente y  $MW$  gas son los pesos moleculares del solvente y del gas, respectivamente,  $P_{cámara}$  es la presión absoluta en la cámara de atomización y  $P^*_{T_{out}}$  es la presión del solvente atomizado evaluado a la temperatura de salida.

Las ecuaciones pueden ser utilizadas para determinar las condiciones de salida del proceso de atomización como una función de  $\phi_{sólidos}$  y  $M_{soln}$ ,  $M_{gas}$  y  $T_{in}$  (Dobry *et al.* 2009).

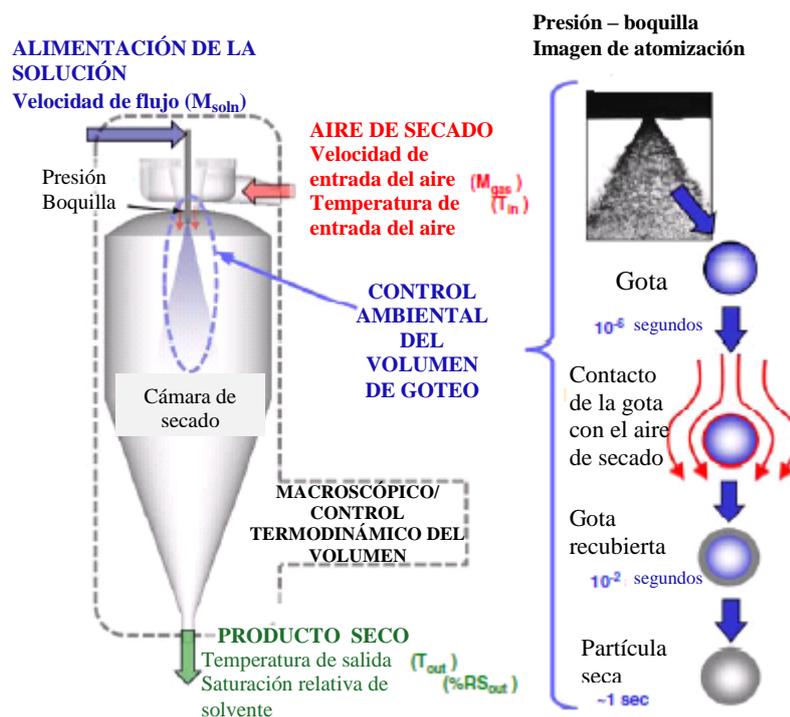


Figura 12. Parámetros del proceso de atomización (Dobry *et al.* 2009).

El control del volumen del goteo comprende la formación de gotas individuales, la interacción de la gota con el aire de secado que inmediatamente rodea la gota, y la evaporación del solvente para formar partículas secas. La cinética del secado de las gotas está definida en el volumen controlado de la gota. Varios eventos ocurren dentro de este volumen controlado. Primero en la escala de microsegundos, las gotas son formadas vía proceso de atomización. Segundo, en la escala de milisegundos, las gotas durante el proceso de atomización entran en contacto con el aire de secado caliente y empieza la evaporación del solvente (Figura 12).

La evaporación del solvente ocurre rápidamente, incrementando la concentración de sólidos en la superficie de la gota y formando una capa de polímero. La capa de polímero resiste la evaporación del solvente porque el solvente se difunde hacia la capa viscosa. Este proceso de secado de las gotas sucede rápidamente aproximadamente 1 segundo (Dobry *et al.* 2009).

## 6. Materiales de encapsulación

La variedad de materiales que pueden emplearse en microencapsulación se va ampliando gradualmente en la medida en que surgen nuevos biomateriales y se perfilan nuevas aplicaciones de la microencapsulación. Dentro de estos materiales se incluyen aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas (Vaydya *et al.* 2006), polímeros, celulosas, almidones y gomas (Madene *et al.* 2006).

Los materiales de encapsulación comúnmente utilizados en la microencapsulación de microorganismos se encuentran en la Tabla 4.

### **6.1. Lípidos**

Dentro de estos se incluyen moléculas y sustancias de gran diversidad y variedad estructural como aceites, grasas, ceras y fosfolípidos. Se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza, como los ácidos grasos, alcoholes grasos, glicéridos, cera carnauba, cera de abejas y fosfolípidos (Wandrey *et al.* 2010). Los materiales utilizados para microencapsulación son la cera carnauba, el alcohol estearílico, el ácido esteárico, los gelucires®, las parafinas, la cera de abejas y el estearato de glicerilo (Manzano y Morales, 2000).

### **6.2. Proteínas**

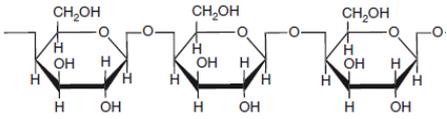
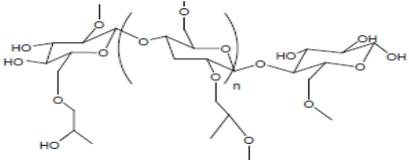
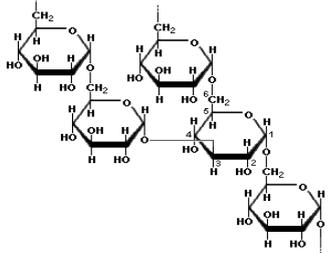
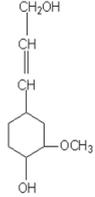
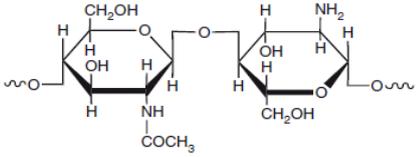
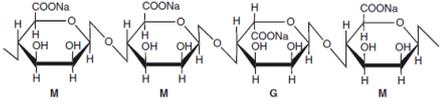
Proteínas animales tales como gelatina, colágeno, caseína o albumina son comúnmente empleadas como componentes de las paredes en procesos de microencapsulación por coacervación, procesos de recubrimiento en líquido y procesos de atomización. Las proteínas derivadas de plantas tales como la gliadina tienen ventajas económicas y en la salud en el caso de productos farmacéuticos (biodegradabilidad, biocompatibilidad, abundancia, economía) contrario a las proteínas animales que pueden presentar algunos riesgos como la gelatina (Mauguet *et al.* 2007).

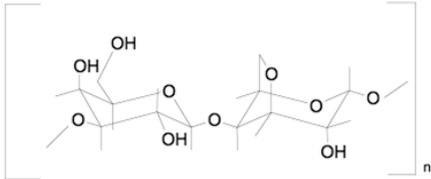
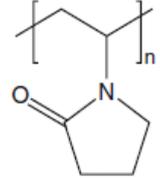
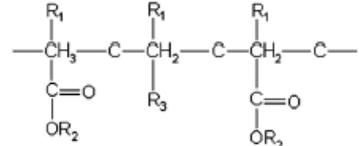
### **6.3. Polímeros**

Debido a su gran versatilidad, ésta es la familia de materiales más utilizada en microencapsulación. Dentro de esta gran familia podemos distinguir entre polímeros naturales, semisintéticos y sintéticos. Los polímeros naturales son principalmente de naturaleza polisacáridica (polímeros de carbohidratos), de origen animal, vegetal, marino y microbiano (Wandrey *et al.* 2010). Dentro de estos se destacan el almidón y sus derivados, la pectina, la amilopectina, las maltodextrinas, los jarabes, la celulosa y sus derivados, el alginato (Li *et al.* 2011), el dextrano (Wandrey *et al.* 2010), la goma tragacanto, la goma guar, el galactomano, la goma arábiga (goma acacia) (Vaydya *et al.* 2006; Fernandes *et al.* 2008) y el quitosano (Manzano y Morales, 2000; Oliviera *et al.* 2005; Liu y Liu, 2009). Otros polímeros de origen microbiano y animal son el xantano y el gelano (Wandrey *et al.* 2010).

Otro polímero abundante que se encuentra en todas las plantas vasculares, es la lignina, que provee protección a formulaciones de bioplaguicidas sensibles al proceso degradativo por la radiación solar (Tamez *et al.* 2002).

Tabla 4. Materiales de encapsulación (Mano *et al.* 2007 en: Shukla y Tiwari, 2012; Vila 2006; Wang y Zhang, 2012)

Material de encapsulación	Fuente	Estructura química
Almidón	Plantas de maíz, arroz, papa, etc.	
Celulosa	Plantas (algodón) ó microorganismos ( <i>Acetobacter xylinum</i> )	
Arabino galactano	Plantas	
Dextrano	Microorganismos ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> )	
Lignina	Plantas vasculares	
Quitosano	Animales: cangrejo, camarón	
Alginato (ácido algínico)	- Algas marrones: <i>Laminaria hyperborea</i> , con alto contenido de ácido galurónico (G) y <i>Macrocystis pyrifera</i> , con alto contenido de ácido manurónico (M) - Microorganismos: ( <i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> )	

Agar	Algas rojas ( <i>Gelidium spp.</i> y <i>Dracilaria spp.</i> )	
Polivinilpirrolidona (PVP)	Polimerización de la N-vinilpirrolidona	
Eudragit	Polímero del ácido metacrílico	 <p> R1 = CH3, H  R2 = CH3, CH3CH2  R3 = COOH (Eudragit® L and S)  R3 = COOCH2CH2N(CH3)3Cl. (Eudragit® RL and RS) </p>

Los polímeros semisintéticos incluyen los derivados celulósicos, como la metilcelulosa (MC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), etilmetilcelulosa (EMC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa sódica (CMC) (Wandrey *et al.* 2010), de los cuales existe una amplia variedad en el mercado con diferentes características de solubilidad. Se destacan la etilcelulosa y el acetobutirato de celulosa, que son polímeros insolubles, mientras que el acetofalato de celulosa (CAP) presenta una solubilidad dependiente del pH (Shukla y Tiwari, 2012).

Los polímeros sintéticos más destacables son los derivados acrílicos, los poliésteres, como el hidroximetilmetiacrilato-metilmetacrilato (HEMA-MMA), y el ácido poliacrílico (Chia *et al.* 2002), así como los polímeros sintéticos del ácido metacrílico (Charpentier *et al.* 1999), como el Eudragit® S100 (Raffin *et al.* 2008; Villamizar *et al.* 2010; Nikam *et al.* 2011; Mustafin, 2011). Dentro de estos derivados acrílicos existen polímeros insolubles con diferente grado de permeabilidad y también variedades con solubilidad dependiente del pH (Manzano y Morales, 2000).

Los polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (PLA), han sido extensivamente usados en sistemas de liberación de medicamentos. La emulsificación y las técnicas de evaporación de solventes orgánicos son a menudo utilizadas para preparar las microcápsulas de PLA (Mauguet *et al.* 2007).

## 7. Eudragit®

Hasta la década de 1950, toda la medicación oral, tenía una gran desventaja: no era posible controlar el tiempo o el lugar de liberación de las sustancias activas. El objetivo de la liberación controlada de fármacos es lograr terapias más eficaces evitando la falta del fármaco ó una sobredosis. Otras ventajas son el mantenimiento de la concentración del fármaco en un intervalo deseado, las menores administraciones, el uso óptimo de fármacos y el aumento de la conformidad del paciente (Nikam *et al.* 2011).

El desarrollo de los Eudragit por Röhm & Haas GmbH de Darmstadt fue la solución a este problema, comercializados por primera vez en la década de 1950. Los polímeros Eudragit® son copolímeros catiónicos y aniónicos sintéticos derivados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico (Kilicarslan y Baykara, 2003), preparados por la polimerización de éstos o sus ésteres, como por ejemplo, el butil éster o el éster dimetilaminoetilo, cuyas propiedades físico-químicas están determinadas por los grupos funcionales -R (Evonik, 2011).

Los polímeros Eudragit son inertes, tienen diferentes grados de solubilidad, están disponibles en diferentes presentaciones y son de bajo costo frente a otros polímeros como el PGLA, para microencapsulación (Año *et al.* 2011). Los polímeros Eudragit® están disponibles en dispersiones acuosas, soluciones orgánicas, gránulos y polvos y se pueden clasificar en:

1. Poli(met)acrilatos insolubles, pero permeables en fluidos digestivos. Los polímeros Eudragit® RL y RS con grupos alcalinos y los polímeros Eudragit® NE con grupos neutros permiten la liberación en tiempo controlado del principio activo por hinchamiento en forma independiente del pH. La permeabilidad de su membrana es regulada por la introducción en el copolímero de una cantidad insignificante de grupos funcionales que son ionizados a un amplio rango de pH. Los Eudragit® policatiónicos RS y RL contienen 5% y 10 %, respectivamente de grupos cuaternarios. Esta clase comprende otros dos tipos de Eudragit® N-neutrales, que en general no contienen grupos capaces de ionizarse porque las unidades del ácido metacrílico (AMA) están totalmente esterificadas (NE y NM). Estos se han diseñado para usarlos principalmente en sistemas de liberación sostenida lenta por su alto peso molecular (Mustafin, 2011).

2. Poli(met)acrilatos solubles en fluidos digestivos por la formación de sales. Los polímeros Eudragit® L, S, FSy E con grupos ácidos o alcalinos permiten la liberación del principio activo en forma dependiente del pH (Evonik, 2011). Incluyen copolímeros con unidades monoméricas ionogénicas en su estructura que hace que los polímeros sean solubles en secciones del tracto gastrointestinal, como los policationes (Eudragit® E) que son solubles en el

estómago y son estables en medio ácido ó los polianiones solubles en el intestino (Eudragit® L, S, FS) (Mustafin, 2011).

Los copolímeros de Eudragit también se pueden clasificar de acuerdo a su estructura química. Están los pH dependiente (sensibles al pH) y los pH independientes. Los copolímeros de Eudragit manufacturados con variedad de grados ionogénicos cubren la totalidad de solubilidad a lo largo del tracto gastrointestinal desde el estómago (pH 1,0-1,2), la primera parte del intestino con el duodeno (pH mayor de 5,5), la pequeña parte del intestino hacia el colon (pH 6,0-7,0), colon (pH 7,0) y las secciones del iliaco (pH 7,5). Lo que permite la liberación controlada de los fármacos en todas las posiciones del intestino (Khandare y Haag, 2010; Mustafin 2011).

### 7.1. Eudragit® S100

Este Eudragit se registró en el año de 1954. Es un copolimero aniónico con grupos funcionales de ácido metacrílico (AMA), tiene cerca del 30% de unidades del ácido metacrílico, lo que hace que sea soluble a un pH mayor de 7.0 (Chan *et al.* 2001). Se presenta en polvo. Su peso molecular promedio es 135.000 g/mol. Su nombre químico según la IUPAC es Poliácido metacrílico-cometilmetacrilato y presenta una relación de grupos carboxilo: grupos ester 1:2 (Figura 13). Se utiliza como material de recubrimiento para fármacos que se liberan en el colon porque este se disuelve a pHs mayores a 7,0 (Chan *et al.* 2001; Mustafin, 2011; Skalsky y Stegemann, 2011; Khann *et al.* 1999 en: Yin *et al.* 2013), por lo tanto provee protección gástrica facilitando la liberación del fármaco en el intestino (Kibbe 2000 en: Cruz *et al.* 2009).

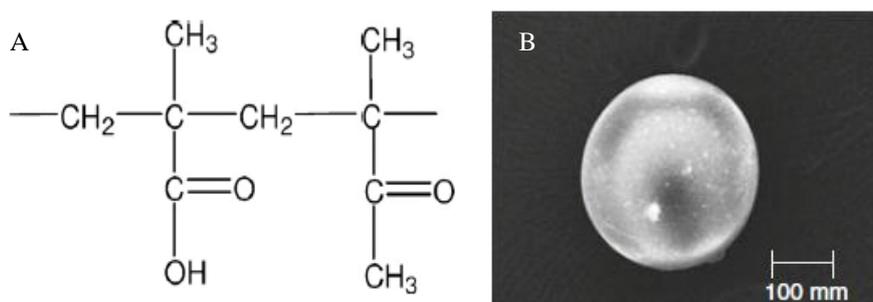


Figura 13. (A) Estructura química del Eudragit®S100 (Evonik, 2011) (B) fotografía de microscopía electrónica de una microesfera recubierta con Eudragit® S100 (Khandare y Haag, 2010)

### 7.2. Propiedades de los Eudragit

Estos polímeros permiten que el fármaco en su forma de dosificación tenga un perfil de liberación en el lugar correcto y en el momento adecuado y si es necesario, durante un período de tiempo deseado. Protege contra las

condiciones ambientales adversas como la humedad, sirve para enmascarar el sabor o el olor del fármaco y así mejorar sus características organolépticas (Nikam *et al.* 2011).

Son adhesivos, sirven para incrementar la viscosidad y para controlar el flujo en líquidos, suspensiones, y emulsiones. Además exhiben una deformación plástica y una rápida y significativa sensibilidad. Tienen propiedades mecánicas y de flexibilidad, propiedades importantes para que no haya ruptura de las tabletas en la compresión y no se pierdan las propiedades de liberación del fármaco (Rujivipat y Bodmeier, 2012). Pueden incrementar la estabilidad del fármaco y modificar sus características de liberación e incrementar la efectividad del fármaco con buena estabilidad durante el almacenamiento (Khandare y Haag, 2010).

Como recubrimientos los Eudragit tienen como propiedades la liberación del principio activo dependiente del pH, la protección de fármacos sensibles, el enmascaramiento del sabor y del olor, la protección contra la humedad, una mejor deglución de la forma farmacéutica, aportando morfologías de superficies lisas y lustrosas (Evonik, 2011), dan estabilidad al principio activo, aumentan la mucoadhesividad, mantienen más tiempo el principio activo en el tracto gastrointestinal, incrementan su solubilidad y su velocidad de disolución y en el medio adecuado se les facilita el coefecto de la hinchazón y disolución para su liberación (Figura 14) (Wang y Zhang, 2012). Los polímeros Eudragit® L y S permiten alcanzar áreas específicas del intestino, por su gastroresistencia (Beck *et al.* 2004) y liberación sostenida del fármaco (Raffin *et al.* 2006; Schaffazick *et al.* 2006; Cruz *et al.* 2009). Además, micropartículas hechas con Eudragit se han utilizado para mejorar la biodisponibilidad de las proteínas (Wang y Zhang, 2012), como la insulina en sistemas de liberación oral, con la mejora dada por la mucoadhesividad del polímero (Zhang *et al.* 2012) y de fármacos poco solubles en fluidos biológicos como el sulfóxido de albendazol (Claro y Maldonado, 2011). Los Eudragit se pueden combinar con otros polímeros como la Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y el talco estabilizando fármacos recubiertos y controlando la liberación de estos (Raffin *et al.* 2007) y se pueden mezclar con polímeros de carbohidratos para elaborar medicamentos con fármacos que se liberan en el colon. Dentro de las combinaciones reportadas están Eudragit-goma guar, Eudragit-pectina y Eudragit-quitosano (Shukla y Tiwari, 2012).

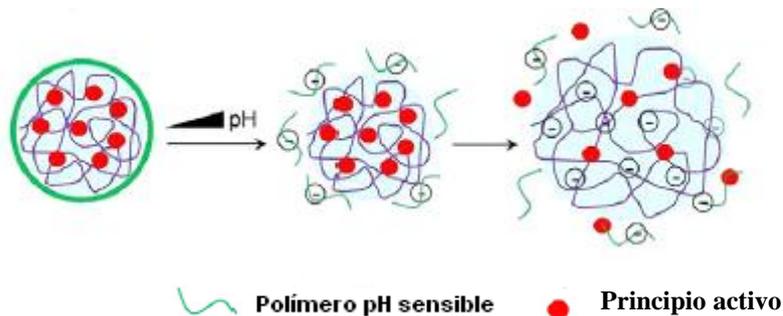


Figura 14. Liberación del principio activo por coefecto de hinchazón y disolución del polímero (Wang y Zhang, 2012).

## 8. Experiencias de la atomización en la microencapsulación de biocontroladores

La técnica de atomización se ha utilizado para el desarrollo de formulaciones a base de microorganismos, como por ejemplo en el estudio de Horaczek y Viernstein (2004a), en el cual se desarrolló una formulación de esporas de *Beauveria brongniartii* para el control de insectos plaga utilizando como matriz leche descremada y la polivinilpirrolidona (PVP). La leche descremada se escogió porque estabiliza la membrana celular durante la criopreservación y es un agente emulsificante y protector ultravioleta (UV). El PVP tiene propiedades adhesivas, afinidad a superficies hidrofílicas e hidrofóbicas con incremento de la viscosidad.

En otro estudio se utilizó un aerosol a baja temperatura de secado por atomización para microencapsular los conidios de *Beauveria bassiana*, con miras a prolongar su actividad y mejorar su vida útil. Se utilizaron varios polímeros como la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), el quitosano, la dextrina, la leche descremada y la polivinilpirrolidona (PVP K90). Los mejores productos encapsulados se obtuvieron utilizando una matriz compuesta de dextrina (10%), leche desnatada (10%), y PVP K90 (5%). Las microesferas obtenidas fueron esféricas con un tamaño promedio de 2,5 a 10 micras. Los conidios exhibieron 80% de viabilidad después de un almacenamiento de 6 meses a 4°C (Liu y Liu, 2009).

Jin y Custis (2011), microencapsularon por atomización conidios de *Trichoderma harzianum* utilizando azúcar. La microencapsulación de los conidios con una solución con 2% de sacarosa incremento el porcentaje de viabilidad en comparación con otras concentraciones evaluadas. La temperatura óptima de entrada/salida para el secado y la microencapsulación fue 60°C/31°C. El tamaño de las microcápsulas fué de 10 a 25 µm. También Muñoz Celaya *et al.* (2012), microencapsularon por atomización conidios de *T. harzianum* en matrices poliméricas de carbohidratos. La alta sobrevivencia de los conidios después del proceso de atomización (86%) y después de

mantenerlos almacenados a 4°C durante 8 semanas (40%), fueron obtenidas con la matriz biopolimérica conformada por maltodextrina (MD10) y goma arábica (GA) (1:1).

La técnica de atomización se ha utilizado también para desarrollar formulaciones que mejoren el potencial comercial de los virus entomopatógenos, como el Baculovirus, ya que dentro de sus limitantes está la pérdida de la actividad insecticida debido a condiciones ambientales adversas (Tamez *et al.* 2000) y la baja estabilidad durante su almacenamiento (Tamez *et al.* 2002).

En el estudio de Tamez *et al.* (2000), se trabajó con nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* (AfMPNV) utilizando lignina potásica (lignina kraft), lignina sódica, harina de maíz pregelatinizada, harina de maíz nixtamalizada, sacarosa, ácido láctico, aceite de maíz y 2-propanol. Para elaborar las formulaciones se utilizó un atomizador Niro, con una temperatura de entrada de 100°C, temperatura de salida de 70°C, presión del aire 5,6Kg/cm<sup>2</sup> y una velocidad de flujo de la suspensión que alimentó el sistema de 8 mL/minuto. En este estudio se demostró que las formulaciones hechas con lignina tienen mayor actividad insecticida después de la exposición a la luz solar que las que no posee lignina.

Mcguirre *et al.* (2001) compararon la actividad en campo de formulaciones de NPVs aislados de *Anagrapha falcifera* (Kirby) y *Autographa californica* (Speyer) microencapsuladas por atomización utilizando como ingredientes lignina soluble en agua (lignina kraft), harina 961, harina de maíz, blankofor BBH, dióxido de titanio, cloruro de calcio, sacarosa, Tween 85 y 2- propanolol en un atomizador Niro. Se obtuvo como resultado que las formulaciones que contenían lignina presentaron más del 50% de actividad remanente en campo, en comparación con el virus no formulado que presentó menos del 50% de actividad a las 24 horas después de su aplicación.

En el 2003 se realizó un estudio de estabilidad del nucleopoliedrovirus de la *A. falcifera* (AfMPNV) microencapsulado por atomización con lignina sódica, harina de maíz pregelatinizada, dióxido de titanio, azúcar, lignina potásica y cloruro de calcio, comparando con el virus sin formular. Las formulaciones elaboradas por atomización presentaron una vida media de 3 meses a 30°C y de 30 meses a 4°C y una mayor actividad insecticida en campo (67,5% de mortalidad) en comparación con el virus no formulado (30% de mortalidad) (Behle *et al.* 2003).

En el estudio realizado por Behle *et al.* (2006), con el NPV de *A. falcifera* (AfMPNV) se determinó el efecto de diferentes condiciones del proceso de microencapsulación por atomización con lignina sobre la actividad insecticida del virus. En este trabajo se encontró que altas temperaturas en el sistema de atomización pueden afectar negativamente la actividad del virus y que el

incremento de la alcalinidad de los revestimientos con lignina AT, causan pérdida de la actividad insecticida, lo cual no se presenta cuando se usa lignina PC-1307.

Arthurs *et al.* (2006) también evaluó la microencapsulación por atomización como alternativa para fotoestabilizar las partículas virales de granulovirus de *C.pomonella* CpGV Tanada, 1964 (familia: Tortricidae) utilizando como polímero la lignina. El virus microencapsulado presentó una fotoestabilidad durante 4 horas de exposición a la radiación ultravioleta generada por un simulador solar.

Behle y Popham (2012), trabajaron con aislamientos nucleopoliedrovirus múltiples de *S.frugiperda* (SfMNPV) microencapsulados por atomización utilizando polvo de lignina sódica (PC-1307, Westvaco, CharlestonHeights, SC) disuelta en agua al 10% p/p y cloruro de calcio dihidratado. Se utilizó un atomizador Niro (Niro, Columbia, MD). En aplicaciones en campo sobre cultivos de repollo la vida media del virus no formulado fue menor de 7,5 horas comparado con la vida media del virus encapsulado (26,7 horas).

***Capítulo III.***  
***Materiales y Métodos***

## **1. Ajuste de las condiciones del proceso de atomización**

### **1.1. Determinación del efecto de la temperatura sobre el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003**

#### **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 media onza que contenían un fragmento de dieta artificial.

#### **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 NPV003 ajustadas a una concentración de  $5 \times 10^6 \text{ CI/mL}$ , utilizando la metodología de la gota (Hughes y Wood, 1981). Las larvas fueron 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.

#### **Efecto de la temperatura sobre la actividad insecticida del virus**

Se preparó una suspensión viral ajustada a una concentración de  $2 \times 10^7 \text{ CI/mL}$  y se dispensaron muestras de 500  $\mu\text{L}$  en tubos Eppendorf, las cuales fueron expuestas a las temperaturas de  $30^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  y  $60^\circ\text{C}$ , 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  $\mu\text{L}$  de las suspensiones virales expuestas o no a cada una de las temperaturas mencionadas anteriormente se mezclaron con 200  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 bebieron el tratamiento, lo que se evidenció por la coloración azul en el cuerpo de las mismas como consecuencia de la ingestión del tratamiento (virus + colorante). La coloración se detectó mediante observación en un estereoscopio

Olympus SZ40, seleccionándose 30 larvas que se ubicaron individualmente en recipientes plásticos de 2 onzas. Se suministró a cada larva un fragmento de dieta artificial y se distribuyeron los 30 recipientes en tres cubetas plásticas (unidad experimental), que se incubaron a 28°C y 60% de humedad relativa.

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. La mortalidad de las larvas se determinó a los siete días después de la inoculación.

Los resultados de mortalidad fueron corregidos con respecto al testigo absoluto estimando la eficacia mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Zar, 1999):

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

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

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

## **1.2. Selección del sistema de atomización (superior e inferior) y de las condiciones del proceso para la adecuada formación de micropartículas**

### **Materiales**

Eudragit® S100 (Röhm GmbH & Co.) donado por Almapal S.A. (Colombia), talco malla 325 calidad farmacéutica (Humedad 0,415%) utilizado como núcleo, etanol al 96% (CIACOMEQ S.A.S), fosfato dibásico de sodio anhidro (Sigma) y ácido cítrico (Merck).

### **Preparación de la solución polimérica**

En 70 mL de solución tampón pH 8,0 se adicionó la cantidad correspondiente de polímero y se mantuvo en agitación constante. Posteriormente se adicionaron 30 mL de etanol manteniendo la agitación hasta obtener una solución translúcida.

## Ajuste de las condiciones de microencapsulación por atomización (Spray drying)

Las micropartículas se elaboraron tanto en el sistema de atomización superior (Top spray), como en el inferior (Bottom spray) utilizando un lecho fluido marca Glatt GmbH D-01277, equipado con una roseta a 1,0 mm para ajustar el flujo de aire (Figura 15).

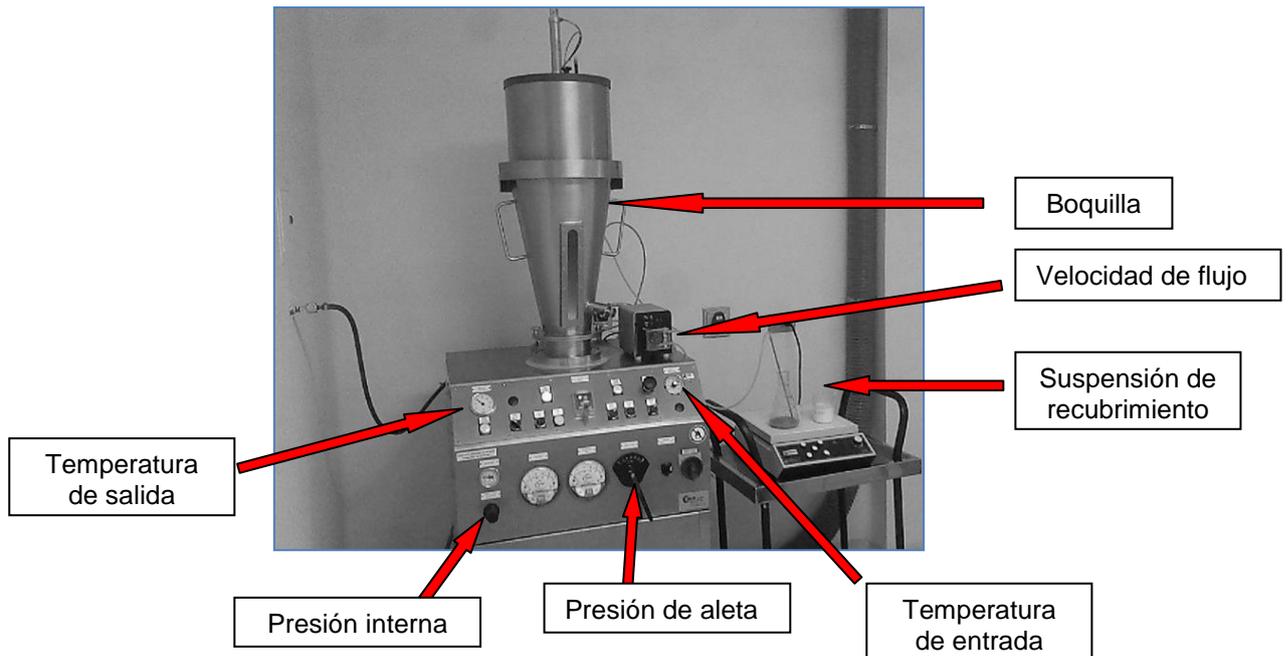


Figura 15. Equipo de lecho fluido Glatt GmbH D-01277

En ensayos previos se fijaron los valores alrededor de los cuales debía realizarse la experimentación para la formación exitosa de micropartículas (datos no mostrados). Estos valores fueron: concentración del polímero del 5,0%, concentración del núcleo (Talco) del 1,5% (Villamizar *et al.* 2010) y presión de aleta expresada como ángulo de apertura de 40°.

A partir de los resultados previos y la revisión bibliográfica se fijaron los parámetros de temperatura de entrada, presión interna de la cámara y velocidad de flujo, los cuales variaron según las matrices de tratamientos que se presentan en la tabla 5 y la tabla 6, utilizando un diseño factorial con tres factores y dos niveles para el sistema de atomización inferior y con un diseño factorial incompleto de tres factores y tres niveles para el sistema de atomización superior. Para el sistema de atomización inferior (BS), se evaluaron ocho tratamientos (Tabla 7) y para el sistema de atomización superior (TS), se evaluaron doce tratamientos (Tabla 8). De cada tratamiento se realizó una sola corrida por sistema.

Tabla 5. Variables y niveles evaluados para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 por sistema de atomización inferior (BS)

Factores	Niveles	
	Bajo	Alto
Temperatura de entrada (°C)	50	60
Presión interna de la cámara(bar) <sup>***</sup>	1	3
Flujo (rpm) <sup>***</sup>	8	16
Velocidad de flujo (mL/min)	(4,12)	(8,61)

<sup>\*\*\*</sup> (Charpentier *et al.* 1999)

<sup>\*\*\*</sup> (Tamez *et al.* 2002, Behle *et al.* 2006)

Tabla 6. Variables y niveles evaluados para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 por sistema de atomización superior (TS)

Factores	Niveles		
	Bajo	Medio	Alto
Temperatura de entrada (°C)	50	60	80
Presión interna de la cámara(bar) <sup>***</sup>	1	--	3
Flujo (rpm) <sup>***</sup>	8	--	16
Velocidad de flujo (mL/min)	(4,12)		(8,61)

<sup>\*\*\*</sup> (Charpentier *et al.* 1999)

<sup>\*\*\*</sup> (Tamez *et al.* 2002, Behle *et al.* 2006)

Se evaluaron algunos parámetros cualitativos como la obtención de producto seco, la homogeneidad y el tamaño de partícula, la pérdida de material en los filtros, la pérdida de material en la tolva y los filtros y la fácil recuperación del producto. Estas características se calificaron con un valor de cero (0) cuando se obtuvo el comportamiento no deseado y con un valor de uno (1) cuando se obtuvo el comportamiento deseado, lo que permitió aplicar una matriz de decisión para seleccionar el tratamiento más promisorio.

## Caracterización de las micropartículas

### Morfología y tamaño

La forma y el tamaño de las micropartículas se determinaron por microscopía. Para el tamaño se utilizó un microscopio de luz Olympus CH3ORF100 equipado con un micrómetro en el aumento de 10X. Se evaluaron 150 micropartículas de cada tratamiento (Villamizar *et al.* 2010)

Las muestras evaluadas fueron obtenidas de la cámara de atomización y se observaron directamente al microscopio, después de tamizarlas por una malla con tamaño de poro de 100 µm.

Tabla 7. Tratamientos evaluados para la formación de micropartículas utilizando atomización inferior

TRATAMIENTOS	TE (°C)	Flujo (rpm)	Vel. Flujo (mL/min.)	PI (bares)
1	50	16	8,61	1
2	50	8	4,12	1
3	50	16	8,61	3
4	50	8	4,12	3
5	60	8	4,12	1
6	60	16	8,61	1
7	60	8	4,12	3
8	60	16	8,61	3

[TE]: temperatura de entrada, [PI]: presión interna de la cámara

Tabla 8. Tratamientos evaluados para la formación de micropartículas utilizando atomización superior

TRATAMIENTOS	TE (°C)	Flujo (rpm)	Vel. de flujo (mL/min)	PI (bar)
1	50	8	4,12	1
2	50	16	8,61	1
3	50	8	4,12	3
4	50	16	8,61	3
5	60	8	4,12	1
6	60	16	8,61	1
7	60	8	4,12	3
8	60	16	8,61	3
9	80	8	4,12	3
10	80	8	4,12	1
11	80	16	8,61	1
12	80	16	8,61	3

[TE]:temperatura de entrada, [PI]: presión interna de la cámara

### 1.3. Selección de las condiciones óptimas para el proceso de microencapsulación por atomización superior

De acuerdo con los resultados obtenidos en la etapa anterior, se seleccionó el sistema de atomización superior (Top spray) y se dejó fija la temperatura de entrada en 80°C, el flujo en 8 rpm equivalente a una velocidad de flujo de 4,12 mL/min, una presión de aleta de 25° y un intervalo de agitación de los filtros de 0,5 minutos durante 10 segundos.

## Preparación del microencapsulado

En esta etapa se utilizó también como núcleo el material inerte talco malla 325 y el polímero de recubrimiento Eudragit® S100 donado por Amapal S.A. El sistema solvente fue una mezcla hidroalcohólica 70:30.

Los factores evaluados fueron la presión de la cámara, la concentración de núcleo y la concentración de polímero en un diseño factorial con tres factores y tres niveles (Tabla 9). Para poder asegurar que las micropartículas obtenidas por el proceso de atomización superior sean ingeridas por larvas neonatas de *S. frugiperda* y así se produzca su acción insecticida, es necesario obtener micropartículas que tengan un tamaño menor a la abertura bucal de una larva neonata que es de aproximadamente 70  $\mu\text{m}$  (Villamizar *et al.* 2010). Teniendo esto en cuenta y considerando que para garantizar que el virus se hubiese microencapsulado las partículas deberían ser de un diámetro superior al de un cuerpo de inclusión, que es de aproximadamente de  $2,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$  (Gómez *et al.* 2010), se seleccionó como rango adecuado de tamaño, partículas entre 10 y 40  $\mu\text{m}$ . Las variables respuesta fueron el diámetro promedio de las micropartículas ( $\bar{d}$ ), la frecuencia de tamaño entre 10 y 40  $\mu\text{m}$  y el rendimiento del proceso. Se conto con 27 tratamientos (Tabla 10), cada uno de los cuales se elaboró por triplicado.

Tabla 9. Tabla de Factores y Niveles

Factores	Niveles		
	-1	0	1
Presión interna de la cámara (bar)	1	2	3
Concentración de polímero (%)	2,5	5,0	7,5
Concentración de núcleo(%)	1,0	1,5	2,0

La influencia de los factores se estableció con el software Statgraphics 8.1, mediante un análisis de superficies de respuesta y diagramas de Pareto, para generar un modelo matemático de predicción y así seleccionar las condiciones óptimas del proceso para continuar con la microencapsulación del virus.

## Caracterización de las micropartículas

### Tamaño y morfología de las micropartículas

La forma, el tamaño y la frecuencia de tamaño de las micropartículas se estudiaron por observación en un microscopio de luz marca NIKON ECLIPSE 300. El diámetro de 150 partículas en tres muestras de cada tratamiento se determinó con un analizador de imágenes Nis-Elements BR3.2.

Adicionalmente, se determinó la morfología de las micropartículas, mediante microfotografías tomadas en un microscopio electrónico de barrido Philips XL 20, siguiendo la metodología descrita por Villamizar *et al.* (2010).

Tabla 10. Tratamientos para la formación de micropartículas. Atomización superior

Tratamiento	PI (bares)	Concentración polímero (%)	Concentración núcleo (%)
1	1	2,5	1,0
2	1	2,5	1,5
3	1	2,5	2,0
4	2	2,5	1,0
5	2	2,5	1,5
6	2	2,5	2,0
7	3	2,5	1,0
8	3	2,5	1,5
9	3	2,5	2,0
10	1	5,0	1,0
11	1	5,0	1,5
12	1	5,0	2,0
13	2	5,0	1,0
14	2	5,0	1,5
15	2	5,0	2,0
16	3	5,0	1,0
17	3	5,0	1,5
18	3	5,0	2,0
19	1	7,5	1,0
20	1	7,5	1,5
21	1	7,5	2,0
22	2	7,5	1,0
23	2	7,5	1,5
24	2	7,5	2,0
25	3	7,5	1,0
26	3	7,5	1,5
27	3	7,5	2,0

[PI]: presión interna de la cámara

## Rendimiento

Para estimar el rendimiento del proceso, se pesó el material recuperado en cada lote (réplica) de cada tratamiento y con este resultado y los pesos de los materiales utilizados se aplicó la siguiente fórmula (Villamizar *et al.* 2010):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{W_{\text{producto}} \times 100}{(W_{\text{polímero}} + W_{\text{núcleo}})}$$

Donde:

$W_{\text{producto}}$  es el peso de las micropartículas obtenidas en un lote de producción

$W_{\text{polímero}}$  es el peso del polímero utilizado en un lote de producción

$W_{\text{núcleo}}$  es el peso del núcleo utilizado en un lote de producción.

## **2. Validación del proceso de microencapsulación para el aislamiento nativo de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003**

Con las condiciones óptimas generadas por el modelo matemático de predicción (Numeral 1.3 capítulo III y capítulo IV) se procedió a la microencapsulación del virus seco. Los valores óptimos determinados fueron: concentración del polímero (Eudragit®S100) de 6%, una concentración de núcleo (virus seco) del 1,35% y una presión interna de la cámara de 2,23 bares. Se procedió a realizar la microencapsulación del aislamiento viral NPV003, elaborando tres lotes de producto utilizando además de las condiciones óptimas determinadas, una temperatura de entrada de 80°C, una presión de aleta de 25° y una boquilla de 1,0 mm para ajustar el flujo de aire, condiciones evaluadas previamente en la selección del sistema de atomización (Numeral 1.2 capítulo III y capítulo IV).

La preparación de la suspensión de recubrimiento se realizó como se describió previamente utilizando la cantidad óptima de polímero determinada y como núcleo el virus purificado y secado en lecho fluido en la cantidad óptima determinada. El virus seco se obtuvo por el proceso de atomización de una suspensión viral ajustada a una concentración de  $3 \times 10^9$  CI/mL y fue utilizado como ingrediente activo para la formulación microencapsulada.

De cada lote fabricado se consideró como producto final, únicamente el depositado en el colector del equipo de atomización. De cada lote se tomaron tres muestras para determinar la morfología de las micropartículas, su diámetro y la frecuencia de tamaño. La morfología y tamaño de las micropartículas y el rendimiento del proceso, se determinaron siguiendo las metodologías previamente descritas. A las micropartículas obtenidas también se les determinó el contenido de humedad (%), la concentración viral, la eficiencia de encapsulación, el contenido residual de solventes, la actividad insecticida del virus y la fotoestabilidad.

### **2.1. Contenido de humedad (%)**

Una muestra de 0,5 g de micropartículas fue secada a 100°C en un analizador de humedad KERN MLS 50 – 3, hasta peso constante. Los resultados se expresaron como porcentaje. Esta característica se evaluó por triplicado para cada lote (AOAC, 2007).

## 2.2. Concentración de las micropartículas y eficiencia de la encapsulación

Para la determinación del contenido viral, se tomó una muestra de 100 mg de producto de cada lote y se mezcló con 9,9 mililitros de tampón fosfato pH 8,0 por 5 minutos para promover la disolución del polímero y liberar los CI, que fueron estimados mediante recuento en cámara de Neubauer. También se tomaron muestras de 100 mg de producto de cada lote y se mezclaron con 9,9 mililitros de tampón pH 5,0 por 5 minutos para liberar los CI que no fueron encapsulados, los cuales se estimaron por recuento en cámara de Neubauer. La cantidad de virus encapsulado eficientemente se determinó por diferencia entre el conteo de los cuerpos de inclusión liberados al medio después de la disolución con el tampón pH 8,0 y el conteo de cuerpos de inclusión obtenido al suspender la muestra en tampón pH 5,0. Para el conteo de los cuerpos de inclusión se utilizó un microscopio de luz marca Olympus CH3ORF100. La eficiencia de encapsulación se calculó utilizando la siguiente fórmula (Villamizar *et al.* 2010):

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{W_{\text{real}}}{W_{\text{teórico}}} \times 100$$

Donde  $W_{\text{real}}$  es la concentración experimental de cuerpos de inclusión que quedaron microencapsulados y corresponde a la diferencia entre el recuento a pH 8,0 y el recuento a pH 5,0 y  $W_{\text{teórico}}$  es el contenido teórico de virus en las micropartículas.

Estas características se evaluaron por triplicado para cada lote.

## 2.3. Contenido residual de solventes

El residuo de etanol fue determinado por cromatografía de gases usando ácido láctico como estándar interno, siguiendo la metodología basada en Zhimadzu (2007) y Holdeman *et al.* (1977). Para preparar las muestras, se peso 1 g de micropartículas de cada lote, se adiciono a cada muestra 5 mL de ácido láctico y se agito vigorosamente. Se dejo en reposo y se tomó una muestra (5  $\mu$ L) para ser inyectada directamente en el cromatógrafo de gases. Para este ensayo se evaluó una muestra por duplicado de cada lote.

Para determinar el tiempo de retención del etanol se realizó una inyección de la muestra del lote 3 de las micropartículas usando la metodología previamente descrita con ácido láctico como estándar interno y etanol como estandar externo. Este ensayo también se evaluó por duplicado.

Las condiciones cromatográficas para los ensayos realizados fueron: cromatógrafo de gases SHIMADZU GC 2014; columna capilar Zebron (ZB-FFAP), longitud 30 m, D.I. 0,53 mm, columna de mediana polaridad utilizada

para determinar alcoholes y ácidos orgánicos, su composición es ácido nitrotereftálico modificado y polietilenglicol (Zebron GC selection Guide, 2014); como gas de arrastre se usó nitrógeno grado cromatográfico a un flujo de 14,99 mL/min; detector de ionización de llama (FID) ; temperatura inicial de columna de 50°C y después se incrementó a una temperatura final de 220°C.

## **2.4. Actividad insecticida**

El bioensayo para determinar la actividad biológica de los tres lotes se realizó siguiendo la metodología de la gota descrita por Hughes y Wood, 1981. Con el virus purificado y las microparticulas se prepararon suspensiones y se ajustaron a cinco concentraciones entre  $2 \times 10^3$  y  $2 \times 10^7$  CI/mL para los lotes de microparticulas, y entre  $2 \times 10^4$  y  $2 \times 10^8$  CI/mL para el virus sin encapsular secado por atomización. Se colocaron 200  $\mu$ L de cada concentración en un pozo de una fila de una microplaca de 96 pozos de fondo plano. Posteriormente, se adicionaron a cada pozo 200  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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 como consecuencia de la ingestión de la mezcla (virus + colorante). La coloración se detectó mediante observación en un estereoscopio Olympus SZ40, seleccionándose 30 larvas que se ubicaron individualmente en recipientes plásticos de 2 onzas. Se suministró a cada larva un fragmento de dieta artificial y se distribuyeron los 30 recipientes en tres cubetas plásticas (unidad experimental), que se incubaron a 28°C y 60% de humedad relativa.

Se contó con un testigo absoluto en el cual las larvas no fueron sometidas a ningún tratamiento. La mortalidad de las larvas se determinó a los siete días después de la inoculación. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial y tres repeticiones por tratamiento. Los resultados de mortalidad se sometieron a un análisis Probit (Finney, 1952) mediante el programa Biostat 2007 para la determinación de las concentraciones letales.

## **3. Determinación de la fotoestabilidad y la dosis mínima efectiva del virus microencapsulado por atomización bajo condiciones de invernadero**

### **3.1. Fotoestabilidad del virus microencapsulado por atomización**

Los tratamientos evaluados fueron el virus seco sin microencapsular, el virus microencapsulado y un testigo absoluto. Se tomaron muestras de 0,2 g de

micropartículas y se prepararon suspensiones con el virus microencapsulado y sin microencapsular en agua destilada, las cuales se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^7$  CI/mL.

Se colocaron 200  $\mu$ L de cada suspensión en 5 pozos de una fila de una microplaca de 96 pozos de fondo plano. La microplaca fue irradiada con una lámpara monocromática (302 nm) durante 2, 4 y 6 horas, a una distancia de 10 cm de la fuente de luz. Antes de iniciar la exposición a la luz se cubrió la primera columna de pozos de la microplaca con papel aluminio (un pozo de cada concentración), consistiendo este tratamiento en el virus no expuesto a la radiación, tiempo 0 horas. Cada 2 horas hasta completar 6 horas se cubrió la columna de pozos siguiente, representando cada columna de la microplaca un tiempo diferente de exposición a la radiación ultravioleta tipo B. Posteriormente se adicionaron a cada pozo 200  $\mu$ L de una solución de sacarosa al 4% que contenía un colorante azul de alimentos al 1% y se llevó a cabo un bioensayo para determinar la actividad insecticida siguiendo la metodología previamente descrita (Hughes y Wood, 1981).

Para determinar la eficacia se utilizó la fórmula de Schneider – Orelli (Zar 1999) y con los valores de eficacia se calculó el porcentaje de actividad original remanente utilizando la siguiente ecuación (Shapiro, 1989):

$$\% \text{ OAR} = (B / A) \times 100$$

Donde:

A: Eficacia del virus no expuesto

B: Eficacia del virus expuesto a la radiación UV

La normalidad de los datos fue estimada mediante una prueba de Shapiro-Wilk (95%) y la homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Barlett (95%). Posteriormente, las diferencias entre tratamientos fueron evidenciadas mediante una prueba DMS (95%), con el programa SAS 9.1.

### **3.2. Selección de la dosis mínima efectiva del virus microencapsulado por atomización bajo condiciones de invernadero**

Para seleccionar la dosis adecuada del producto se llevó a cabo un experimento en invernadero en las instalaciones de Corpoica, Centro de Investigaciones Tibaitatá. Se sembraron plantas de maíz (*Zea mays* L) ICA variedad 508 especial para clima frío. Se utilizó un diseño experimental de cuadro latino con cinco repeticiones por tratamiento (Figura 16), los cuales consistieron en la mezcla de los tres lotes de virus microencapsulado por atomización, a las dosis de 1250 g/ha, 1000 g/ha y 750 g/ha; un testigo absoluto (sin aplicación) y un testigo positivo que consistió en el producto

convencional de nucleopoliedrovirus producido actualmente por Corpoica a su dosis recomendada (1000 g/ha equivalente a  $1 \times 10^{12}$  CI/ha). La unidad experimental consistió en un surco de 1,05 m de largo con 7 plantas y con distancia de siembra de 15 cm. La distancia entre surcos fue de 1,2 m. El cultivo contó con todas las prácticas agronómicas típicas de riego, fertilización y control de malezas.

El mapa del experimento se presenta en la figura 16, donde se ubican los tratamientos identificados con colores así: dosis de 750g/ha de color rojo, dosis de 1000 g/ha de color azul, dosis de 1250 g/ha de color verde, el testigo absoluto de color negro y el producto convencional de color blanco.

BvConv	Testigo	BvMic750	BvMic1250	BvMic1000
BvMic750	BvMic1250	BvMic1000	BvConv	Testigo
BvMic1000	BvConv	BvMic1250	Testigo	BvMic750
BvMic1250	BvMic750	Testigo	BvMic1000	BvConv
Testigo	BvMic1000	BvConv	BvMic750	BvMic1250

Figura 16. Mapa del experimento para determinar la dosis mínima efectiva del virus microencapsulado por atomización bajo condiciones de invernadero

Treinta días después de la siembra se realizó la aplicación de los tratamientos. Para tal fin se asperjaron 2 mL de los mismos sobre cada planta haciendo énfasis en el cogollo y utilizando un atomizador manual. Después de una hora se colocaron dos larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* por planta, distribuidas individualmente en las hojas jóvenes. Pasados dos días se recogió una larva de cada planta de todos los tratamientos (7 larvas/ réplica), las cuales se ubicaron en vasos plásticos independientes que contenían un pedazo de dieta artificial y se llevaron al laboratorio bajo condiciones controladas (28°C y 60% HR). La mortalidad se evaluó siete días después de la recolección de las larvas y hasta que las larvas murieron o se convirtieron en pupa.

Sobre el total de larvas recogidas se determinó el porcentaje de mortalidad y el porcentaje de eficacia de los tratamientos mediante la fórmula de Schneider – Orelli (Zar 1999). La normalidad de los datos fue estimada mediante una prueba de Shapiro-Wilk (95%) y la homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Barlett (95%). Posteriormente, las diferencias entre tratamientos fueron evidenciadas mediante un análisis de varianza ANAVA y una comparación múltiple de medias de Tukey (95%), con el programa SAS 9.0.

***Capítulo IV.***  
***Análisis y discusión de resultados***

## 1. Ajuste de las condiciones del proceso de atomización

### 1.1 Efecto de la temperatura sobre el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003

La suspensión viral no expuesta a cambios de temperatura, presentó un porcentaje de eficacia del 97,68%, mientras que el porcentaje de eficacia de los tratamientos expuestos a las temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C durante los tiempos de 30, 45, 60, 120 y 180 minutos, oscilaron entre el 65% y el 100% (Figura 17). Estos valores de eficacia no presentaron diferencias significativas entre sí (Anexo 1), 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; siendo factible la utilización de temperaturas inferiores a 50°C para desarrollar procesos de formulación.

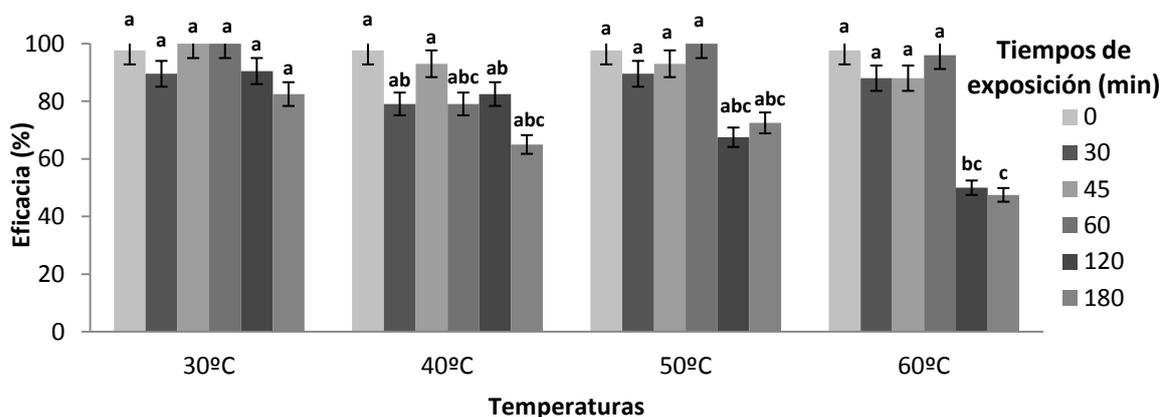


Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la eficacia del aislamiento viral NPV003. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes, según prueba de Tukey (95%).

A 60°C se detectaron diferencias significativas ( $F = 7.43$ ,  $gl = 19$ ,  $P = 0.00001$ ), entre la eficacia a los tiempos 0, 30, 45, 60 minutos con respecto a la del virus expuesto durante 120 y 180 minutos (Anexo 1), 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. El porcentaje de inactivación se obtiene al relacionar la pérdida de actividad insecticida del inóculo experimental con la actividad insecticida del inóculo estándar (suspensión viral no expuesta a la temperatura).

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. Esta inactivación está relacionada con un efecto directo de la temperatura sobre el ADN y las proteínas de los cuerpos de inclusión virales, ocasionado desnaturalización de

las mismas y por tanto reduciendo la infectividad (Peng *et al.* 1999; Miller, 1997; Caballero *et al.* 2001; Michalsky *et al.* 2008; Villamizar, 2011).

En algunos trabajos se ha determinado que una temperatura mayor a 40°C puede causar una rápida inactivación, particularmente en suspensiones acuosas y con temperaturas de 60°C se han obtenido pérdidas de actividad mayores al 50% en aproximadamente en 10 minutos (Lacey y Kaya, 2007). Sin embargo, el aislamiento NPV003 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, como el nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* AcMNPV que presentó disminución de su infectividad en dos unidades logarítmicas después de una exposición a temperaturas mayores de 45°C por 120 minutos (Michalsky *et al.* 2008).

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, que 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 *et al.* 1999).

La producción *in vivo* de los baculovirus a partir de larvas infectadas posiblemente también se relaciona con el efecto deletéreo de la temperatura, ya 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 (Jones y Burges, 1998), causando la desnaturalización de la cápside por cambios conformacionales de sus proteínas estructurales (Boshetti *et al.* 2003).

Por lo anterior, conocer los efectos de la temperatura sobre la estabilidad viral es crucial para desarrollar procesos de formulación de bioplaguicidas y con ello favorecer su eficacia en campo (Sporleder *et al.* 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 *et al.* 2006).

Dicho efecto de la temperatura ha sido estudiado para varios virus entomopatógenos como el Iridovirus de *Chilo suppressalis* (Fukaya y Nasu, 1966) (Lepidoptera: Pyralidae), para el que observaron que la velocidad de inactivación aumenta directamente con la temperatura, disminuyendo la infectividad del virus a los cincuenta días de exposición a temperaturas superiores a 25°C (Marina *et al.* 2000). En el caso del Iridovirus de *Galleria mellonella* (Day y Gilbert, 1967)(Lepidoptera: Pyralidae); también encontraron

que al exponerlo a 70°C por 60 minutos y a 80°C por 30 minutos, su inactivación fue casi total (Martínez *et al.* 2003).

## 1.2. Selección del sistema de atomización en lecho fluido (superior e inferior) y de las condiciones del proceso para la adecuada formación de micropartículas

### 1.2.1. Elaboración de micropartículas por atomización inferior (Bottom spray)

En este proceso, la temperatura de entrada influyó directamente sobre la temperatura interna de la cámara y su temperatura de salida (Tabla 11).

Tabla 11. Temperatura de entrada, interna y de salida en el proceso de atomización inferior

Tratamiento	FACTORES Y NIVELES				VARIABLES RESPUESTA		
	Flujo (rpm)	Velocidad de Flujo (mL/min.)	TE (°C)	PI (bar)	TE máx. (°C)	TIC (°C)	TS (°C)
1	16	8,61		1	54 -55	18,8–20,2	19,0-19,0
2	8	4,12			57-80	17,6-20,3	23,0-26,0
3	16	8,61	50	3	N.D.	N.D.	N.D.
4	8	4,12			N.D.	N.D.	N.D.
5	8	4,12		1	60-64	38,7–41,3	35-40
6	16	8,61			68,0-68,0	20,9- 20,9	22,0-22,0
7	8	4,12	60	3	62,0-64,0	28,8- 29,6	25,0-26,0
8	16	8,61			79,0-79,0	20,1- 20,1	23,0-23,0

[TE]: temperatura de entrada, [TIC]: temperatura interna de la cámara, [TS]: temperatura de salida, [PI]: presión interna de la cámara, [N.D]: No determinado por no obtenerse formación de partículas

Las temperaturas de entrada de 50°C y 60°C generaron temperaturas internas de la cámara entre 17,3°C y 20,3°C y entre 20,1°C a 41,3°C y temperaturas de salida de 19°C a 26°C y de 22°C a 40°C, respectivamente. Estos valores de temperatura se podrían considerar adecuados para el proceso de microencapsulación de principios activos sensibles a temperaturas altas como las partículas virales de los baculovirus, las cuales se inactivan a temperaturas mayores de 50°C (Young, 2000).

Los resultados muestran que la velocidad de flujo (Flujo) afectó la temperatura interna de la cámara, que se redujo cuando aumentó el flujo. Esto puede ser aprovechado para reducir el efecto de las altas temperaturas de entrada sobre principios activos sensibles a estas temperaturas (Jin y Custis, 2011).

La temperatura de entrada fijada en el equipo también afectó la temperatura dentro del equipo, observándose una relación directa entre las dos variables (Tabla 11).

El proceso de atomización (Spray drying) para microorganismos no debe alcanzar altas temperaturas, con el fin de mantener la integridad del principio activo. Por ejemplo Liu y Liu (2009) encontraron la mayor estabilidad de la viabilidad del hongo *Beauveria bassiana* cuando se microencapsuló utilizando una temperatura de entrada de 60°C y una temperatura de salida de 30+/-2°C, en comparación a la atomización convencional que maneja una temperatura de entrada de 100°C y una temperatura de salida de 80+/-5°C. De igual forma en el estudio de Behle *et al.* (2006), encontraron que el nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV) puede presentar una pérdida mínima de actividad cuando se expone a altas temperaturas en el proceso de atomización por pocos minutos.

En la tabla 12 se presenta la matriz de decisión utilizada para seleccionar el tratamiento más promisorio. Dentro de los parámetros calificados se incluyeron factores como la obtención de producto seco, la homogeneidad en el tamaño de las micropartículas, un menor tamaño de las micropartículas (<100µm), la pérdida de material en filtros, la pérdida de material en la tolva y la fácil recuperación del producto.

En la matriz se puede observar que uno de los problemas que presentó el proceso de atomización inferior a una temperatura de entrada de 50°C, (Tratamientos 1, 2, 3 y 4), fue la no formación adecuada de partículas, debido a que la suspensión del polímero y el núcleo fueron atomizados pero no se logró la evaporación completa de los solventes.

Cuando la temperatura de entrada fue de 60°C, con velocidad de flujo de 8,61 mL/min y a presiones internas de la cámara de 1 y 3 bares, correspondientes a los ensayos 6 y 8, también se encontró humedad en la cámara de atomización, posiblemente porque bajo estas condiciones el proceso de secado no está bien controlado generándose condensación de agua (Jin y Custis, 2011). Efecto evidente, por la presencia del líquido en las paredes de la cámara de atomización y en el cilindro ubicado en la parte inferior.

Cuando se trabajó con una velocidad de flujo de 4,12 mL/min y una temperatura de entrada de 60°C, con presiones internas de la cámara de 1 y 3 bares, condiciones que corresponden a los tratamientos 5 y 7, no se detectó humedad en el sistema de atomización inferior. Esto indica que en estas condiciones, el proceso de secado es más controlado. Además utilizando estas condiciones, las pérdidas de material en los filtros y en la tolva fueron menores y la recuperación del producto final se facilitó por encontrarse más seco que con los tratamientos restantes.

Tabla 12. Matriz de decisión del proceso de microencapsulación en el sistema de atomización inferior (Bottom spray)

Tratamiento	Sin Humedad	HT de MPs	MPs de menos de 100 µm	Pérdida de material en filtros	Pérdida de material en tolva	Facilidad de recuperación	Total
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	1	1	1	1	1	1	6
6	0	1	1	0	0	0	2
7	1	1	1	1	1	1	6
8	0	0	0	0	0	0	0

[HT de MPs]: homogeneidad en el tamaño de las micropartículas, [N.D.]: No determinado por no obtenerse formación de partículas. Valor 0: comportamiento no deseado, Valor 1: comportamiento deseado

Los tratamientos con la calificación más alta fueron el 5 y el 7, para los que se emplearon: temperatura de entrada de 60°C, velocidad de flujo de 4,12 mL/min (8 rpm) y presiones internas de 1 y 3 bares respectivamente, por lo que se puede concluir que la presión no tuvo un efecto significativo en la respuesta, a diferencia de la temperatura y el flujo. Sin embargo, algunos autores han concluido que para el proceso de atomización inferior el parámetro más crítico es la fluidización del aire, lo que depende de la presión interna de la cámara y de la selección del plato ubicado en la parte inferior de la tolva, que distribuye el aire y logra una buena separación (elevación) de las partículas durante su fluidización (Srivastava y Mishra, 2010).

Cheow *et al.* (2010) determinaron que estas variables deben ser seleccionadas previamente para prevenir el exceso de humedad que se puede presentar en la cámara de atomización, lo que se presentó en algunos de los tratamientos evaluados en el presente estudio. El control de estos parámetros permite una buena circulación de las partículas y un adecuado proceso de microencapsulación, ya que influyen en el sistema de atomización inferior (Bottom spray), donde la fluidización está dada por el flujo del aire en interacción con el movimiento de las partículas (Mafadi *et al.* 2003).

### Caracterización de las micropartículas (Bottom spray)

En el proceso, se obtuvieron micropartículas de diferentes tamaños, formas irregulares y poco homogéneas (Figura 18). Además se formaron aglomerados, posiblemente por coalescencia de las gotas durante la evaporación de los solventes y la fluidización de las mismas. Las micropartículas obtenidas por el proceso de atomización inferior mostraron un tamaño menor de 100 µm. Caso similar, cuando se microencapsularon conidios de *Beauveria bassiana* por atomización, se obtuvieron micropartículas con tamaños entre 2,5 y 10 µm

(Liuy Liu 2009) y con conidios de *Trichoderma harzianum* se obtuvieron tamaños entre 10 y 25  $\mu\text{m}$  (Jin y Custis, 2011).

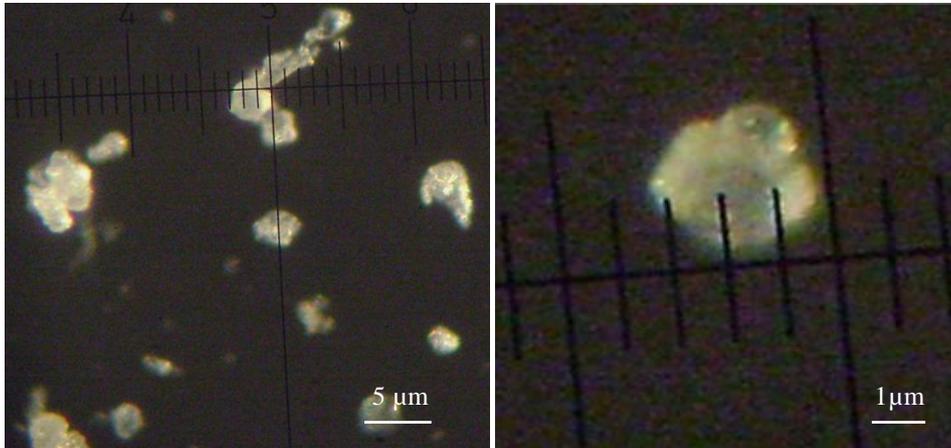


Figura 18. Micropartículas obtenidas por el sistema de atomización inferior (Bottom spray)

La ventaja de la aplicación de técnicas de atomización (spray drying) en microencapsulación es que permite el ajuste de la atomización mediante variaciones de la boquilla, la presión interna de la cámara y la velocidad de la bomba de alimentación (Velocidad de flujo) para obtener partículas de tamaños pequeños o grandes según se requiera (Jin y Custis, 2011). En la figura 19 se muestran fotografías de la partículas obtenidas con los tratamientos 1, 5, 6 y 7, que corresponden a condiciones de presión interna de la cámara de 1 y 3 bares y velocidades de flujo de 4,12 mL/min y 8,61 mL/min, con temperaturas de entrada de 50°C y 60°C. Las micropartículas más homogéneas con respecto a forma y tamaño se obtuvieron con la condición de temperatura de entrada 60°C, velocidad de flujo 4,12 mL/min y presión interna de la cámara de 3 bares, correspondiente al tratamiento 7 (Figura 19D).

En el sistema de atomización inferior la calidad de la formación de la micropartícula depende del flujo de aire o fluidización, ya que una alta velocidad de flujo de aire dada por la presión interna de la cámara, mejora la circulación de las partículas y asegura la transferencia de masa y calor. Por esto, en este sistema, la selección de la presión interna de la cámara es muy importante para asegurar un buen flujo de aire que evite que la suspensión de recubrimiento se deposite en las paredes y que haya pérdidas de material y bajos rendimientos del proceso (Mafadi *et al.* 2003).

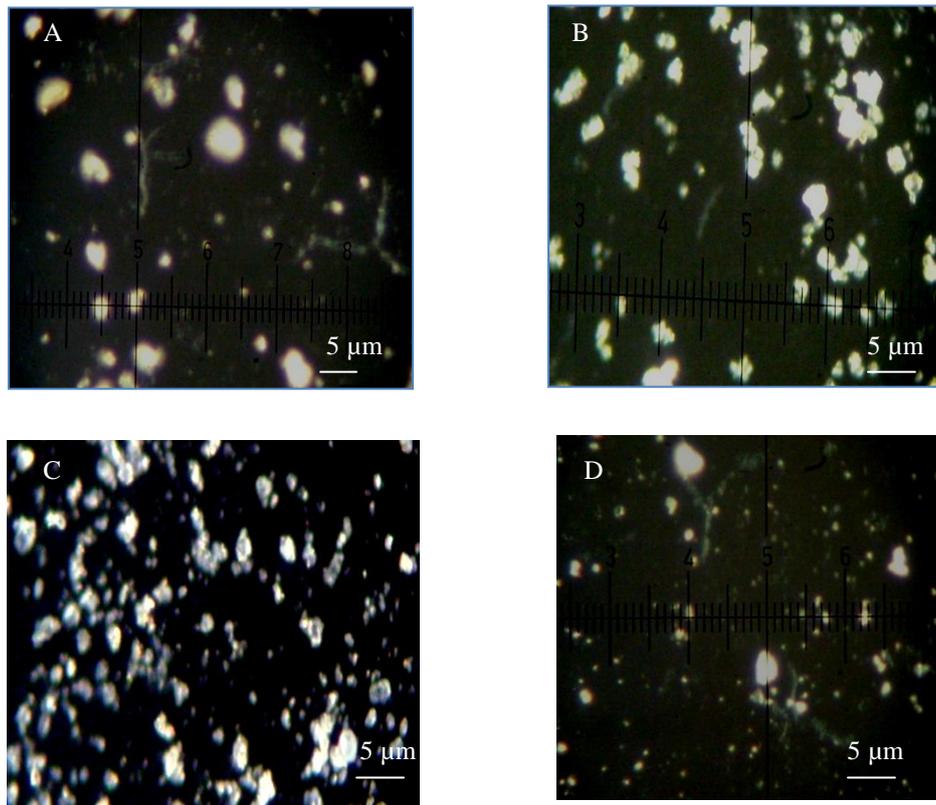


Figura 19. Fotografías de la micropartículas obtenidas por atomización inferior observadas al microscopio de luz con un aumento de 10X. (A) Tratamiento 1 (B) Tratamiento 5 (C) Tratamiento 6 (D) Tratamiento 7

Las altas velocidades que producen el choque de las micropartículas afectan la morfología de mismas. Además, la presencia de zonas muertas cercanas a la pared interna de la cámara de atomización, donde las partículas se mueven muy lentamente, produce micropartículas de tamaño y forma heterogénea (Fitzpatrick *et al.* 2003), fenómeno que se presentó con los tratamientos evaluados en el presente trabajo.

De acuerdo a la calificación de los tratamientos (Tabla 12), se establecen como condiciones a utilizar en el sistema de atomización inferior (Bottom spray) para la suspensión de Eudragit® S100 al 5% utilizando como núcleo talco al 1,5%; una velocidad de flujo de 4,12 mL/min (8 rpm), una presión interna de la cámara entre 1 y 3 bares y una temperatura de entrada de 60°C.

### 1.2.2. Elaboración de micropartículas por atomización superior (Top spray)

Los resultados para cada uno de los tratamientos se presentan en la tabla 13, donde se destaca que los tratamientos 1, 2, 3 y 4 no permitieron la formación de micropartículas.

Para los Tratamientos correspondieron a las codificaciones 1, 2 ,3 y 4. En la Tabla 13 se observa que cuando la temperatura de entrada se ajustó a 50°C, no hubo formación de micropartículas, posiblemente porque aunque la suspensión se dispersó, la evaporación del solvente fue lenta, no se secaron las gotas formando partículas y el material húmedo quedó en la superficie interna de la cámara.

Para los tratamientos correspondientes a las codificaciones 5, 6, 7 y 8. En la Tabla 13 se observa que con una temperatura de entrada de 60°C se presentaron temperaturas internas de la cámara entre 8,9°C y 19,7°C y temperaturas de salida entre 17°C y 22°C. En general, con esta temperatura, el proceso de atomización superior (Top Spray) no fue adecuado, ya que hubo condensación de agua y depósito de la suspensión líquida en la superficie interna de la cámara de atomización.

Tabla 13. Temperatura de entrada, interna y de salida en el proceso de atomización superior

TRATAMIENTOS	FACTORES Y NIVELES				VARIABLES RESPUESTA		
	Flujo (rpm)	Velocidad de flujo (mL/min)	TE (°C)	PI (bar)	TE máx. (°C)	T I C (°C)	T S (°C)
1	8	4,12	50	1	N.D.	N.D.	N.D.
2	16	8,61		1	N.D.	N.D.	N.D.
3	8	4,12		3	N.D.	N.D.	N.D.
4	16	8,61		3	N.D.	N.D.	N.D.
5	8	4,12	60	1	82-98	18,4-19,7	22,0-22,0
6	16	8,61		1	84-84	13,9-13,9	19-19
7	8	4,12		3	115-120	14,1-15,1	21,0-21,0
8	16	8,61		3	88-109	8,9-9,5	17,0-19,0
9	8	4,12	80	3	80-85	33,6-38,3	22-28
10	8	4,12		1	80-85	40,6-51,2	18-35
11	16	8,61		1	105-120	20,8-30	24-25
12	16	8,61		3	91-100	8,7-8,7	15-15

[TE]: temperatura de entrada, [TIC]: temperatura interna de la cámara, [TS]: temperatura de salida, [PI]: presión interna de la cámara, [N.D.]: No determinado por no obtenerse formación de partículas

Con temperaturas de entrada de 80°C se presentaron temperaturas internas de la cámara entre 8,7°C y 40,6°C y de salida entre 15°C y 28°C. Además, al aumentar la velocidad de flujo se produjo condensación de agua y gotas de la suspensión líquida en la superficie de la cámara de atomización, con disminución de la temperatura interna de la cámara y aumento de la temperatura de entrada detectada por el equipo, que alcanzó 120°C, en el tratamiento 11 y 100°C en el tratamiento 12.

Se debe tener en cuenta que en el sistema de atomización superior (Top spray), las variaciones de velocidad del flujo de líquido y de flujo del aire (presión interna de la cámara), determinan el proceso de secado de las gotas

atomizadas en el lecho de aire (Ronsse *et al.* 2009) y que este es más eficiente cuando se trabaja a temperaturas altas (Srivastava y Mishra, 2010).

En el estudio de Horaczek y Viernstein (2004b) encontraron que para una buena actividad y longevidad de los conidios de *Beauveria brongniartii* y *Metarhizium anisopliae* en un proceso de microencapsulación, el parámetro más importante es la temperatura de salida del proceso, sobre la cual influyen la temperatura de entrada y la velocidad de flujo.

En el estudio, el ajuste de los factores velocidad de flujo y la temperatura de entrada, afectó el desarrollo adecuado del proceso de atomización superior. Como se presenta en los ensayos 1, 2, 3, 4, 6 y 8, al trabajar a temperaturas de 50°C y 60°C, y velocidad de flujo de 8,61 mL/min (16 rpm), el proceso de secado no fue eficiente, se presentó humedad en la cámara de atomización, pérdida de material (suspensión) y dificultad en la recuperación del producto.

Tabla 14. Matriz de decisión del proceso de microencapsulación en el sistema de atomización superior (Top Spray)

Tratamiento	Sin Humedad	HT de MPs	MPs de menos de 100 µm	Pérdida de material en filtros	Pérdida de material en Tolva	Facilidad de Recuperación	Total
1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	1	1	0	0	1	1	4
6	0	0	1	1	0	0	2
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	1	1	1	1	1	1	6
10	1	1	1	0	1	1	5
11	0	0	0	0	0	0	0
12	0	1	1	0	0	0	2

[HT de MPs]: homogeneidad en tamaño de micropartículas, [N.D.]: No determinado por no obtenerse formación de partículas. Valor 0: comportamiento no deseado, Valor 1: comportamiento ideal.

En la en la matriz de decisión (Tabla 14), se observa que los tratamientos 9 y 10 presentaron la máxima puntuación y se seleccionaron: una velocidad de flujo de 4,12 mL/minuto, una temperatura de entrada de 80°C y una presión interna de la cámara entre 1 y 3 bares, como los parámetros a evaluar para la selección de las condiciones óptimas del proceso de atomización superior (Top Spray).

Por la tabla 13, se puede observar que en el sistema de atomización superior (Top spray), la velocidad de flujo, la presión interna y la posición de la boquilla en la parte superior de la cámara fueron los parámetros que más influyeron en

el proceso, posiblemente porque éstos determinan la distribución de la temperatura y la humedad de las partículas.

Cabe destacar que para el proceso es importante la correcta preparación de la suspensión de recubrimiento, ya que características como una alta viscosidad y tensión superficial pueden causar pérdidas en el proceso de atomización y variación en la distribución de la temperatura sobre las partículas, afectando su diámetro y el área superficial en la cual ocurre la transferencia de masa de las gotas al medio dispersante (Ronsse *et al.* 2009).

### Caracterización de las micropartículas (Top spray)

Por el proceso de atomización superior (Top Spray), las micropartículas obtenidas fueron de tamaños y formas heterogéneas; se encontraron algunas partículas esféricas (Figura 20). Otros autores, obtuvieron resultados similares, empleado este mismo proceso (Hede *et al.* 2008; Ronsse *et al.* 2008; Ronsse *et al.* 2009; Srivastava y Mishra, 2010).

Sobre la morfología de las micropartículas inciden diferentes factores: la naturaleza del material de encapsulación usado, las condiciones operacionales del secado, la temperatura de entrada, la concentración de sólidos, la velocidad de flujo de aire y la velocidad de alimentación (Li *et al.* 2010).

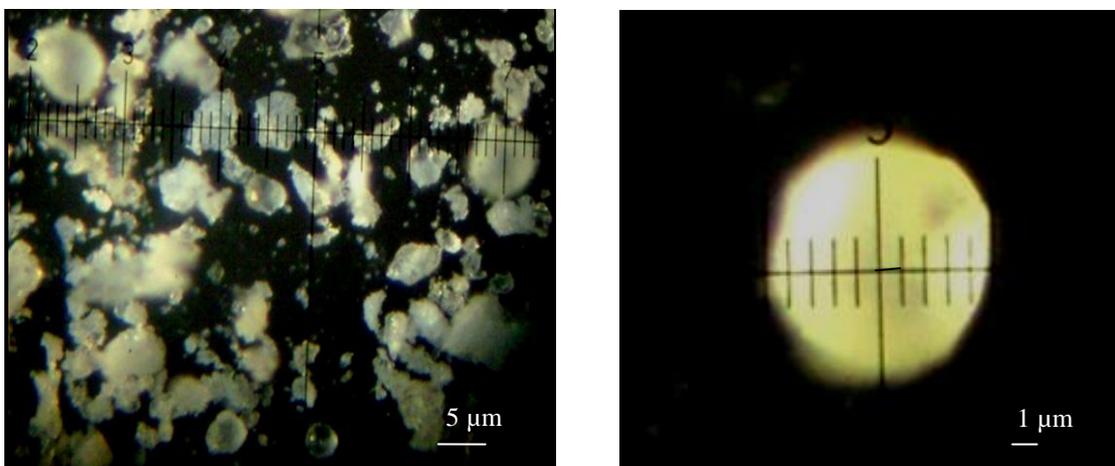


Figura 20. Micropartículas obtenidas por el sistema de atomización superior (Top Spray)

En el experimento por el método Top Spray, el tamaño de las micropartículas obtenidas fue menor a 100 µm, que podría deberse a que la relación entre la boquilla utilizada, la presión interna de la cámara y la velocidad de flujo posiblemente permitieron una adecuada atomización en gotas de tamaños pequeños. En los tratamientos donde se utilizó la mayor presión interna de la cámara (3 bares), y la menor velocidad de flujo (4,12 mL/min) se produjeron

micropartículas más pequeñas, resultados similares a los encontrados por Ronsse *et al.* (2009). Estos autores también determinaron que la velocidad de flujo y la presión interna de la cámara afectan la uniformidad del crecimiento de la capa de recubrimiento. De igual forma, Srivastava y Mishra (2010) concluyeron que la presión interna de la cámara es el parámetro más crítico, seguido por la velocidad de flujo, la concentración de sólidos y la temperatura de entrada.

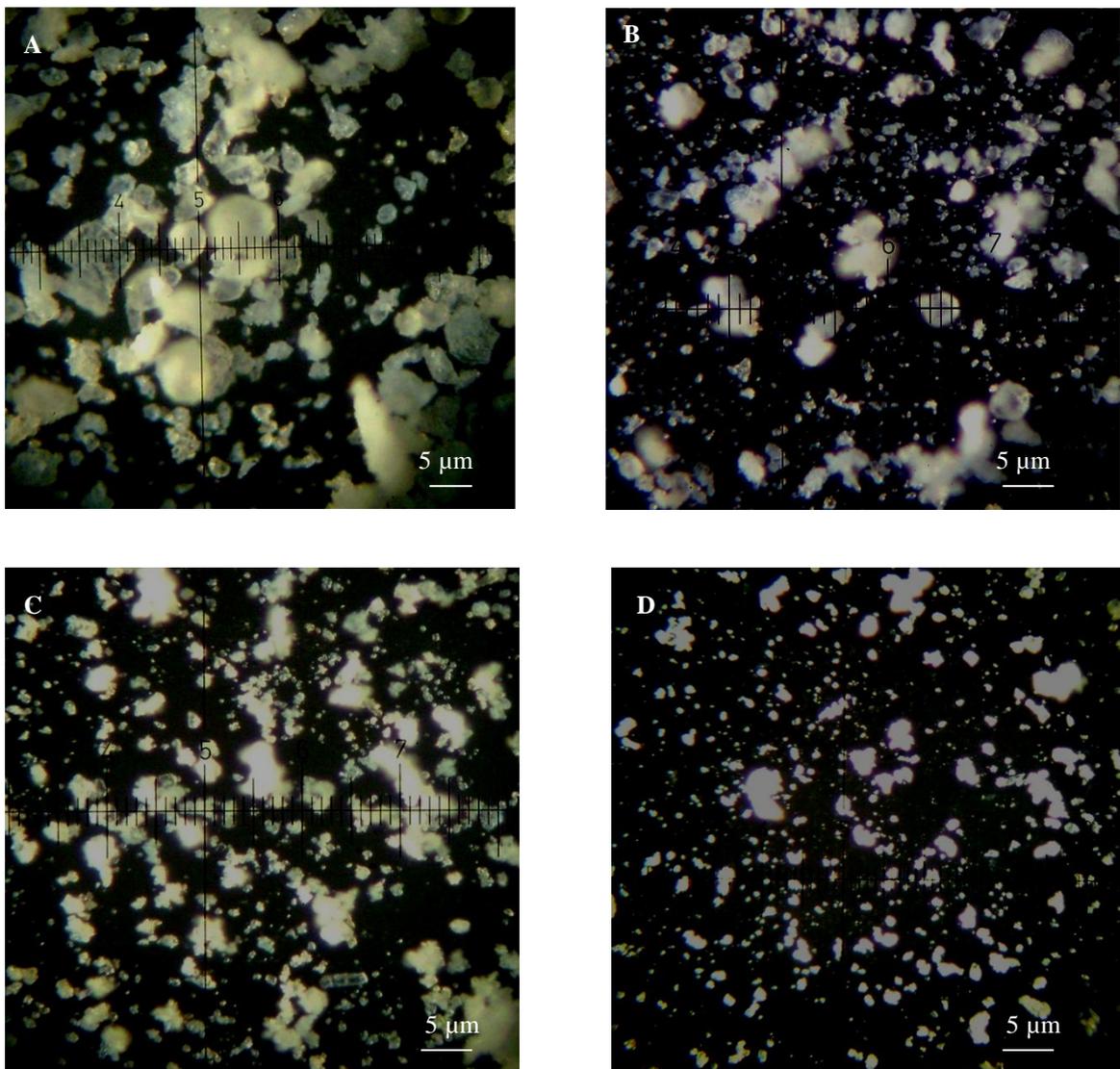


Figura 21. Fotografías de la micropartículas obtenidas con atomización superior observadas al microscopio de luz con un aumento de 10X. (A) Tratamiento 5 (B) Tratamiento 7 (C) Tratamiento 9 (D) Tratamiento 10

Cuando se incrementó la temperatura de entrada disminuyó el tamaño de las micropartículas, como se observa en el tratamiento 10 (Figura 21D), en el cual se utilizó una temperatura de entrada de 80°C en comparación con lo observado en los tratamientos 5 y 7 (Figuras 21A y 21B) en los cuales se utilizó una temperatura de entrada de 60°C. El incremento en la presión interna de la cámara en los tratamientos 7 y 9 produjo una disminución del tamaño de las micropartículas posiblemente porque se generaron gotas de tamaños pequeños, en los cuales se utilizó una presión interna de la cámara de 3 bares, en comparación con lo obtenido en el tratamiento 5 (Figura 21A) para el cual la presión interna fue de 1 bar.

Se establecen como condiciones óptimas a utilizar para el proceso de atomización superior (Top spray): para la suspensión de Eudragit® S100 al 5% utilizando como núcleo talco al 1,5%; una temperatura de entrada de 80°C, una presión interna de la cámara entre 1 y 3 bares y un flujo de 4,12 mL/min (8 rpm). Estas condiciones evitan un exceso de humedad en la cámara, para evitar bajo rendimiento del proceso y compactación de las micropartículas (Cheow *et al.* 2010).

### **1.2.3. Selección del sistema de atomización**

Los resultados para los dos sistemas de atomización ensayados muestran que diferentes condiciones de atomización afectan el producto final. Después de evaluar el efecto de los dos sistemas de atomización en lecho fluido (superior e inferior) en la formación de micropartículas como primera aproximación al desarrollo de un proceso eficiente de microencapsulación, se seleccionó el sistema de atomización superior "Top Spray", por permitir una formación adecuada de micropartículas, las cuales presentaron menor tamaño en comparación con las obtenidas al utilizar atomización inferior (Bottom spray). Las condiciones óptimas que se fijaron para dicho sistema fueron una velocidad de flujo de 4,12 mL/min (8 rpm), una temperatura de entrada de 80°C y una presión interna de la cámara entre 1 y 3 bares.

### **1.3. Selección de las condiciones óptimas para el proceso de microencapsulación por atomización superior**

Para seleccionar los factores óptimos para el proceso de microencapsulación se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos previamente respecto a la estabilidad del virus frente a la temperatura (Tolerancia hasta 180 minutos a temperaturas menores de 50°C) y el sistema seleccionado de atomización superior (Top spray), utilizando una temperatura de entrada de 80°C, una velocidad de flujo de 4,12 mL/min y una presión de aleta como ángulo de apertura de 25°.

Con esta información se procedió a realizar un diseño factorial multinivel que combina diferentes factores y niveles y que fue descrito previamente en la metodología (Numeral 1.3 capítulo III).

En los resultados reportados en la tabla 15 se observa que manteniendo un flujo de 8 rpm (Velocidad de flujo 4,12 ml/min), en la mayoría de los casos la temperatura de entrada no superó el valor establecido en el equipo de 120°C, y por lo tanto la temperatura interna de la cámara de atomización se mantuvo en general en valores inferiores a 50°C, garantizando así la estabilidad del virus.

Tabla 15. Parámetros fisicoquímicos y resultados de las variables de respuesta durante el proceso de microencapsulación

Tratamiento	PI (bares)	Concentración polímero (%)	Concentración núcleo (%)	TIC (°C)	d (µm)	Rendimiento (%)
1	1	2,5	1,0	26,7-48,3	14,77	24,45
2	1	2,5	1,5	18,6-35,6	10,42	30,90
3	1	2,5	2,0	36,1-54,2	12,60	29,98
4	2	2,5	1,0	34,2-50,5	10,84	35,78
5	2	2,5	1,5	15,6-24,0	16,36	51,62
6	2	2,5	2,0	13,9-29,6	15,59	60,72
7	3	2,5	1,0	11,7-25,3	14,0	65,69
8	3	2,5	1,5	13,5-51,7	13,70	54,83
9	3	2,5	2,0	16,8-52,4	16,87	26,47
10	1	5,0	1,0	36,8-52,9	20,50	60,40
11	1	5,0	1,5	34,3-53,1	20,74	75,17
12	1	5,0	2,0	29,8-52,6	20,72	62,32
13	2	5,0	1,0	24,0-47,2	20,26	75,36
14	2	5,0	1,5	32,9- 50,0	19,55	92,46
15	2	5,0	2,0	26,7-47,7	22,20	57,30
16	3	5,0	1,0	24,6- 49,7	19,51	80,81
17	3	5,0	1,5	10,5- 47,7	19,62	78,61
18	3	5,0	2,0	30,6-47,7	19,11	60,86
19	1	7,5	1,0	35,5-48,3	19,28	88,06
20	1	7,5	1,5	35,6- 50,0	18,27	63,08
21	1	7,5	2,0	25,0- 52,7	21,22	62,64
22	2	7,5	1,0	41,5- 50,8	20,52	56,95
23	2	7,5	1,5	28,0- 47,3	18,95	86,51
24	2	7,5	2,0	20,4- 49,2	20,97	86,44
25	3	7,5	1,0	34,0- 53,7	18,99	73,69
26	3	7,5	1,5	26,7- 49,8	20,59	80,60
27	3	7,5	2,0	19,2- 50,7	18,53	49,32

[PI]: presión interna de la cámara, [TIP]: temperatura interna de la cámara, [ $\bar{d}$ ]: diámetro promedio de micropartículas

En todos los tratamientos se obtuvo la formación de partículas de tamaño y forma variable, con diámetros que oscilaron entre 10,42 y 22,20 µm (Tabla 15). Estos valores fueron similares a los obtenidos en diferentes trabajos como en la microencapsulación por atomización de conidios de *Beauveria brongniartii* con

leche descremada (SM) Kollidon y polivinilpirrolidona (PVP K90), trabajo donde se obtuvieron micropartículas con tamaños entre 3 y 20  $\mu\text{m}$  (Horaczek y Viernstein, 2004a), así como en el trabajo en el que se microencapsuló *Bifidobacterium* BB-12 con leche descremada (RSM) y donde se obtuvieron tamaños entre 14,45 y 18,78  $\mu\text{m}$  (Fritzen-Freire *et al.* 2012).

Los menores tamaños promedio se obtuvieron con los tratamientos 2 y 4 con 10,42 y 10,84  $\mu\text{m}$  respectivamente (Tabla 15), tratamientos que involucraron la utilización de la menor concentración de polímero (2,5%), sugiriendo un posible efecto de este factor sobre dicha variable de respuesta.

Al aumentar la concentración de polímero a 5% se obtuvieron tamaños promedio de micropartículas entre 19,11 y 22,20  $\mu\text{m}$ ; así como rendimientos entre el 57,30% en el tratamiento 15 hasta el 92,46% en el tratamiento 14. Es importante destacar que con esta concentración de polímero se obtuvo el mayor tamaño promedio de partículas y el mayor rendimiento. Con la concentración de polímero de 7,5% se obtuvieron tamaños promedio de micropartículas entre 18,27 y 21,22  $\mu\text{m}$ ; así como rendimientos entre el 49,32% en el tratamiento 27 y el 88,06% en el tratamiento 19 (Tabla 15).

### **Tamaño y morfología de las micropartículas**

En la superficie de respuesta obtenida para la variable tamaño partícula (diámetro) como función de la presión y la concentración de polímero (Figura 22A), se observa que la presión no tiene una influencia marcada sobre el tamaño de partícula, mientras que la concentración de polímero sí afectó esta característica, la cual se minimiza cuando este parámetro tiende a -1.

En la superficie de respuesta obtenida para la variable tamaño partícula como función de la presión y la concentración de núcleo (Figura 22B), no se observa ningún efecto marcado de los factores, obteniéndose una superficie casi plana y paralela al eje X, lo cual sugiere que ni la presión, ni la concentración de núcleo influyeron de forma marcada sobre el tamaño de partícula.

En la superficie de respuesta generada para la variable tamaño partícula como función de la concentración de núcleo y la concentración de polímero (Figura 22C), se puede observar de nuevo que la concentración del polímero sí tiene un efecto sobre el tamaño de las partículas, ya que la superficie presenta una inclinación que minimiza la respuesta del diámetro cuando la concentración de polímero tiende a -1. Estos resultados permiten sugerir que el factor que más influye en la respuesta de tamaño promedio de partículas es la concentración de polímero, encontrándose una relación directa entre los dos factores.

En la figura 22D se presenta el diagrama de Pareto que muestra la influencia de los factores evaluados y sus respectivas interacciones sobre el tamaño

promedio de partículas. El diagrama de Pareto muestra la magnitud del efecto y dibuja una línea de referencia que indica el 95% de confianza (Cheow *et al.* 2010).

Según este diagrama, el factor concentración de polímero (B), seguido por la interacción polímero-polímero (B:B), fueron los únicos parámetros que tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la respuesta tamaño de partícula. Esta relación se debe posiblemente a que al utilizar una baja concentración de polímero se forma una capa más delgada que recubre el núcleo y por lo tanto se forman micropartículas más pequeñas, mientras que al utilizar una mayor concentración de polímero la capa de recubrimiento será mayor y por lo tanto las micropartículas serán más grandes (Ronsse *et al.* 2009).

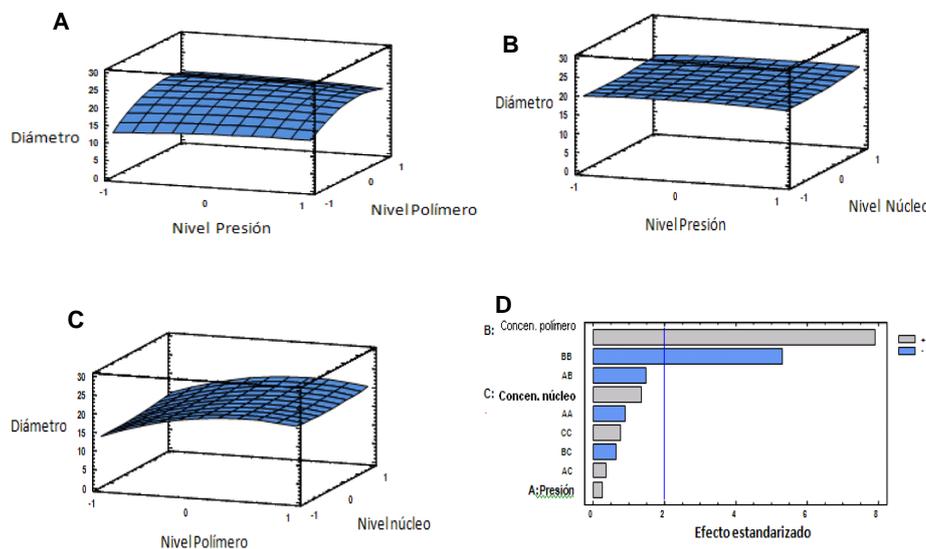


Figura 22. (A), (B) y (C) Superficies de respuesta de los diámetros medios de partícula en función de la presión, concentración de polímero y de núcleo, para la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 (D) Diagrama de Pareto

Resultados similares se presentaron en el trabajo de Villamizar *et al.* (2010), quienes encontraron que la concentración de polímero fue el único factor que influyó significativamente sobre el tamaño de microcápsulas de Eudragit® S100 elaboradas por el método de evaporación de solventes. Motlekar y Youan (2008), también concluyeron según el diagrama de Pareto realizado por ellos que la concentración de polímero fue uno de los factores que afectaron el recubrimiento de las partículas, cuando microencapsularon por atomización heparina con Eudragit. En el trabajo de Tabjer *et al.* (2009) se encontró un

comportamiento similar al utilizar el proceso de atomización, donde tres variables mostraron un efecto directo al tamaño de partícula; la concentración de excipientes dentro de la que se incluye el polímero, la temperatura de entrada, y la velocidad de flujo.

Cheow *et al.* (2010), también observaron mediante un análisis con diagramas de Pareto y de superficies de respuesta, que uno de los parámetros con mayor efecto sobre el diámetro de las micropartículas elaboradas por atomización es la concentración de excipientes. Este mismo comportamiento fue reportado por Shah *et al.* (2011) en un análisis de superficies de respuesta que mostraron que el tamaño de partícula de microesferas de aceclofenaco recubiertas con Eudragit®S100 por atomización fueron altamente dependientes de la relación polímero-fármaco y cuando esta relación se incrementó aumentó también el tamaño de partícula, lo cual se atribuyó al incremento de la viscosidad de la suspensión de recubrimiento que influye en la relación entre la fase dispersa y el medio de dispersión afectando la distribución del tamaño de la partícula.

Teniendo en cuenta las consideraciones establecidas previamente sobre el tamaño de micropartículas para que sean ingeridas por las larvas neonatas de *S. frugiperda* y la garantía que el virus se hubiese microencapsulado, se seleccionó como rango adecuado de tamaño de partículas entre 10 y 40  $\mu\text{m}$  y con este rango se realizó un análisis del efecto de los factores sobre la frecuencia de estos tamaños de partícula.

En la superficie de respuesta obtenida para la frecuencia de tamaño de partícula entre 10 y 40  $\mu\text{m}$ , como función de la presión y la concentración de polímero (Figura 23A), se puede observar que la concentración de polímero maximizó la respuesta cuando dicho factor tendió al nivel cero (5,0%). Por el contrario, la presión no mostró un efecto marcado sobre la frecuencia de estos tamaños.

Al correlacionar la frecuencia de tamaño de partícula entre 10 y 40  $\mu\text{m}$ , como función de la concentración de núcleo y la presión (Figura 23B), se puede observar que ninguno de estos factores tuvo un efecto marcado sobre la variable respuesta.

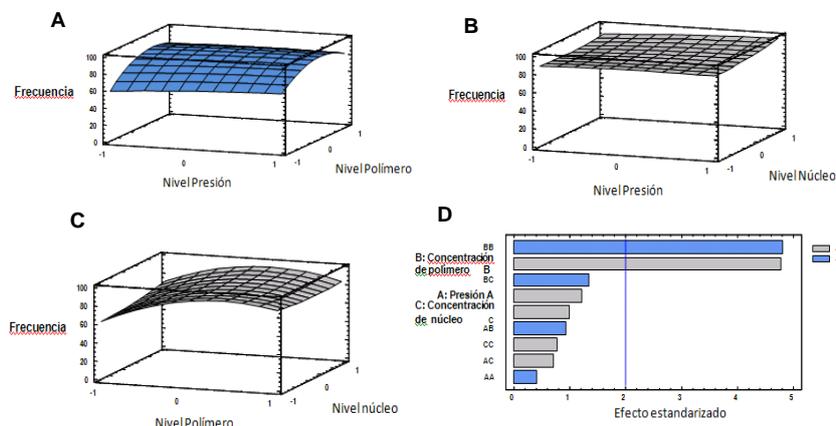


Figura 23. (A), (B) y (C) Superficie de respuesta de la variable frecuencia de tamaño 10 – 40  $\mu\text{m}$  en función de la presión, concentración de polímero y de núcleo, para la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 (D) Diagrama de Pareto

La frecuencia de tamaño de partícula entre 10 y 40  $\mu\text{m}$  como función de la concentración de núcleo y la concentración de polímero (Figura 23C), mostró su máxima respuesta cuando la concentración de polímero osciló entre los niveles 0 y +1 (5,0% y 7,5%, respectivamente), sin mostrarse un efecto marcado de la concentración del núcleo.

En la figura 23D se presenta el diagrama de Pareto que muestra la influencia de los factores evaluados y sus respectivas interacciones con la frecuencia de partículas de tamaño entre 10 y 40  $\mu\text{m}$ . En el diagrama se evidenció, que la interacción polímero-polímero (B:B), y el factor concentración de polímero (B), nuevamente fueron los únicos que tuvieron un efecto significativo sobre la respuesta. De tal manera si este factor se aumenta se obtiene un mayor porcentaje de micropartículas con el tamaño deseado. Esta relación se debe posiblemente a que al utilizar una baja concentración de polímero se forma una capa más delgada que recubre el núcleo y por lo tanto se forman micropartículas más pequeñas, mientras que al utilizar una mayor concentración de polímero la capa de recubrimiento será mayor y por lo tanto las micropartículas serán más grandes.

Las micropartículas obtenidas se analizaron mediante microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido. En algunos tratamientos se observaron partículas independientes con formas regulares (Figuras 24A), y en otros se obtuvieron agregados que se presentaron por la posible coalescencia de las gotas durante el proceso de secado (Figuras 24B).

En cuanto a la estructura, se observaron algunas micropartículas con cavidades u hoyos, que pueden ser atribuidas a la contracción generada en la formación de la partícula durante el proceso de secado por la evaporación rápida (Fritzen-Freire *et al.*2012). También se observó la presencia de contornos irregulares y lisos, que pueden ser debidos a las condiciones del proceso de secado, ya que en el proceso de atomización superior, al incrementarse la presión interna de la cámara se incrementa el flujo de aire de enfriamiento y de secado, lo cual influye en la distribución de la temperatura sobre la partícula afectando la uniformidad del crecimiento de la capa de recubrimiento (Ronsse *et al.* 2009).

En los trabajos de Beck *et al.* 2004; Raffin *et al.* 2006 y Cruz *et al.* 2009 que utilizaron como polímero Eudragit®S100 e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), se obtuvieron por el proceso de atomización micropartículas esféricas con superficies lisas, irregulares y arrugadas y plegadizas. Estas morfologías sugieren que posiblemente se presentó una fuerza irregular de contracción durante el secado de las gotas o que la temperatura de la gota fue menor al punto de ebullición del solvente cuando se formó la capa de la gota, causando la aparición de arrugas (Uva seca) (Dobry *et al.* 2009).

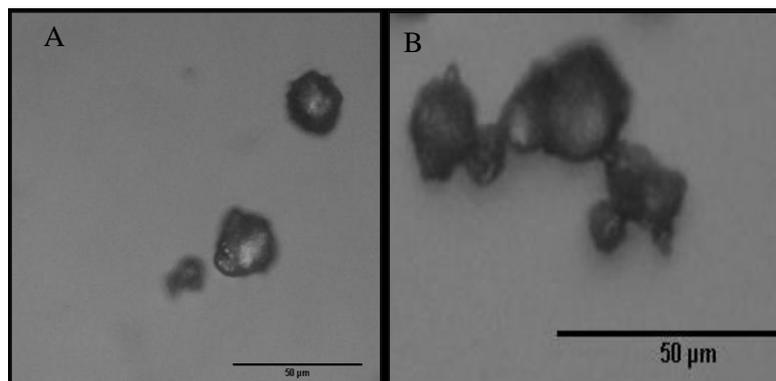


Figura 24. Micropartículas obtenidas por atomización superior observadas por microscopía de luz con un aumento de 40X. Diferentes magnificaciones (A) Tratamiento 5 (B) Tratamiento 14

Con los tratamientos 21 y 26, para los que se utilizó una presión alta de 3 bares y mayor contenido de polímero (7,5%), se obtuvieron micropartículas con una morfología más homogénea y se presentó menor coalescencia, lo que coincide con lo reportado por Motlekar y Youan (2008), cuando microencapsularon heparina por atomización con Eudragit. Los autores demostraron que la concentración de polímero afectó la morfología de las micropartículas y que con una concentración de 9% de polímero se obtuvieron las partículas más homogéneas, posiblemente porque la mayor viscosidad de la suspensión produjo una buena estabilidad de la gota.

## Rendimiento

El rendimiento en general para los veintisiete tratamientos osciló entre 24,45% y 92,46% (Tabla 15), un rango amplio que se encuentra dentro de lo obtenido por otros autores que reportan valores que oscilan entre 31 y 69% (Johansen *et al.* 2000); 72 y 76% (Beck *et al.* 2004); 21,6 y 62,3% (Tajber *et al.* 2009) y 50% y 70% (Li *et al.* 2010). Al comparar los resultados se observa que los valores de rendimiento obtenidos en este trabajo presentan una alta variación, aunque el 76% de los veintisiete tratamientos presentó un rendimiento mayor al 50%.

La figura 25A muestra el análisis de superficie del rendimiento de las micropartículas como función de la presión y la concentración de polímero donde se observa que la mejor respuesta correspondiente al mayor rendimiento se obtuvo cuando la presión osciló entre 0 y 1 y la concentración de polímero tendió hacia el nivel de 0, correspondiente a una concentración del 5%; punto donde se destacó el tratamiento 14 que presentó el mayor rendimiento con un 92,46%.

La figura 25B muestra el rendimiento en función de la presión y la concentración del núcleo, observándose que cuando la presión tiende hacia el nivel +1 (3 bares) y la concentración del núcleo al nivel 0 (2%) se obtiene el mayor rendimiento.

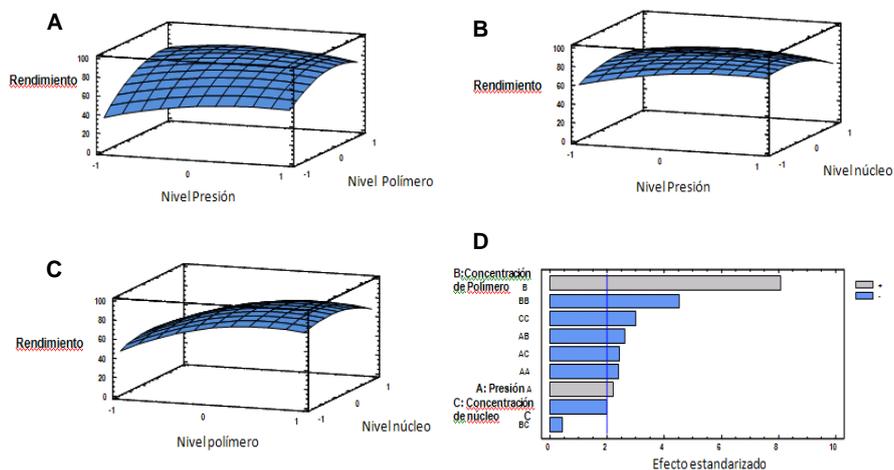


Figura 25. (A), (B) y (C) Superficie de respuesta de la variable rendimiento en función de la presión, concentración de polímero y de núcleo, para la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 (D) Diagrama de Pareto

En la figura 25C se presenta el rendimiento en función de la concentración del polímero y la concentración del núcleo y se observa la máxima respuesta cuando la concentración del polímero tendió al nivel +1 (7,5%) y cuando la concentración del núcleo se acercó al nivel 0 (2%).

El diagrama de Pareto (Figura 25D) mostró claramente la influencia de los factores evaluados y sus respectivas interacciones en la respuesta rendimiento, observándose que el factor concentración de polímero (B) fue el parámetro que tuvo el mayor efecto significativo sobre esta variable de respuesta, seguido por la interacción de los factores polímero-polímero (B:B), núcleo-núcleo (C:C), presión-polímero (A:B), presión-núcleo (A:C), presión-presión (A:A) y el factor presión (A). Según el diagrama el factor concentración de núcleo y la interacción polímero-núcleo (B:C) no tuvieron efecto significativo en la respuesta evaluada.

En el trabajo de Tabjer *et al.* (2009), encontraron que el flujo de aire, la temperatura de entrada y la concentración de excipientes tuvieron efecto positivo sobre el rendimiento, mientras que la velocidad de flujo tuvo un efecto negativo. En el presente trabajo se determinó que el factor que más influyó en el rendimiento fue la concentración del polímero, seguida por interacciones de los factores polímero-núcleo-presión y por el factor presión, coincidiendo este último con lo observado en el trabajo en mención.

Posteriormente, se realizó un análisis multicriterio para determinar los valores óptimos de los factores. El modelo de predicción indicó que los parámetros óptimos (Tabla 16) para el proceso son una presión de 2,23 bares, una concentración de polímero de 6% y una concentración de núcleo de 1,35%, niveles que permitirían optimizar las respuestas con un rendimiento teórico del 87,26% y una frecuencia de tamaño de partícula entre 10 y 40  $\mu\text{m}$  del 91,38%.

Tabla 16. Resultados y valores óptimos del análisis multicriterio

<b>Factor</b>	<b>Valor</b>
Presión (Bar)	2,23
Concentración de polímero (%)	6,00
Concentración de núcleo (%)	1,35
<b>Variable respuesta</b>	<b>Óptimo</b>
Rendimiento (%)	87,26
Frecuencia 10 – 40 $\mu\text{m}$	91,38

Estos valores se utilizaron para realizar la validación del proceso de microencapsulación para el aislamiento nativo de nucleopoliedrovirus de *S.frugiperda* NPV003.

## 2. Validación del proceso de microencapsulación para el aislamiento nativo de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003

Para esta etapa de investigación se procedió a microencapsular el virus, elaborando tres lotes de producto. Para el proceso se utilizó como núcleo el virus purificado y secado en el lecho fluido.

El virus seco utilizado presentó una concentración de  $5,46 \times 10^9$  CI/g, un contenido de humedad del  $3,57 \pm 0,41\%$  y una contaminación microbiana de  $4,73 \times 10^7$  UFC/g. Al comparar estos resultados con los límites permitidos para este tipo de producto sugieren un contenido de humedad del 5% (Jones y Burges, 1998) y de contaminantes microbianos de  $5 \times 10^8$  UFC/g (Jenkins y Grzywacz, 2003), esto permitió concluir que el virus seco presentaba las características adecuadas para su uso como principio activo de un bioplaguicida viral, por lo que se utilizó para el proceso de microencapsulación.

### 2.1. Caracterización de los lotes de micropartículas y del proceso de microencapsulación desarrollado

#### 2.1.1. Tamaño y frecuencia de tamaño demicropartículas del NPV003 de *S. frugiperda*

El tamaño de las micropartículas de los tres lotes estuvo entre 17,64 y 19,47 $\mu\text{m}$ , con un tamaño promedio entre lotes de  $18,84 \pm 8,54 \mu\text{m}$  (Tabla 17). El coeficiente de variación entre lotes fue inferior al 10% (5,49%), lo que demostró que para esta variable existía repetibilidad entre lotes. El valor de tamaño medio de las micropartículas no fue significativamente diferente del valor práctico determinado previamente para estos tratamientos utilizando como núcleo talco ( $23,85 \pm 3,77 \mu\text{m}$ ), lo cual sugiere una repetibilidad en el proceso.

Tabla 17. Tamaño y frecuencia de tamaño de micropartículas del nucleopoliedrovirus NPV003 de *S. frugiperda* con Eudragit® S100 obtenidas por atomización

Lote	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	Frecuencia de tamaño 10-40 $\mu\text{m}$ (%)
1	19,47	81,00
2	19,39	96,00
3	17,64	96,00
Promedio	18,84	91,00
Desviación estándar	1,03	8,66
Valor esperado según modelo matemático	10-40	91,38

El análisis de frecuencias de tamaño de partícula para los tres lotes producidos (Figura 26) mostró que el 91% de las micropartículas presentaron un tamaño

deseado entre 10 y 40  $\mu\text{m}$ , porcentaje cercano al teórico estimado con el modelo matemático (91,38%). Además, se observó repetibilidad para esta variable entre lotes, ya que el coeficiente de variación obtenido fue bajo con un 9,51%. Con esta frecuencia de tamaño obtenida se puede sugerir que las larvas neonatas de *S. frugiperda* van a ingerir estas micropartículas por tener un tamaño menor a su abertura bucal (70  $\mu\text{m}$ ) y se puede garantizar que mínimo el 91% del producto cumple con el tamaño ideal del bioplaguicida.

### 2.1.2. Morfología de las micropartículas

En cuanto a la morfología de las micropartículas, para los tres lotes se presentaron partículas con formas variables y presencia de aglomerados (Figura 27 y Figura 28), posiblemente formados por la coalescencia de las gotas durante el proceso de secado. La aglomeración es el resultado de la formación de un puente líquido entre las partículas húmedas y ocurre si la capacidad de evaporación del lecho es baja (Ronsse *et al.* 2009) o también puede ser debido a la presencia de etanol como solvente, el cual según Yoo *et al.* (2011) puede favorecer la formación de agregados.

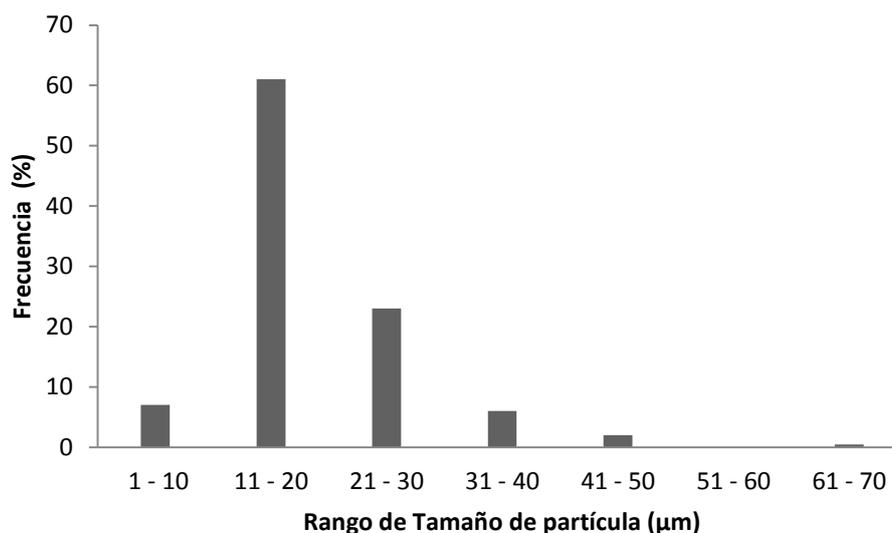


Figura 26. Distribución de rango de frecuencias de tamaños de partícula de los tres lotes obtenidos al microencapsular el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003 con Eudragit® S100

La morfología y tamaño de las partículas obtenidas (10-40 $\mu\text{m}$ ) permite finalmente el diseño de una formulación de aplicación foliar, con facilidad para suspenderse en agua, con una alta adherencia sobre las hojas y sin problemas de taponamiento de boquillas en los equipos de aplicación, además comercialmente estas formulaciones tienen ventajas sobre las formulaciones líquidas por facilidades en su almacenamiento, manejo y mayor estabilidad (Tamez *et al.* 2002). Por otra parte, la porosidad que le aporta el Eudragit®

S100 (Villamizar *et al.* 2010) a las micropartículas y la presencia de superficies irregulares podría favorecer una liberación sostenida del virus, característica ideal para mejorar su persistencia en el campo (Jones y Burges, 1998).

Las diferentes formas de las micropartículas obtenidas permiten sugerir una distribución heterogénea de los componentes de las mismas, como lo reporta Burki *et al.*(2011), quienes estudiaron los efectos de la atomización sobre la morfología de las micropartículas concluyendo que es posible que una distribución diferente de los componentes dentro de la cápsula sea la responsable de las variaciones en la forma. En dicho trabajo también se estableció que la formación de partículas pequeñas se da cuando el secado es rápido, mientras que las partículas grandes se forman cuando el proceso es lento y puede ocasionar que el principio activo se acumule en la superficie produciendo partículas arrugadas.

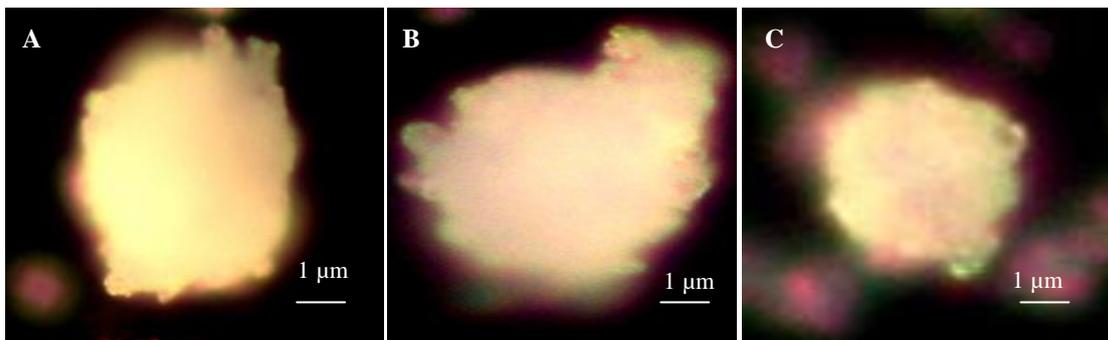


Figura 27. Micropartículas obtenidas al encapsular el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003 con Eudragit® S100 observadas al microscopio de luz con un aumento de 40X. (A) Lote 1, (B) Lote 2 y (C) Lote 3

La tendencia de las micropartículas a arrugarse y a formar pliegues es debida no solo a las fuerzas de contracción durante el secado de las gotas, sino también al incremento de la viscosidad de la suspensión de recubrimiento (Foster y Laetherman, 1995 en: Raffin *et al.* 2006), ya que la viscosidad alta y el contenido de sólidos tienen influencia sobre la formación de la gota y el proceso de secado, requiriéndose más energía para evaporar el agua y consecuentemente hay una disminución de la temperatura de salida produciendo un colapso o rompimiento de la estructura debido a la existencia de una presión de vapor alta en el interior y al alto contenido de humedad residual (Wiggenhorn, 2007), Este efecto pudo haber ocurrido en el proceso realizado en el presente trabajo, donde se puede observar que la superficie en algunos casos fue lisa y en otros con cavidades y pliegues (Figura 28A).

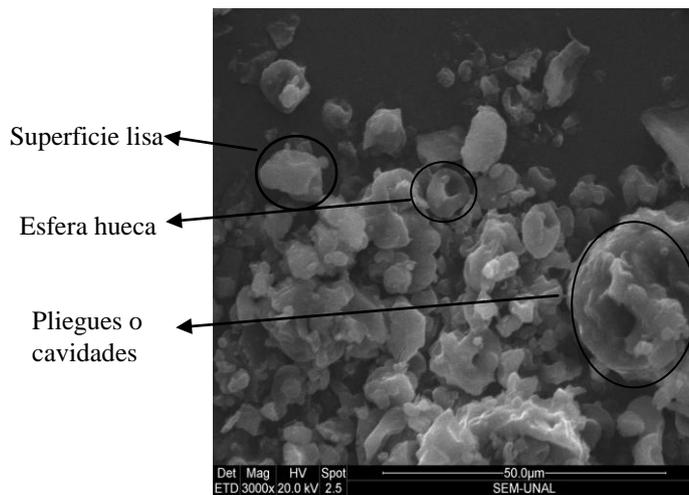


Figura 28. Fotografía de las micropartículas obtenidas al encapsular el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003 con Eudragit® S100 (Lote 2) observadas al microscopio electrónico de barrido

Como lo describió Dobry *et al.* (2009), durante el proceso de secado se pueden presentar diferentes morfologías de las micropartículas formadas en el proceso de atomización. En el caso del secado rápido en caliente, la temperatura de la gota está cercana o por encima del punto de ebullición del solvente cuando la capa de la gota se forma. Esto produce que la presión de vapor en la partícula la proteja de ser inflada cuando se seca, generando una morfología de esfera hueca (Figura 28A). En el caso de secado lento en frío, la temperatura de la gota es menor al punto de ebullición del solvente cuando se forma la capa de la gota, causando en la partícula un colapso de su morfología con hoyos y pliegues (Figura 28A).

Los defectos observados y descritos en la morfología de las micropartículas obtenidas en el presente trabajo también se pueden relacionar con el uso de una mezcla hidroalcohólica como solvente del polímero, ya que se ha reportado que la utilización de un solvente acuoso puede generar morfologías pobres y colapso de la forma esférica (arrugas y pliegues) (Raffin *et al.* 2006; Cruz *et al.* 2009; Alhnan *et al.* 2011), debido a la pérdida de friabilidad de las partículas y a la evaporación prematura de la gota (Ronsse *et al.* 2009).

La formación de agregados esféricos con cavidades se debe a que la evaporación del líquido de la superficie de la gota expone la partícula a la fase de vapor en la interfase líquido-vapor. Como la energía de la superficie en una interfase sólido-vapor es mayor que la de la interfase líquido-vapor, los sólidos migran hacia el centro de la gota para reducir la energía de su superficie, generándose una rápida velocidad de secado convectivo. Durante este secado el tiempo de evaporación del líquido es muy corto y produce una expansión del agua después de la rápida solidificación de la cápsula, lo que resulta en la

formación de hoyos en la superficie. Como resultado de la evaporación, las partículas se endurecen y se ensamblan en si mismas formando una cápsula viscoelástica que se engruesa con el progreso del secado (Raffin *et al.* 2006; Cheow *et al.* 2010).

El polímero utilizado para el recubrimiento Eudragit® S100, es un material que tiene como propiedades el aporte de viscosidad a las suspensiones y por sus características es un polímero que se despliega (hincha) y presenta propiedades de adhesividad (Nikam *et al.* 2011). Esta característica de adhesividad podría estar relacionado con la formación de aglomerados o agregados (Figura 28), los cuales se han observado en otros estudios donde se ha utilizado este polímero para microencapsular por atomización diferentes principios activos como el diclofenac (Beck *et al.* 2004) y la melatonina (Schaffazick *et al.* 2006).

La aglomeración se produce cuando disminuye la fuerza de secado y el recubrimiento de las gotas se seca lentamente dejando una capa húmeda por un largo tiempo sobre la superficie del núcleo, formándose puentes líquidos entre las partículas, que después del secado se convierten en enlaces sólidos que causan la aglomeración (Hede *et al.* 2008; Ronsse *et al.* 2009). La morfología de estos aglomerados depende de la probabilidad de colisión entre partículas y gotas que se están secando, así como de la fuerza del impacto que podría afectar su estructura final haciéndolos más o menos compactos (Turchiulli *et al.* 2011).

En la superficie de las micropartículas obtenidas se observa la presencia de pequeñas partículas que por su morfología poliédrica podrían ser cuerpos de inclusión virales que no fueron microencapsulados o gotas de la suspensión de recubrimiento que quedaron adheridas después del secado (Figura 28B).

### **2.1.3. Contenido de humedad de las micropartículas**

El contenido de humedad de la micropartículas obtenidas por atomización (Spray drying) es un importante indicador de la eficiencia del proceso de secado y de la calidad del producto final. Además, las propiedades de flujo, la tendencia a la aglomeración y la estabilidad del producto son dependientes en gran medida del contenido de agua en el material (Rattes y Olivieria, 2007).

El contenido de humedad de los lotes elaborados varió entre 9,40% y 11,06% con un valor promedio de  $10,38 \pm 0,87\%$  (Tabla 18). El coeficiente de variación entre lotes fue inferior al 10% (8,38%), lo que indica que para esta variable existió repetibilidad entre lotes. Sin embargo las condiciones del proceso de atomización realizado no permitieron alcanzar la humedad recomendada para este tipo de productos, la cual debe ser inferior al 5% (Jones y Burges, 1998).

Tabla 18. Contenido de humedad de las micropartículas del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* con Eudragit® S100

Lote	Contenido de humedad (%)
1	11,06
2	10,67
3	9,40
<b>Promedio</b>	10,38
<b>Desviación estándar</b>	0,87

La humedad excesiva en este tipo de formulaciones puede favorecer la proliferación de bacterias, hongos u otros microorganismos contaminantes (Caballero *et al.* 2001), además puede causar oxidación de los componentes en la formulación y la formación de radicales libres que inactivan el virus (Jones y Burges, 1998). También, como se mencionó previamente puede ser una de las causas de la aglomeración observada en las micropartículas obtenidas en los diferentes lotes elaborados (Figura 28).

Para reducir el contenido de humedad se recomienda mejorar el proceso de atomización ajustando condiciones como la temperatura de entrada y la relación entre el aire de atomización y la velocidad de flujo de la suspensión que alimenta el sistema (Wiggenhorn, 2007), ya que se ha observado que el incremento de la temperatura de entrada facilita la evaporación de polímeros disueltos en medios acuosos y disminuye el contenido de humedad de las micropartículas (Rattes y Oliviera, 2007; Año *et al.* 2011), teniendo en cuenta que para este proceso se debe mantener una temperatura de salida menor a 50°C, para evitar una posible inactivación de este baculovirus (Camacho *et al.* 2013). También se puede utilizar como alternativa un proceso secundario de secado al vacío, el cual ha sido utilizado en procesos de atomización de liposomas disminuyendo el contenido de humedad (Wiggenhorn, 2007).

#### 2.1.4. Contenido residual de solventes

Para los tres lotes evaluados se observó el mismo comportamiento en los cromatogramas obtenidos. El compuesto más abundante fue el patrón interno utilizado (ácido láctico), el cual presentó dos picos, un pico grande con un tiempo de retención de 7,79 minutos y un pico pequeño cuyo tiempo de retención es 12,75 minutos (Figura 29 y Figura 30).

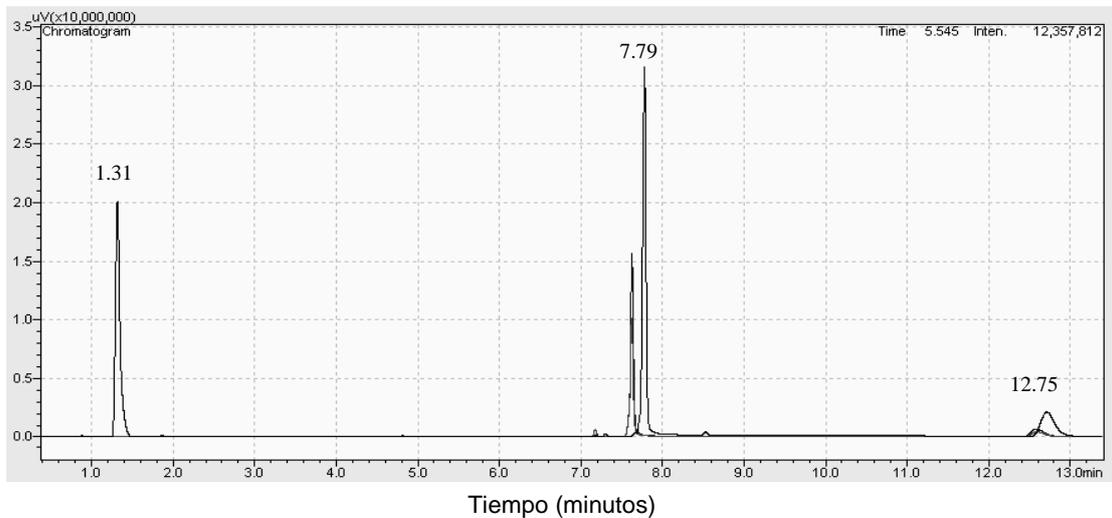


Figura 29. Cromatograma del Lote 3 con adición de etanol. Tiempo de retención aproximado de etanol 1,31 minutos.

Al observar los tres lotes evaluados en la figura 30, se ve la superposición de los 6 cromatogramas obtenidos (dos réplicas por lote), identificándose únicamente la presencia de los picos correspondientes al patrón interno (ácido láctico) (7,79 y 12,75 minutos). Este resultado indica que las micropartículas analizadas no presentan residuos de etanol, solvente utilizado en el proceso de microencapsulación, cuyo tiempo de retención aproximado es de 1,31 minutos, como se puede observar en la figura 29, confirmando la eficiencia del proceso para la remoción del mismo.

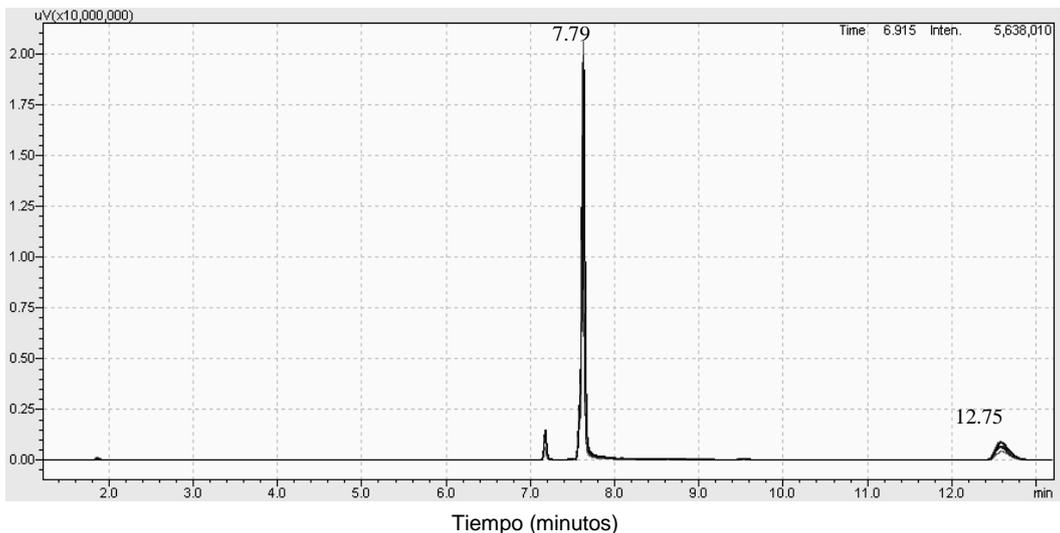


Figura 30. Superposición de los cromatogramas de los Lotes 1, 2 y 3.

La eficiente remoción del etanol durante el proceso de microencapsulación desarrollado para el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda*, permite obtener un producto ideal para su aplicación en la agricultura orgánica limpia o

convencional, ya que no hay presencia de residuos de sustancias químicas, siendo ésta una ventaja adicional para su comercialización como agente de control biológico.

El proceso de atomización para los tres lotes utilizó temperaturas de entrada que fluctuaron entre 80°C y 92°C, con temperaturas de salida que fluctuaron entre 27°C y 45°C durante un tiempo de proceso en promedio de 77 minutos para cada lote. Estas condiciones favorecieron la remoción total del etanol al utilizar una boquilla superior (Top) de 1 mm que forma gotas esféricas pequeñas con mayor área superficial que favorece la evaporación, sumado a que esta posición de la boquilla tiene un efecto mayor sobre la distribución de la temperatura en las micropartículas (Ronsse *et al.* 2009; Suryan *et al.* 2010). Además, este solvente posee una presión de vapor alta de 7,87 kPa (25°C) (Presión de vapor agua 3,17 kPa a 25°C) (Raula *et al.* 2004), propiedad que depende de la temperatura y que es directamente proporcional a la volatilidad de la sustancia (Gennaro, 2003).

A diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, en trabajos similares de microencapsulación con Eudragit® S100 no se ha logrado retirar completamente los solventes orgánicos. Por ejemplo en el trabajo de Villamizar *et al.* (2010) se realizó la microencapsulación de un SfNPV por el método de evaporación de solventes detectándose residuos de n-hexano en las microcápsulas obtenidas, lo cual representa riesgos para el medio ambiente y el ser humano porque es un agente que puede causar efectos tóxicos que pueden ser irreversibles como neurotoxicidad o teratogenicidad (Miller y Gil, 2012).

Para la caracterización del proceso de microencapsulación desarrollado se tuvieron en cuenta el rendimiento expresado en porcentaje (%), la concentración viral (CI/g) y la eficiencia de encapsulación (%).

### **2.1.5. Rendimiento**

El rendimiento promedio para los diferentes lotes de micropartículas (Tabla 19) fue de  $91,20 \pm 6,40\%$ , valor mayor al esperado (87,26%), de acuerdo con el modelo matemático propuesto previamente (Tabla 16). El coeficiente de variación entre lotes fue inferior al 10% (7,01%), lo que demostró que para esta variable existió repetibilidad entre lotes. Por otra parte, se observó que a medida que el contenido de humedad de los lotes es menor, el rendimiento del proceso fue mayor. Es así como se obtuvo un mayor rendimiento del proceso (98,34%) para el lote tres que presentó un contenido de humedad residual del 9,40%.

Este comportamiento puede estar relacionado con una alta pérdida de material en las partes del equipo cuando hay mayor humedad. Un fenómeno similar fue descrito por Tabjer *et al.* (2009), quienes observaron que los mayores

rendimientos (51,5% y 62,3%) se presentaban para los lotes de budesonida/fumarato de formoterol obtenidos por atomización, en los cuales hay un contenido de humedad bajo entre 0,6 y 1,5%.

Las pérdidas de producto durante el proceso fueron tan solo del 9% y podrían encontrarse posiblemente en las partes internas del equipo de lecho fluido (Filtros o paredes de la cámara de atomización).

Tabla 19. Rendimiento del proceso de microencapsulación del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* con Eudragit® S100

Lote	Rendimiento (%)
1	86,00
2	89,25
3	98,34
Promedio	91,20
Desviación estándar	6,40
Valor esperado según modelo matemático	87,26

El rendimiento obtenido en este trabajo fue similar a los resultados encontrados para la microencapsulación de  $\beta$ -galactosidasa utilizando atomizadores a escala de laboratorio (Mini Spray Dryer B-90) en donde se reportan rendimientos que oscilaron entre 60,1% y 93,7%. En este mismo ensayo se observó que bajas temperaturas de entrada y un alto contenido de etanol produjeron un alto rendimiento (Burki *et al.* 2011).

En varios trabajos se han obtenido altos rendimientos en procesos de microencapsulación por atomización con Eudragit® S100, tal es el caso de Beck *et al.* (2004), quienes obtuvieron rendimientos del 72 al 76% para microencapsulados de diclofenac sódico en un Mini Spray Dryer Buchi 190®. Año *et al.* (2011) también obtuvieron altos rendimientos utilizando altas temperaturas en un Büchi 191 Mini Spray Dryer con dos tipos de Eudragit® (87,2± 6,3% para Eudragit® L30D55 y 74,2±5,4% para Eudragit® FS30D).

Las temperaturas de secado juegan un rol importante en el tamaño de las micropartículas obtenidas y en el rendimiento del proceso de atomización (Spray drying), ya que un incremento en la temperatura en la cabeza de la boquilla produce un mayor calentamiento en la cámara de atomización, facilitando una mejor evaporación del polímero y disminuyendo la humedad de la micropartícula, reduciendo la pérdida por la adhesión de la partícula a las paredes de la cámara de atomización y así incrementando el rendimiento final del producto (Esposito *et al.* 2000). La mayor pérdida del producto en este proceso ocurre principalmente por el depósito en las paredes de la cámara de atomización y por la recolección manual del producto (Burki *et al.* 2011).

### 2.1.6. Eficiencia de microencapsulación y concentración de las micropartículas

Teniendo en cuenta que la concentración del principio activo (Virus seco) era de  $5,46 \times 10^9$  CI/g y que para cada lote se utilizó un 1,35% y un 6% de núcleo y de polímero, respectivamente (7,35% de sólidos), la concentración teórica de las micropartículas se estimó en  $1,03 \times 10^9$  CI/g. La concentración experimental de los tres lotes presentó un valor promedio de  $8,73 \times 10^8$  CI/g. Con este valor y la concentración teórica, se calcularon los porcentajes de eficiencia del proceso que se presentan en la tabla 20.

La eficiencia del proceso de microencapsulación varió entre 69,98% y 95,20%, con un valor promedio del  $84,61 \pm 13,09\%$ , que indica que tan solo el 16% del virus quedó fuera de las micropartículas o se perdió durante el proceso de atomización.

El método de atomización utilizado en el presente trabajo mejoró en más de un 30% la eficiencia de encapsulación de este virus, en comparación con el trabajo de Villamizar *et al.* (2010), en el cual se utilizó el método de evaporación de solventes y se obtuvo una eficiencia del 53,43%.

Tabla 20. Eficiencia del proceso de microencapsulación del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* con Eudragit® S100

Lote	Concentración viral (CI/g)	Eficiencia de microencapsulación (%)
1	$9,15 \times 10^8$	88,66
2	$9,82 \times 10^8$	95,20
3	$7,21 \times 10^8$	69,98
Promedio	$8,73 \times 10^8$	84,61
Valor esperado	$1,03 \times 10^9$	---

En otros trabajos donde se utilizó el proceso de atomización se obtuvieron eficiencias similares a las obtenidas en este estudio, por ejemplo Beck *et al.* (2004), reportaron que al microencapsular diclofenac sódico utilizando como polímero Eudragit® S100 obtuvieron eficiencias entre el  $82,16 \pm 2,58\%$  y el  $95,78 \pm 3,68\%$  (NC-MP-1) y Cruz *et al.* (2009), quienes al elaborar micropartículas de alendronato sódico en una mezcla de Eudragit® S100 e Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) obtuvieron eficiencias entre el  $82,2 \pm 1,1\%$  y el  $85,0 \pm 1,3\%$ . La eficiencia de estos procesos inclusive ha llegado a ser del 100%, como lo reportó Raffin *et al.* (2006) para lotes de micropartículas de pantoprazol usando mezclas de Eudragit® S100 y HPMC.

La eficiencia del proceso de microencapsulación depende de muchos factores tales como: el proceso utilizado, los materiales utilizados, la solubilidad de los componentes y su coeficiente de reparto entre otros, siendo este último muy importante, ya que determina la distribución del principio activo entre fases (Solvente del polímero y la fase externa), afectando directamente la cantidad de material encapsulado (Kim *et al.* 2002).

Es así como una alta eficiencia de encapsulación se presenta cuando hay una solidificación rápida de las micropartículas debida a factores como: la baja solubilidad del polímero en un solvente orgánico, la alta solubilidad del solvente orgánico en el agua, una alta concentración del polímero, una baja relación entre la fase dispersa y la fase continua y una rápida velocidad de remoción del solvente, por el contrario una baja eficiencia de encapsulación se presenta cuando hay una solidificación lenta de las micropartículas, afectada por factores como la alta solubilidad del polímero en el solvente orgánico, baja solubilidad del solvente orgánico en agua, baja concentración del polímero, la relación alta entre la fase dispersa y la fase continua y una baja velocidad de remoción del solvente (Yeo y Park, 2004).

De acuerdo a lo descrito previamente se puede concluir que los factores que contribuyeron a la alta eficiencia de encapsulación obtenida durante el desarrollo de este trabajo fueron la alta solubilidad del solvente orgánico en el agua, ya que en este caso se utilizó etanol, siendo un solvente miscible que permite una transferencia de masa alta entre la fase dispersa y la fase continua llevando a una rápida precipitación del polímero (Jyothi *et al.* 2010).

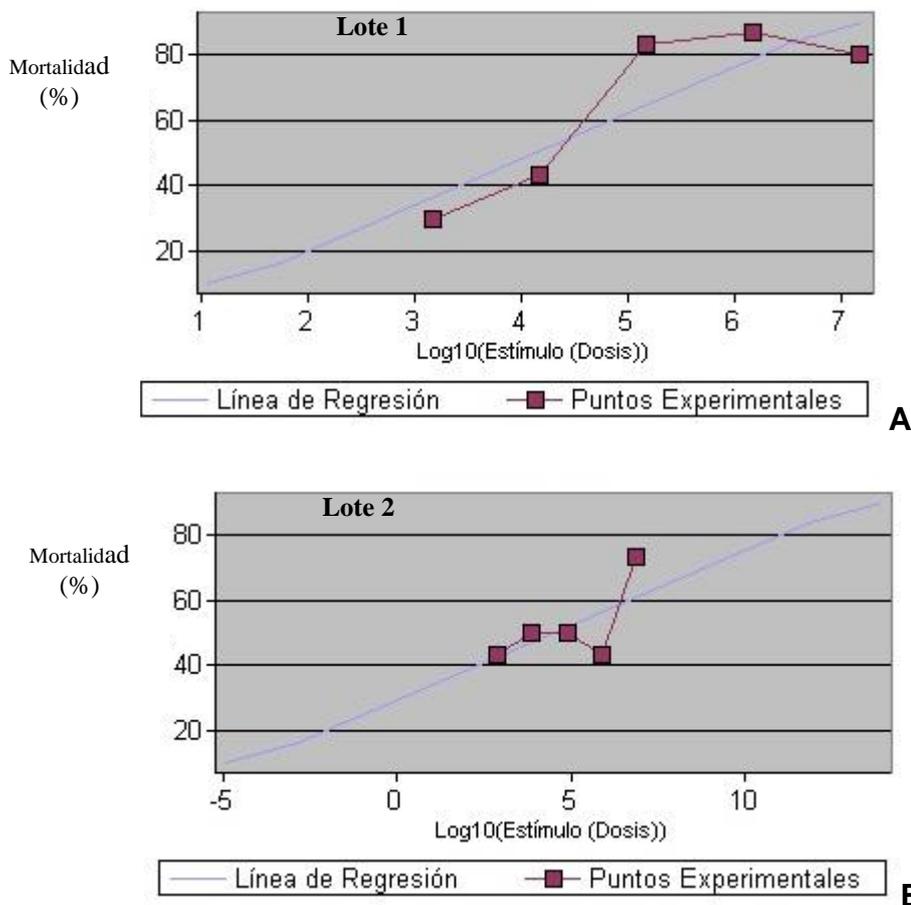
Otro factor a tener en cuenta en la alta eficiencia de encapsulación es la rápida velocidad de remoción del solvente orgánico. El etanol tiene una presión de vapor alta (7,87 kPa a 25°C), razón por la cual es muy usado en procesos de atomización y este solvente se remueve a temperaturas de salida entre 30 – 40°C (Miller y Gil, 2012), las cuales fueron alcanzadas durante el proceso de microencapsulación realizado (27 – 45°C) en 77 minutos.

También, se puede tener en cuenta la baja relación entre la fase dispersa (virus) y la fase continua (solución polimérica), ya que un volumen mayor de la fase continua produce un gradiente de concentración alto del solvente orgánico por su dilución en ésta, causando una rápida solidificación de las micropartículas e incrementando la eficiencia de encapsulación (Jyothi *et al.* 2010), lo cual pudo haberse presentado en el proceso realizado ya que se trabajó con una relación entre fases de 7,35/100.

### 2.1.7. Actividad insecticida de las micropartículas

Las larvas a las cuales se les administró tanto el virus microencapsulado por atomización, como el virus puro secado por lecho fluido presentaron los síntomas típicos de la infección, como es el cambio en el color que al inicio fue rosado claro y posteriormente cambió a pardo oscuro (código 7588u, página 26, Escala Pantone) (Pantone, 2011). Las larvas tendieron a moverse hacia las paredes y tapas de los recipientes, donde su tegumento se tornó frágil y al romperse se liberó un fluido de color pardo oscuro, correspondiente en su mayoría a los cuerpos de inclusión de la progenie viral. Este comportamiento ha sido observado en otros trabajos como el de Villamizar *et al.* (2010), quienes evaluaron el efecto de micropartículas de nucleopoliedrovirus NPV001 sobre larvas neonatas de *S. frugiperda*.

En la figura 31 se presentan las líneas de regresión calculadas mediante el análisis probit, obtenidas al correlacionar los resultados de dosis y mortalidad de larvas al evaluar los tres lotes de micropartículas y el virus seco sin microencapsular (Anexo 2).



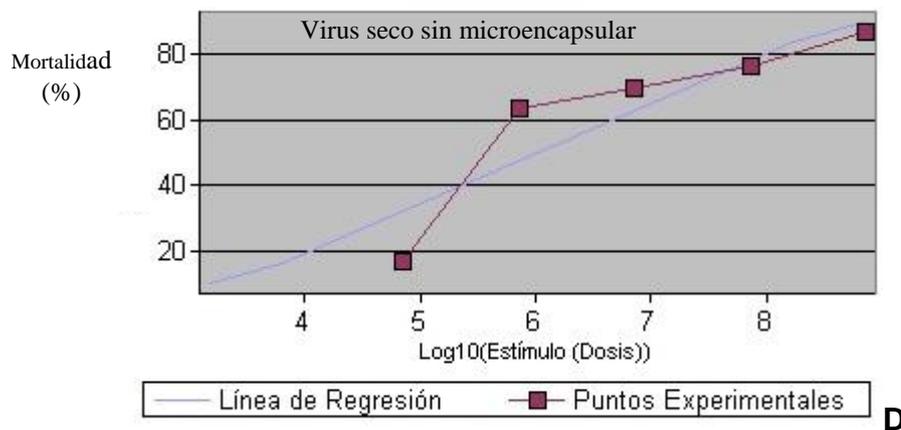
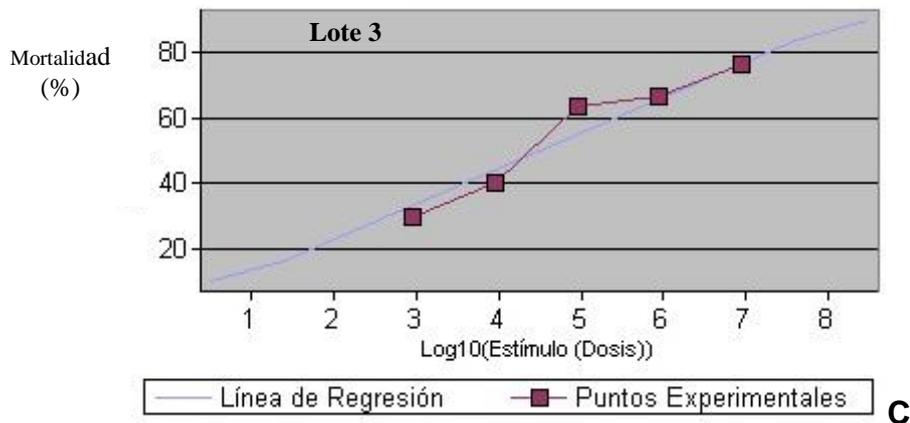


Figura 31. Líneas de regresión obtenidas en la evaluación dosis mortalidad del aislamiento NPV003 de nucleopoliedrovirus sobre larvas neonatas de *S. frugiperda* (A) Lote 1 (B) Lote2 (C) Lote 3 (D) Virus seco sin microencapsular

La concentración letal media obtenida para los lotes del virus microencapsulado por atomización fue en promedio de  $2,5 \times 10^4$  CI/mL, (Tabla 21). Al comparar los límites fiduciales (95%) obtenidos para la  $CL_{50}$  de cada lote, se observa que estos se traslapan, sugiriéndose que no existen diferencias significativas entre la patogenicidad de los tres lotes de virus microencapsulado (Anexo 2). Este resultado indica que existe repetibilidad en el proceso empleado para la microencapsulación de este virus con Eudragit® S100 por el método de atomización desarrollado en el presente trabajo.

Tabla 21. Concentración letal media del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003 microencapsulado con Eudragit®S100 por atomización

Lote de virus microencapsulado	CL <sub>50</sub> (CI/mL)	Límites de confianza (CI/mL) 95%		Nivel de p	Heterogeneidad $\chi^2$
		Inferior	Superior		
Lote 1	1,3 x 10 <sup>4</sup>	2,8 x 10 <sup>2</sup>	6,4 x 10 <sup>5</sup>	0,53	2,19
Lote 2	3,1 x 10 <sup>4</sup>	9,1 x 10 <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	0,63	1,70
Lote 3	3,1 x 10 <sup>4</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	0,94	0,39
Promedio Lotes	2,5 x 10 <sup>4</sup>	1,7 x 10 <sup>3</sup>	5,9 x 10 <sup>5</sup>	0,70	1,42

En la Tabla 22 se presentan las concentraciones letales medias obtenidas para el virus microencapsulado por atomización, el virus sin microencapsular pero secado por atomización en lecho fluido, utilizado como principio activo de las micropartículas y una suspensión de este virus puro que no fue sometido a ningún proceso de secado.

La concentración letal media del virus microencapsulado fue menor a la obtenida para el virus seco sin microencapsular (1,2x10<sup>6</sup>CI/mL) y a la reportada por Gómez *et al.* (2010) para una suspensión de virus puro de este aislamiento viral. Sin embargo, al comparar los límites fiduciales (95%), se observa que no existen diferencias significativas entre las CL<sub>50</sub> de los tres tratamientos, lo que sugiere que todos tienen la misma patogenicidad. A partir de este resultado se puede concluir que el proceso de microencapsulación por atomización con Eudragit® S100 no afectó la actividad insecticida de los cuerpos de inclusión virales.

Tabla 22. Concentraciones letales medias del virus microencapsulado, el virus seco sin microencapsular y el virus puro sin secar.

Tratamiento	CL <sub>50</sub> (CI/mL)	Límites de confianza (CI/mL) 95%		Nivel de p	Heterogeneidad $\chi^2$
		Inferior	Superior		
Virus microencapsulado	2,5 x 10 <sup>4</sup>	1,7 x 10 <sup>3</sup>	5,9 x 10 <sup>5</sup>	0,70	1,42
Virus seco sin microencapsular	1,2 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>	3,1 x 10 <sup>6</sup>	0,30	3,64
Suspensión de virus puro (Gómez <i>et al.</i> 2010)	2,3 x 10 <sup>5</sup>	5,4 x 10 <sup>4</sup>	4,7 x 10 <sup>6</sup>	0,25	4,72

Un comportamiento similar obtuvo Behle *et al.* (2003), durante la encapsulación del nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* AnafaMNPV con lignina por el método de atomización, no encontrando cambios en la actividad insecticida del virus antes y después de formular.

Durante el proceso de atomización superior de los tres lotes, la temperatura interna presentó un valor promedio de 42,15°C y teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente sobre el efecto de la temperatura en la eficacia del aislamiento viral NPV003 (Figura 7), se puede concluir que esta temperatura no afectó la actividad insecticida del virus, ya que durante todo el proceso la temperatura nunca superó los 50°C.

El proceso de microencapsulación por atomización se ha utilizado para otros baculovirus, ya que la formación de microcápsulas sirve para enmascarar la presencia del agente viral mientras pequeñas cantidades de éste son ingeridas (Winder *et al.* 2003) y en algunos casos puede mejorar la actividad insecticida. Por ejemplo en el trabajo de Tamez *et al.* (2002), se obtuvo una mayor actividad insecticida con las formulaciones a base del nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* elaborado por atomización utilizando lignina, con las cuales se alcanzaron mortalidades entre el 68,8% y el 96,6% frente al virus sin formular con un 60,0%. Arthurs *et al.* (2006) también obtuvieron mayor actividad insecticida con las formulaciones elaboradas por atomización, a base del granulovirus de *Cydia pomonella*, con mortalidades entre el 92% y el 93,6% frente al virus sin formular (67,2%).

Para microencapsular el aislamiento viral NPV003 se utilizó Eudragit® S100 como polímero de recubrimiento, el cual fue seleccionado basado en estudios previos donde se microencapsuló otro aislamiento de este virus codificado como NPV001 utilizando el método de evaporación de solventes. En dicho trabajo, la encapsulación no afectó la patogenicidad viral al igual que se observó en el presente estudio, adicionalmente dicha formulación mejoró considerablemente la fotoestabilidad de las partículas virales (Villamizar *et al.* 2010).

Una característica muy importante que tiene el Eudragit® S100 es su mucoadhesividad, propiedad que incrementa la absorción de los fármacos formulados con este polímero. El Eudragit® S100 es un polímero hidrófobo que tiene una gran afinidad por las membranas lipídicas y cuando las micropartículas se encuentran en el medio adecuado se inicia el hinchamiento del polímero pH dependiente, éstas pasan de un estado sólido a un estado de gel, que favorece la adherencia sobre las mucosas (Wang y Zhang, 2012). Esta propiedad podría ser una ventaja en formulaciones de baculovirus utilizados como insecticidas, ya que sí las micropartículas se adhieren a la mucosa intestinal de la larva, podrían realizar una liberación sostenida y no permitir la eliminación de los cuerpos de inclusión en las heces; considerando que un mecanismo de defensa del insecto frente a la infección es el aumento del peristaltismo (Caballero *et al.* 2001).

Como la CL<sub>50</sub> de los tres lotes elaborados fue igual, se utilizó una mezcla de estos para la determinación de la actividad insecticida en invernadero y para la selección de la dosis mínima efectiva del virus microencapsulado.

### 3. Determinación de la actividad insecticida en invernadero y la fotoestabilidad del virus microencapsulado por atomización

#### 3.1. Fotoestabilidad del virus microencapsulado por atomización

Los resultados obtenidos para los lotes del virus microencapsulado y el virus sin microencapsular secado por atomización se presentan en la Figura 32.

En general se puede observar que para todos los tratamientos hubo una disminución en el porcentaje de eficacia, a medida que aumentó el tiempo de exposición. Este resultado indica que la radiación UVB (302 nm) afectó negativamente el virus formulado y sin formular, pero el efecto fue más drástico sobre las partículas virales sin microencapsular.

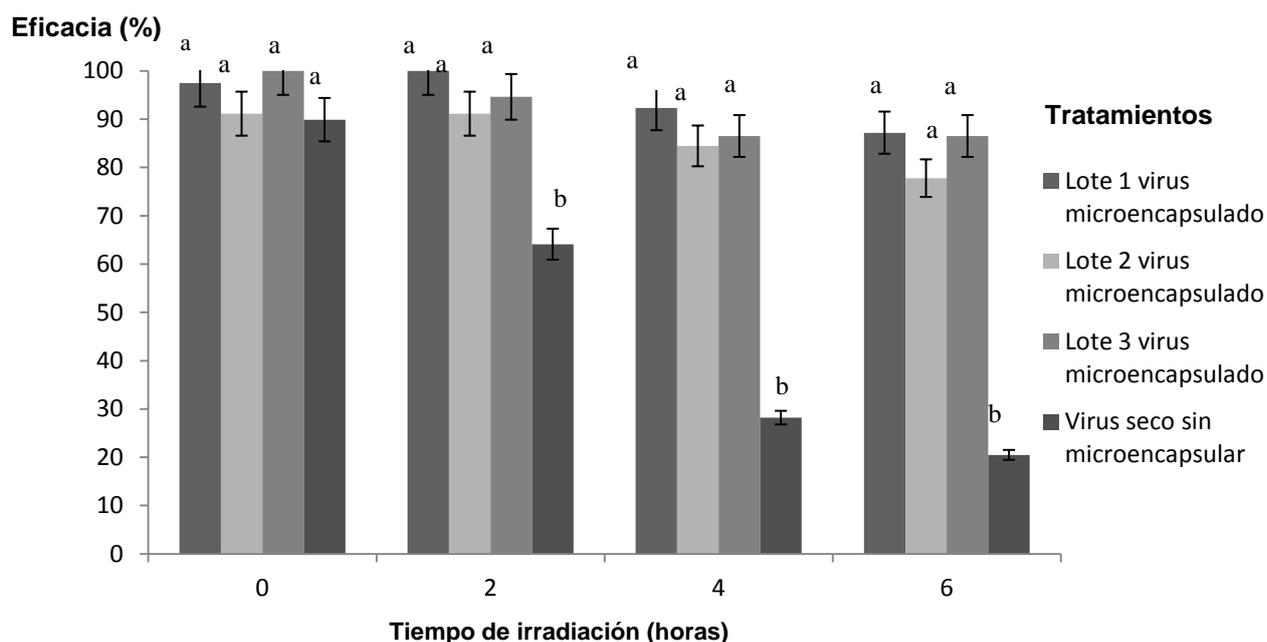


Figura 32. Efecto de la radiación UVB sobre la eficacia del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003 microencapsulado con Eudragit® S100 por atomización. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes según prueba DMS (95%).

La eficacia inicial del virus seco sin irradiar fue del 89,74% y después de 6 horas la irradiación se redujo al 20,51%. Los lotes de micropartículas del virus presentaron una eficacia del 97,44%, 91,11% y 100%, para el lote 1, lote 2 y lote 3 respectivamente, valores que se redujeron durante la exposición a la luz

UVB, hasta obtener el 87,18% para el lote 1, el 77,77% para el lote 2 y el 86,49% para el lote 3 después de 6 horas de exposición (Tabla 23).

Las eficacias obtenidas para los tres lotes del virus microencapsulado y para el virus seco sin microencapsular no presentaron diferencias significativas entre sí (Anexo 3) en el tiempo de exposición correspondiente a 0 horas ( $F=2.03$ ,  $gl=3$ ;  $p= 0,1879$ ). A partir del tiempo de exposición de 2 horas se observaron diferencias significativas entre las eficacias de los lotes microencapsulados y la eficacia del virus seco sin microencapsular ( $F=21.12$ ,  $gl=3$ ;  $p= 0,0004$ ) comportamiento evidenciado también a las 4 ( $F=31.89$ ,  $gl=3$ ;  $p< 0,0001$ ) y 6 horas de exposición ( $F=22.6$ ,  $gl=3$ ;  $p= 0,0003$ ) con una inactivación del virus sin formular del 69% y del 77%, respectivamente. Este resultado indica que el proceso de microencapsulación por atomización desarrollado en este trabajo fotoestabilizó las partículas virales.

En la tabla 23 se presenta el resumen de los resultados de las variables estimadas en el estudio de fotoestabilidad, donde se observa que la inactivación después de 6 horas de irradiación osciló entre el 10% y el 17% para el virus microencapsulado, valores que fueron significativamente menores ( $F= 33,70$ ;  $gl= 3$ ;  $p<0.0001$ ) que el valor de inactivación obtenido para el virus sin microencapsular del 77%. Este resultado confirma el efecto protector de la formulación sobre las partículas virales, posiblemente porque el polímero utilizado como recubrimiento (Eudragit®S100) actúa bloqueando el paso de la radiación, característica importante en el diseño de formulaciones microencapsuladas para los baculovirus (Winder *et al.* 2003). Cabe destacar que durante el proceso de preparación de la suspensión viral se adicionó silicato de magnesio, diluyente que posiblemente también contribuyó a la protección actuando como una barrera física.

La inactivación presentada por el aislamiento viral NPV003 microencapsulado en el presente estudio fue en promedio del 8,67% después de 4 horas de exposición a la luz UVB (302 nm), resultado similar al obtenido por Villamizar *et al.* (2010), quienes microencapsularon otro aislamiento de este virus (NPV001) con Eudragit® S100 por el método de evaporación de solventes y encontraron una inactivación del 13% después de 4 horas de exposición a una lámpara Repti Glo 8.0 la cual simula la radiación solar UV (33% de UVA y 8% de UVA) lo que confirma la eficiencia fotoestabilizadora de la microencapsulación con este polímero, independientemente del método de encapsulación utilizado.

La radiación UVB empleada en el presente estudio está en la franja del espectro ultravioleta con más energía que tiene la propiedad de penetrar la biosfera, aunque es absorbida en parte por el ozono atmosférico (Niegel y Dylan 2003; Villamizar *et al.* 2009). Esta radiación es absorbida por muchas moléculas biológicas incluyendo macromoléculas como el ADN, provocando

lesiones directas debido a la formación de fotoproductos tales como dímeros de pirimidinas (Aparición de enlaces covalentes entre bases pirimidínicas adyacentes: citosina-citosina o citosina- tiamina), hidratos de pirimidina y entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas (Diffey 1991 en: Villamizar *et al.* 2009). La formación de dímeros de pirimidina, impide la replicación del ADN y la consecuente formación de nuevos viriones (Burges, 1998).

Tabla 23. Eficacia (%), actividad original remanente (%) e inactivación (%) de los lotes microencapsulados y del aislamiento viral NPV003 seco sin microencapsular

Tiempo (h)	Tratamiento (h)	Eficacia (%)	OAR (%)	Inactivación (%)
0	Lote 1	97a	100a	0a
	Lote 2	91a	100a	0a
	Lote 3	100a	100a	0a
	Virus sin microencapsular	89a	100a	0a
2	Lote 1	100a	100a	0b
	Lote 2	91a	94a	6b
	Lote 3	94a	93a	5b
	Virus sin microencapsular	64b	71b	28a
4	Lote 1	92a	95a	5b
	Lote 2	84a	92a	8b
	Lote 3	86a	86a	13b
	Virus sin microencapsular	28b	31b	69 <sup>a</sup>
6	Lote 1	87a	89a	10b
	Lote 2	77a	83a	17b
	Lote 3	86a	86a	13b
	Virus sin microencapsular	20b	23b	77a

Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes según prueba DMS (95%).

Varios estudios han demostrado el efecto deletéreo de la radiación ultravioleta tipo B sobre la viabilidad de los baculovirus, por ejemplo, Villamizar *et al.* (2009), determinaron la susceptibilidad de un nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV001a las radiaciones ultravioleta monocromáticas UVA, UVB y UVC, para lo cual cinco concentraciones de virus purificado fueron expuestas a cada tipo de radiación UV durante diferentes tiempos por un máximo de una hora. Los autores observaron un efecto negativo de los tres tipos de radiación sobre la actividad insecticida del virus, siendo éste mayor al aumentar el tiempo de exposición y la energía de la radiación UV.

La radiación ultravioleta del sol es el factor que tiene mayor efecto negativo sobre la actividad de los baculovirus en el campo (Lacey y Arthurs, 2005), por lo que generalmente se recomienda incluir en la formulación de los bioinsecticidas una o más sustancias fotoprotectoras (Killick y Warden 1991 en: Caballero *et al.* 2009). Dentro de dichas sustancias se han probado diferentes tipos de compuestos, destacándose los abrillantadores ópticos (Okuno *et al.* 2003; Tamez *et al.* 2006; Lasa *et al.* 2007; Ibargutxi *et al.* 2008; Caballero *et al.* 2009), sustancias que 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).

Una adecuada formulación permite mejorar la fotoestabilidad de los baculovirus, como lo demostró Chaparro *et al.* (2010), quienes evaluaron dos formulaciones a base del granulovirus de *P. operculella*, las cuales fueron irradiadas con luz ultravioleta. En este trabajo se determinó que las formulaciones protegieron eficientemente al virus del efecto de la radiación, obteniéndose mortalidades del 60% después de 10 horas de exposición para un concentrado emulsionable, del 46,6% para un granulado dispersable y del 23,3% para el virus sin formular.

En otro trabajo se comprobó la estabilidad y la persistencia de dos formulaciones polvo mojable (WP) y emulsión oleosa (EO) de AgMNPV desarrolladas por el Instituto Biológico y la Escuela Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", de la Universidad de São Paulo, Brasil. Las formulaciones fueron mantenidas en condiciones ambientales y expuestas a radiación ultravioleta en el laboratorio y a radiación solar en el campo. No se presentaron diferencias significativas entre las dos formulaciones cuando se expusieron a la luz ultravioleta, observándose que ambas formulaciones protegieron el virus ya que se obtuvieron mortalidades del 37%, en comparación con la obtenida con el virus no formulado que fue del 19%. Bajo condiciones de campo, la formulación EO aumentó la persistencia viral, con más del 60% de la actividad original presente después de 14 días de aplicación (Filho *et al.* 2001).

Otros protectores solares son los derivados de la lignina, con los cuales se han alcanzado niveles de protección de 421 días bajo condiciones de campo (Hamed *et al.* 2004 en: Fenalce, 2009). La Lignina es un polímero abundante encontrado en las plantas vasculares que es conocido por absorber la luz visible (Arthurs *et al.* 2006). Tamez *et al.* (2000), demostraron la fotoestabilidad de formulaciones de nucleopoliedrovirus de *A. falcifera* AfMNPV preparadas con lignina por atomización, mostrando que estas formulaciones presentaron mayor actividad residual después de la exposición a un simulador de luz solar que las formulaciones sin lignina, con mortalidades entre el 77% y 96%, en comparación con el virus sin formular (65% de mortalidad).

Arthurs *et al.* (2006) también evaluaron formulaciones encapsuladas por atomización para el granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV), pero el polímero empleado en dicho trabajo fue lignina. Los resultados obtenidos mostraron que las formulaciones protegieron el virus de la radiación solar simulada cuando fueron aplicadas a una proporción alta de  $3 \times 10^{10}$  CI/L. De igual forma Behle y Popham, (2012), observaron que las formulaciones encapsuladas con lignina por atomización de dos tipos de baculovirus Sf3 y 3AP2 aislados de *S. frugiperda*, presentaron una actividad residual remanente (OAR)  $\geq$

65% cuando se expusieron a luz solar simulada en el laboratorio, comparada con una actividad residual remanente (OAR) < 6% para el virus sin formular.

### 3.2. Selección de la dosis mínima efectiva del virus microencapsulado por atomización bajo condiciones de invernadero

Dos días después de la aplicación de los tratamientos se evidenció el daño causado por la plaga, el cual fue menor en los tratamientos en comparación con el testigo (Figura 33B). El principal daño causado por *S. frugiperda* ocurrió sobre las hojas del cogollo, siendo éste masivo en las plantas no tratadas con el virus, en las cuales se observaron excrementos abundantes y frescos del insecto, indicativo de que las larvas estaban vivas (testigo) (Figura 33A).

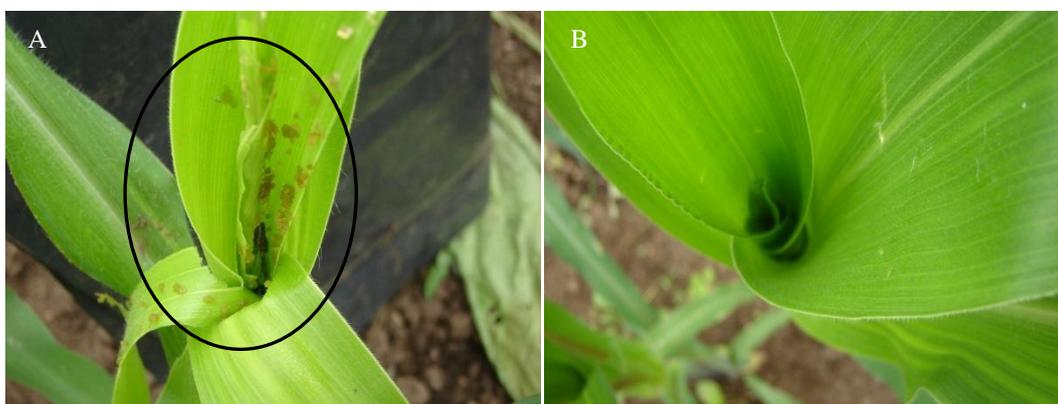


Figura 33. Daño fresco producido por *S. frugiperda* en plantas de maíz. (A) Planta no tratada (B) Planta con tratamiento viral

Las larvas de *S. frugiperda* hacen raspaduras sobre las partes tiernas de las hojas, que posteriormente aparecen como pequeñas áreas translúcidas; una vez que la larva alcanza cierto estado de desarrollo, empieza a comer follaje perforando el cogollo que al desplegarse muestra en las hojas una hilera regular de perforaciones a través de la lámina o bien áreas alargadas comidas. En esta fase es característico observar los excrementos de la larva (Negrete y Morales, 2003).

Larvas con signos de infección como cambio de color de rosa a pardo oscuro (código 7588u, página 26, Escala Pantone)(Pantone, 2011), reducción en la alimentación y movilidad (Moscardi, 1999) fueron observadas únicamente en plantas con tratamiento viral (Figura 34B y 34C). Las larvas enfermas presentaron un tegumento frágil, que al romperse liberó un fluido de color pardo oscuro, que corresponde principalmente a los CIs virales (Caballero *et al.* 2001).

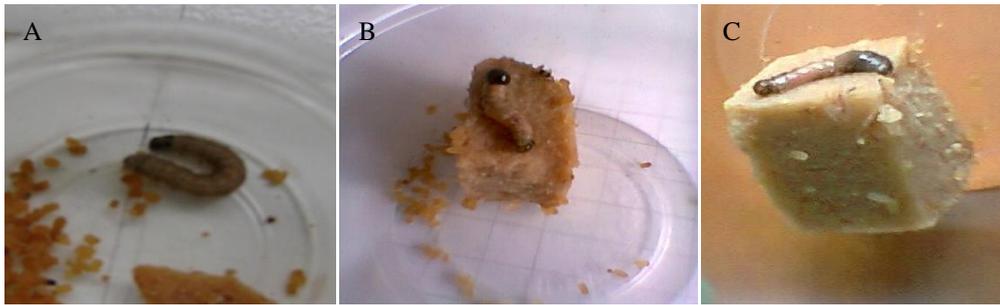


Figura 34. Larvas de *S. frugiperda* tomadas de las plantas de maíz. (A) Planta no tratada (B) y (C) Planta con tratamiento viral

El producto microencapsulado por atomización en sus diferentes dosis presentó valores de eficacias mayores al 90% (Tabla 24), en comparación con el bioplaguicida convencional formulado por el método de evaporación de solventes con una eficacia del 87,5%.

Tabla 24. Eficacia del virus microencapsulado por atomización utilizando diferentes dosis en condiciones de invernadero.

Tratamientos	Dosis g/ha	Promedio de Eficacia (%)	SD
Virus	750	90,62	8,56
microencapsulado por atomización	1000	93,75	8,56
	1250	93,75	8,56
Bioplaguicida convencional	1000	87,50	13,07

Anova no detectó diferencias significativas entre tratamientos (95%)

El análisis de varianza no detectó diferencias significativas ( $F=1.39$ ;  $gl = 3$ ;  $p=0.2817$ ), entre las eficacias del virus microencapsulado por atomización a las dosis de 750 g/ha, 1000 g/ha y 1250 g/ha (Tabla 24, Anexo 4), ni entre estos tratamientos y el bioplaguicida convencional elaborado por el método de evaporación de solventes a su dosis recomendada de 1000 g/ha. Este resultado sugiere que el producto desarrollado en el presente trabajo aplicado a una dosis de 750 g/ha, es igualmente eficaz que el producto convencional a su dosis mínima efectiva de 1000 g/ha, lo que significa que con el bioplaguicida elaborado por atomización se podría reducir la dosis en un 25%.

La mayor eficacia del producto atomizado podría estar relacionada con el menor tamaño de las micropartículas obtenidas por este proceso, que en promedio fue de 18  $\mu\text{m}$ , en comparación con el producto convencional que presenta un tamaño medio de partícula de 198  $\mu\text{m}$  (Villamizar *et al.* 2010). Contar con partículas más pequeñas permite mayor cobertura de la superficie foliar y facilita la ingestión de las larvas de *S. frugiperda* de estadios jóvenes más susceptibles a la infección (Winder *et al.* 2003).

Cabe destacar que la eficacia de este tipo de productos depende directamente de la patogenicidad del virus, la calidad y cantidad depositada de éste en las plantas, la plaga, su movimiento, la fenología del cultivo y los hábitos alimenticios del insecto plaga, entre otros factores (Mor y Matthews, 2003; Caballero *et al.* 2009; Villamizar *et al.* 2012), factores que pudieron favorecer las altas eficacias obtenidas en el presente trabajo.

Estos resultados permitieron seleccionar una dosis mínima efectiva de 750 g/ha para el producto microencapsulado por atomización, equivalente a  $3,99 \times 10^{11}$  cuerpos de inclusión/hectárea (CIs/ha). Esta menor dosis con respecto a la recomendada para el producto convencional (1000 g/ha) permitirá disminuir los costos de aplicación en un 25% por hectárea con respecto al producto convencional mejorando la factibilidad económica del bioplaguicida. Este resultado es interesante considerando que este tipo de productos virales pueden resultar costosos debido a la producción *in vivo* del principio activo, que requiere el mantenimiento de una colonia de insectos y una alta demanda de mano de obra; inversiones que repercuten en el precio del bioplaguicida. Por tal razón, alcanzar altas eficacias con la dosis más baja es una de las metas en el desarrollo de este tipo de productos (Williams, 2002).

La dosis seleccionada para el producto atomizado de  $3,99 \times 10^{11}$  CI/ha, es baja en comparación con la determinada para otros productos a base de estos virus. Por ejemplo, Valicente y Costa (1995) ensayaron tres dosis ( $2,0 \times 10^{11}$  CI/ha,  $1,0 \times 10^{12}$  CI/ha y  $2,0 \times 10^{12}$  CI/ha) de un polvo mojable a base de un SfNPV para el control de *S. frugiperda* en cultivos de maíz en campo en Brasil, estableciendo que la mortalidad fue proporcional a la dosis usada, con resultados del 89,3% y del 90,7% con las dosis altas y de un 62,6% con la dosis baja, por lo que se seleccionaron dosis del orden de  $10^{12}$  CI/ha.

Gómez *et al.* (2013), seleccionaron la dosis de  $1,5 \times 10^{12}$  CIs/ha (1500 g/ha) como la recomendada para aplicación en campo en cultivos de maíz del nucleopoliedrovirus NPV003 de *S. frugiperda* microencapsulado por el método de evaporación con solventes con Eudragit® S100, con eficacias mayores al 70%. Williams *et al.* (1999) también evaluaron un SfNPV sobre larvas de *S. frugiperda* en cultivos de maíz en campo utilizando concentraciones expresadas como equivalentes larvales EL/ha, asumiendo que un EL es equivalente a  $6 \times 10^9$  CIs. Las concentraciones utilizadas fueron 50, 250 y 1000 EL/ha, observándose una alta prevalencia de la enfermedad viral en las parcelas donde se aplicaron 1000 EL/ha ( $6 \times 10^{12}$  CI/ha) con un 39,6% de mortalidad en México y un 37,8% en Honduras. Lasa *et al.* 2007 quienes seleccionaron una concentración de  $1 \times 10^{12}$  CIs/ha para una formulación de NPV sobre *S. exigua* en plantas de pimiento dulce en condiciones de invernadero, encontraron que el virus formulado produjo mortalidades entre el

62% y el 97%, significativamente mayores que la del virus sin formular (Lasa *et al.* 2007).

Para otros virus se han encontrado resultados similares a los del presente estudio, como en el trabajo de Bianchi *et al.* (2000) donde utilizaron aplicaciones de  $3 \times 10^{11}$  CIs/ha de un SeMNPV en cultivos de crisantemo en invernadero produciendo una mortalidad del 90% en los primeros estadios de *S. exigua*.

En el presente trabajo también se pudo establecer que la dosis seleccionada para el producto microencapsulado de NPV003, es baja en comparación con la utilizada para otros virus microencapsulados por atomización. Por ejemplo, McGuire *et al.* (2001) utilizaron nucleopoliedrovirus de *A. falcifera* y de *A. californica*, en aplicaciones de  $2,5 \times 10^{12}$  CIs/ha en Illinois y  $4,9 \times 10^{12}$  CIs/ha en Mississippi, en cultivos de repollo y algodón, respectivamente y encontraron mortalidades mayores del 50%. Behle *et al.* (2003) utilizando una dosis de  $2,5 \times 10^{12}$  CIs/ha encontraron mortalidades del 67,5% con formulaciones del nucleopoliedrovirus de *A. falcifera* sobre larvas de *Trichoplusia ni* en cultivos de repollo. Arthus *et al.* (2006) utilizaron aplicaciones de  $6,57 \times 10^{12}$  CIs/ha de granulovirus de *Cydia pomonella* en árboles de manzana y encontraron mortalidades entre 88% y 93% en campo. Behle y Popham (2012), aplicaron dosis de  $2,47 \times 10^{12}$  CIs/ha de dos formulaciones encapsuladas con lignina por atomización de dos tipos de baculovirus Sf3 y 3AP2 aislados de *S. frugiperda* y encontraron una actividad original remanente OAR alta (88,3%) en comparación con la del virus sin microencapsular (70,0%).

El producto desarrollado en el presente trabajo mostró una alta eficacia que podría verse favorecida en el tiempo, por las propiedades de bioadhesividad del polímero Eudragit®S100 (Nikam *et al.* 2011), ya que los principales factores que afectan la duración del plaguicida después de la aplicación foliar en maíz son tanto el rápido crecimiento de la planta en el cogollo, llevando el ingrediente activo fuera del mismo (Andrews 1980 en: Williams *et al.* 2004), como el arrastre del producto por la lluvia, que favorecen una rápida recolonización por larvas de primer estadio de *S. frugiperda* (Harrison 1986 en: Williams *et al.* 2004).

La determinación de la actividad insecticida en condiciones de invernadero del aislamiento nativo NPV003 de *S. frugiperda* microencapsulado por atomización permitió seleccionar 750 g/ha como la dosis mínima efectiva del producto con una eficacia del 90,62%. Esta dosis será utilizada como línea base para establecer la dosis recomendada para el uso del producto en condiciones de campo, lo que requiere experimentos posteriores de ajuste y validación.

# ***CAPÍTULO V. CONCLUSIONES***

El aislamiento nativo de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003 es susceptible a temperaturas superiores a 50°C, reduciendo su actividad insecticida después de 120 minutos de exposición.

El método de atomización superior fue seleccionado para microencapsular el virus utilizando el polímero Eudragit® S100, obteniéndose mayor homogeneidad del tamaño y la forma de las micropartículas y menores pérdidas en el proceso.

La concentración del polímero (Eudragit® S100) en la solución de recubrimiento es el factor determinante del tamaño de las partículas, ya que a mayor viscosidad mayor tamaño de las gotas atomizadas.

El modelo matemático generado es confiable y permitió predecir con exactitud las respuestas esperadas en el proceso de microencapsulación del NPV003 por atomización superior.

Las condiciones óptimas seleccionadas para la microencapsulación del virus NPV003 por atomización superior en un lecho fluido Glatt GmbH D-01277t con boquilla de 1mm, temperatura de entrada de 80°C, velocidad de flujo de 4,12 mL/minuto y presión de aleta de 25° fueron una concentración de polímero del 6%, una concentración del virus del 1,35% y una presión del aire de entrada de 2,23 bares.

El proceso de microencapsulación por atomización superior desarrollado permitió obtener micropartículas pequeñas (18,84 µm) y sin residuos de solventes orgánicos.

El proceso de microencapsulación por atomización superior con Eudragit® S100 no afectó la actividad insecticida del virus NPV003 y mejoró su fotoestabilidad frente a la radiación UVB reduciendo su inactivación en un 63,67% después de 6 horas de irradiación.

La dosis mínima efectiva del producto microencapsulado por atomización determinada en condiciones de invernadero, se redujó en un 25% con respecto a la del producto original elaborado por evaporación de solventes, seleccionándose para continuar con la validación en campo una dosis de 750 g/ha.

## ***Capítulo VI.***

### ***Recomendaciones***

Reducir el contenido de humedad de las micropartículas generadas por el proceso de atomización incrementando la temperatura de entrada y la velocidad de flujo de la suspensión que alimenta el sistema, de tal forma que la temperatura de salida sea menor a 50°C.

Utilizar como alternativa un proceso secundario de secado al vacío para reducir la humedad de las micropartículas y adaptar un ciclón al equipo de atomización para separar el producto seco de la corriente de aire y así evitar agregados.

Mejorar la morfología de la micropartículas adicionando un surfactante a la formulación que evite el colapso de las mismas y la presencia de virus en la superficie de la micropartícula.

Desarrollar un estudio de la estabilidad de la formulación microencapsulada bajo las condiciones de almacenamiento utilizadas para este tipo de productos, así como evaluar su eficiencia bajo condiciones de campo.

Utilizar los resultados obtenidos en este trabajo para microencapsular por atomización otros agentes de control biológico utilizando un equipo de lecho fluido.

***Capítulo VII.***  
***Producción científica***

## **1. Publicaciones científicas (Ver Anexos producción científica)**

Artículos publicados:

Efecto de la temperatura y de dos procesos de secado sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* .Vol. 12, No. 3 (2013) 437- 450

Selección de un sistema de atomización para la formación de micropraticulas de Eudragit® S100 en lecho fluido.2010. NOVA.Vol.8 No. 13: 87 – 100pp

Artículos sometidos:

Microencapsulation of a Colombian *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedro-virus with Eudragit®S100 by Spray drying.

Effect of spray dryer processing parameters on the insecticidal activity of two encapsulated formulations of baculovirus. *Biocontrol Science and Technology*

## **1. Participación en eventos científicos**

Poster:

Insecticidal Activity of a Spray Dried formulation based on a Colombian *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus  
14vo Encuentro de la IOBC/wprs Working Group Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes Junio 16 -20, 2013 Zagreb, Croacia.

Poster:

Efecto de la temperatura sobre el nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* NPV003". V jornada de socialización de resultados de investigación. Universidad de la Sabana. Octubre 26 al 28. 2011 Chía, Colombia.

Presentación Oral:

Materiales de encapsulación: aplicaciones en recubrimiento de microorganismos Caso: Microencapsulación de Baculovirus por atomización". Universidad de la Sabana. Semana de Ingeniería. Programa de Ingeniería Química. Curso: "Innovación en Ingeniería Química: Diseño de Producto y Sistemas de Liberación controlada" Octubre 23 y 24 de 2013. Universidad de La Sabana Chía, Colombia.

## **Pasantía**

La pasantía de investigación se realizó en The National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, USDA, Peoria, IL, USA entre Junio y Septiembre 2013.

## ***Bibliografía***

- Alhnan M, Kidia E, Basit A. 2011. Spray-drying enteric polymers from aqueous solutions: A novel, economic, and environmentally friendly approach to produce pH-responsive microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79: 432–439.
- Año G, Esquisabel A, Pastor M, Talavera A, Cedréa B, Fernández S, Sifontesa S, Aranguren Y, Falero G, García L, Solís RL, Pedraz JL. 2011. A new oral vaccine candidate based on the microencapsulation by spray-drying of inactivated *Vibrio cholera*. *Vaccine* 29:5758–5764.
- Armenta R, Martínez A, Chapman J, Magallanes R, Goulson D, Caballero P, Cave R, Cisneros J, Valle J, Castillejos V, Penagos D, Garcia L, Williams T. 2003. Impact of a nucleopolyhedrovirus bioinsecticide and selected synthetic insecticides on the abundance of insect natural enemies on maize in southern Mexico. *Journal of Economic Entomology* 96: 649-661.
- Arthurs S, Lacey L, 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 Invertebrate Pathology* 93: 88-95.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. 2007. Official methods of analysis. 18<sup>th</sup> ed. Maryland, USA: AOAC. 2590 p.
- Batista A, Alves S, Augusto N, Pereira R, Alves L. 2001. Stability and persistence of two formulations Lepidoptera *Anticarsia gemmatalis* Nuclear polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotropical Entomology* 30: 411–416.
- Beck R, Pohlmann R, Guterres S. 2004. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. *Journal of Microencapsulation* 21: 499–512.
- 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, 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, McGuire M, 2003. Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations. *Journal of Economic Entomology* 96: 1066–1075.

Behle R, Tamez-Guerra P, Mcguire M. 2000. Effect of Light Energy on Alkali-Released Virions from *Anagrapha falcifera* Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 120-126.

Beltrán L, Chanona-Pérez J, Jiménez-Aparicio A, Gutiérrez-López G. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* 67: 179–184.

Bianchi F, Snoeiijing I, Van Der Werf W, Mans R, Smits P, Vlak J. 2000. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (105epidoptera: noctuidae). *Journal of invertebrate pathology* 75: 28-35.

Boschetti N, Wyss K, Mischler A, Hostettler T, Kempf C. 2003. Stability of minute virus of mice against temperature and sodium hydroxide. *Biologicals* 31: 181–185.

Bregni C, Degrossi J, García R, Lamas M, Firenstein R, D`Aquino M. 2000. Alginate microspheres of *Bacillus subtilis*. *Ars Pharmaceutica* 41:245-248.

Burges H. 1998. Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp 7-21.

Bürki K, Jeon I, Arpagaus C, Betz G. 2011. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. *International Journal of Pharmaceutics* 408: 248–256.

Caballero P, Murillo R, Muñoz D, 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.

Caballero P, Lopez Ferber M, Williams T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad pública de Navarra. Editorial Phytoma. España. 517 p.

Camacho J, Gómez M, Villamizar L. 2013. Effect of temperature and two drying processes on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera frugiperda*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12:437-450.

Chaparro M, Espinel C, Cotes A, Villamizar L. 2010. Fotoestabilidad y actividad insecticida de dos formulaciones de granulovirus sobre larvas de *Tecia solanivora*. *Revista Colombiana de Entomología* 36:25-30.

- Chan W.A., Boswell C.D., Zhang Z. 2001. Comparison of the release profiles of a water soluble drug carried by Eudragit-coated capsules in different in-vitro dissolution liquids. *Powder Technology* 119: 26–32.
- Charpentier A, Gadielle P, Benoit P. 1999. Rhizobacteria microencapsulation : properties of microparticles obtained by spray-drying. *Journal of Microencapsulation* 16: 215-229.
- Cheng X, Liu R, He Y. 2010. A simple method for the preparation of monodisperse protein-loaded microspheres with high encapsulation efficiencies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 76:336–341.
- Cheow W, Li S, Hadinoto K. 2010. Spray drying formulation of hollow spherical aggregates of silica nanoparticles by experimental design. *Chemical engineering research and design* 88: 673–685.
- Chia SM, Wan A, Quek C, Mao HQ, Xu X, Shen L, Ng N, Leong KW, Yu H. 2002. Multi layered microcapsules for cell encapsulation. *Biomaterials* 23: 849-856.
- Clem R. 2005. The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 289:113-130.
- Cruz L, Assumpção E, Stanisçuaski S. 2009. High encapsulation efficiency of sodium alendronate in Eudragit®S100/HPMC blend microparticles. *Quimica Nova*. 32:1170-1174.
- Claro de Souza M y Maldonado J. 2011. Development of albendazole sulfoxide-loaded Eudragit microparticles: A potential strategy to improve the drug bioavailability. *Advanced Powder Technology* 23:801-807.
- Daigle D y Cotty P. 1997. The effect of sterilization, pH, filler and spore concentration on the preparation of alginate pellets. *Biocontrol Science and Technology* 7: 3- 10.
- Della Porta G, Castaldo F, Scognamiglio M, Paciello L, Parascandola P, Reverchona E. 2012. Bacteria microencapsulation in PLGA microdevices by supercritical emulsion extraction. *Journal of Supercritical Fluids* 63: 1–7.
- Devotto L y Gerding M. 2003. Respuesta de dos aislamientos Chilenos de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin a la adición de un protector solar. *Agricultura técnica (Chile)*. 63: 339-346.

Dobry D, Settell D, Baumann J, Ray R, Graham L, Beyerinck R. 2009. A Model Based Methodology for Spray-Drying Process Development. *Journal of Pharmaceutical Innovation* 4: 133-142.

EPA, 2013. Pesticides: Regulating Pesticides. Biopesticide Ingredient & Product List. Disponible en: [www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product\\_lists](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product_lists). Consultada en Abril de 2014

Esposito E, Roncarati R, Cortesi R, Cervellati F, Nastruzzi C. 2000. Production of Eudragit microparticles by spray-drying technique: influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics. *Pharmaceutical Development Technology* 5:267–78.

Evonik Röhm GmbH. 2011. Eudragit® Polímeros acrílicos para formas farmacéuticas sólidas orales. 15 p.

FAO. 2012. Agronoticias America Latina y El Caribe. Disponible en: [www.fao.org/agronoticias/agr\\_noticias/detalle/es/c/143943/](http://www.fao.org/agronoticias/agr_noticias/detalle/es/c/143943/). Consultada en Abril de 2014

Fondo Nacional Cerealista Fenalce. 2009. Informe de Gestión Consolidado. FENALCE. 194 p.

Fernandes L, Turatti I, Lopes N, Ferreira J, Candido R, Oliveira W. 2008. Volatile Retention and Antifungal Properties of Spray-Dried Microparticles of *Lippia sidoides* Essential Oil. *Drying Technology* 26:1534–1542.

Filho A, Alves S, Augusto N, Pereira R, Alves E. 2001. Stability and persistence of Two Formulations Containing *Anticarsia gemmatalis* Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotropical Entomology* 30: 411-416.

Fini A, Cavallari C, Ospitali F. 2008. Raman and thermal analysis of indomethacin/PVP solid dispersion enteric microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70: 409–420.

Finney D. 1952. *Probit Analysis*. Cambridge University Press. London. 151 p.

Fisher TW, L.A. A. 1999. Quarantine. In T.S Bellows and T.W. Fisher (ed.) *Handbook of Biological Control*. Academic Press, San Diego, California, USA. Pp.103-124

Fitzpatrick S, Ding Y, Seiler Ch, Lovegrove C, Booth S, Forster R, Parker R, Jonathan S. 2003. Positron Emission Particle Tracking Studies of a Wurster Process for Coating Applications. *Pharmaceutical Technology* 70-78.

Friesen P., Miller L. 2001. *General Virology*. Capítulo 20: insect viruses, Cuarta edición. Lippincot Williams y Wilkins. pp. 599-621

Fritzen-Freire C, Prudencio E, Amboni R, Pinto S, Negrao-Murakami A, Murakami F. 2012. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International* 45: 306-312.

Gander B, Johansen P, Nam Tran H, Merkle H. 1996. Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-Lactide) by Spray Drying. *International Journal of Pharmaceutics* 129: 51-61.

García F, Mosquera M, Vargas C, Rojas L. 2002. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) plaga de maíz y otros cultivos en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 28: 53-60.

Gennaro A. 2003. Remington Farmacia. 20ª edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 2506 p.

Glatt. Disponible en: [http://www.glatt.com/e/01\\_tecnologien/01\\_04\\_09.htm](http://www.glatt.com/e/01_tecnologien/01_04_09.htm)  
Consultada en febrero del 2014

Gómez J, Guevara J, Cuartas P, Espinel C, Villamizar L. 2013. Microencapsulated *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: insecticidal activity and effect on arthropod populations in maize. *Biocontrol Science and Technology* 23: 829-846.

Gómez J, Guevara EJ, Barrera GP, Cotes AM, Villamizar LF. 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, Becerra E, Santiago Alvarez C, Vargas Osuna E. 2005. 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.

Gutiérrez S y López Ferber M. 2004. Les stratégies des baculovirus pour franchir l'intestin des insectes. *Virology* 8: 311- 321.

Harrison R y Hoover K. 2012. Viruses Insect Pathology. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville, Maryland, USA. Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA pp.73-131

Hede P, Bach P, Jensen A. 2008. Top-spray fluid bed coating: Scale-up in terms of relative droplet size and drying force. Powder Technology 184: 318–332.

Herniu E, Olszewski J, O’reilly D, Cory J. 2004. Ancient coevolution of Baculoviruses and their insect host. Journal of Virology 78: 3244-3251.

Holdeman LV, Cato EP, More W E C. 1977. Chromatographic procedures for analysis of acid and alcohol products. Anaerobic Laboratory Manual, VPI Press, pp 134-178.

Horaczek A, Viernstein H. 2004a. *Beauveria brongniartii* subjected to spray-drying in a composite carrier matrix system. Journal of Microencapsulation 21: 317–330.

Horaczek A, Viernstein H. 2004b. 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. 1981. A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses. Journal of Invertebrate Pathology 37:154-159.

Hynes R y Boyetchko S. 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. Soil Biology and Biochemistry 38: 845 – 849.

Ibargutxi M, Muñoz D, Bernal A, Ruiz de Escudero I, Caballero P. 2008. Effects of stilbene optical brighteners on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* and a single nucleopolyhedrovirus on *Helicoverpa armigera*. Biological Control 47: 322–327.

Jarafi S, Assadpoor E, He Y, Bhandari B.2008. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. Drying Technology 26: 816–835.

Jehle J, Blissard G, Bonning B, Cory J, Herniou E, Rohrmann G, Theilmann D, Thiem S, Vlaskovits J. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. Archives of Virology 151:1257–1266.

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). Wageningen University, Netherlands. pp. 247 – 263

Jin X y Custis D. 2011. Microencapsulating aerial conidia of *T. 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.

Jones K.y Burges H.1998. Technology of formulation and application. In H. D. Burges (Ed.), *Formulation of microbial biopesticides. Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Netherlands: Kluwer Academic. pp. 7-27

Jyothi N, Prasanna P, Sakarkar S, Prabha K, Ramaiah P, Srawan G. 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation* 27:187–197.

Khandare J y Haag R. 2010. Pharmaceutically Used Polymers: Principles, Structures, and Applications of Pharmaceutical Delivery Systems en Drug Delivery. M. Schafer-Korting (ed.) *Handbook of Experimental Pharmacology* 197, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 221-250

Kaplan B. 1958. The Heat Inactivation of Vaccinia Virus. *Journal of general Microbiology* 18:58-63.

Kho K y Hadinoto K. 2010a. Effects of excipient formulation on the morphology and aqueous re-dispersibility of dry-powder silica nano-aggregates *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 359: 71–81.

Kho K y Hadinoto K. 2010b. Aqueous re-dispersibility characterization of spray-dried hollow spherical silica nano-aggregates. *Powder Technology* 198: 354–363.

Kilicarslan y Baykara, 2003 The effect of the drug/polymer ratio on the properties of the verapamil HCl loaded microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 252: 99–109.

Kim B, Hwang S, Park H. 2002. Preparation and characterization of drug-loaded polymetracrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method. *Journal of Microencapsulation* 19:811-822.

Krishnan S, Kshirsagar A, Singhal R.2005. The use of gum Arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate polymers* 62: 309 – 315.

Lacey L y Kaya HK.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. 867 p.

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.

Lasa R,Williams T,Caballero P. 2008.Insecticidal Properties and Microbial Contaminants in a *Spodoptera exigua* Multiple Nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) Formulation Stored at Different Temperatures. Journal of Economic Entomology 101: 42-49.

Lasa R, Ruiz C, Alcazar M, Belda J, Caballero P,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.

Li X, Anton N, Arpagaus C, Belleteix F, Vandamme Th. 2010. Nanoparticles by Spray drying using innovate new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. Journal of Controlled Release 147:304-310.

Li X, Guang Chen X, Wu Suna Z, Park HJ, Cha D-S. 2011.Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393.Carbohydrate Polymers 83: 1479–1485.

Liu X, Atarashi T, Furuta T, Yoshii H, Aishima S, Ohkawara M, Linko P. 2001. Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavors by spray drying. Drying Technology19: 1361-1374.

Liu Ch y Liu S-D. 2009. Low-Temperature Spray Drying for the Microencapsulation of the Fungus *Beauveria bassiana*. Drying Technology 27:747-753.

Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S. 2006.Flavor encapsulation and controlled release – a review. International. Journal of Food Science and Technology 41: 1-21.

Manzano O. y Morales M. 2000. Formas Farmacéuticas sólidas. Microcápsulas. Grupo Gylsa S. A. de C. V. México.17 p

Mafadi S, Hayert M, Poncelet D. 2003. Fluidization Control in the Wurster Coating Process. Hemijska Industrija 57: 641-644.

Marina FC, Williams T, Valle J. 2000. Effect of Temperature, pH, Ion Concentration, and Chloroform Treatment on the Stability of Invertebrate Iridescent Virus 6. *Journal of Invertebrate Pathology* 75:91-94.

Martínez A, Williams T, López MF, Caballero P. 2005. Optical Brighteners Do Not Influence Covert Baculovirus Infection of *Spodoptera frugiperda*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1668-1670.

Martínez G, Christian P, Marina C, Williams T. 2003. Sensitivity of Invertebrate iridescent virus 6 to organic solvents, detergents, enzymes and temperature treatment. *Virus Research* 91: 249-254.

Martoni C, Bhatena J, Malgorzata A, Prakash S. 2008. Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract. *Biotechnological Products and Process Engineering* 81: 225 – 233.

Mauguet M, Legrand J, Brujes L, Carnelle G, Larre C, Popineau Y. 2007. Gliadin matrices for microencapsulation processes by simple coacervation method. *Journal of Microencapsulation* 19: 377-384.

McGuire M, Tamez-Guerra P, Behle R, Streett D. 2001. Comparative field stability of selected entomopathogenic virus formulations. *Journal of Economic Entomology* 94: 1037-1044.

Michalsky R, Pfromm P, Czermak P, Sorensen C, Passarelli AL. 2008. Effects of temperature and shear force on infectivity of the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virological Methods*. 153: 90-96.

Miller LK. *The Baculoviruses*. 1997. U. of Georgia. PLENUM PRESS. New York and London. 397 p.

Miller D y Gil M. 2012. *Spray-Drying Technology*. En: *Formulating Poorly Water Soluble Drugs*. Springer. New York. pp. 363-442

Mirzaei H, Pourjafar H, Homayouni A. 2012. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese *Food Chemistry* 132: 1966-1970.

Mor S y Matthews G. 2003. Recent Developments in Sprayers for Application of Biopesticides an Overview. *Biosystems Engineering* 84:119–125.

Moscardi F, Lobo de Souza M, Batista de Castro M, Lara Moscardi M, Szewczyk B. 2011. *Baculovirus Pesticides: Present State and Future Perspectives* Chapter

16 I. Ahmad et al. (eds.), *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. Springer. pp. 415-445

Moscardi F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review Entomology* 44:257-289.

Motlekar N y Youan B. 2008. Optimization of experimental parameters for the production of LMWH-loaded polymeric microspheres. *Drug Design Development and Therapy* 2:39-47.

Muñoz-Celaya A, Ortiz-García M, Vernon-Carter E, Jauregui-Rincón J, Galindo E, Serrano-Carreón L. 2012. Spray-drying microencapsulation of *T. harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices. *Carbohydrate Polymers* 88:1141-1148.

Mustafin R. 2011. Drug synthesis methods and manufacturing technology. Interpolymer combinations of chemically complementary grades of eudragit copolymers: a new direction in the design of peroral solid dosage forms of drug delivery systems with controlled release (review). *Pharmaceutical chemistry journal* 45: 285-295.

Nikam V, Kotade K, Gaware V, Dolas R, Dhamak K, Somwanshi S, Khadse A, Kashid A. 2011. Eudragit a versatile polymer : A Review. *Pharmacology online* 1:152-164.

Negrete F y Morales JG. 2003. El gusano cogollero del maíz (*S. frugiperda*. Smith). CORPOICA. Colombia. 26 p

Niegel D. y Dylan G. 2003. Ecological Roles of solar UV radiation: Towards and Integrated approach (Review): *TRENDS in Ecology and Evolution*. Elsevier 18: 48– 54

Oers M. 2011. Opportunities and challenges for the Baculovirus expression system. *Journal of Invertebrate Pathology* 107: S3-S15.

Okuno S, Takatsuka J, Nakai M, Ototake S, Masui A, Kunimi Y. 2003. Viral-enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. *Biological Control* 26:146-152.

Oliveira B, Santana M, Ré M. 2005. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with d, l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 22, (consultada en Redylac on line Abril 2014).

Organización Mundial de la Salud. 2003. Índice UV Solar mundial. OMS. Guía práctica. 28 p

Pantone, 2011. Escala de colores para litografía. Pantone. Fórmula Guide. Color pardo oscuro: código 7588u, página 26, Disponible: [www.Pantone.com](http://www.Pantone.com). Consultada en Octubre de 2014

Peng F, Fuxa JR, Richter A, Johnson S. 1999. Effects of Heat-Sensitive Agents, Soil Type, Moisture, and Leaf Surface on Persistence of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) Nucleopolyhedrovirus. *Environmental Entomology* 28: 330-338.

Pemsel M, Schwabb S, Scheurerb A, Freitagc D, Schatza R, Schluckera E. 2010. Advanced PGSS process for the encapsulation of the biopesticide *Cydia pomonella* granulovirus *Journal of Supercritical Fluids* 53:174-178.

Poncelet D. 2006. Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. *Surface Chemistry. Biomedical and Environmental Science*. 228:23– 34.

Raffin R, Colome L, Shapoval E, Polhman A, Guterres S. 2008. Increasing sodium pantoprazole photostability by microencapsulation: Effect of the polymer and the preparation technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69:1014–1018.

Raffin R, Colome L, Haas S, Jornada D, Pohlmann A, Guterres S. 2007. Development of HPMC and Eudragit® S100 blended microparticles containing sodium pantoprazole. *Pharmazie* 62: 361-364.

Raffin R, Jornada D, Ré MI, Pohlmann A, Guterres S. 2006. Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: Effect of the scale of production and process validation. *International Journal of Pharmaceutics* 324:10-18.

Rattes A y Oliveira W. 2007. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technology* 171:7-14.

Raula J, Eerikäinena H, Kauppinen E. 2004. Influence of the solvent composition on the aerosol synthesis of pharmaceutical polymer nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 284:13-21.

Rohrmann G.F. 2008. *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI;

Disponible en:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir>.  
Consultada en Abril 2014

Ronsse F, Pieters J, Dewettinck K. 2008. Modelling side-effect spray drying in top-spray fluidized bed coating processes. *Journal of Food Engineering* 86: 529-541.

Ronsse F, Pieters J. G, Dewettinck K. 2009. Modelling heat and mass transfer in batch, top-spray fluidised bed coating processes. *Powder Technology* 190: 170-175.

Rujvipat S y Bodmeier R. 2012. Moisture plasticization for enteric Eudragit\_L30D-55-coated pellets prior to compression into tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 81:223-9.

Salazar R. 2003. *Tecnología Farmacéutica Industrial. Fabricación y control de medicamentos sólidos de administración por vía oral*. Labortecnic, Barcelona.34p.

Schaffazick S, Pohlmann A, Mezzalira G, Guterres S.2006.Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin.*Journal of the Brazilian Chemical Society* 17:562-569.

Scragg A. 2001. *Biotecnología ambiental*. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza. 307 p

Shah V, Shinde M, Patil S, Nikam M, Ghodke D, Shah R. 2011.Impact of Selected Variables on the Preparation of Aceclofenac Microspheres by Spray Drying using Full Factorial Design.*International Journal of Pharmaceutical Technology Research* 3: 1066-1072.

Shapiro M. 1989. Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (*Lepidoptera: Limantriidae*) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economical Entomology* 82:548-550.

Shimadzu.2007. News 3: Avoiding engine damage determination of methanol in biodiesel. pp 2-3. Disponible en:  
[http://www.ssi.shimadzu.com/enews/pdf/Shimadzu\\_DeterminationMethanolContentGC.pdf](http://www.ssi.shimadzu.com/enews/pdf/Shimadzu_DeterminationMethanolContentGC.pdf) Consultada en Noviembre de 2014

Shukla R y Tiwari A. 2012. Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers* 88: 399–416.

Simón O, Williams T, López M, Caballero P. 2004. Genetic Structure of a *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus Population: High Prevalence of Deletion Genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5579 – 5588.

Skalsky B y Stegemann S. 2011. Coated Multiparticulates for Controlling Drug Release. En: *Controlled Release in Oral Drug Delivery, Advances in Delivery Science and Technology*, Controlled Release Society. Wilson C. G. and Crowley P.(eds.), USA.pp. 257-276

Srivastava S, Mishra G. 2010. Fluid Bed Technology: Overview and Parameters for Process Selection. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 2: 236-246.

Sporleder M, Zegarra O, Rodriguez EM, 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.

Suryan A, Sun Kim D, Dong Kim H. 2010. Experimental Study on the Inlet Fogging System Using Two-Fluid Nozzles. *Journal of Thermal Science* 19:132-135.

Tajber L, Corrigan O, Healy A. 2009. Spray drying of budesonide, formoterol fumarate and their Composites—II. Statistical factorial design and *in vitro* deposition properties. *International Journal of Pharmaceutics* 367: 86-96.

Tamez P, Zamudio V, Carrillo JL, Rodríguez C, Gómez R. 2006. Formulaciones granulares de Baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como Bioinsecticida. *Ciencia UANL* 9:149-156.

Tamez P, McGuire M, Behle R, Shasha B, Pingel R. 2002. Storage Stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray dried formulations. *Journal of Invertebrate Pathology* 79: 7-16.

Tamez-Guerra P, McGuireM, Behle R, Hamm J, Sumner H, Shasha B. 2000. Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 210-218.

Turchiuli C, Gianfrancesco A, Palzer S, Dumoulin E. 2011. Evolution of particle properties during spray drying in relation with stickiness and agglomeration control. *Powder Technology* 208: 433-440.

Vaydya S, Bhosale R, Singhal R. 2006. Microencapsulation of Cinnamon Oleoresin by Spray Drying Using Different Wall Materials. *Drying Technology* 24: 983-992.

Valicente F y Da costa E. 1995. Controle da lagarta do cartucho, *S. frugiperda* (J.E. Smith), como *Baculovirus spodoptera*, aplicado via água de irrigação. *Annual Society Entomology Brasil* 24: 61-67.

Vila J.L. 2006. Nanotecnología Farmacéutica: Una Galénica Emergente. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 91 p

Villamizar L, Guevara J, Espinel C, Gómez M, Gómez J, Cuartas P, Barrera G, Cruz M, Santos A, Uribe L, Ruiz C, Castro O, Lopez-ferber M, Valicente F, Caballero P, Simon O, López Avila A, Martínez F, Cotes A.M. 2012. Desarrollo de un bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control de gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*. Bogotá: Corpoica. 100p

Villamizar L. 2011. Virus entomopatógenos y cambio climático. En: Ed: Sociedad Colombiana De Entomología Socolen. Memorias Cambio Climático: Retos Y Oportunidades Para La Entomología. 38 Congreso Socolen. Colombia. pp.127-143.

Villamizar L, Barrera G, Cotes A, Martínez F. 2010. Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical, characterization, photostability and *invitro* virus release. *Journal of Microencapsulation* 27:314-324.

Villamizar L, Espinel C, 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.

Villamizar L, Martinez F. 2008. Determination of the basic conditions for microencapsulation of an entomopathogenic Baculovirus by means of coacervation using Eudragit S100®. *VITAE* 15: 123-131.

Wandrey C, Bartkowiak A, Harding S. 2010. Materials for Encapsulation. En: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Zuidam N. J. and Nedović V. (eds.). Springer Verlag. USA. pp.31-100

Wang X y Zhang Q. 2012. pH-sensitive polymeric nanoparticles to improve oral bioavailability of peptide/protein drugs and poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 82:219-229.

Williams T. 2010. Insecticidas basados en los Baculovirus. Disponible en: [http://www.trevorwilliams.info/Virus\\_insecticidas\\_es.htm](http://www.trevorwilliams.info/Virus_insecticidas_es.htm). Consultada en Abril 2014

Williams T, Cisneros J, Penagos D, Valle J, Tamez-Guerra P. 2004. Ultralow rates of spinosad in phagostimulant granules provide control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) in maize. *Journal of Economic Entomology* 97: 422-428.

Williams T. 2002. Diseño y aplicación de los bioinsecticidas. Basados en baculovirus. *PHYTOMA* 144:1-4

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

Winder R, Wheeler J, Conder N, Otvos I, Nevill R, Duan L. 2003. Microencapsulation: A Strategy for Formulation of Inoculum Biocontrol. *Science and Technology* 13:155-169.

Wiggenhorn M. 2007. Scale-Up of Liposome Manufacturing: Combining High Pressure Liposome Extrusion with Drying Technologies. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München. München, Germany. 238 p.

Winstaley Dy Reilly`O D. 1999. Baculoviruses (Baculoviridae). Granuloviruses in: *Encyclopedia of Virology*. pp.140-146

Yañez J, Salazar J, Chaires Martínez L, Jiménez Hernández J, Márquez Robles M, Ramos Ramírez E. 2002. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. *Avance y Perspectiva* 21: 313-319.

Yeo Y y Kinam P. 2004. A New Microencapsulation Method using and ultrasonic atomizer based and interfacial solvent exchange. *Journal of Controlled Release* 100: 379-388.

Yeo Y y Park K. 2004. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Archives of Pharmacal Research* 27:1-12.

Yin Hsu F, Syuan Yu D, Chiang Huang Ch. 2013. Development of pH-sensitive pectinate/alginate microspheres for colon drug delivery. *Journal of Materials Science* 24:317-323.

Yoo J, Giri N, Lee Ch. 2011. pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 403:262-267.

Young S. 2000. Persistence of viruses in environment. Disponible en: <http://www.Agctr.isu.edu/s265/young.htm>. Consultada en Abril del 2014

Yu C, Wang W, Yao H, Liu H. 2007. Preparation of Phospholipid Microcapsule by Spray Drying. *Drying Technology* 25:695-702.

Zar J. 1999. Biostatistical analysis. 4<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice Hall. 523 p

Zhang Y, Wu X, Meng L., Zhang Y., Ai R., Qi N., He H., Xu H., Tang X. 2012. Thiolated Eudragit nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation, characterization and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 436: 341-350.

Zhang W, Guang C, Li P, Liu Cheng S, Zhi He Q. 2008. Preparation and Characterization of Carboxymethyl Chitosan and  $\beta$ -Cyclodextrin Microspheres by Spray Drying. *Drying Technology* 26:108-115.

Zebron. 2014. GC Selection Guide.

Disponible en: [www.phenomenex.com/zebron](http://www.phenomenex.com/zebron). Consultada en Noviembre de 2014

# ***Anexos***

**Anexo 1**  
**Comparación múltiple de medias de tukey (95%) para los porcentajes de eficacia vs temperatura**

Statistix 8.0  
 21:22:12

05/10/2011,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test**

Variable	Mean	Homogeneous Groups
d	10.000	A
e	10.000	A
o	10.000	A
b	9.8816	A
c	9.8207	A
t	9.7936	A
i	9.6414	A
s	9.6341	A
n	9.6307	A
f	9.5099	A
j	9.4514	A
lm	9.4514	A
r	9.3808	A
k	9.0748	AB
g	9.0677	AB
h	8.8789	ABC
q	8.4797	ABC
p	8.1805	ABC
l	8.0198	ABC
u	6.9853	BC
v	6.8776	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.4834  
 Critical Q Value 6.189 Critical Value for Comparison 2.1158  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Anexo 2**  
**Análisis Probit (Método Finney [Distribución Lognormal]) Lote 1**

Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Probit (Y)	Peso (Z)	X*Z	X*X*Z	Y*Z	X*Y*Z
3,176091	0,3	4,479083	18,02962	14,21618	10016992	19,92713	29890,69
4,176091	0,433333	4,832859	19,0961	20,18073	1,09E+09	23,35252	350287,8
5,176091	0,833333	5,889992	17,82226	30,88762	8,02E+10	21,27528	3191292
6,176091	0,866667	6,0817	14,60408	37,74103	7,13E+12	19,35614	29034216
7,176091	0,8	5,721579	10,40905	41,91883	8,59E+14	22,29735	3,34E+08
<b>Suma</b>			<b>79,96112</b>	<b>394,1529</b>	<b>2085,486</b>	<b>426,3918</b>	<b>0</b>
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
3,176091	0,3	0,345556	30	9	10,36669	-1,36669	0,180177
4,176091	0,433333	0,507555	30	13	15,22664	-2,22664	0,325609
5,176091	0,833333	0,668299	30	25	20,04897	4,951027	1,22264
6,176091	0,866667	0,802756	30	26	24,08267	1,917333	0,152648
7,176091	0,8	0,897563	30	24	26,9269	-2,9269	0,318147
<i>Chi cuadrado</i>	2,199221	<i>Grados de Libertad</i>	3	<i>nivel p</i>	0,532102		

**Percentil de Dosis (Estímulo)**

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar	
1	2,673215	-1,45883	-13,3665	0,034768	-4E+11	
5	3,354789	0,178457	-9,91208	1,508194	-6,2E+09	
10	3,718271	1,051618	-8,06413	11,26208	-6,5E+08	
20	4,158543	2,109244	-5,81352	128,6009	-4,2E+07	
25	4,325811	2,511056	-4,95141	324,3811	-1,5E+07	
30	4,475998	2,871837	-4,17094	744,452	-5517571	
40	4,747067	3,523	-2,72982	3334,265	-894937	
50	5	4,130599	-1,24286	13508,24	-117762	
60	5,252933	4,738197	-1,05216	54726,44	-306122	
70	5,524002	5,389361	-0,57868	245109,7	-432192	
75	5,674189	5,750142	-1,30487	562524,9	-5661331	
80	5,841457	6,151953	-2,30717	1418905	-1,4E+08	
90	6,281729	7,209579	-4,65382	16202379	-3,7E+11	
95	6,645211	8,08274	-6,52513	1,21E+08	-2E+14	
99	7,326785	9,720023	-9,99633	5,25E+09	-2,6E+19	
<i>Log10[LD50]</i>	4,130599	<i>Log10[LD16]</i>	1,72839	<i>Log10[LD84]</i>	6,532807	
<b>LD50</b>	<b>13508,24</b>	LD16	53,50444	Beta	0,416284	<i>Error Estándar Log10[LD50]</i> 0,526959
<i>Error Estándar LD50</i>	20718,94	LD84	3410417	Alfa	3,2805	
LD50 LCL	284,3255	LD100	5108871	<i>Error Estándar Beta</i>	0,14098	
LD50 UCL	641773,1	<i>Nivel de Significación</i>	0,05			

**Análisis Probit (Método Finney [Distribución Lognormal]) Lote 2**

Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Probit (Y)	Peso (Z)	X*Z	X*X*Z	Y*Z	X*Y*Z
2,879669	0,433333	4,832382	18,7653	13,91584	2776549	23,35252	17701,21
3,879669	0,5	5,000199	19,04946	19,39835	2,87E+08	25	189500
4,879669	0,5	4,999954	19,08013	24,39835	2,87E+10	25	1895000
5,879669	0,433333	4,827723	18,85625	28,41318	2,78E+12	23,35252	17701211
6,879669	0,733333	5,604744	18,38549	38,68154	2,44E+14	23,92313	1,81E+08
<b>Suma</b>			<b>94,13662</b>	<b>458,4028</b>	<b>2418,713</b>	<b>475,4106</b>	<b>0</b>
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
2,879669	0,433333	0,412947	30	13	12,3884	0,611599	0,030194
3,879669	0,5	0,466453	30	15	13,99359	1,006405	0,07238
4,879669	0,5	0,520574	30	15	15,61722	-0,61722	0,024394
5,879669	0,433333	0,574318	30	13	17,22953	-4,22953	1,03827
6,879669	0,733333	0,626713	30	22	18,80139	3,198612	0,544168
<i>Chi cuadrado</i>	1,709405	<i>Grados de Libertad</i>	3	<i>nivel p</i>	0,634845		

**Percentil de Dosis (Estímulo)**

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar	
1	2,673215	-12,6364	-80,4963	2,31E-13	-3,6E+67	
5	3,354789	-7,61679	-57,3941	2,42E-08	-3E+49	
10	3,718271	-4,93985	-45,0685	1,15E-05	-6,7E+39	
20	4,158543	-1,69738	-30,1263	0,020073	-1,3E+28	
25	4,325811	-0,46551	-24,4408	0,342369	-4,7E+23	
30	4,475998	0,640578	-19,3264	4,370973	-4,6E+19	
40	4,747067	2,636916	-10,0279	433,4272	-2,3E+12	
50	5	4,499693	-1,42131	31600,43	-416246	
60	5,252933	6,36247	-6,49975	2303932	-3,6E+12	
70	5,524002	8,358808	-15,8967	2,28E+08	-9E+23	
75	5,674189	9,464891	-21,0219	2,92E+09	-1,5E+30	
80	5,841457	10,69677	-26,7133	4,97E+10	-1,3E+37	
90	6,281729	13,93924	-41,6614	8,69E+13	-2E+55	
95	6,645211	16,61618	-53,9887	4,13E+16	-2E+70	
99	7,326785	21,63576	-77,0924	4,32E+21	-2,7E+98	
<i>Log10[LD50]</i>	4,499693	<i>Log10[LD16]</i>	-2,865	<i>Log10[LD84]</i>	11,86439	
<b>LD50</b>	<b>31600,43</b>	<i>LD16</i>	0,001365	<i>Beta</i>	0,135783	<i>Error Estándar Log10[LD50]</i> 0,784827
<i>Error Estándar LD50</i>	93676,57	<i>LD84</i>	7,32E+11	<i>Alfa</i>	4,389019	
<i>LD50 LCL</i>	915,0231	<i>LD100</i>	1,1E+12	<i>Error Estándar Beta</i>	0,073225	
<i>LD50 UCL</i>	1091324	<i>Nivel de Significación</i>	0,05			

**Análisis Probit (Método Finney [Distribución Lognormal]) Lote 3**

<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Peso (Z)</b>	<b>X*Z</b>	<b>X*X*Z</b>	<b>Y*Z</b>	<b>X*Y*Z</b>
2,954243	0,3	4,475824	17,46484	13,22318	3606117	19,92713	17934,41
3,954243	0,4	4,747283	18,88988	18,77105	3,85E+08	22,53464	202811,8
4,954243	0,633333	5,33678	18,94943	26,4569	3,77E+10	24,88423	2239581
5,954243	0,666667	5,430417	17,6323	32,33327	3,7E+12	24,81485	22333364
6,954243	0,766667	5,726495	15,18436	39,8315	3,28E+14	23,16659	2,08E+08
<b>Suma</b>			<b>88,12079</b>	<b>430,7532</b>	<b>2272,348</b>	<b>451,6779</b>	<b>0</b>
<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Porcentaje Probit (%)</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>E(R)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Chi cuadrado</b>
2,954243	0,3	0,310479	30	9	9,314381	-0,31438	0,010611
3,954243	0,4	0,431001	30	12	12,93004	-0,93004	0,066896
4,954243	0,633333	0,558371	30	19	16,75114	2,24886	0,301912
5,954243	0,666667	0,679932	30	20	20,39795	-0,39795	0,007764
6,954243	0,766667	0,784703	30	23	23,54108	-0,54108	0,012437
<i>Chi cuadrado</i>	0,39962	<i>Grados de Libertad</i>	3	<i>nivel p</i>	0,940321		

**Percentil de Dosis (Estímulo)**

<b>Percentil</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Error Estándar</b>	
1	2,673215	-2,75977	2,410124	0,001739	0,22352	
5	3,354789	-0,63428	1,759762	0,232124	6,672991	
10	3,718271	0,499242	1,417169	3,156763	41,18552	
20	4,158543	1,872232	1,011648	74,51299	379,0656	
25	4,325811	2,393857	0,863121	247,6604	886,5687	
30	4,475998	2,862216	0,734762	728,142	1909,679	
40	4,747067	3,707545	0,526568	5099,699	7813,514	
50	5	4,496318	0,396369	31355,8	32759,3	
60	5,252933	5,285091	0,396849	192793	201730,7	
70	5,524002	6,13042	0,540109	1350267	2146861	
75	5,674189	6,598779	0,652452	3969896	8474766	
80	5,841457	7,120404	0,790527	13194827	39660073	
90	6,281729	8,493394	1,183793	3,11E+08	2,37E+09	
95	6,645211	9,626916	1,522373	4,24E+09	7,04E+10	
99	7,326785	11,75241	2,16951	5,65E+11	4,18E+13	
<i>Log10[LD50]</i>	4,496318	<i>Log10[LD16]</i>	1,377814	<i>Log10[LD84]</i>	7,614822	
<b>LD50</b>	<b>31355,8</b>	<i>LD16</i>	23,8679	<i>Beta</i>	0,320667	<i>Error Estándar Log10[LD50]</i> 0,396369
<i>Error Estándar LD50</i>	32759,3	<i>LD84</i>	41192820	<i>Alfa</i>	3,558181	
<i>LD50 LCL</i>	4038,935	<i>LD100</i>	61773552	<i>Error Estándar Beta</i>	0,077444	
<i>LD50 UCL</i>	144554,7	<i>Nivel de Significación</i>	0,05			

**Análisis Probit (Método Finney [Distribución Lognormal]) Virus seco sin microencapsular**

Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Probit (Y)	Peso (Z)	X*Z	X*X*Z	Y*Z	X*Y*Z
4,856124	0,166667	4,092536	17,28382	19,58299	1,84E+10	14,37745	1032301
5,856124	0,633333	5,33517	19,06399	31,27318	2,4E+12	24,88423	17866876
6,856124	0,7	5,520086	18,11342	37,87324	2,3E+14	24,59284	1,77E+08
7,856124	0,766667	5,723407	14,7785	44,99717	2,09E+16	23,16659	1,66E+09
8,856124	0,866667	6,090911	10,23699	54,11825	1,63E+18	19,35614	1,39E+10
<b>Suma</b>			<b>79,47672</b>	<b>526,5231</b>	<b>3627,824</b>	<b>419,3678</b>	<b>0</b>
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
4,856124	0,166667	0,300729	30	5	9,021882	-4,02188	1,792923
5,856124	0,633333	0,47185	30	19	14,15551	4,844488	1,657946
6,856124	0,7	0,648423	30	21	19,45268	1,547321	0,123078
7,856124	0,766667	0,797507	30	23	23,92522	-0,92522	0,035779
8,856124	0,866667	0,900505	30	26	27,01515	-1,01515	0,038146
<i>Chi cuadrado</i>	3,647872	<i>Grados de Libertad</i>	3	<i>nivel p</i>	0,302084		

**Percentil de Dosis (Estímulo)**

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar	
1	2,673215	0,861121	1,276192	7,263088	68,40137	
5	3,354789	2,370081	0,959145	234,4666	1054,197	
10	3,718271	3,174808	0,793278	1495,573	4525,379	
20	4,158543	4,149541	0,598771	14110,45	26230,77	
25	4,325811	4,51986	0,528214	33102,45	50947,91	
30	4,475998	4,852365	0,467512	71181,13	92306,35	
40	4,747067	5,452493	0,368397	283460,7	270341,9	
50	5	6,01247	0,298099	1029131	763184,9	
60	5,252933	6,572448	0,267227	3736354	2446875	
70	5,524002	7,172576	0,292138	14879078	10780818	
75	5,674189	7,505081	0,328028	31994897	26530394	
80	5,841457	7,8754	0,380254	75058535	74443480	
90	6,281729	8,850133	0,550836	7,08E+08	1,16E+09	
95	6,645211	9,65486	0,708291	4,52E+09	1,11E+10	
99	7,326785	11,16382	1,018382	1,46E+11	7,54E+11	
<i>Log10[LD50]</i>	6,01247	<i>Log10[LD16]</i>	3,798536	<i>Log10[LD84]</i>	8,226404	
<b>LD50</b>	<b>1029131</b>	<i>LD16</i>	6288,346	<i>Beta</i>	0,451685	<i>Error Estándar Log10[LD50]</i> 0,298099
<i>Error Estándar LD50</i>	763184,9	<i>LD84</i>	1,68E+08	<i>Alfa</i>	2,284259	
<i>LD50 LCL</i>	215166,2	<i>LD100</i>	2,52E+08	<i>Error Estándar Beta</i>	0,084614	
<i>LD50 UCL</i>	3171932	<i>Nivel de Significación</i>	0,05			

### Anexo 3

#### Comparación de medias DMS (95%) para eficacia, actividad original remanente y % de inactivación para los lotes microencapsulados de NPV003 y el virus seco sin microencapsular

Sistema SAS

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores			
Tratamiento	4	Lote1	Lote2	Lote3	Virus
Número de observaciones leídas					12
Número de observaciones usadas					12

Procedimiento GLM

Variable dependiente: **Tiempo0**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	215.3168917	71.7722972	2.03	0.1879
Error	8	282.4459333	35.3057417		
Total corregido	11	497.7628250			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Tiempo0 Media
0.432569	6.280874	5.941863	94.60250

Cuadrado de Fuente	DF	Tipo I SS	la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	215.3168917	71.7722972	2.03	0.1879

Cuadrado de Fuente	DF	Tipo III SS	la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	215.3168917	71.7722972	2.03	0.1879

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para Tiempo0

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error de cuadrado medio	35.30574
Valor crítico de t	2.30600
Diferencia menos significativa	11.188

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t	Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	100.000	3	Lote3	
A				
A	97.433	3	Lote1	
A				
A	91.110	3	Lote2	
A				
A	89.867	3	Virus	

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	Lote1 Lote2 Lote3 Virus

Número de observaciones leídas 12  
 Número de observaciones usadas 12  
 Sistema SAS 12:00 Monday, January 5, 2009 10

Procedimiento GLM

Variable dependiente: OAR0 OAR0

Suma de Fuente	Cuadrado de	DF	cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo		3	0	0	.	.
Error		8	0	0		
Total corregido		11	0			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	OAR0 Media
0.000000	0	0	100.0000

Cuadrado de Fuente	DF	Tipo I SS	la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	0	0	.	.

Cuadrado de Fuente	DF	Tipo III SS	la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	0	0	.	.

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para OAR0

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 8  
 Error de cuadrado medio 0  
 Valor crítico de t 2.30600  
 Diferencia menos significativa 0

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t	Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	100.0	3	Lote1	
A	100.0	3	Lote2	
A	100.0	3	Lote3	
A	100.0	3	Virus	

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	Lote1 Lote2 Lote3 Virus

Número de observaciones leídas 12  
 Número de observaciones usadas 12

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Inact0 Inact0

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0	0	.	.
Error	8	0	0		
Total corregido	11	0			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Inact0 Media
0.000000	.	0	0

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	0	0	.	.

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	0	0	.	.

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para Inact0

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

	Alpha	0.05
	Error Degrees of Freedom	8
Error de cuadrado medio	0	
	Valor crítico de t	2.30600
	Diferencia menos significativa	0

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	0	3	Lote1
A			
A	0	3	Lote2
A			
A	0	3	Lote3
A			
A	0	3	Virus

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	Lote1 Lote2 Lote3 Virus

Número de observaciones leídas	12
Número de observaciones usadas	12

Procedimiento GLM

Variable dependiente: **Tiempo2**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	2302.377558	767.459186	21.12	0.0004
Error	8	290.664733	36.333092		
Total corregido	11	2593.042292			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Tiempo2 Media
0.887906	6.892797	6.027694	87.44917

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	2302.377558	767.459186	21.12	0.0004

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	2302.377558	767.459186	21.12	0.0004

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para Tiempo2

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error de cuadrado medio	36.33309
Valor crítico de t	2.30600
Diferencia menos significativa	11.349

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	100.000	3	Lote1
A			
A	94.593	3	Lote3
A			
A	91.110	3	Lote2
B	64.093	3	Virus

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	Lote1 Lote2 Lote3 Virus

Número de observaciones leídas	12
Número de observaciones usadas	12

Procedimiento GLM

Variable dependiente: OAR2 OAR2

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	1407.197259	469.065753	12.87	0.0020
Error	8	291.472614	36.434077		
Total corregido	11	1698.669873			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	OAR2 Media
0.828411	6.721746	6.036065	89.79906

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	1407.197259	469.065753	12.87	0.0020

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	1407.197259	469.065753	12.87	0.0020

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para OAR2

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error de cuadrado medio	36.43408
Valor crítico de t	2.30600
Diferencia menos significativa	11.365

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	100.000	3	Lote1
A	94.593	3	Lote3
A	93.016	3	Lote2
B	71.587	3	Virus

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	Lote1 Lote2 Lote3 Virus

Número de observaciones leídas	12
Número de observaciones usadas	12

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Inact2 Inact2

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	1407.197259	469.065753	12.87	0.0020
Error	8	291.472614	36.434077		

Total corregido 11 1698.669873

R-cuadrado Coef Var Raíz MSE Inact2 Media  
 0.828411 59.17167 6.036065 10.20094

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	1407.197259	469.065753	12.87	0.0020

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	1407.197259	469.065753	12.87	0.0020

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para Inact2

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error de cuadrado medio	36.43408
Valor crítico de t	2.30600
Diferencia menos significativa	11.365

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	28.413	3	Virus
B 6.984 3			Lote2
			B
	5.407	3	Lote3
			B
B 0.000 3			Lote1

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	Lote1 Lote2 Lote3 Virus

Número de observaciones leídas 12  
 Número de observaciones usadas 12

Procedimiento GLM

Variable dependiente: **Tiempo4**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	8077.139100	2692.379700	31.89	<.0001
Error	8	675.478467	84.434808		
Total corregido	11	8752.617567			

R-cuadrado      Coef Var      Raíz MSE      Tiempo4 Media  
0.922826      12.61193      9.188842      72.85833

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	8077.139100	2692.379700	31.89	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	8077.139100	2692.379700	31.89	<.0001

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para Tiempo4

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error de cuadrado medio	84.43481
Valor critico de t	2.30600
Diferencia menos significativa	17.301

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	92.300	3	Lote1
A	86.490	3	Lote3
A	84.443	3	Lote2
B	28.200	3	Virus

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	Lote1 Lote2 Lote3 Virus

Número de observaciones leídas 12  
 Número de observaciones usadas 12  
 Sistema SAS 12:00 Monday, January 5, 2009 28

Procedimiento GLM

Variable dependiente: OAR4 OAR4

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	8189.778526	2729.926175	56.22	<.0001
Error	8	388.482215	48.560277		
Total corregido	11	8578.260741			

R-cuadrado 0.954713  
 Coef Var 9.143623  
 Raíz MSE 6.968520  
 OAR4 Media 76.21181

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	8189.778526	2729.926175	56.22	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	8189.778526	2729.926175	56.22	<.0001

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para OAR4

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 8  
 Error de cuadrado medio 48.56028  
 Valor crítico de t 2.30600  
 Diferencia menos significativa 13.121

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	94.867	3	Lote1
A			
A	92.223	3	Lote2
A			
A	86.490	3	Lote3
B	31.268	3	Virus

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	Lote1 Lote2 Lote3 Virus

Número de observaciones leídas 12  
 Número de observaciones usadas 12  
 Sistema SAS 12:00 Monday, January 5, 2009 31

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Inact4 Inact4

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	8189.778526	2729.926175	56.22	<.0001
Error	8	388.482215	48.560277		
Total corregido	11	8578.260741			

R-cuadrado 0.954713  
 Coef Var 29.29403  
 Raíz MSE 6.968520  
 Inact4 Media 23.78819

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	8189.778526	2729.926175	56.22	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	8189.778526	2729.926175	56.22	<.0001

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para Inact4

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 8  
 Error de cuadrado medio 48.56028  
 Valor crítico de t 2.30600  
 Diferencia menos significativa 13.121

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t	Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
	A	68.732	3	Virus
B	13.510	3	Lote3	B

			B	7.778	3	Lote2
			B			
B	5.133	3	Lote1			

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	Lote1 Lote2 Lote3 Virus

Número de observaciones leídas	12
Número de observaciones usadas	12

Procedimiento GLM

Variable dependiente: **Tiempo6**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	9187.23433	3062.41144	22.60	0.0003
Error	8	1084.09533	135.51192		
Total corregido	11	10271.32967			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Tiempo6 Media
0.894454	17.12325	11.64096	67.98333

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	9187.234333	3062.411444	22.60	0.0003

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	9187.234333	3062.411444	22.60	0.0003

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para Tiempo6

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error de cuadrado medio	135.5119
Valor crítico de t	2.30600
Diferencia menos significativa	21.918

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	87.180	3	Lote1
A	86.487	3	Lote3
A	77.777	3	Lote2
B	20.490	3	Virus

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores			
Tratamiento	4	Lote1	Lote2	Lote3	Virus

Número de observaciones leídas	12
Número de observaciones usadas	12

Procedimiento GLM

Variable dependiente: OAR6 OAR6

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	9098.615212	3032.871737	33.70	<.0001
Error	8	719.888154	89.986019		
Total corregido	11	9818.503366			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	OAR6 Media
0.926680	13.46924	9.486096	70.42783

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	9098.615212	3032.871737	33.70	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	9098.615212	3032.871737	33.70	<.0001

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para OAR6

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05

	Error Degrees of Freedom	8
Error de cuadrado medio	89.98602	
	Valor crítico de t	2.30600
	Diferencia menos significativa	17.861

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	89.533	3	Lote1
A			
A	86.487	3	Lote3
A			
A	82.777	3	Lote2
B	22.915	3	Virus

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	Lote1 Lote2 Lote3 Virus

Número de observaciones leídas	12
Número de observaciones usadas	12

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Inact6 Inact6

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	9098.615212	3032.871737	33.70	<.0001
Error	8	719.888154	89.986019		
Total corregido	11	9818.503366			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Inact6 Media
0.926680	32.07778	9.486096	29.57217

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	9098.615212	3032.871737	33.70	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	9098.615212	3032.871737	33.70	<.0001

Procedimiento GLM

t Tests (LSD) para Inact6

NOTA: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

	Alpha	0.05
	Error Degrees of Freedom	8
Error de cuadrado medio	89.98602	
	Valor crítico de t	2.30600
	Diferencia menos significativa	17.861

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

	t	Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
		A	77.085	3	Virus
B	17.223	3	Lote2		
		B	13.513	3	Lote3
		B			
B	10.467	3	Lote1		

Anexo 4

Análisis de varianza (95%) para las dosis 750 g/ha, 1000 g/ha y 1250 g/ha del virus NPV003 microencapsulado por atomización y el bioplaguicida convencional a sus dosis de 1000 g/ha

Estadística descriptiva para EFICACIA  
2012

31  
10:47 Monday, August 16,

----- TTO=BVCONV -----  
--

The MEANS Procedure

Analysis Variable : EFI

N	Mean	Std Dev	Variance	Coeff of Variation	Std Error
5	87.4980000	13.0734108	170.9140700	14.9413824	5.8466071

----- TTO=BvMic100 -----  
--

Analysis Variable : EFI

N	Mean	Std Dev	Variance	Coeff of Variation	Std Error
5	93.7480000	8.5609036	73.2890700	9.1318253	3.8285525

----- TTO=BvMic125 -----  
--

Analysis Variable : EFI

N	Mean	Std Dev	Variance	Coeff of Variation	Std Error
5	93.7480000	8.5609036	73.2890700	9.1318253	3.8285525

----- TTO=BvMic750 -----  
--

Analysis Variable : EFI

N	Mean	Std Dev	Variance	Coeff of Variation	Std Error
5	90.6220000	8.5609036	73.2890700	9.4468270	3.8285525

Anava para efectos de tto sobre EFICACIA y comparaciones

32

10:47 Monday, August 16,

2012

The GLM Procedure

Class Level Information

	Class	Levels	Values
	TTO	4	BVCONV BvMic100 BvMic125 BvMic750
BLO	5	1 2 3 4 5	

Number of observations 20  
 Anava para efectos de tto sobre EFICACIA y comparaciones  
 33  
 10:47 Monday, August 16, 2012

The GLM Procedure

Dependent Variable: EFI

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	305.308640	43.615520	0.38	0.8993
Error	12	1392.101640	116.008470		
Corrected Total	19	1697.410280			

R-Square 0.179867  
 Coeff Var 11.78364  
 Root MSE 10.77072  
 EFI Mean 91.40400

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TTO	3	134.2851600	44.7617200	0.39	0.7652
BLO	4	171.0234800	42.7558700	0.37	0.8265

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TTO	3	134.2851600	44.7617200	0.39	0.7652
BLO	4	171.0234800	42.7558700	0.37	0.8265

Anava para efectos de tto sobre EFICACIA y comparaciones

34  
 10:47 Monday, August 16, 2012

The GLM Procedure

Observation	Observed	Predicted	Residual
1	68.75000000	88.28150000	-19.53150000
2	84.37000000	84.37150000	-0.00150000
3	100.00000000	92.18650000	7.81350000
4	84.37000000	84.37150000	-0.00150000
5	100.00000000	88.27900000	11.72100000
6	100.00000000	94.53150000	5.46850000
7	84.37000000	90.62150000	-6.25150000
8	84.37000000	98.43650000	-14.06650000
9	100.00000000	90.62150000	9.37850000
10	100.00000000	94.52900000	5.47100000
11	100.00000000	94.53150000	5.46850000
12	100.00000000	90.62150000	9.37850000
13	100.00000000	98.43650000	1.56350000
14	84.37000000	90.62150000	-6.25150000

15	84.37000000	94.52900000	-10.15900000
16	100.00000000	91.40550000	8.59450000
17	84.37000000	87.49550000	-3.12550000
18	100.00000000	95.31050000	4.68950000
19	84.37000000	87.49550000	-3.12550000
20	84.37000000	91.40300000	-7.03300000

Sum of Residuals	0.000000
Sum of Squared Residuals	1392.101640
Sum of Squared Residuals - Error SS	0.000000
First Order Autocorrelation	0.046921
Durbin-Watson D	1.596596

Anava para efectos de tto sobre EFICACIA y comparaciones 35  
10:47 Monday, August 16, 2012

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for EFI

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type

II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	116.0085
Critical Value of Studentized Range	4.19852
Minimum Significant Difference	20.224

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TTO
A	93.748	5	BvMic125
A			
A	93.748	5	BvMic100
A			
A	90.622	5	BvMic750
A			
A	87.498	5	BVCONV

Anava para efectos de tto sobre EFICACIA y comparaciones

36

The GLM Procedure

Dunnett's t Tests for EFI

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error for comparisons of all treatments against a control.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	116.0085
Critical Value of Dunnett's t	2.68292
Minimum Significant Difference	18.276

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by \*\*\*.

TTO Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
BvMic125 - BVCONV	6.250	-12.026 24.526
BvMic100 - BVCONV	6.250	-12.026 24.526
BvMic750 - BVCONV	3.124	-15.152 21.400

Anava para efectos de tto sobre EFICACIA y comparaciones 37  
10:47 Monday, August 16, 2012

The UNIVARIATE Procedure  
Variable: REFI

Moments

N	20	Sum Weights	20
Mean	0	Sum Observations	0
Std Deviation	8.55970253	Variance	73.2685074
Skewness	-0.6723476	Kurtosis	-0.2056477
Uncorrected SS	1392.10164	Corrected SS	1392.10164
Coeff Variation	.	Std Error Mean	1.91400767

Basic Statistical Measures

Location		Variability	
Mean	0.00000	Std Deviation	8.55970
Median	0.78100	Variance	73.26851
Mode	-6.25150	Range	31.25250
		Interquartile Range	12.89375

NOTE: The mode displayed is the smallest of 5 modes with a count of 2.

Tests for Location:  $\mu_0=0$

Test	-Statistic-	-----p Value-----		
Student's t	t	0	Pr >  t	1.0000
Sign	M	0	Pr >=  M	1.0000
Signed Rank	S	4	Pr >=  S	0.8911

Tests for Normality

Test	--Statistic--	-----p Value-----		
Shapiro-Wilk	W 0.942927	Pr < W	0.2722	
Kolmogorov-Smirnov	D 0.158105	Pr > D	>0.1500	
Cramer-von Mises	W-Sq 0.062358	Pr > W-Sq	>0.2500	
Anderson-Darling	A-Sq 0.404115	Pr > A-Sq	>0.2500	

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
100% Max	11.72100
99%	11.72100
95%	10.54975
90%	9.37850

Anava para efectos de tto sobre EFICACIA y comparaciones

38  
10:47 Monday, August 16, 2012

The UNIVARIATE Procedure  
Variable: REFI

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
75% Q3	6.64225
50% Median	0.78100
25% Q1	-6.25150
10%	-12.11275
5%	-16.79900
1%	-19.53150
0% Min	-19.53150

Extreme Observations

-----Lowest-----		-----Highest-----	
Value	Obs	Value	Obs
-19.5315	1	7.8135	3
-14.0665	8	8.5945	16
-10.1590	15	9.3785	9
-7.0330	20	9.3785	12
-6.2515	14	11.7210	5

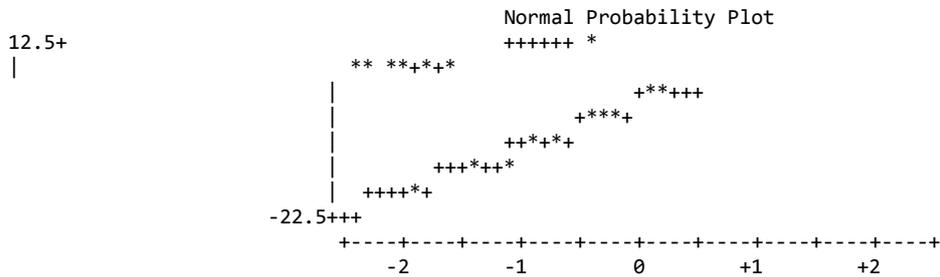
Stem Leaf	#	Boxplot
1 2	1	
0 55558999	8	+-----+
0 2	1	*---+---*
-0 3300	4	
-0 766	3	+-----+
-1 40	2	
-1		
-2 0	1	

-----+-----+-----+-----+  
Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

Anava para efectos de tto sobre EFICACIA y comparaciones  
10:47 Monday, August 16, 2012

39

The UNIVARIATE Procedure  
Variable: REFI



Homogeneidad de varianza para TTO

40  
10:47 Monday, August 16, 2012

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TTO	4	BVCONV BvMic100 BvMic125 BvMic750

Number of observations 20  
 Homogeneity de varianza para TTO 41  
 10:47 Monday, August 16, 2012

The GLM Procedure

Dependent Variable: EFI

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	134.285160	44.761720	0.46	0.7153
Error	16	1563.125120	97.695320		
Corrected Total	19	1697.410280			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	EFI Mean
0.079112	10.81363	9.884094	91.40400

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TTO	3	134.2851600	44.7617200	0.46	0.7153

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TTO	3	134.2851600	44.7617200	0.46	0.7153

42  
 10:47 Monday, August 16, 2012

The GLM Procedure

Bartlett's Test for Homogeneity of EFI Variance

Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
TTO	3	1.0977	0.7776

43  
 10:47 Monday, August 16, 2012

The GLM Procedure

Level of	N	Mean	Std Dev
BVCONV	5	87.4980000	13.0734108
BvMic100	5	93.7480000	8.5609036
BvMic125	5	93.7480000	8.5609036
BvMic750	5	90.6220000	8.5609036

44  
 10:47 Monday, August 16, 2012

The GLM Procedure

Levene's Test for Homogeneity of EFI Variance  
ANOVA of Squared Deviations from Group Means

	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TTO	3	22873.5	7624.5	1.39	0.2817	
	Error	16	87711.2	5481.9		

Homogeneidad de varianza para TTO

45

10:47 Monday, August 16, 2012

The GLM Procedure

		Level of TTO	N	-----EFI----- Mean	Std Dev
BVCONV	5	87.4980000	13.0734108		
BvMic100	5	93.7480000	8.5609036		
		BvMic125	5	93.7480000	8.5609036
		BvMic750	5	90.6220000	8.5609036

***Anexos***  
***Producción científica***



**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<sup>1,2\*</sup>, M.I. Gómez<sup>3</sup> y L.F. Villamizar<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup>Centro 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 (CL<sub>50</sub>) 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 (LC<sub>50</sub>) 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 involucren 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  $5 \times 10^6$  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  $2 \times 10^7$  CI/mL y se dispensaron muestras de 50  $\mu\text{L}$  en tubos Eppendorf, las cuales fueron expuestas a las temperaturas de  $30^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  y  $60^\circ\text{C}$ , 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  $\mu\text{L}$  de las suspensiones virales expuestas o sin exponer a la temperatura se mezclaron con 200  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $28^\circ\text{C}$  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):

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

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 Ultraturrax 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  $3 \times 10^9$  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  $3 \times 10^9$  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  $92^\circ\text{C}$  y una presión de aleta expresada como ángulo de apertura de  $25^\circ$  al inicio del proceso y de  $35^\circ$  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  $50^\circ\text{C}$ . Para el proceso de secado en estufa con corriente de aire, se tomó la suspensión viral ajustada a una concentración  $3 \times 10^9$  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  $30^\circ\text{C}$ , temperatura del bulbo seco  $37.85^\circ\text{C}$ , 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  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^7$  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,

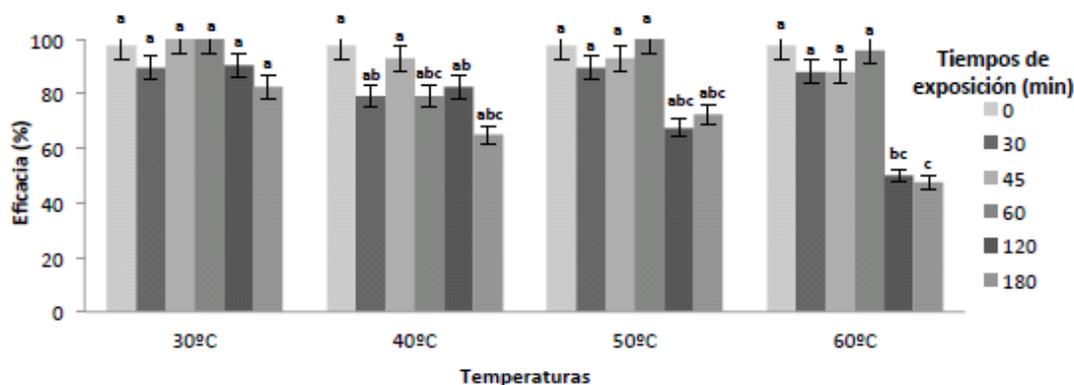


Fig. 1. Efecto de la temperatura sobre la eficacia del aislamiento viral SfMNPV003. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes, según prueba de Tukey (95 %).

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 (Burges, 1998), causando la desnaturalización de la cápsida 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 (Sportleder 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  $4.88 \times 10^8$  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  $1 \times 10^9$  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 saprófitos 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)	$4.88 \times 10^8$	$1.00 \times 10^9$	Jenkins y Grzywacz (2003)
Contaminación bacteriana (UFC/mL)	$4.88 \times 10^8$		
Contaminación fúngica (UFC/mL)	< 100		
Concentración viral (CI/mL)	$3.00 \times 10^9$		

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 (Borges, 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). Cabe 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  $5 \times 10^8$  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 ( $4.88 \times 10^8$  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  $2.74 \times 10^9$  UFC/g y la del producto atomizado de  $2.82 \times 10^9$  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  $1.9 \times 10^8$  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 ( $2.09 \times 10^9$  CI/g) y secado en estufa ( $2.44 \times 10^9$  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)	$3.88 \times 10^8$ **	$2.33 \times 10^7$ **
Contaminación fúngica (UFC/g)	$1.97 \times 10^4$ *	$1 \times 10^3$ *
Concentración viral (CI/g)	$2.09 \times 10^9$	$2.44 \times 10^9$

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

<sup>1</sup>La 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 <sub>50</sub>	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 containing *Anticarsia gemmatilis* 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 morfológicos 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 nucleopoliedrovirus (NPV) (Baculoviridae) isolados em larvas de *Spodoptera exigua* e *S. litoralis* 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 Nucleopoliedrovirus (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 nucleopoliedrovirus (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* nucleopoliedrovirus. *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 *Anicarsia gemmatilis* (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*. Labortecnib, 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 *Anicarsia gemmatilis* 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 Internacional* 42-68
- Sporleder, M., Zegarra, O., Rodríguez, 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 abrillantadores 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.

**Microencapsulation of a Colombian *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus with Eudragit®S100 by spray drying**

Judith E. Camacho<sup>1</sup>, Martha I. Gómez<sup>2</sup> and Laura F. Villamizar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Doctorado en Biociencias, Universidad de la Sabana. Puente del Común Km 7 Auto Norte, Bogotá, Colombia.*

<sup>1</sup>*Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Calle 28 No 6 - 02, Bogotá, Colombia.*

<sup>2</sup>*Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Bogotá, Colombia.*

(Received ; returned ; accepted )

**Abstract**

A Colombian *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus NPV003 with high potential for the development of an efficient biopesticide was microencapsulated by spray drying with a pH dependent polymer (Eudragit®S100). Conditions to produce the microparticles were standardized and microencapsulation process was validated. Physical properties, insecticide activity and photostability of the microencapsulated virus were determined. Obtained microparticles had spherical and irregular shapes, with sizes between 17.64 and 19.47  $\mu\text{m}$ . The moisture content was  $10.38 \pm 0.87\%$ , the encapsulation efficiency was  $84.61 \pm 13.09\%$  and the process yield was  $91.20 \pm 6.40\%$ . Additionally, the microencapsulation process did not affect the insecticidal activity of the virus and provided efficient protection against UVB radiation. The results demonstrated the technological feasibility of the spray drying process to be used for formulating biopesticides based on NPV003.

**Key words:** Baculovirus, microencapsulation, spray drying, Eudragit® S100, photostability

**Introduction**

Baculovirus is a family of entomopathogenic viruses that regulate the insect population in nature and are being massively used in pest control (Oers, 2011). Baculovirus form a protein capsule called “occlusion

body” (OB) that protects them from the environment. When an insect of a susceptible species consumes food contaminated with viral occlusion bodies (OBs), these dissolve in the middle intestine, releasing virions that infect the intestinal cells and afterwards infect almost all the insect’s tissues. The infection causes the death of the insect; the tegument degrades and releases millions of new OBs to the environment (Caballero et al., 2001).

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), the corn fall armyworm, is a natural host for baculovirus and has made possible the isolation of several nucleopolyhedrovirus (NPVs) in various regions of North, Central and South America. Some of these isolations have been evaluated under field conditions, demonstrating a high potential for pest control in corn crops (Williams et al., 1999; Moscardi, 1999; Gómez et al., 2013).

In spite of the fact that these viruses are an efficient tool to control various insects’ pests, evaluation under field conditions in some cases has produced inconsistent results, possibly due to the damaging effect of environmental conditions such as solar radiation over viral particles. (Borges, 1998; Moscardi, 1999; Behle et al., 2000; Caballero et al., 2001; Lacey and Arthurs, 2005; Villamizar et al., 2009; Moscardi et al., 2011). Viral activity can be completely lost in less than 24 hours and ultraviolet radiation in the B region (UV-B) (280–310 nm) is the most important cause of baculovirus inactivation under field conditions (Moscardi et al., 2011). For such a reason, the formulations that encapsulate the viral particles have been a preferred delivery system to minimize activity losses due to solar radiation (Tamez et al., 2002).

Microencapsulation of virus and bacteria within polymeric materials is very useful for developing biopesticides. First, a relatively small amount of non-toxic material can be used as the formulation component. Also, microcapsules can be formed from polymers that do not dilute in rain or heavy dew. Finally, microscopic particles can be efficiently dispersed from the air on to foliage, and even small, young larval stages of insects can consume them more readily than larger beads (Winder et al., 2003). Microencapsulation has been used to develop formulations based on microorganisms such as baculovirus due to the photostabilizing effect (Tamez et al., 2002; Arthurs et al., 2006; Villamizar et al., 2010) and the improvement of storage stability (Tamez et al., 2002).

Microparticles can be obtained through several physical and chemical methods (Li et al., 2010) among which the spray drying process stands out (Beck et al., 2004; Yu et al., 2007; Li et al., 2010). This process is performed in a **spray drying** and has the advantage of being fast and just one step, applicable to heat sensitive materials and easy to industrially scale up (Ré, 1998, Beck et al., 2004; Yu et al., 2007; Liu and Liu, 2009; Jin and Custis, 2011).

In Colombia, three native isolations of *S. frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) codified as NPV003, NPV009 and NPV011 were physically, molecularly and biologically characterized demonstrating their high pathogenicity and virulence, from which the NPV003 isolation was selected due to its higher insecticidal activity and tolerance to ultraviolet radiation (Gómez et al., 2010). Considering the promising photostabilization results obtained in a previous study where virus was microencapsulated with Eudragit® S100 by solvent evaporation method (Villamizar et al., 2010), is necessary to continue improving this formulation solving some detected problems as the low process efficiency (53,43%), the big microparticle size and the use of organic solvents such as acetone and n-hexane; evaluating other more efficient, economical and sustainable techniques such as spray drying.

The objective of this study was to develop a microencapsulation system for the virus by spray drying with Eudragit® S100 polymer. In this sense, conditions to produce the microparticles were standardized and physical and biological properties of microparticles were determined.

## **Materials and Methods**

### *Materials*

Eudragit® S100 (Röhm GmbH &Co.) was kindly donated and purchased from Almapal (Colombia), Magnesium silicate mesh 325 pharmaceutical quality (Moisture 0.415%), Ethanol (96%) were purchased from CIACOMEQ S.A.S. (Bogotá, Colombia), Anhydrous dibasic sodium phosphate from Sigma (St. Louis, USA) and citric acid was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### *Insect colony*

The insects were obtained from a colony of *S. frugiperda* established with larvae collected in corn fields in the Espinal (Tolima) in Colombia. The insects were kept in a room at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  and 60% relative humidity with a photoperiod of 12 hours. The larvae were individually kept in half ounce plastic containers with a fragment of artificial diet (Gómez et al., 2010).

### *Virus production*

Virus NPV003 (also codified as SfCOL) was isolated from *S. frugiperda* larva collected from pasture in Monteria, department of Córdoba (Colombia) in 2010 (Barrera et al. 2011). Viral occlusion bodies (OBs) were produced by inoculating third instar *S. frugiperda* larvae with a virus suspension with a concentration of  $1 \times 10^7$  OBs/mL, using the droplet feeding method (Hughes and Wood, 1981). The inoculated larvae were incubated at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  and 60% relative humidity and fed with artificial diet until they died due to the infection.

### *Active ingredient*

A sample of 20 grams of infected larvae was homogenized with 260 mL of distilled sterile water using an Ultraturrax IKA 40 (Jankel and Kunkel, Germany) disperser at 10.000 rpm for one minute. The mix was filtered through a layer of cloth to remove insect tissue and the viral concentration was adjusted with water to  $3 \times 10^9$  OBs/mL. To increase the mass of the active ingredient, magnesium silicate at 10% was added as diluents to viral suspension and vigorously shaken, then mixture was spray dried in a fluidized bed with top spray (Glatt GmbH D-01277, Germany) until final moisture content of  $3.57 \pm 0.41\%$ . Process conditions were an internal pressure of 1 bar, a flow of 12 rpm which is equivalent to a flow speed of 6.18 mL/minute, an **inlet** temperature of  $92^\circ\text{C}$  and a flap pressure expressed as a  $25^\circ$  angle of aperture at the beginning of the process and  $35^\circ$  at the end. Dry virus in powder was collected in the drying chamber and used as an active ingredient or nucleus in the microencapsulated formulation.

### *Polymer solution*

The corresponding quantity of polymer according to the treatment (Table 1) was added to 70 mL of pH 8.0 phosphate buffer solution (972.5 mL of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2M and 27.5 mL of citric acid 0.1M) with

continuous agitation at 8000 rpm. Then, 30 ml of ethanol (96%) were added with continuous agitation until a clear solution was obtained.

#### *Selection of optimal conditions for microencapsulation by spray drying*

Microparticles were made with mixture of polymer solution and nucleus by spray drying in a fluidized bed with top spray (Glatt GmbH D-01277, Germany) using a 1.0 mm nozzle to adjust air flow. The inlet temperature was 80°C, the flow speed was 4.12 mL/minute and the flap pressure was 25° in the sprayer system (Camacho et al., 2010). For this experiment, magnesium silicate was used as nucleus to simulate the virus, considering the similar particle size and the high cost of virus production.

Evaluated factors were chamber pressure, core concentration and polymer concentration in a factorial design with three factors and three levels for a total of 27 treatments (Table 1), each one carried out three times. Response variables were the mean diameter of the microparticles (d) and the process yield.

The factor influence was established with Statgraphics 8.1 software (v. 5.1, Manugistics Inc., Rockville, Maryland) by means of a response surface analysis and Pareto diagrams. A mathematical prediction model was generated and optimal process conditions were selected to proceed with virus microencapsulation.

#### *Microparticles size and morphology*

The shape and size of the microparticles were studied with a optical microscope (NIKON ECLIPSE 300). The diameter of 150 particles in three samples of each treatment was determined with an image analyzer (Nis-Elements BR3.2).

The morphology of the microparticles was determined by using microphotographs taken with a scanning electron microscope (SEM)(Philips XL 20) following the methodology described by Villamizar et al. (2010).

### *Yield*

To estimate the process yield, the material recovered from each batch of each treatment was weighed and using this result and the weight of the used materials, the following formula was applied (Villamizar et al., 2010):

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{W}_{\text{product}}}{(\text{W}_{\text{polymer}} + \text{W}_{\text{nucleus}})} \times 100 \quad (1)$$

Where:

$\text{W}_{\text{product}}$  is the weight of the microparticles obtained in a production batch

$\text{W}_{\text{polymer}}$  is the weight of the polymer used in a production batch

$\text{W}_{\text{nucleus}}$  is the weight of the nucleus (active ingredient) used in a production batch

### *Virus microencapsulation by spray drying*

With optimal conditions generated by a mathematical model of prediction, the microencapsulation of the dry virus was performed. The optimal values determined were: 6% of polymer concentration (Eudragit®S100), 1.35% of nucleus concentration (dry virus), and an internal chamber pressure of 2.23 bars. Microencapsulation of the viral isolation NPV003 was performed manufacturing three product batches. Additional process conditions were an inlet temperature of 80°C, a flap pressure of 25° and a 1.0 mm nozzle to adjust air flow.

Only the product deposited in the collector of the spray drying equipment was considered as final product. Three samples from each batch were taken to determine the morphology and diameter of the microparticles using the previously described methods. Moisture content (%), viral concentration, encapsulation efficiency, residual content of solvents, biological activity and photostability were also studied.

### *Moisture Content (%)*

A sample of 0.5g was dried at 100°C in a humidity analyzer (KERN MLS 50 – 3) until constant weight. Results were expressed as a percentage and determination was carried out three times for each product batch (AOAC, 2007).

#### *Concentration of microparticles and encapsulation efficiency*

Samples of 100 mg of each product batch were added to 9.9 milliliters of pH 5.0 citrate buffer and mixed for 5 minutes to wash the microcapsules and release the not encapsulated OBs, which were estimated in a Neubauer counting chamber and a light microscope (Olympus CH3ORF100). Then, total OBs concentration in the product was determined by mixing samples of 100 mg of each batch with 9.9 milliliters of pH 8.0 phosphate buffer to promote polymer dissolution for releasing encapsulated OBs and counting in a Neubauer chamber and a light microscope (Olympus CH3ORF100). The experimental concentration of microencapsulated OBs was determined by estimating the difference between the total OBs concentration after dissolution at pH 8.0 and the not encapsulated OBs released by washing the microparticles at pH 5.0.

Then encapsulation efficiency was calculated by using the following formula (Villamizar et al., 2010):

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{W_r \times 100}{W_t} \quad (2)$$

Where  $W_r$  is the experimental concentration of microencapsulated OBs and  $W_t$  is the theoretical concentration of the virus in the microparticles calculated by using the weight and concentration of polymer and active ingredient used for preparing the product. These characteristics were evaluated three times for each batch.

#### *Residual solvent content*

To determine the residual ethanol content in the microparticles, a sample of 1g of each batch of microparticles was suspended in 5 mL of lactic acid. After the mixture was sealed and extracted for 10 min, the solution was allowed to settle and the lactic acid layer was collected. The layer collected was used for GC-FID (SHIMADZU GC 2014; FID 2014 detector, USA) analysis. The ethanol was used as an external pattern. The GC-FID conditions were: a Zebron (ZB-FFAP, USA) capillary column (30 m x 0.53 mm); nitrogen as carrier gas (14.99 mL/min) and an injector temperature of 220°C. This characteristic was evaluated two times for each batch.

### *Biological activity*

The bioassay was performed using the droplet feeding method (Hughes and Wood, 1981). Suspensions were adjusted to five concentrations from  $2 \times 10^3$  to  $2 \times 10^7$  OBs/mL for microencapsulated virus, and from  $2 \times 10^4$  to  $2 \times 10^8$  OBs/mL for non-encapsulated virus (active ingredient). Neonates were starved for 12h at 25°C and then larvae were allowed to drink from aqueous suspensions prepared by mixing equal volumes of a solution of 10% (w/v) sucrose, 1% (w/v) food colourant E132 (Indigotine) with each viral treatment. Larvae that ingested the suspension were transferred to individual recipients with artificial diet. Experiment was performed with 30 larvae per virus treatment and 30 larvae as negative control without any treatment (Villamizar et al., 2010).

Larvae mortality was determined seven days after inoculation. The experimental design was completely random with factorial arrangement and three repetitions for each treatment. Mortality results were subjected to Probit analysis (Finney, 1952) using Biostat 2007 software to determine the lethal concentrations.

### *Photostability of microencapsulated virus*

Suspensions of microencapsulated and non-encapsulated virus (active ingredient) were prepared in distilled water and adjusted to a concentration of  $2 \times 10^7$  OBs/mL. Samples of 200  $\mu$ L of each suspension were placed in 5 continuous wells (column) of 96 well flat bottom plate, which was irradiated with a monochromatic UVB lamp at 302 nm and 8 watts (3UV™ lamp, UVP, Upland, CA) located at a distance of 10 cm, for 2, 4 and 6 hours. Before beginning irradiation, the first column of microplate wells was covered with aluminum foil (one well from each concentration), these treatments corresponded to non-irradiated or 0 hours of exposure. Every two hours until completing 6 hours, the following column of wells was covered, representing each column a different irradiation time. Neonatal larvae were starved for 12h and then they were allowed to drink from aqueous suspensions prepared by mixing equal volumes of a solution of 10% (w/v) sucrose, 1% (w/v) food colorant E132 (Indigotine) with each viral treatment according to the previously described method.

To determine treatments efficacy, the Schneider – Orelli formula (Zar, 1999) was used.

$$\text{Efficacy (\%)} = \frac{(A-B)}{(100-B)} \times 100 \quad (3)$$

Where A is larva mortality obtained in the treatment and B is the mortality in the negative control treatment.

Data normality and homogeneity were estimated using a Shapiro-Wilk (95%) and Barlett (95%) test respectively. Then the differences between treatments were detected by LSD (95%) test using the SAS (v9.1) Software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## **Results and discussion**

### *Selection of optimal conditions for microencapsulation by spray drying*

Microparticles with variable size and shape were obtained in all evaluated treatments, with diameters that oscillated between 10.42 and 22.20  $\mu\text{m}$  (Table 2). These values were similar to those obtained in the microencapsulation by spray drying of *Beauveria brongniartii* conidium with skin milk, Kollidon and polyvinylpyrrolidone (PVP K90), where microparticles showed sizes between 3 and 20  $\mu\text{m}$  (Horaczek and Viernstein, 2004), as well as in the study in which *Bifidobacterium* BB-12 was microencapsulated with skin milk and product presented sizes between 14.45 and 18.78  $\mu\text{m}$  (Fritzen-Freire et al., 2012).

The smallest average sizes of 10.42 and 10.84  $\mu\text{m}$  were obtained with treatments 2 and 4, respectively (Table 2), treatments that involved the use of the lowest concentration of polymer (2.5%) suggesting a possible effect of this factor over this response variable.

When the polymer concentration was increased to 5%, the microparticles size oscillated between 19.11 and 22.20  $\mu\text{m}$  and the yield ranged from 57.30% in treatment 15 to 92.46% in treatment 14. It is important to note that with this polymer concentration, the highest efficiency and size were obtained. With a polymer concentration of 7.5%, microparticles size oscillated between 18.27 and 21.22  $\mu\text{m}$ , and yield ranged from 49.32% in treatment 27 to 88.06% in treatment 19 (Table 2).

Response surface obtained for particle size (diameter) as a function of the pressure and the polymer concentration (Figure 1a), showed that the pressure does not have an important influence on the

particle size, while the polymer concentration affected this characteristic, which is minimized when this parameter tends to level -1.

When the particle size was evaluated as a function of the pressure and the nucleus concentration (Figure 1b), the response surface was almost flat and parallel to the X axis, which suggests that pressure and nucleus concentration did not significantly influenced the particle size within the range of the evaluated concentrations.

#### Table 2

The response surface for the particle size as a function of the nucleus and polymer concentrations (Figure 1c), showed again that diameter is minimized when polymer concentration tends towards level -1. These results allow suggesting that the factor with the highest influence on the particle size is the polymer concentration, with a proportional direct relationship.

#### Figure 1

Pareto diagram in figure 1d shows the influence of the evaluated factors and their respective interactions over particle size. According to this diagram, the polymer concentration factor (B), followed by the polymer-polymer interaction (B:B) were the only two parameters that had a significantly statistical effect over the particle size response. This relation is possibly due to a thin polymer layer formed to cover the nucleus when polymer concentration is low, forming smaller microparticles than obtained when high polymer concentration forms a thick covering layer (Ronsse et al., 2009).

Similar results were obtained by Villamizar et al. (2010), who found that polymer concentration was the only factor that significantly influenced the size of Eudragit® S100 microcapsules produced by the solvent evaporation method. Motlekar and Youan (2008), using the Pareto diagram, also concluded that polymer concentration was the unique factor that affected particle coating when heparin was microencapsulated with Eudragit by spray drying. This same behavior was reported by Shah et al. (2011) in a surface analysis which showed that the particle size of aceclophenac microspheres coated with Eudragit®S100 by spray drying were highly dependent of the polymer-drug relationship because when this relationship increased the particle size also increased.

To ensure that microparticles obtained by the top spraying process could be ingested by neonatal *S. frugiperda* larvae for producing its insecticide action, the microparticles must be smaller than the maximum mouth opening of these larvae, which is approximately 70  $\mu\text{m}$  (Villamizar et al., 2010). Keeping this in mind, and considering a diameter superior to the OBs size which is approximately  $2.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$  (Gómez et al., 2010) to guarantee viral microencapsulation, an adequately size range was selected between 10 and 40  $\mu\text{m}$  and used for analyzing the effect of all factors on the particle size frequency.

Figure 2a presents the response surface for size frequency between 10 and 40  $\mu\text{m}$  as a function of the pressure and the polymer concentration, where is possible to observe that response is maximized when the polymer concentration tends to level 0 (5.0%) and the pressure did not affect the frequency of these particle sizes.

When the size particle frequency between 10 and 40  $\mu\text{m}$  was correlated as a function of the nucleus concentration and the pressure (Figure 2b), none of the factors had an effect on the response variable. Nucleus and the polymer concentrations (Figure 2c) generated the maximum response when the polymer concentration fluctuated between levels 0 and +1 (5.0% and 7.5% respectively) and the nucleus concentration did not shown any effect.

Figure 2.

Pareto diagram (Figure 2d) showed that the polymer-polymer interaction and the polymer concentration (B) were again the only factors that had a significant effect over particle size, concluding that when polymer concentration is increased, a higher percentage of microparticles with desired size is obtained.

In some treatments independent spherical particles were observed (Figures 3a) but in other treatments big aggregates were produced possible due to the coalescence of drops during the drying process (Figures 3b). Some microparticles showed cavities or holes that can be attributed to the contraction generated by particle formation during the drying process due to the fast solvent evaporation (Fritzen-Freire et al., 2012).

Figure 3

In the studies of Beck et al. (2004), Cruz et al. (2009) and Raffin et al. (2006) where the Eudragit®S100 and the hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) were used as encapsulation polymers in a spray drying process, spherical microparticles with smooth, irregular and wrinkled surfaces were obtained. These morphologies suggest the possibility of an irregular contraction force during drops drying or could be due to a drops temperature lower than the boiling point of the solvent when the drop layer was formed, causing a wrinkled (raisin) appearance (Dobry et al., 2009). The treatments 21 and 26 that used high pressure of 3 bars and high polymer concentration (7.5%), obtained microparticles that showed a more homogenous morphology and less coalescence, similar behavior to reported by Motlekar and Youan (2008) when heparin was microencapsulated with Eudragit using spray drying process.

In general, the yield for the 27 treatments oscillated between 24.45% and 92.46% (Table 2), a wide range also found by other authors who reported values that oscillate between 72% and 76% (Beck et al. 2004); 21.6% and 62.3% (Tajber et al. 2009) and 50% and 70% (Li et al., 2010).

Response surface for the variable yield as a function of pressure and polymer concentration (Figure 4a) was maximized when pressure oscillated between levels 0 and 1 and polymer concentration was near to level 0 (5%), being the treatment 14 which presented the highest yield with 92.46%. Figure 4b presents the yield as a function of pressure and nucleus concentration, showing the highest response when the pressure tends to level +1 (3 bars) and nucleus tends to level 0 (2%). Yield as a function of the polymer and nucleus concentrations (Figure 4c) showed the maximum response when polymer concentration was near to level +1 (7.5%) and nucleus was around level 0 (2%).

Figure 4.

Pareto diagram (Figure 4d) showed the influence of the evaluated factors and their respective interactions over process yield, being the polymer concentration the factor (B) with the highest significant effect on this response variable, followed by the interactions polymer-polymer (B:B), nucleus-nucleus (N:N), pressure-polymer (A:B), pressure-nucleus (A:N), pressure-pressure (A:A) and the pressure factor (A). In a similar work Tabjer et al. (2009) found that some variables had a positive effect over yield variable, which were the air flow, the inlet temperature and the excipient concentration, while the flow speed had a negative effect. Authors determined that polymer concentration was the factor with the

highest effect over the yield, followed by the interactions polymer-nucleus-pressure and the pressure factor.

Then, a multi-criteria analysis was performed to generate a mathematical model for predicting the optimum factor values in order to obtain the maximum response for particle size between 10 and 40 $\mu\text{m}$  and the yield. Predicted optimum parameters were a pressure of 2.23 bars, a polymer concentration of 6% and a core concentration of 1.35% and predicted responses were a yield of 87.26% and a particle size frequency between 10 and 40  $\mu\text{m}$  of 91.38%.

#### *Virus microencapsulation by spray drying*

Dried virus (nucleus) had a concentration of  $7.17 \times 10^9$  OBs/g, a moisture content of  $3.57 \pm 0.41\%$  and a microbial contamination of  $4.73 \times 10^7$  UFC/g, adequate characteristics to be used as an active ingredient for a viral biopesticide with optimal conditions for microencapsulation process predicted by the mathematical model, dry virus was formulated and the microcapsules presented the following characteristics.

#### *Particle size*

Size of microparticles of three production batches oscillated between 17.64 and 19.47  $\mu\text{m}$ , with a mean size of  $18.84 \pm 8.54 \mu\text{m}$ . The variation coefficient between the batches was lower than 10% (5.49%), which suggests high repeatability between batches. The mean microparticles diameter was not significantly different from the practical value previously determined for these treatments by using magnesium silicate as nucleus ( $23.85 \pm 3.77 \mu\text{m}$ ), confirming process repeatability.

The analysis of particle size frequency showed that 91% of the microparticles presented a desired size between 10 and 40  $\mu\text{m}$  (Figure 5), percentage which was not different from theoretical value estimated with the mathematical model (91.38%).

Figure 5.

#### *Microparticles morphology*

Microparticles with spherical and irregular shapes were obtained (Figure 6). Aggregation of microparticles was observed, phenomenon possible due to the coalescence of drops during the drying process. Clumping results from the formation of a liquid bridge between the wet particles and occurs if

the evaporation capacity of the bed is low (Ronsse et al., 2009) or when ethanol is employed as a solvent, which has demonstrated to favors aggregates formation (Yoo et al., 2011).

Different shapes of the microparticles suggests a heterogeneous distribution of their components (Burki et al., 2011) and observed tendency of microparticles to wrinkle and form folds and cavities (Figure 7c) could be a consequence of the contraction force and viscosity increase during drops drying process (Foster and Laetherman, 1995 in: Raffin et al., 2006).

Figure 6.

Hollow sphere morphology suggests a quick drying process with high temperature close or above to the solvent boiling point, which produces vapor inside the particle generating an empty core (Dobry et al., 2009) and small particles observed on the surface of microparticles could be viral occlusion bodies that were not microencapsulated.

#### *Moisture content (%)*

The moisture content for the three batches oscillated between 9.40% and 11.06% with an average value of  $10.38 \pm 0.87\%$ . Variation coefficient between batches was lower than 10% (8.38%) indicating high process repeatability. However, this moisture content is higher than recommended for this type of bioproducts, which should have a humidity lower than 5% in order to maintain microbial stability during storage conditions (Jones and Burges, 1998). This excessive moisture could favor the proliferation of bacteria, fungus and other contaminating microorganisms (Caballero et al., 2001) and can also cause oxidation of the components in the formulation and formation of free radicals, which can inactivate the virus (Jones and Burges, 1998).

In this sense, spray drying process should be improved for reducing moisture content in the final product, which could be achieved by adjusting some conditions such as inlet temperature and the relationship between spray drying air and flow speed of the suspension feeding the system (Wiggenhorn, 2007). If inlet temperature is increased, evaporation of polymers solvents is faster reducing the moisture content of the product (Rattes and Oliviera, 2007; Año et al., 2011), but it is important to keep in mind that temperature should be maintained below 50°C in order to avoid possible inactivation of viral particles, as reported by Camacho et al., (2013).

### *Residual content of solvents*

Superposition of six obtained chromatograms (three batches and two replicates for each one) is presented in figure 7. Same behavior in chromatograms was observed for three microparticles batches. The only and most abundant compound was the internal pattern (lactic acid) which presented two peaks, one with a time retention of 7.79 minutes and a small one whose time retention was 12.75 minutes (Figure 7).

Figure 7.

This result indicates that the ethanol, solvent used in the microencapsulation process, whose retention time is approximately 1.31 minutes (data not shown), was completely removed confirming the efficiency of the drying process for eliminating the organic solvent. Complete removal of ethanol is due to spraying process conditions as inlet temperatures that fluctuated between 80°C and 92°C with outlet temperatures ranged from 27°C to 45°C. These temperatures favored the ethanol evaporation considering its high vapor pressure of 7.87 kPa (25°C) (Raula et al., 2004), property that depends of the temperature and is directly proportional to the volatility of the substance (Gennaro, 2003).

Obtained result suggests that spray drying could be more efficient than other microencapsulation processes with the polymer Eudragit® S100 for removing organic solvents. For example, in the study of Villamizar et al. (2010) for microencapsulation of a SfNPV by solvent evaporation with the same polymer in order to develop a biopesticide, residues of n-hexane were detected in the final microcapsules which could generate some environmental and health risks (Miller and Gil, 2012). In this sense, efficient removal of ethanol during developed microencapsulation process by spray drying provides an ideal product for application in organic, clean or conventional agriculture since there are no residues of chemical substances.

### *Yield*

The process yield was  $91.20 \pm 6.40\%$ , value which was not different from the estimated by the mathematical model (87.26%). Yield showed an inverse relation with the product moisture content, probably due to the high material losses as a consequence of humid material deposit on internal equipment surfaces. A similar phenomenon was described by Tabjer et al. (2009), who obtained higher process yield

(51.5% and 62.3%) during microencapsulation of budesonide/formoterol fumarate by spray drying, when moisture content was minimum and oscillated between 0.6 and 1.5%.

High process yields have been obtained in different works of microencapsulation with Eudragit® S100 by spray drying, as reported by Beck et al. (2004), who obtained yields from 72% to 76% microencapsulating sodium diclofenac in a Mini Spray Dryer Buchi 190®. Año et al. (2011) also obtained high yields by using high temperatures in a Büchi 191 Mini Spray Dryer with two types of Eudragit® ( $87.2 \pm 6.3\%$  for Eudragit® L30D55 and  $74.2 \pm 5.4\%$  for Eudragit® FS30D).

#### *Concentration of microparticles and encapsulation efficiency*

Theoretical concentration of microparticles was estimated in  $1.03 \times 10^9$  OBs/g based on viral concentration of active ingredient ( $5.46 \times 10^9$  OBs/g) and used quantities of the nucleus and the polymer. Mean experimental concentration of three batches was  $8.73 \times 10^8$  OBs/g, and encapsulation process efficiency was estimated in  $84.61 \pm 13.09\%$ , indicating that the majority of viral particles were microencapsulated.

Developed process improved by more than 30% the microencapsulation efficiency in comparison with the microencapsulation of the same virus with Eudragit® S100 by solvent evaporation method, when efficiency was 53.43% (Villamizar et al., 2010).

Similar results were found by Beck et al. (2004) when microencapsulated diclofenac sodium using Eudragit® S100, with efficiencies between  $82.16 \pm 2.58\%$  and  $95.78 \pm 3.68\%$ . Cruz et al. (2009) also obtained high microencapsulation efficiency preparing microparticles of alendronate sodium with a mix of Eudragit® S100 and Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) with values between  $82.2 \pm 1.1\%$  and  $85.0 \pm 1.3\%$ .

High encapsulation efficiency can be obtained when solidification of the microparticles occurs very fast due to factors such as: low solubility of the polymer in the organic solvent, high solubility of the organic solvent in water, high polymer concentration, a low relationship between the disperse phase and the continuous phase and fast solvent removal (Yeo and Park, 2004). In this sense, the high efficiency with the developed process could be related with the use of ethanol as organic solvent, which presents

high solubility in water, allowing a high mass transfer between the dispersed phase and the continuous phase and favoring polymer precipitation (Jyothi et al., 2010).

#### *Biological activity*

All larvae treated with pure and microencapsulated virus showed typical symptoms of viral disease, such as color change which at the beginning of the infection was light pink and later changed to dark brown. Several larvae tended to move towards the walls and tops of the containers, where tegument became weak and upon breaking released a brown colored fluid, corresponding to the viral progeny as has been also observed in other works (Villamizar et al., 2010; Gómez et al., 2013).

The mean lethal concentration obtained for microencapsulated virus was  $2.5 \times 10^4$  OBs/mL (Table 3). Fiducial limits (95%) obtained for the  $LC_{50}$  of each batch overlapped indicating no significant differences between the pathogenicity of three products and suggesting high repeatability between batches.

Table 3.

The  $LC_{50}$  of microencapsulated virus was lower than obtained for the nucleus or non-encapsulated virus ( $1.2 \times 10^6$  OBs/mL) and the value reported by Gómez et al. (2010) for a liquid suspension of pure virus (Table 4). However, when fiducial limits (95%) were compared, no significant differences were found between treatments, which suggest the same pathogenicity. This behavior allow to conclude that developed microencapsulation process did not affect the insecticidal activity of the viral occlusion bodies, as was reported by Behle et al. (2003) during the encapsulation of the *A. falcifera* nucleopolyhedrovirus with lignin by using spray drying, where insecticidal activity was not affected due to encapsulation process.

Table 4.

#### *Photostability of microencapsulated virus*

The efficacy or insecticidal activity (corrected mortality of larvae) of all evaluated treatments was reduced after irradiation with UVB light (Figure 8), which negatively affected formulated and non-formulated virus, but this effect was more drastic were virus was not microencapsulated.

Initial efficacy (non-irradiated) of dried virus was 89.74% and after six hours of irradiation, the insecticidal activity was reduced to 20.51%. Microencapsulated virus presented initial efficacy of  $96.18 \pm 4.57\%$ , value that were reduced to  $83.81 \pm 5.24\%$  after 6 hours of irradiation (Table 5). This deleterious effect of UVB light is related with the absorption of this radiation by many biological molecules including macromolecules like DNA, causing direct lesions due to the formation of photoproducts such as pyrimidine dimers (appearance of covalent bonds between adjacent pyrimidinic bases: cytosine-cytosine or cytosine-thiamine), pyrimidine hydrates and overlaps between DNA and proteins (Diffey 1991 en: Villamizar et al., 2009).

Figure8.

The efficacies of three batches of the microencapsulated virus and non-encapsulated virus were not significantly different between them ( $F=2.03$ ,  $df=3$ ;  $p=0.1879$ ) before irradiation but after two hours of UV exposure, non-encapsulated virus showed a significantly lower activity ( $F=21.12$ ,  $df=3$ ;  $p=0.0004$ ). This behavior was also observed after four ( $F=31.89$ ,  $df=3$ ;  $p<0.0001$ ) and six ( $F=22.6$ ,  $df=3$ ;  $p=0.0003$ ) hours of irradiation of the non-encapsulated virus with inactivation of 69% and 77% respectively. This result indicates that developed formulation is able to protect viral OBs from deleterious effect of ultraviolet radiation, which is possible related with the microcapsule coat which can act as a physical barrier blocking radiation due to the used the polymer Eudragit®S100 as was demonstrated by Villamizar et al. (2010), but also due to the magnesium silicate added during active ingredient elaboration.

The inactivation of microencapsulated virus in the present study was 8.67% after four hours of exposure to UVB light (302 nm) and similar results were obtained by Villamizar et al. (2010), who microencapsulated another isolation of this virus (NPV001) with Eudragit® S100 by solvent evaporation, which presented an inactivation of 13% after four hours of irradiation with a ReptiGlo 8.0 lamp (33% UVA and 8% UVA) confirming the polymer protective effect against UV-light. This effect could be related with the white color of the polymer in solid state, in suspension or when is moderately solubilized at pHs lower than 7 (Villamizar et al. 2008).

Spray drying has been used for baculovirus formulation with other polymers as lignin improving OBs photostability, as reported by Arthurs et al. (2006) who encapsulated *Cydia pomonella* (CpGV)

granulovirus. Behle and Popham, (2012) also encapsulated two *S. frugiperda* NPVs by spray drying with lignin, obtaining inactivation of 35% of microencapsulated virus irradiated with simulated solar light while non-formulated virus reduced its insecticidal activity in more than 94%.

### **Conclusion**

This study showed the technological feasibility for microencapsulating the *S. frugiperda* NPV003 nucleopolyhedrovirus by spray drying using Eudragit® S100 as a coating polymer. The microencapsulation process under the established conditions did not affect the insecticidal activity of the virus and provided efficient protection from UVB radiation, presenting high potential to be used in the formulation of other biological control agents.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Colombian Agricultural Ministry (MADR) for their financial.

### **Declaration of Interest statement**

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

### **References**

- Año G, Esquisabel E, Pastor M, Talavera A, Cedré B, Fernández S, Sifontes S, Aranguren Y, Falero G, GarcíaL, Solís R, Pedraz J. A new oral vaccine candidate based on the microencapsulation by spray-drying of inactivated *Vibrio cholera*. *Vaccine*,2011;29:5758– 5764.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC.2007. Official methods of analysis. 17th ed. Maryland,USA: AOAC.
- Arthurs S, Lacey L, Behle R. 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*,2006;93:88-95.

- Barrera G, Simón O, Villamizar L, Williams W, Caballero P. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biological Control*, 2011;58:113–120.
- Beck R, Pohlmann A., Guterres S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. *J. Microencapsulation*, 2004; 21: 499–512.
- Behle R, Popham H. Laboratory and field evaluations of the efficacy of a fast-killing baculovirus isolate from *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012;109:194–200.
- Behle R, Tamez-Guerra P, McGuire M, Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations. *J. Econ. Entomol*, 2003;96: 1066–1075.
- Behle R, Tamez-Guerra P, McGuire M. Effect of Light Energy on Alkali-Released Virions from *Anagrapha falcifera* Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000; 76: 120-126.
- Burges H. 1998. Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Holanda:Kluwer Academic Publishers.
- Bürki K, Jeon I, Arpagaus C, Betz G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011;408:248–256.
- Caballero P, LopezFerber M, Williams T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad pública de Navarra, España:Editorial Phytoma.
- Camacho J, Villamizar L, Gómez M. Selección de un sistema de atomización para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 en lecho fluido. *Revista Nova*, 2010;8:87-100.
- Camacho J, Gómez M. Villamizar L. Effect of temperature and two drying processes on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera frugiperda*. *Revista Mexicana de IngenieríaQuímica*, 2013;12:437-450.
- Cheow W, Li S, Hadinoto K. Spray drying formulation of hollow spherical aggregates of silica nanoparticles by experimental design. *Chemical Engineering Research and Design*, 2010;88: 673–685.
- Cruz L, Assumpção E, Stanisçuaski S. High Encapsulation Efficiency of sodium alendronate in Eudragit S100/HPMC blend microparticles. *Quimica Nova*, 2009;32:1170-1174.

- Dobry D, Settell D, Baumann J, Ray R, Graham L, Beyerinck R. A Model Based Methodology for Spray-Drying Process Development. *J Pharm Innov*,2009;4:133-142.
- Finney D. J. 1952.Probit Analysis.Cambridge, England:Cambridge University Press.
- Fritzen-Freire C, Prudêncio E, Pinto S,Negrão-Murakami A, Murakami F. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 2012;45:306-312.
- Gómez J, Guevara J, Barrera G, Cotes A.M, Villamizar L. Aislamiento, Identificación y Caracterización de Nucleopoliedrovirus Nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, 2010; 63:5511-5520.
- Gómez J, Guevara J, Cuartas P, Espinel C, Villamizar L. Microencapsulated *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: insecticidal activity and effect on arthropodpopulations in maize. *Biocontrol Science and Technology*, 2013;23:829-846.
- Horaczek A,Viernstein H. *Beauveria brongniartii* subjected to spray-drying in a composite carrier matrix system. *J. Microencapsulation*,2004;21:317–330.
- Hughes P, Wood HA. A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1981;37:154-159.
- Jin X, Custis D. Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control*,2011;56:202–208.
- Jones K, Burges H.1998.Technology of formulation and application.In H. D.Burges (Ed.), *Formulation of microbial biopesticides. Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments* (pp. 7-27). Netherlands: Kluwer Academic.
- Jyothi N, Prasanna P, Sakarkar S, Prabha K, Ramaiah P,Srawan G. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 2010; 27: 187–197.

- Lacey L, Arthurs S. New method for testing solar sensitivity of commercial formulations of the granulovirus of codling moth (*Cydia pomonella*, Tortricidae: Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*,2005;90:85–90.
- Li X, Anton N, Arpagaus C, Belleteix F, Vandamme Th. Nanoparticles by Spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*,2010;147:304-310.
- Liu Ch, Liu S-D. Low-Temperature Spray Drying for the Microencapsulation of the Fungus *Beauveria bassiana*. *Drying Technology*, 2009;27:747–753.
- Moscardi F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera Annual Review Entomology,1999;44:257–89.
- Moscardi F, Lobo de Souza M, Batista de Castro M, Lara Moscardi M, Szewczyk B. Baculovirus Pesticides: Present State and Future Perspectives Chapter 16 I. Ahmad et al. (eds.), *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, Springer,2011:415-445.
- Motlekar N, Youan B. Optimization of experimental parameters for the production of LMWH-loaded polymeric microspheres. *Drug Design Development and Therapy*, 2008;2:39–47.
- Miller D, Gil M.Spray-Drying Technology R.O. Williams III et al. (eds.), *Formulating Poorly Water Soluble Drugs*, AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series 3. American Association of Pharmaceutical Scientists, 2012.10:363-442.
- Oers M. Opportunities and challenges for the Baculovirus expression system. *Journal of Invertebrate Pathology*,2011;107: S3–S15.
- Raffin R, Jornada D, Ré M, Pohlmann A, Guterres S. Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: Effect of the scale of production and process validation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006;324:10–18.
- Raula J, Eerikäinen H, Kauppinen E. Influence of the solvent composition on the aerosol synthesis of pharmaceutical polymer nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004;284:13–21.
- Rattes A, Oliveira W. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technology*,2007; 171:7–14.

- Ré MI. Microencapsulation by Spray Drying. *Drying Technology*,1998;16:1195-1236.
- Ronsse F, Pieters J. G, Dewettinck K. Modelling heat and mass transfer in batch, top-spray fluidised bed coating processes. *Powder Technology*,2009;190:170–175.
- Shah V, Shinde M, Patil S, Nikam M,Ghodke M,Shah R.Impact of Selected Variables on the Preparation of Aceclofenac Microspheres by Spray Drying using Full Factorial Design. *International Journal of PharmTech Research*, 2011;3:1066-1072.
- Tamez-Guerra P, McGuire M, Behle R, Shasha B, Pingel R. Storage Stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray dried formulations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2002;79:7–16.
- Tajber L, Corrigan O, Healy A. Spray drying of budesonide, formoterol fumarate and their Composites—II.Statistical factorial design and *in vitro* deposition properties. *International Journal of Pharmaceutics*,2009;367:86–96.
- Villamizar L, Martínez F. Estudio fisicoquímico de la solubilidad del EUDRAGIT® S100 en algunos medios acuosos y orgánicos. *Revista Colombiana de Química*, 2008;37(2):173-187.
- Villamizar L, Barrera G, Cotes A, Martínez F. Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical, characterization, photostability and *in vitro* virus release. *Journal of Microencapsulation*,2010;27:314-324.
- Villamizar L, Espinel C, Cotes A.Efecto de la radiación ultravioleta sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*,2009;35:116-121.
- Williams T, Goulson D, Caballero P, Cisneros J, Martínez A, Chapman J, Roman D, Cave R. Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small-scale maize growers in Latin America. *Biological Control*,1999;14:67-75.
- Wiggenhorn M.2007.Scale-Up of Liposome Manufacturing: Combining High Pressure Liposome Extrusion with Drying Technologies. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.München, Germany.
- Winder R, Wheeler J, Conder N, Otvos I, Nevill R, Duan L. Microencapsulation: A Strategy for Formulation of Inoculum. *Biocontrol. Science and Technology*, 2003;13:155-169.

Yeo Y, Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems.

Arch Pharm Res, 2004; 27:1–12.

Yoo J, Giri N, Lee Ch. pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. International

Journal of Pharmaceutics, 2011; 403: 262–267.

Yu C, Wang W, Yao H, Liu H. Preparation of Phospholipid Microcapsule by Spray Drying. Drying

Technology, 2007; 25: 695–702.

ZAR J. 1999. Biostatistical analysis. 4th ed. New Jersey, USA: Prentice Hall.

#### Tables

Table 1. Experimental design Factors and levels

<b>Factors</b>	<b>Levels</b>		
	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Pressure (bar)	1,0	2,0	3,0
Polymer(% w/v)	2,5	5,0	7,5
Nucleus(%w/v)	1,0	1,5	2,0

**Table 2. Particle size and yield of spray dried microparticles prepared with Eudragit® S100 as a polymer and magnesium silicate as the nuclear agent using varied conditions**

Treatment	IP (bars)	Polymer (%w/v)	Nucleus (%w/v)	ITC (°C)	d (µm)	Yield (%)
1	1	2,5	1,0	26,7-48,3	14,77	24,45
2	1	2,5	1,5	18,6-35,6	10,42	30,90
3	1	2,5	2,0	36,1-54,2	12,60	29,98
4	2	2,5	1,0	34,2-50,5	10,84	35,78
5	2	2,5	1,5	15,6-24,0	16,36	51,62
6	2	2,5	2,0	13,9-29,6	15,59	60,72
7	3	2,5	1,0	11,7-25,3	14,0	65,69
8	3	2,5	1,5	13,5-51,7	13,70	54,83
9	3	2,5	2,0	16,8-52,4	16,87	26,47
10	1	5,0	1,0	36,8-52,9	20,50	60,40
11	1	5,0	1,5	34,3-53,1	20,74	75,17
12	1	5,0	2,0	29,8-52,6	20,72	62,32
13	2	5,0	1,0	24,0-47,2	20,26	75,36
14	2	5,0	1,5	32,9- 50,0	19,55	92,46
15	2	5,0	2,0	26,7-47,7	22,20	57,30
16	3	5,0	1,0	24,6- 49,7	19,51	80,81
17	3	5,0	1,5	10,5- 47,7	19,62	78,61
18	3	5,0	2,0	30,6-47,7	19,11	60,86
19	1	7,5	1,0	35,5-48,3	19,28	88,06
20	1	7,5	1,5	35,6- 50,0	18,27	63,08
21	1	7,5	2,0	25,0- 52,7	21,22	62,64
22	2	7,5	1,0	41,5- 50,8	20,52	56,95
23	2	7,5	1,5	28,0- 47,3	18,95	86,51
24	2	7,5	2,0	20,4- 49,2	20,97	86,44
25	3	7,5	1,0	34,0- 53,7	18,99	73,69
26	3	7,5	1,5	26,7- 49,8	20,59	80,60
27	3	7,5	2,0	19,2- 50,7	18,53	49,32

[IP]: internal pressure, [ITC]: internal temperature Chamber, [d]: Average diameter of MPs.

Table 3. Mean lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) of three batches of microencapsulated nucleopolyhedrovirus NPV003 estimated over *S. frugiperda* neonates

Batch	LC <sub>50</sub> (OBs/mL)	Fiducial Limits (OBs/mL) 95%		p	R <sup>2</sup>
		Lower	Upper		
1	1.3 x 10 <sup>4</sup>	2.8 x 10 <sup>2</sup>	6.4 x 10 <sup>5</sup>	0.53	2.19
2	3.1 x 10 <sup>4</sup>	9.1 x 10 <sup>2</sup>	1.0 x 10 <sup>6</sup>	0.63	1.70
3	3.1 x 10 <sup>4</sup>	4.0 x 10 <sup>3</sup>	1.4 x 10 <sup>5</sup>	0.94	0.39
Average	2.5 x 10 <sup>4</sup>	1.7 x 10 <sup>3</sup>	5.9 x 10 <sup>5</sup>	0.70	1.42

Probit regressions were fitted using the PoloPlus program (LeOra software, 1987).

Table 4. Mean lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) of microencapsulated, dried and unformulated nucleopolyhedrovirus NPV003 estimated over *S. frugiperda* neonates

Treatment	LC <sub>50</sub> (OBs/mL)	Fiducial Limits (OBs/mL) 95%		p	R <sup>2</sup>
		Lower	Upper		
Microencapsulated virus	2,5 x 10 <sup>4</sup>	1,7 x 10 <sup>3</sup>	5,9 x 10 <sup>5</sup>	0,70	1,42
Dried virus	1,2 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>	3,1 x 10 <sup>6</sup>	0,30	3,64
Unformulated virus (Gómez et al. 2010)	2,3 x 10 <sup>5</sup>	5,4 x 10 <sup>4</sup>	4,7 x 10 <sup>6</sup>	0,25	4,72

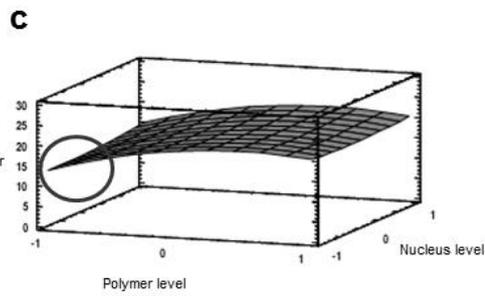
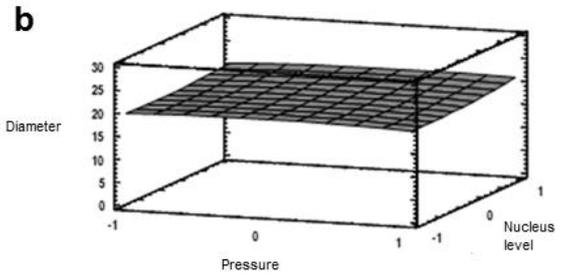
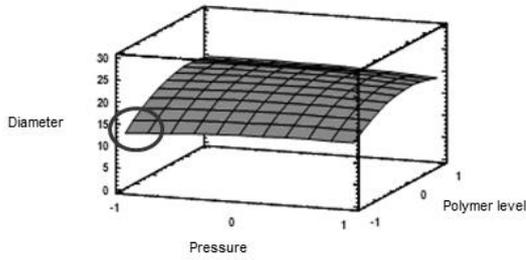
Probit regressions were fitted using the PoloPlus program (LeOra software, 1987).

Table 5. Efficacy, OAR and inactivation of the microencapsulated and dried virus (non microencapsulated)

<b>Time (h)</b>	<b>Samples</b>	<b>Efficacy (%)</b>	<b>OAR (%)</b>	<b>Inactivation (%)</b>
0	Batch 1	97a	100a	0a
	Batch 2	91a	100a	0a
	Batch 3	100a	100a	0a
	Virus	89a	100a	0a
2	Batch 1	100a	100a	0b
	Batch 2	91a	94a	6b
	Batch 3	94a	93a	5b
	Virus	64b	71b	28a
4	Batch 1	92a	95a	5b
	Batch 2	84a	92a	8b
	Batch 3	86a	86a	13b
	Virus	28b	31b	69a
6	Lote 1	87a	89a	10b
	Lote 2	77a	83a	17b
	Lote 3	86a	86a	13b
	Virus	20b	23b	77a

Treatments with the same letter was not significantly different according LSD (95%).

Figures  
a



d

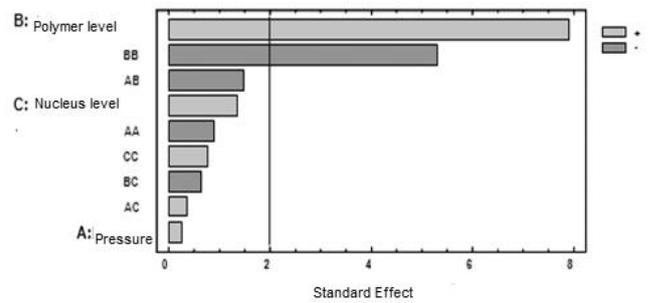


Figure 1.(a) Response surface of the mean diameters as a function of the pressure and polymer level; (b) Response surface of the mean diameters as a function of the pressure and nucleus level; (c)Response surface of the mean diameters as a function of polymer level and nucleus level for microparticles of Eudragit® S100;(d) Pareto diagram

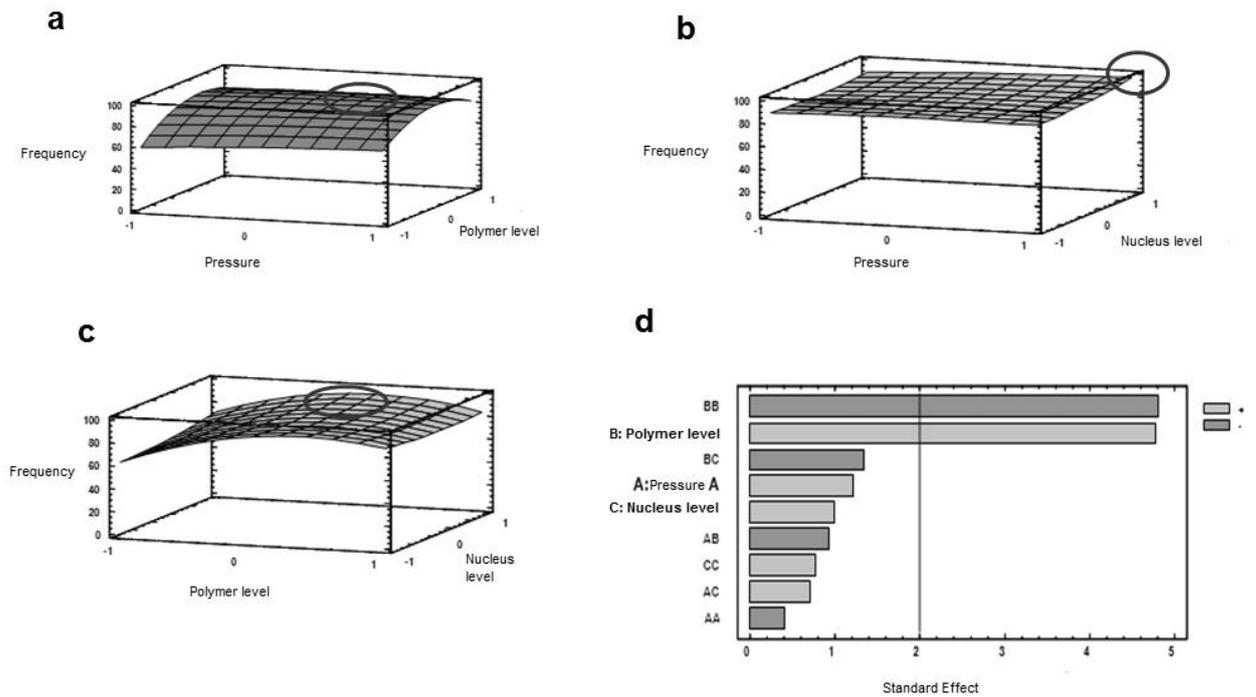


Figure 2.(a)Response surface of the frequency of size between 10 – 40  $\mu\text{m}$  as a function of the pressure and polymer level; (b) Response surface of the frequency of size between 10 – 40  $\mu\text{m}$  as a function of the pressure and nucleus level; (c) Response surface of the frequency of size between 10 – 40  $\mu\text{m}$  as a function of polymer level and nucleus level for microparticles of Eudragit® S100;(d) Pareto diagram

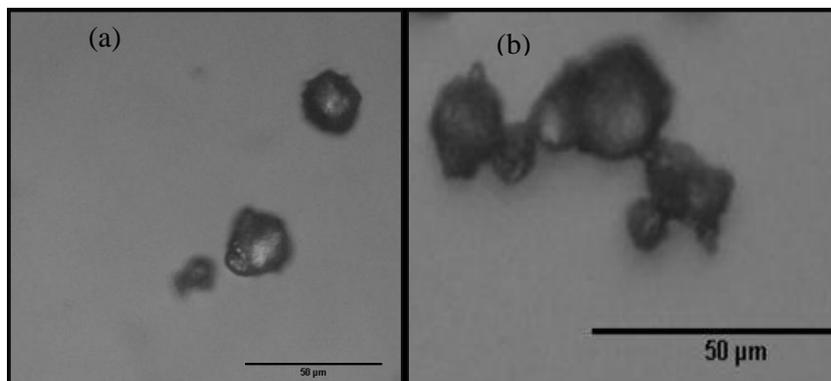


Figure 3. Photographs of Treatments (a) 5 (b)14.Eudragit® S100-spray-dried microparticles. Different magnification. Light microscope

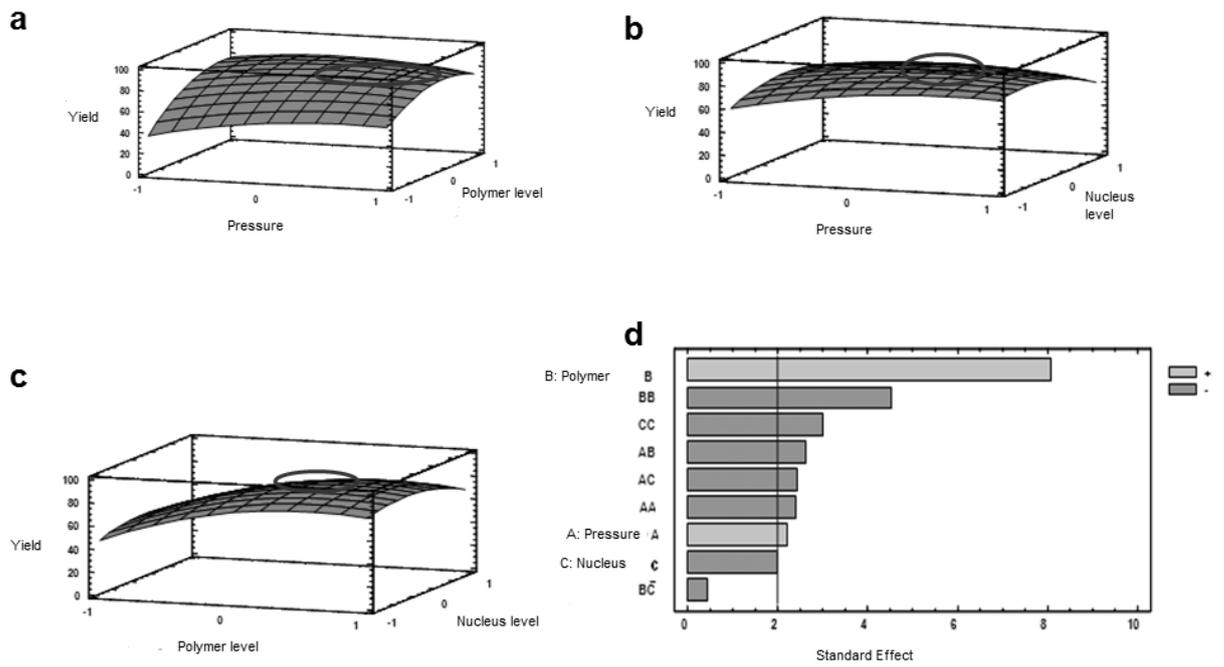


Figure 4.(a) Response surface of yield as a function of the pressure and polymer level; (b) Response surface of yield as a function of the pressure and nucleus level;(c) Response surfaces of yield as a function of polymer and nucleus level for microparticles of Eudragit® S100;(d) Pareto diagram

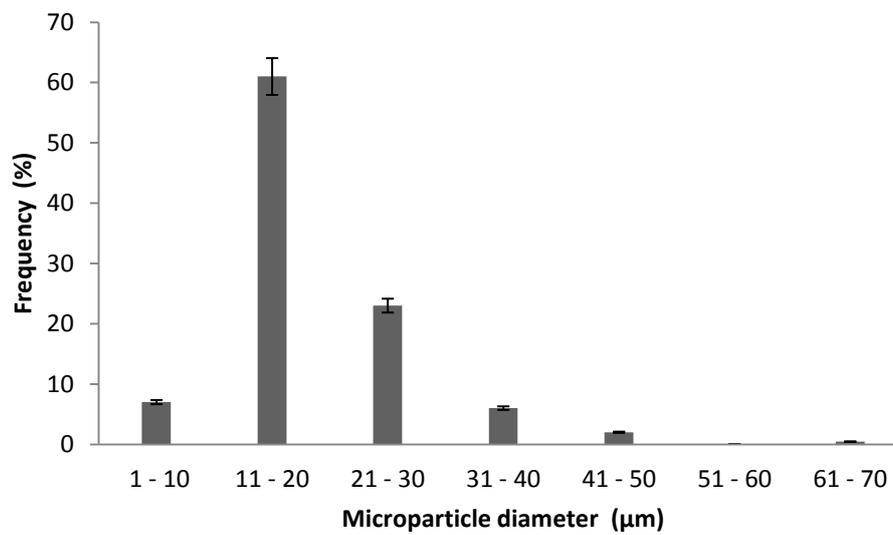


Figure 5. Frequency particle size distribution of batches 1,2 and 3 *S. frugiperda* nucleopolyhedrovirus NPV003-Eudragit®S100-spray-dried microparticles

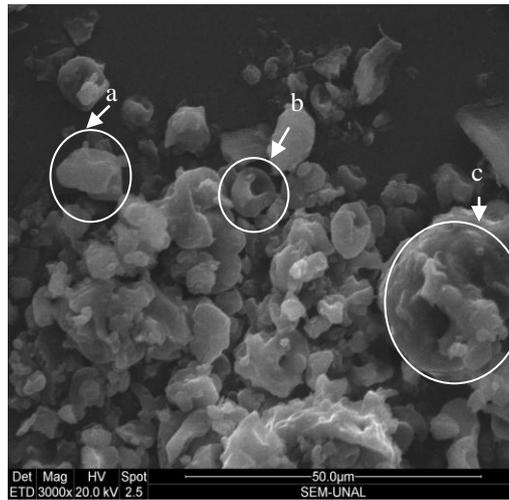


Figure 6. SEM Photographs of *S. frugiperda* nucleopolyhedrovirus NPV003 microencapsulated with Eudragit®S100 by spray drying. a.Smooth surface b.Hollow sphere c. Cavities and folds

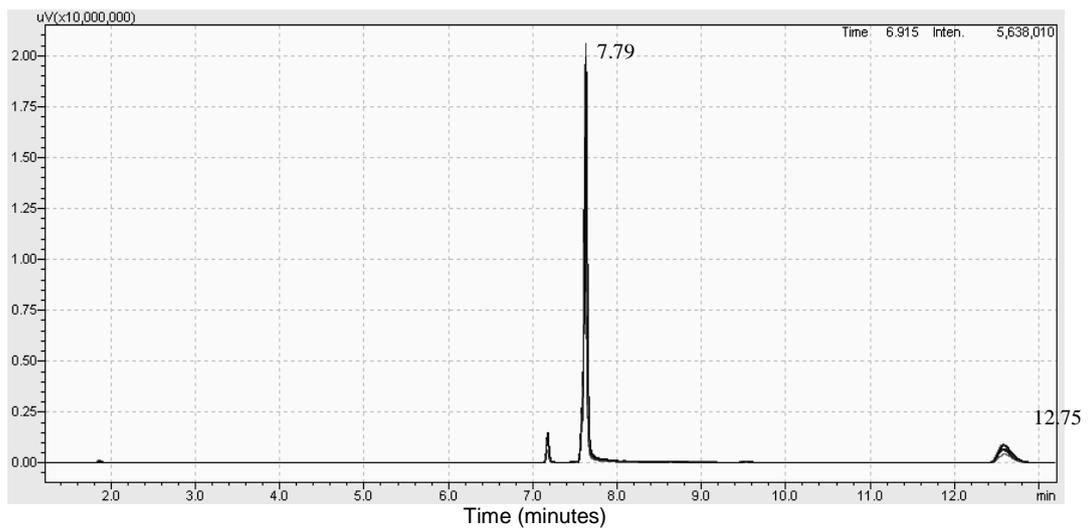


Figure 7. GC-FID chromatograms of Batches 1, 2 and 3 *S. frugiperda* nucleopolyhedrovirus NPV003-Eudragit®S100-spray-dried microparticles

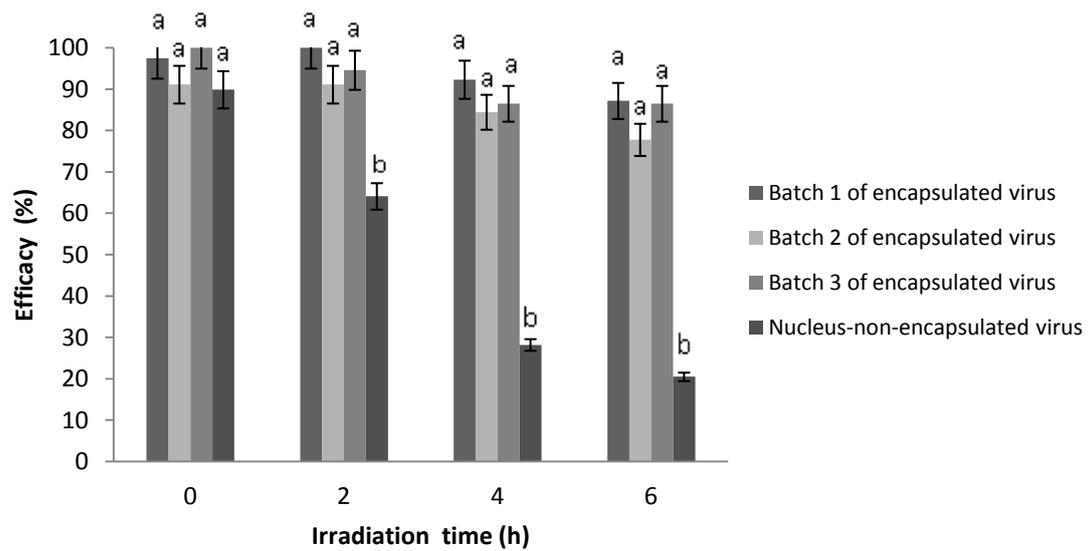


Figure 8. Effect of the UVB radiation on the efficacy of *S. frugiperda* nucleopolyhedrovirus NPV003-Eudragit®S100-spray-dried microparticles. Treatments with the same letter was not significantly different according LSD (95%), applied independent for every time of irradiation.

**EFFECT OF SPRAY DRYER PROCESSING PARAMETERS ON THE  
INSECTICIDAL ACTIVITY OF TWO ENCAPSULATED FORMULATIONS  
OF BACULOVIRUS**

Judith E. Camacho<sup>a</sup>, Robert W.Behle<sup>b</sup>, Laura F.Villamizar<sup>c</sup> and Martha I.Gómez<sup>c</sup>

*<sup>a</sup>Doctorado en Biociencias, Universidad de la Sabana. Puente del Común Km 7 Auto Norte, Bogotá, Colombia.*

*<sup>a</sup>Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Calle 28 No 6 - 02, Bogotá, Colombia.*

*<sup>b</sup>Crop Bioprotection Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, USDA-ARS, 1815 N. University Ave., Peoria, IL 61604-3902, USA*

*<sup>c</sup>Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Bogotá, Colombia.*

(Received ; returned ; accepted )

This work evaluated the effect of spray dryer processing parameters on the process yield and insecticidal activity of baculovirus to the development of this beneficial group of microbes as biopesticides. For two baculoviruses [granulovirus (GV) from *Pieris rapae* (L.) and multiple nucleopolyhedrovirus (MNPV) from *Anagraphafalcifera* (Kirby)]. 32 samples were prepared using the two viruses mentioned, two dryer-atomizer configurations (rotary atomizer and two-fluid spray atomizer), four drying temperatures (50°C to 100°C outlet temperatures), and two encapsulating formulations (lignin and methacrylic acid polymer). Spray-dried samples were evaluated based on yield and insecticidal activity evaluated under laboratory conditions. With water feed rate of 4.12

ml/minute and 20 ml/minute and increasing inlet temperatures. The two atomizing configurations produced similar outlet temperatures. The microparticles produced with a two-fluid spray atomizer had lower product yields ( $57.8 \pm 18.80\%$  -  $74.6 \pm 4.26\%$ ) when compared with the paired samples produced with a rotary-disc atomizer ( $58.1 \pm 7.13\%$  -  $82.6 \pm 3.12\%$ ). Thus, the atomizer selection significantly affected the physical properties like the process yield. Spray drying reduced insecticidal activity of the granulovirus when compared with virus that was not dried. Among dried samples, the spray dryer processing parameters (atomizer, drying temperatures, and formulation) had minimal effect on the insecticidal activity of either baculovirus. These data demonstrate the versatility of spray drying for processing baculoviruses by documenting of the process parameters to improve production yield while having minimal impact on insecticidal activity.

**Keywords:** Baculovirus, microencapsulation, spray drying, lignin, methacrylic acid polymer

## **1. Introduction**

Formulation research on biological agents for pest control is essential for successful marketing of potential products. The goal of this research is to develop formulations of beneficial microbial agents in efforts to provide effective replacements for more toxic chemical pesticides.

One group of biological agents under study is baculovirus due to its high pathogenicity for pest insect species (Miller, 1997; Moscardi, 1999; Caballero, Lopez-Ferber, & Williams, 2001). However, a major constraint for commercial development is their short residual insecticidal activity of treatments when exposed to sunlight (Burgess, 1998; Behle, Tamez-Guerra, & McGuire, 2006; Lacey & Arthurs, 2005; Villamizar, Espinel & Cotes, 2009; Behle & Popham, 2012). To combat this loss, formulations that encapsulate the virus in protective matrixes have been used to provide photostability by minimizing degradation due to solar radiation (Tamez-Guerra et al., 2000a; Tamez-Guerra, McGuire, Behle, Shasha, & Pingel, 2002; Arthurs, Lacey, & Behle, 2006; Behle, Tamez-Guerra, & McGuire, 2006; Villamizar, Barrera, Cotes, & Martínez, 2010).

Encapsulation of viruses may provide additional benefits useful for biopesticides when nontoxic materials are used as components of the formulation. These materials may aid in application by improving mixing characteristics, resist wash-off by rain and dew, and act as a phagostimulant to improve consumption by targeted larvae.

Also, the microcapsule formation serves to mask the presence of the viral agent while small amounts there of are ingested (Winder et al., 2003) and in some cases may improve the insecticidal activity. For example, Tamez-Guerra et al., (2002) reported that

greater insecticidal activity was obtained with the formulations of the nucleopolyhedrovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Kirby) when prepared by spray drying using a lignin polymer (68.8% to 96.6% mortality) when compared with unformulated virus (60.0% mortality). Arthurs et al. (2006) found that the insecticidal activity was also higher with spray-dried formulations of *Cydia pomonella* (L.) granulovirus with lignin (92% to 93.6% mortality) versus unformulated virus (67.2%).

A *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) nucleopolyhedrovirus (*SfNPV*) was microencapsulated with methacrylic acid polymer using an oil-in-oil emulsion (O/O) solvent evaporation method to improve virus photostability without affecting the insecticidal activity (Villamizar et al., 2010). One important feature of this pH-dependent polymer is its mucoadhesiveness, a property that increases the absorption of drugs formulated with this polymer (Nikam et al. 2011). Methacrylic acid polymer is a hydrophobic polymer having a high affinity for lipid membranes and the microparticles can under go pH dependent polymer swelling, passing from a solid state to a gel state, which favors adhesion to mucous membranes (Wang & Zhang, 2012).

Microencapsulation by spray drying has several advantages as a processing technique when compared with solvent evaporation process. Spray drying offers attractive advantages for producing microcapsules in that the process is relatively simple, inexpensive, and a continuous operation (Horazek & Viernstein, 2004). Spray drying uses relatively high inlet temperatures to rapidly evaporate of water from the small droplets of the atomized feed stock. The outlet temperature of the chamber represents the temperature reached by the sample and is controlled by adjusting the flow

rate, and inlet temperature. The processing time is relatively short, which can minimize the damage that may result from exposure of biological material to the elevated temperatures (Ohtake et al., 2010; Jin & Custis, 2011). This study was conducted to gain broad knowledge about the effect of the several processing variables on insecticidal activity of two beneficial baculoviruses, multiple nucleopolyhedrovirus isolated from *A. falcifera* (AfMNPV) and granulovirus isolated from *Pieris rapae* (L.) (PrGV), when encapsulated with two previously reported formulations (lignin and methacrylic acid polymer). Additional processing variables that we evaluated include: two kinds of atomizing nozzles and increasing outlet temperatures.

## **2. Materials and methods**

This work was conducted at the National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, USDA, Peoria, IL, USA between June and September 2013. Work included production of virus, production of sample formulations, and evaluating insecticidal efficacy under laboratory conditions.

### ***2.1. Insect rearing and virus production***

#### *2.1.1. The insect colony*

Insecticidal activities and production of the two baculoviruses used neonate cabbage looper (CL), *Trichoplusia ni* (Hübner) and *P. rapae* (imported cabbage worm, ICW). *T. ni* were from a colony maintained on artificial diet at the USDA-ARS-National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL. Founders for this colony were obtained from USDA-ARS-Biological Control Insect Research Laboratory, Columbia, MO before 2008. Neonate *P. rapae* were from a colony maintained on

cabbage plants at the USDA-ARS-National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL. Founders for this colony were obtained from native population captured in Peoria County, Illinois in July 2013.

### 2.1.2. Production of virus

Fresh *AfMNPV* and *PrGV* were produced *in vivo* using *T. ni* and *P. rapae* larvae, respectively. Virus occlusion bodies (OBs) were produced by inoculating third instar larvae.

For *AfMNPV* newly eclosed *T. ni* larvae were fed on general purpose diet for Lepidoptera (Bio-Serve, Frenchtown, NJ, USA) in individual 30 ml plastic cups for 5-7 d at 25°C. Diet was then contaminated with stock virus and larvae were incubated for an additional 5 d. Larvae were collected from cups, macerated with a blender, filtered through 4 layers of cheesecloth, and the concentration of occlusion bodies was determined by microscopic counts using a Bright-line hemacytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA). The viral suspensions of *AfMNPV* used had between  $1.4 \times 10^9$  OBs/ml and  $1.62 \times 10^9$  OBs/ml.

For *PrGV*, newly eclosed *P. rapae* larvae were transferred to cabbage leaves of greenhouse grown plants ('Bravo F1' hybrid, Harris Seeds, Rochester, NY) and allowed to feed for 7 d at 25°C. Excised cabbage leaf discs (38 mm diameter) were dipped in a suspension of *PrGV* ( $8.5 \times 10^7$  OBs/ml) and 0.1% SilwetL-77 surfactant (polyalkylene oxide modified heptamethyl trisiloxane, GE Silicones, Friendly, WV, USA) mixture then allowed to dry in open petri dishes (50 x 9 mm style, BD Falcon petri dish, Franklin Lakes, NJ, USA) with filter paper (42.5 mm diameter, #1 Whatman,

Buckinghamshire, UK). Ten selected healthy larvae were placed on each leaf disc and incubated at 25°C. Larvae were checked daily and fresh untreated leaf material was added as needed. After larvae started to exhibit signs of virus infection (shiny appearance and sluggish behavior), but before they died, they were transferred to a clean container without leaf tissue or frass and stored in freezer.

Larvae were macerated, diluted with water to form slurry, and filtered through 4 layers of cheese cloth. This virus suspension was diluted 1:1 with 0.2% w/v sodium lauryl sulfate (SDS). The concentration of virus in this mixture was determined microscopically with a counting chamber (Sperm Bacteria, Petroff-Hausser Counter, Hauser Scientific) and stored in freezer. The viral suspension of *PrGV* used had  $3.2 \times 10^{10}$  OBs/ml.

## ***2.2. Microencapsulation by spray drying***

The encapsulated formulations were prepared in a Niro atomizer (Niro, Columbia, MD, USA) spray dryer using a 4.12 ml/minute for dosage response assay and 20 ml/minute feed rate for single dosage assay, unless otherwise stated.

### ***2.2.1. Drying parameters***

Two nozzles for top down atomization of the feed stock were compared, (rotating disc and two-fluid atomizer systems, GEA Niro, Søborg, Denmark). Standard operating pressures were 5.8 bars for the rotating disc atomizer and a 34% pressure to the two fluid atomizer systems. The inlet temperatures used for drying samples were 100°C, 128°C, 152°C and 170°C as provided by dial settings of I-4.5, I-6.0, I-7.0 and II-4.0, respectively. These settings were expected to provide a range of outlet

temperatures between 50 and 100°C. Final outlet temperatures varied slightly among runs due to relative inaccuracy of the controls, and ambient environmental conditions in the pilot bay. Two atomizer configurations for atomizing dryer feed were initially compared in preliminary runs for impact on resulting outlet temperatures by simply drying water and sample formulations without virus feed stocks at a 20 ml/min. A total of 6 runs were realized, two runs using water, two runs using lignin formulation without virus and two runs using Eudragit®S100 formulations without virus. The last measure of each treatment was recorded for the analysis using Excel program 2007. Linear regression trend lines were generated to compare Outlet Temperature/Inlet Temperature correlation for the two atomizer configurations based on the regression slopes.

#### 2.2.2. Formulations

To investigate influences of formulation compositions, two previously reported formulations were prepared and spray dried to encapsulate the viruses. The lignin formulation was produced using 8g of sodium lignin powder (PC-1307, Westvaco, Charleston Heights, SC) dissolved in 72 g of water. Then, virus stock (*AfMNPV* or *PrGV*) was added to the lignin solution followed by 1.6 g calcium chloride dihydrate (dissolved in 32 g water). An additional 88 g water was added creating the 5% w/w solids dryer feed as reported previously (Tamez-Guerra et al., 2000a; 2000b; Arthurs et al., 2006; Behle et al., 2006; Behle & Popham 2012). The second formulation was made with methacrylic acid polymer (Eudragit® S100, Röhm GmbH & Co.). Six g was added to 70 ml pH 8.0 phosphate buffer solution (972.5 ml of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M and 27.5 ml of citric acid 0.1 M to 1L) with continuous agitation in a magnetic stir plate at high rpm.

Then, 30 ml of ethanol (98%) were added with continuous agitation until a clear solution was obtained (Camacho, Villamizar, & Gómez, 2010) then the virus stock (*AfMNPV* or *PrGV*) was added creating the 7.98% solids dryer feed. For the lignin formulation, virus was added to produce a product with  $2.2 \times 10^9$  OBs/g dried powder and for the methacrylic acid polymer formulation to provide  $1.66 \times 10^9$  OBs/g. A total of thirty two samples were prepared; sixteen samples were prepared for each virus and for each formulation.

For the formulations with solids content 10% w/v was mixed 16 g sodium lignin powder and 3.2 g calcium chloride dihydrate for lignin formulation and 8 g methacrylic acid polymer and 1.98 g phosphates buffer solution for methacrylic acid polymer formulation. The formulations were prepared following procedures described previously with and without virus. When virus was added, final dried products were expected to contain  $2.2 \times 10^9$  OBs/g dried powder for both polymers. A total of eight samples were prepared; four samples were prepared for each virus, and for each formulation.

### *2.2.3. Effect of the outlet temperature on the formulations compositions*

To investigate influences of outlet temperatures (Table 1) on the formulation compositions, these formulations were prepared following procedures described previously. Both viruses were produced using the *in vivo* techniques described above. Samples were prepared using both the rotating disc atomizer and the two-fluid atomizer. The liquid feed flow rate was 20 ml/minute, the atomization pressure was 5.8 bars for the rotating disc atomizer and a 34% pressure for the two-fluid

atomizer system. A total of thirty two samples were prepared. A total of sixteen samples were prepared using 5% content of solids (lignin formulation) and a total of sixteen samples were prepared using 7.98% content of solids (Eudragit®S100 formulation).

The influences of the outlet temperature was determinate using assay to evaluate insecticidal activity.

#### ***2.4. Physical evaluations***

The yield was calculated based on dividing of the weights of the spray-dried powders collected by the total mass of solids introduced in the feed stock. Calculated yield measurement was performed for each formulation sample. A total of sixteen samples were prepared using 5% content of solids (lignin formulation) and a total of sixteen samples were prepared using 7.98% content of solids (Eudragit®S100 formulation) and an additional eight samples were prepared using 10% content of solids (both formulations).

#### ***2.5. Insecticidal activity***

Two assays were used to evaluate insecticidal activity of spray dried samples of baculovirus. The first assay was a dosage response assay to determine  $LC_{50}$  and  $LC_{80}$  concentrations for four representative formulations for each virus. The  $LC_{80}$  concentrations were used for subsequent single dosage assays to compare among the 16 formulations made from the combinations of drying parameters for each virus. Freshly prepared spray dried virus formulations were assayed within 2 weeks of production for all experiments. Specific methods varied to address specific needs of each virus as follows.

### 2.5.1. Dosage Response Assay

The dosage response assay compared two spray dried formulations (lignin and methacrylic acid polymer) produced at two different temperatures (inlet temperatures of 100 and 140°C) using rotating disc atomizer (4 formulation treatments for each virus). For *AfMNPV* and *PrGV* samples, the treatments included the control (without virus), and the four spray dried formulations. The cabbage leaf discs (dia. = 38 mm) were placed in 50 x 9 mm self-seal petri dishes (BD Falcon) with a piece of filter paper. For both viruses were used 5 dishes per treatment x dose. The leaf discs were excised from cabbage plants ('Bravo F1' hybrid, Harris Seeds, Rochester, NY) grown in pots in a glasshouse and washed with DI water.

For *AfMNPV*, unformulated and formulated samples were mixed with deionized water to create concentrations of  $1 \times 10^7$  OBs/ml,  $3.3 \times 10^6$  OBs/ml,  $1.1 \times 10^6$  OBs/ml,  $3.7 \times 10^5$  OBs/ml,  $1.2 \times 10^5$  OBs/ml. Then, 100  $\mu$ l of virus suspension was applied to each leaf disc, spread with a glass rod, and allowed to air-dry. The application was expected to provide 1,000,000; 330,000; 110,000; 37,000 and 12,000 *AfMNPV* OBs/leaf disc. Twelve *T. ni* neonates were added to each dish. The larvae were incubated at 28°C and allowed larvae to feed for 24 h. Thirty larvae (six larvae from each of five dishes) were transferred per treatment dosage to individual cups containing diet and incubated at 28°C for an additional 6 d. During the incubation period, larvae were evaluated daily for mortality.

For *PrGV*, samples were diluted to  $1.2 \times 10^6$  OBs/ml,  $4.2 \times 10^5$  OBs/ml,  $1.4 \times 10^5$  OBs/ml,  $4.67 \times 10^4$  OBs/ml,  $1.17 \times 10^4$  OBs/ml. Each leaf disc was treated with 25  $\mu$ l to provide 30,000, 10,500, 3,500, 1,167, and 292 OBs/leaf, respectively. Following the procedure outlined for the *AfMNPV*, 12 *P. rapae* neonates were added to each dish for the 24 h feeding period at 28°C. The larvae were transferred to individual cups containing fresh untreated leaf discs for the 6 d incubation period prior to evaluation for mortality. During the incubation period, larvae were evaluated daily for mortality.

For the both assays, final larvae mortality was determined seven days after the initial exposure to virus. The experimental design was completely random with factorial arrangement and three repetitions for each treatment. After incubation, larvae were evaluated for mortality and the results were subjected to POLO Plus (version 2, LeOra Software, Petaluma, CA) analysis to determine  $LC_{50}$  and  $LC_{80}$  values.

#### 2.5.2. Single Dosage Assay

For the second assay technique, spray dried formulations of *AfMNPV* and *PrGV* samples were produced at 4 different inlet temperatures using rotating disc atomizer and two fluid atomizer (16 formulation treatments for each virus). Formulation treatments for each virus were compared using a single dosage bioassay at the previously calculated  $LC_{80}$  for the cabbage leaf disc assay against *T. ni* larvae and *P. rapae* neonates for *AfMNPV* and *PrGV* treatments, respectively. The treatments included a no-virus control, an unformulated virus control, and 16 spray dried formulations made with the inlet temperatures  $100 \pm 10^\circ\text{C}$ ,  $128 \pm 10^\circ\text{C}$ ,  $150 \pm 10^\circ\text{C}$  and  $170 \pm 10^\circ\text{C}$  with the rotating disc atomizer. The dosage for *AfMNPV* treatments applied a concentration of

$1.9 \times 10^6$  OBs/ml. The dosages for *PrGV* applied concentrations of  $1 \times 10^5$  OBs/ml for unformulated virus and  $5 \times 10^5$  OBs/ml for spray-dried formulated virus. Following the bioassay techniques described for the dosage response assay, 25  $\mu$ l samples of each treatment (47,500 OBs/leaf disc for *AfMNPV* and 2500 OBs/leaf disc for unformulated *PrGV* virus and 12,500 OBs/leaf for formulated *PrGV* virus) were applied to each leaf disc.

Larvae mortality was determined seven days after inoculation. The experimental design was completely random with factorial arrangement and three repetitions for each treatment. After incubation, larvae were evaluated for mortality.

## 2.6. Statistical analysis

Dosage response was determined using POLO Plus version 1 software (LeOra Software Company, Petaluna, CA). The mortality data for single dosage assays were subjected to analysis of variance and treatment means were separated by the least significant difference LSD (95%) test using the SAS (v9.4) Software (SAS Institute Inc., Cary, NC). The out - standard deviation SDs for each outlet temperature mean was determined using Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. *Microencapsulation by spray drying*

#### 3.1.1. *Drying parameters*

Preliminary operation of the dryer showed that the two atomization techniques provided similar outlet temperatures for each of the increasing inlet temperatures (Figure 1). When averaged over four preliminary runs using dryer feeds consisting of water or

formulations without virus, the rotating disc nozzle had inlet temperatures of  $100\pm 0^{\circ}\text{C}$ ,  $125\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $148\pm 5^{\circ}\text{C}$ , and  $184\pm 12^{\circ}\text{C}$  that produced outlet temperatures of  $52\pm 0^{\circ}\text{C}$ ,  $70\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $83\pm 2^{\circ}\text{C}$ , and  $95\pm 5^{\circ}\text{C}$ . The two fluid nozzle had inlet temperatures of  $100\pm 0^{\circ}\text{C}$ ,  $131\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $153\pm 5^{\circ}\text{C}$  and  $174\pm 12^{\circ}\text{C}$  that produced outlet temperatures of  $51\pm 4^{\circ}\text{C}$ ,  $72\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $83\pm 1^{\circ}\text{C}$ , and  $93\pm 3^{\circ}\text{C}$ . These data showed a linear outlet temperature (OT)/ inlet temperature (IT) correlation,  $R^2=0.9816$  for rotating disc and  $R^2= 0.9903$  for the two nozzle spray. According, the slope the two nozzle spray is faster to obtain outlet temperature for each of the increasing inlet temperatures (slope = 0.57 OT/IT) than the rotating disc Nozzle (slope = 0.54 OT/IT). The slopes are different, possibly because the flatter sloped of the two fluid nozzle may have resulted from the use of compressed air to atomize the feed liquid and discharged into the drying chamber may have an added cooling affect in the dryer.

Moreover, possibly because the degree of atomization for the rotating disc atomizer depends on the wheel speed, feed rate, liquid properties (viscosity and surface tension) and atomizer design (Teunou & Poncelet, 2005), while the two-fluid atomizer employs compressed air as the energy source to atomize the liquid spray at the nozzle tip (Suryan, Sun Kim, & Dong Kim, 2010).

### *3.1.2. Formulation characteristics with virus*

Lignin and methacrylic acid polymer formulations were spray-dried to encapsulate *AfMNPV* and *PrGV* with both atomizers and at different temperatures. The resulting outlet temperatures were similar to those obtained when drying the

formulations without virus. This similarity indicates repeatability of the spray drying process used for the microencapsulation of these viruses with lignin and methacrylic acid polymer.

Microencapsulated baculoviruses with lignin using rotating disc atomizer yielded an average of  $80.3 \pm 0.84\%$  and  $82.6 \pm 3.12\%$  for *AfMNPV* and *PrGV*, respectively (Table 1). Similar drying yields (82.6%) were found by Behle et al. 2011 when encapsulating nootkatone oil with lignin as a formulation intended for control of ticks. Baculoviruses microencapsulated with methacrylic acid polymer and the rotating disc atomizer yielded  $58.1 \pm 7.13\%$  for *AfMNPV* and  $78.5 \pm 4.49\%$  for *PrGV*.

The lignin formulation dried using the two-fluid atomizer yielded an average of  $57.8 \pm 18.80\%$  for *AfMNPV* and  $74.6 \pm 4.26\%$  for *PrGV*. The methacrylic acid polymer formulation yielded  $67.1 \pm 7.85\%$  for *AfMNPV* and  $65.8 \pm 1.62\%$  for *PrGV*. Spray drying virus formulations with the two-fluid atomizer had lower product yields compared with the rotating disc atomizer ( $F= 4.52$ ;  $df= 1, 31$ ;  $P= 0.0495$ ) (Table 5). Product loss was the result of greater amounts of dried powders that accumulated in the dryer chamber when using the two fluid nozzle.

However, increasing the dryer temperature with the two-fluid atomizer system increased the yield for both formulations (Table 1). The two fluid nozzle was created to provide a large evaporative surface area by atomizing liquid feed stock into very small droplets (Suryan et al. 2010). ). Año et al. (2011) also obtained higher yields at high inlet temperatures (100°C) for the microparticles prepared with two types of

methacrylic acid polymer ( $87.2 \pm 6.3\%$  for Eudragit® L30 D55 microparticles and  $74.2 \pm 5.4\%$  for Eudragit® FS30D microparticles).

Esposito, Roncarati, Cortesi, Cervellati & Nastruzzi (2000) indicated that the drying temperatures play a role in the size of the microparticles and yield of the spray drying process. An increase in temperature at the head of the nozzle produces a higher heating atomization chamber, providing a better evaporation of the carrier (water) and decreasing the humidity of the microparticle. Lower particle humidity reduced adhesion of the particle to the chamber walls and thus increases the final product yield. The greatest loss of the product in this process occurs mainly by deposition on the walls of the chamber and other parts of the machine (Bürki, Jeon, Arpagaus, & Betz, 2011).

The treatments previously reported were prepared with solids content between 5% and 7.98%. To compare the effect of solids content, subsequent formulations were prepared with a content of 10% solids feed stock. These samples dried at an inlet temperature of 100°C resulted in outlet temperatures between 55 and 62°C (Table 2). The yield for the samples prepared with rotating disc atomizer averaged  $84.6\% \pm 3.45$ . The yield for the samples prepared with two-fluid atomizer averaged  $58.0\% \pm 6.85$ , similar results to those made from lower solids feed stock at the same inlet temperature. The lower yield was observed for samples made with methacrylic acid polymer using two-fluid atomizer, which was related to the sticking of the polymer to the walls of the spray cylinder, cyclone, and tubing, resulting in smaller quantities of microparticles reaching the collection container. Similar results were observed by

Alhnan & Basit (2011) when microencapsulated by spray drying prednisolone with Eudragit S and Eudragit L using a Niro SD Micro dryer.

### *3.2. Insecticidal activity under laboratory conditions*

#### *3.2.1. Dosage response mortality*

Four samples of *AfMNPV* and *PrGV* were spray dried and used to determine dosage response mortality of respective larvae exposed to treated leaf discs, Figure 2 and Figure 3. These products were prepared using a lower product feed rate of 4.12 mL/minute that resulted in increased outlet temperatures when compared with outlet temperatures resulting from a 20 mL/minute feed rate (Table 1 and Table 2). For samples dried at 100°C inlet temperature, the outlet temperatures were 67, 69, 73 and 75°C for *AfMNPV* methacrylic acid polymer, *AfMNPV* lignin, *PrGV* methacrylic acid polymer and *PrGV* lignin samples, respectively. For the same products microencapsulated at the high inlet temperature of 140°C, the resulting outlet temperatures were 67, 53, 115 and 101°C, respectively. Outlet temperatures were unusually low for the *AfMNPV* samples dried at the high inlet temperature because of an incomplete seal of the dryer lid, which allowed entry of ambient air into the chamber and resulted in the unusually cool outlet temperatures for the machine settings. This problem was corrected for all other dryer runs.

Based on dosage response mortalities, there were no significant differences (confidence limits for lethal dose ratio include 1.0, Table 3) among LC<sub>50</sub>s for the five formulated and unformulated treatments of *AfMNPV* (Figure 2). LC<sub>50</sub> values were  $3.7 \times$

$10^5$ ,  $5.6 \times 10^5$ ,  $6.9 \times 10^5$ ,  $4.4 \times 10^5$ , and  $3.9 \times 10^5$  OBS/mL treatment concentration for unformulated, low temperature lignin, high temperature lignin, low temperature methacrylic acid, and high temperature methacrylic acid, respectively.

In contrast, larval mortalities showed that drying *PrGV* virus significantly reduced insecticidal activity (confidence limits for lethal dose ratio did not include 1.0, Table 4) for the granulovirus when compared with unformulated virus that was not exposed to the spray dryer (Figure 3).  $LC_{50}$  values were  $1.1 \times 10^4$ ,  $1.9 \times 10^5$ ,  $4.1 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$ , and  $5.3 \times 10^5$  OBS/mL treatment concentration for unformulated, low temperature lignin, high temperature lignin, low temperature methacrylic acid, and high temperature methacrylic acid, respectively. The lethal concentration for microencapsulated *PrGV* was lower than  $LC_{50}$  for unformulated virus demonstrated that the drying process reduced insecticidal activity of viral isolate *PrGV*, regardless of the encapsulating formulation or outlet temperature during spraying drying process. The effect of spray drying on insecticidal activity of the *PrGV* formulations could be the result of the different morphological structure of the baculovirus. The nucleopolyhedrovirus have many enveloped virions in each occlusion body while the granulovirus occlude only one enveloped virion each (Moscardi,1999), which could explain why the granulovirus was more sensitive to drying than the nucleopolyhedrovirus.

### 3.2.2. Single Dosage Mortality

The lignin formulation with rotating disc atomizer, the lignin formulation with two-fluid atomizer, and the methacrylic acid formulation with two-fluid atomizer are

hardly influenced by the temperature, and infectivity of these formulations fluctuates with relatively low values and the infectivity of the methacrylic acid formulation with rotating disc atomizer reduces by increasing temperature (Figure 4), which could be related to product loss during the process when is used this kind of nozzle with Eudragit ®S100 (Figure 6).

The unformulated viral suspension AfMNPV was not exposed to dryer temperatures, caused a mortality of 70%, while the treatments exposed to the inlet temperature: 100°C, 128°C, 152°C and 170°C resulted in outlet temperatures of 49°C, 70°C, 85°C and 89°C, respectively. The individual mortalities for spray dried samples ranged from 20% to 73% (Figure 4). The average insect mortalities among the outlet temperatures were not significantly different ( $P>0.05$ ) (Figure 4), indicating that the outlet temperatures did not affect virus activity.

Insect mortalities for formulated samples made with the two different atomizers for the atomization also were not significantly different ( $P>0.05$ )(Figure 4), which indicates that either can be used for the microencapsulation process. As noted, the effect of the atomizers is their impact on product loss as they affect the physical properties of feed stock atomization during the drying process.

The insecticidal activity of encapsulating formulation samples processed at different outlet temperatures were not significantly different ( $P>0.05$ )(Figure 4). The average mortality for larvae exposed to the methacrylic acid polymer formulation (ES 100C, ES 100S) (Figure 4) was 73% compared with the lignin (Lignin C, Lignin S) (Fig. 4) that averaged 63% mortality. The mortality greatly fluctuated by the

formulation conditions as shown in Fig. 4. Such destabilization of insecticidal activity is a serious problem to the practical use of the microbial insecticide.

For *PrGV* applied at  $LC_{80}$  concentrations, unformulated viral suspension not exposed to drying provided a mortality rate of 93%, and the dried treatments exposed to the inlet temperature: 100°C, 128°C, 152°C and 170°C resulted in outlet temperatures 52°C, 77°C, 89°C and 94°C, respectively provided mortalities ranging from 67% to 93% (Fig. 5). When comparing among outlet temperatures, larval mortalities were not significantly different ( $F = 1.01$ ;  $df = 3, 15$ ;  $P = 0.4282$ )(Table 6) (Figure 5), indicating that the outlet temperatures did not affect insecticidal activity. This lack of significance may have resulted from the short duration of exposure. The small samples were processed in 20 minutes from the start to finish for each sample.

The use of different atomizers for the atomization did not significantly affect insecticidal activity ( $F = 0.72$ ;  $df = 1, 15$ ;  $P = 0.4160$ ) (Table 6)(Figure 5), which indicates that either can be used for the microencapsulation process. As noted, the effect of these atomizers is more related to product loss during the process rather than the physical properties of the product.

Selection of the formulation used to encapsulate the *PrGV* virus significantly affected insecticidal activity ( $F = 12.84$ ;  $df = 1, 15$ ;  $P = 0.0050$ ) (Table 6)(Figure 5). Methacrylic acid polymer (ES 100C, ES 100S, Fig. 5) averaged significantly higher insecticidal activity with mortalities between 80% and 93% compared with lignin encapsulated virus (Lignin C, Lignin S, Fig. 5) with mortalities between 67% and 83%.

Figure 5.

The effects of temperature on viral stability are crucial to their effectiveness in the field (Sporleder, Zegarra, Rodriguez-Cauti, & Kroschel, 2008). Higher temperatures have been reported to reduce infectivity (Michalsky, Pfromm, Czermak, Sorensen, & Passarelli, 2008), possibly due to hydrolysis and auto-oxidation resulting from exposure to free radicals derived from lipids of the larvae, which are not removed from the virus suspension (Lasa, Williams, & Caballero, 2008), denaturing the capsid, or conformational changes in capsid proteins (Boshetti, Wyss, Mischler, Hostettler, & Kempf, 2003). Our data for two baculoviruses exposed to outlet temperatures up to 90°C do not support the assumption that higher temperatures reduce insecticidal activity. This difference may be the result of the short exposure duration in the spray dryer and or benefits provided by the formulation ingredients.

#### **4. Conclusions**

This study showed the technological feasibility for microencapsulating baculovirus with lignin and methylacrylic acid polymer by spray drying using two kinds of nozzles. The microparticles produced with a two-fluid spray atomizer had lower product yields when compared with the paired samples produced with a rotary-disc atomizer. The microparticles produced with rotary-disc atomizer and methylacrylic acid polymer formed residue on the wheel, reducing product yield (Figure 6). The atomizer significantly affected the physical properties like the process yield. However, the spray dryer processing parameters (atomizer, drying temperatures, and formulation) had minimal effect on the insecticidal activity of two baculoviruses. These data demonstrate the versatility of spray drying for processing baculoviruses by documenting the impact

of the process to improve production yield while having minimal impact on insecticidal activity. Future research to complement this study could be verification of insecticidal activity of various formulation when applied under field conditions and to demonstrate photostability of both formulations.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Erica Goett for technical assistance and for providing larvae used for production of virus and in assay evaluations for insecticidal activity.

### **References**

- Alhnan, M., Basit, A. (2011). Engineering polymer blend microparticles: An investigation into the influence of polymer blend distribution and interaction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, 30–36.
- Año, G., Esquisabel, E., Pastor, M., Talavera, A., Cedré, B., Fernández, S., Sifontes, S., Aranguren, Y., Falero, G., García, L., Solís, R., Pedraz, J. (2011). A new oral vaccine candidate based on the microencapsulation by spray-drying of inactivated *Vibrio cholera*. *Vaccine*, 29, 5758– 5764.
- Arthurs, S., Lacey, L., 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.
- Behle, R., 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., McGuire, M. (2006). Evaluating conditions for producing spray-dried formulations of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedroviruses (AfMNPV). *Biocontrol Science and Technology*, 16, 941-952.
- Behle, R., Flor Weiler Lina, Bharadwaj Anuja, Stafford Kirby C. (2011). A formulation to Encapsulate Nootkatone for Tick Control. *Journal of Medical Entomology*, 48, 1120-1127.
- Boschetti, N., Wyss, K., Mischler, A., Hostettler, T., Kempf, C. (2003). Stability of minute virus of mice against temperature and sodium hydroxide. *Biologicals*, 31, 181-185.
- Burges, H. (1998). *Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Kluwer Academic Publishers. Holanda.
- Bürki, K., Jeon, I., Arpagaus, C., 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., Williams, T. (2001). *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Universidad pública de Navarra. Editorial Phytoma, España.
- Camacho, J., Villamizar, L., Gómez, M. (2010). Selección de un sistema de atomización para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 en lecho fluido. *Revista Nova*, 8, 87-100.
- Eposito, E., Roncarati, R., Cortesi, R., Cervellati, F., Nastruzzi, C. (2000). Production of Eudragit microparticles by spray-drying technique: influence of experimental

- parameters on morphological and dimensional characteristics. *Pharm. Dev. Technol.*, 5,267–78.
- Horaczek, A., 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.
- Jin, X., Custis, D. (2011). Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control*, 56,202–208.
- Lacey, L., 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.
- Lasa, R., Williams, T., Caballero, P. (2008). Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) Formulation Stored at Different Temperatures. *Journal of Economy Entomology*, 101, 42-49.
- Michalsky, R., Pfromm, P., Czermak, P., Sorensen, C., 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.
- Miller, L.K. (1997). *The Baculoviruses*. PLENUM PRESS, New York, London.
- Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review Entomology*, 44,257–89.

- Nikam, V., Kotade, K., Gaware, V., Dolas, R., Dhamak, K., Somwanshi, S., Khadse, A., Kashid, A. (2011). Eudragit a versatile polymer: A Review. *Pharmacologyonline*, 1, 152-164.
- Ohtake, S., Martin, R., Yee, L., Chen, D., Kristensen, D., Lechuga-Ballesteros, D., Truong-Le, V. (2010). Heat-stable measles vaccine produced by spray drying. *Vaccine*, 28, 1275–1284.
- Sporleder, M., Zegarra, O., Rodriguez-Cauti, E.M., Kroschel, J. (2008). Effects of temperature on the activity and kinetics of the granulovirus infecting the potato tuber moth *Phthorimaea perculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). *Biological Control*, 44, 286–29.
- Suryan, A., Sun Kim, D., Dong Kim, H. (2010). Experimental Study on the Inlet Fogging System Using Two-Fluid Nozzles. *Journal of Thermal Science*, 19, 132-135.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M., Behle, R., Shasha, B., Pingel, R. (2002). Storage Stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray dried formulations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 79, 7–16.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M., Behle, R., Hamm, J., Sumner, H., Shasha, B. (2000a). Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 93, 210–218.

- Tamez-Guerra, P., McGuire, M., Behle, R., Shasha, B.S., Galán, L. (2000b). Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 93, 219–225.
- Teunou, E., Poncelet, D. (2005). Rotary disc atomization for microencapsulation applications—prediction of the particle trajectories. *Journal of Food Engineering*, 71,345–353.
- Villamizar, L., Barrera, G., Cotes, A., Martínez, F. (2010). Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical, characterization, photostability and *invitro* virus release. *Journal of Microencapsulation*, 27,314-324.
- Villamizar, L., Espinel, C., 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.
- Wang, X., Zhang, Q. (2012). pH-sensitive polymeric nanoparticles to improve oral bioavailability of peptide/protein drugs and poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*,
- Winder, R. S., Wheeler, J. J., Conder, N., Otvos, I. S., Nevill, R., Duan, L. (2003). Microencapsulation: A Strategy for Formulation of Inoculum. *Biocontrol Science and Technology*, 13,155-169.

Table 1. Outlet temperatures and product yield of spray-dried lignin and methacrylic acid polymer (Eudragit®S100) formulations containing Baculovirus using two atomizing nozzles

Formulation	InletSetting	Atomizing nozzle	<i>PrGV</i>		<i>AfMNPV</i>	
			Outlet	Yield	Outlet	Yield
			temperature (°C)	(%)	temperature (°C)	(%)
Lignin	100	Rotating Disc	52	81.2	53	86.2
Lignin	128	Rotating Disc	72	80.6	74	84.2
Lignin	150	Rotating Disc	88	80.2	95	79.3
Lignin	175	Rotating Disc	95	79.2	97	80.9
Eudragit	100	Rotating Disc	52	82.3	53	65.0
Eudragit	128	Rotating Disc	67	77.4	74	62.3
Eudragit	150	Rotating Disc	62	81.7	87	49.0
Eudragit	175	Rotating Disc	102	72.6	98	56.0
Lignin	100	Two-Fluid Spray	49	69.5	49	33.6
Lignin	128	Two-Fluid Spray	70	79.9	70	57.3
Lignin	150	Two-Fluid Spray	92	74.0	85	61.1
Lignin	175	Two-Fluid Spray	95	75.0	94	79.3
Eudragit	100	Two-Fluid Spray	60	66.7	55	57.0
Eudragit	128	Two-Fluid Spray	77	64.1	74	66.7
Eudragit	150	Two-Fluid Spray	89	67.6	90	69.0
Eudragit	175	Two-Fluid Spray	94	64.8	89	76.0

Table 2. Outlet temperatures and product yield of spray-dried samples of Baculovirus\*

Treatments	<i>PrGV</i>		<i>AfMNPV</i>	
	Outlet temperature (°C)	Yield (%)	Outlet temperature (°C)	Yield (%)
L1c	57	83.3	56	89.7
L1s	58	63.0	57	64.2
E1c	55	82.0	60	83.4
E1s	57	49.7	62	55.1

\* Solids content 10%; L: lignin; E: Eudragit® S100; c: rotating disc atomizer; s: two fluid system atomizer

Table 3. Lethal dose ratio (LC<sub>50</sub>) of virus microencapsulated, virus free dry and unseasoned pure virus *AfMNPV* based on dosage response using neonate *Trichoplusia ni*.

Treatment	Ratio LC <sub>50</sub> (CI/mL)	Confidential Limits (CI/mL) 95%		Intercepts	Standard error	t	Slope	Standard error	t
		Lower	Upper						
Formulation LL	1.10	0.63	0.95	-727	1.17	-6.22	1.26	0.19	6.42
Formulation LH	0.29	0.09	1.90	-2.86	0.95	-2.99	0.45	0.15	2.90
Formulation EL	1.00	0.56	0.94	-6.60	1.10	-5.94	1.14	0.18	6.12
Formulation EH	0.99	0.60	1.62	-8.91	1.29	-6.92	1.54	0.22	7.07
Unformulated	n.c.	n.c.	n.c.	-11.47	1.56	-7.34	1.98	0.26	7.46

LL: low temperature lignin; LH: high temperature lignin, EL: low temperature methacrylic acid; EH: high temperature methacrylic acid

n.c.: not calculated

Table 4. Lethal dose ratios (LC50) of virus microencapsulated, virus free dry and unseasoned pure virus *PrGV* based on dosage response using neonate *Pieris rapae*.

Treatment	Ratio LC50 (CI/mL)	Limits (CI/mL) 95%		Intercepts	Standard error	t	Slope	Standard error	t
		Lower	Upper						
Formulation LL	0.03	0.01	0.95	-11.51	2.52	-4.56	2.17	0.46	4.71
Formulation LH	0.02	0.01	0.06	-13.49	3.28	-4.10	2.47	0.58	4.21
Formulation EL	0.05	0.02	0.11	-15.79	3.33	-4.73	3.04	0.63	4.83
Formulation EH	0.01	0.00	0.03	-12.20	4.95	-2.46	2.13	0.85	2.50
Unformulated	n.c.	n.c.	n.c.	-7.13	2.23	-3.19	1.83	0.51	3.57

LL: low temperature lignin; LH: high temperature lignin; EL: low temperature methacrylic acid; EH: high temperature methacrylic acid  
nc: not calculated

Table 5. Analysis of variance for nozzle, formulation, outlet temperature and interactions on process yields of spray dried sample formulations of *AfMNPV* and *PrGV*

<b>Dependent variable</b>	<b>Interaction effects</b>	<b>Degree of freedom</b>	<b>Mean square</b>	<b>F-value</b>	<b>p-value</b>
Yield	Kind of Nozzle	1	582.25	4.52	0.049
	Formulation	1	333.46	2.59	0.127
	Formulation*nozzle	1	362.48	2.81	0.113
	Outlet temperature	3	40.48	0.31	0.815
	Formulation*outlet Temperature	3	45.62	0.35	0.787
	Kind of Nozzle*Outlet Temperatures	3	199.32	1.55	0.241
	Formulation* Kind of Nozzle*Outlet Temperatures	3	14.51	0.11	0.951

Nozzle: rotating disc nozzle and two fluid nozzle; Formulation: Lignin formulation and Eudragit ®S100 formulation; Outlet temperatures: 50°C, 70°C, 90°C and 95°C.

Table 6. Analysis of variance for effect of the nozzle, formulation, outlet temperature on the mortality of spray dried formulations of *PrGV*

<b>Dependent variable</b>	<b>Interaction effects</b>	<b>Degree of freedom</b>	<b>Mean square</b>	<b>F-value</b>	<b>p-value</b>
Mortality (%)	Kind of Nozzle	1	20.25	0.72	0.416
	Formulations	1	361.00	12.84	0.005
	Outlet temperatures	3	28.41	1.01	0.428

Kind of Nozzle: rotating disc Nozzle and Two fluid Nozzle; Formulation: Lignin formulation and Eudragit @S100 formulation; Outlet temperatures: 52°C, 77°C, 89°C and 94°C.

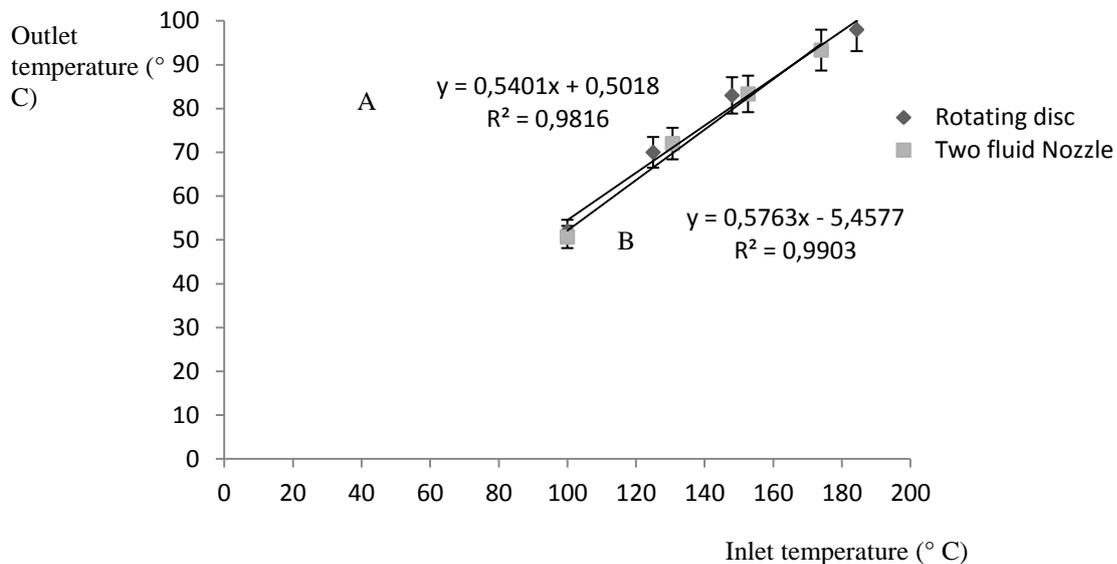


Figure 1. Correlation between Outlet temperature and Inlet temperature for (A) Rotating disc Nozzle and (B) Two Fluid Nozzle System; every point represents mean values derived from three process realized for every kind of nozzle (one with water, one with lignin and one with Eudragit®S100). Error bars represent SD of the sample mean.

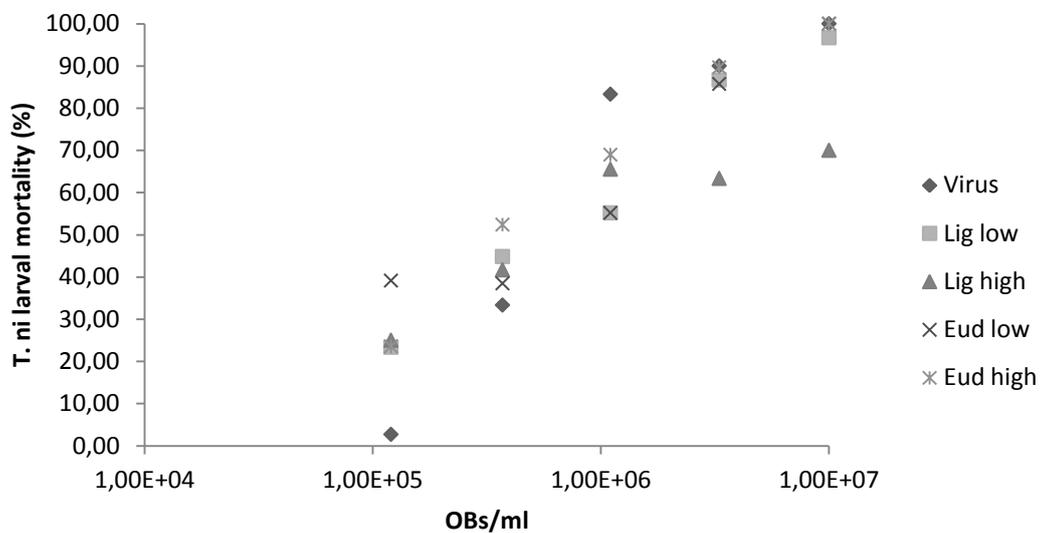


Figure 2. Dosage response mortality of *Trichoplusia ni* (Hübner) larvae treated with two spray dried formulations of AfMNPV produced at high and low outlet temperatures. Lig low: lignin formulation prepared to low outlet temperature; Lig high: lignin formulation prepared to high outlet temperature; Eud low: Eudragit® S100 formulation prepared to low outlet temperature; Eud high: Eudragit® S100 formulation prepared to high outlet temperature

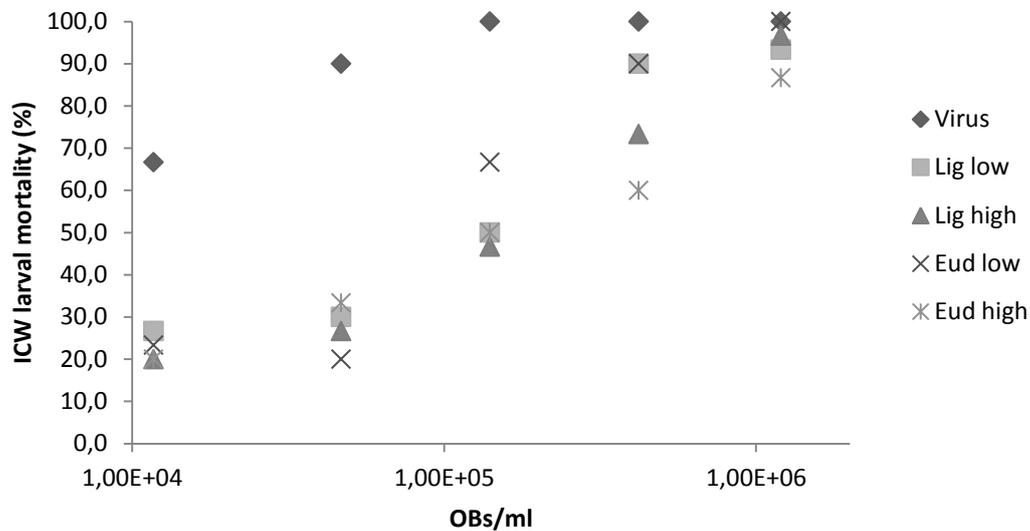


Figure 3. Dosage response mortality of *Pieris rapae* (L.) larvae treated with two spray dried formulations of *PrGV* produced at high (108°C) and low (74°C) outlet temperatures. Virus: virus without treatment; Lig low: lignin formulation prepared to low outlet temperature; Lig high: lignin formulation prepared to high outlet temperature; Eud low: Eudragit® S100 formulation prepared to low outlet temperature; Eud high: Eudragit® S100 formulation prepared to high outlet temperature

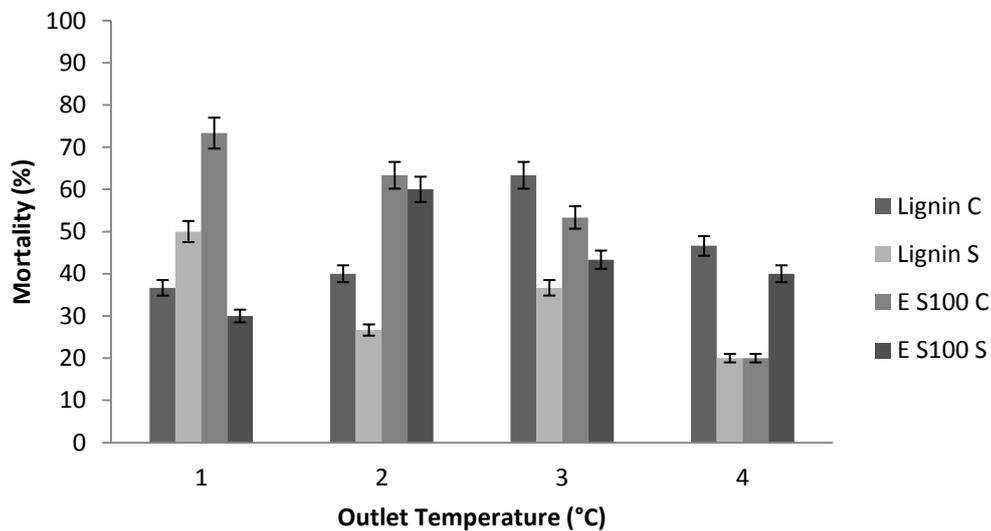


Figure 4. Effect of the outlet temperature about the mortality of spray dried formulations of *AfMNPV*. Outlet temperatures: 1: 49 - 55°C; 2:70 - 74°C; 3: 85 - 95°C; 4:89 - 98°C. Lignin C: lignin formulation prepared with rotating disc atomizer; Lignin S: lignin formulation prepared with two-fluid atomizer; E S100C: Eudragit® S100 formulation prepared with rotating disc atomizer; E S100 S: Eudragit® S100 formulation prepared with two-fluid atomizer. Error bars represent SD of the sample mean.

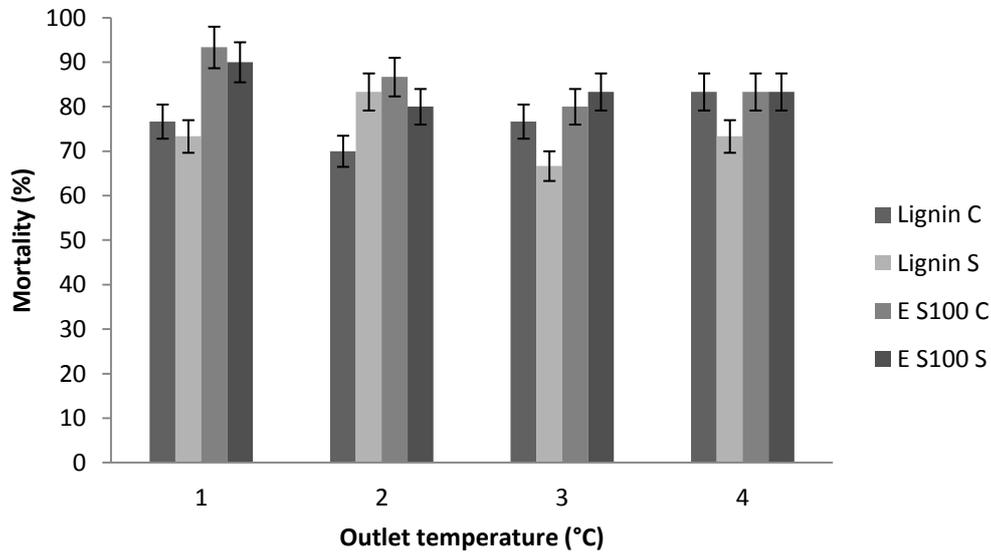


Figure 5. Effect of the outlet temperature about the mortality of spray dried formulations of *PrGV*. Outlet temperatures: 1: 49 - 60°C; 2:67 - 77°C; 3:62 - 92°C; 4:94 - 102°C. Lignin C: lignin formulation prepared with rotating disc atomizer; Lignin S: lignin formulation prepared with two-fluid atomizer; E S100C: Eudragit® S100 formulation prepared with rotating disc atomizer; E S100 S: Eudragit® S100 formulation prepared with two-fluid atomizer. Error bars represent SD of the sample mean.

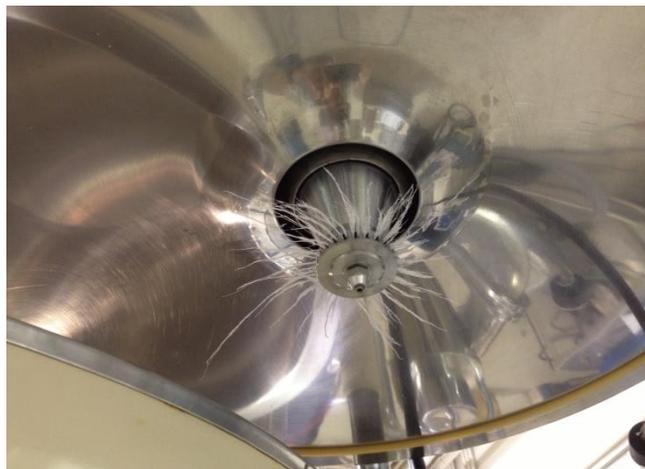


Figure 6. Residue on the wheel of microparticles produced with the methacrylic acid polymer (Eudragit® S100) using rotary-disc atomizer

## Selección de un sistema de atomización para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 en lecho fluido

Judith Elena Camacho<sup>1</sup>, Laura Fernanda Villamizar<sup>2</sup>,  
Martha Isabel Gómez<sup>2</sup>

1. Doctorado en Biociencias, Universidad de la Sabana, Bogotá, Colombia  
2. Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, Km. 14, vía Mosquera, Bogotá, Colombia

Correspondencia:

Recibido: 04-11-10 / Aceptado: 06-27-10

### Resumen

La elaboración de micropartículas en lecho fluido es de gran interés en la industria farmacéutica, alimentaria y agrícola, ya que este tipo de formulación permite controlar la liberación de ingredientes activos y su estabilidad y funcionalidad mediante la formación de pequeñas partículas sólidas. El lecho fluido es el equipo comúnmente usado en la industria para realizar el proceso y éste puede tener dos sistemas de atomización: superior (Top spray) e inferior (Bottom spray). En este trabajo se evaluaron los dos sistemas de atomización con miras a la formación de micropartículas de Eudragit® S100. Se realizaron experimentos para ajustar los factores críticos del proceso y los niveles de éstos utilizando un diseño factorial multinivel y trabajando en un lecho fluido marca Glatt GmbH D – 01277. Los factores evaluados fueron la temperatura de entrada, la presión interna de la cámara y la velocidad de flujo. El material de recubrimiento consistió en un polímero del ácido metacrílico denominado Eudragit® S100 y como núcleo se empleó talco malla 325. El sistema seleccionado para la microencapsulación fue el de atomización superior (Top spray). Las condiciones de atomización establecidas fueron velocidad de flujo de 4,12 mL/min (flujo 8 rpm), temperatura de entrada de 80°C y presión interna de la cámara de 1 y 3 bares. Las micropartículas presentaron formas y tamaños homogéneos, menores de 100 µm. Las condiciones fijadas para el sistema de atomización superior se pueden aplicar al desarrollo de procesos de microencapsulación de diferentes principios activos utilizando como polímero Eudragit® S100.

**Palabras clave:** Microencapsulación, micropartículas, Eudragit®, atomización superior, atomización inferior, factores críticos

### Abstract

Selecting a spray system for the formation of Eudragit® S100 microparticles in a fluid bed

The development of microparticles in fluid bed is of high interest in the pharmaceutical, food and agriculture, as this type of formulation to control the release of active ingredients and their stability and functionality by the formation of small solid particles. The fluid bed equipment is commonly used in industry

to carry out the process and this can have two sets of spray drying: top spray and bottom spray. In this study we evaluated the two sets of spray drying towards the formation of microparticles of Eudragit® S100. Experiments were conducted to adjust the critical process factors and their levels using a multilevel factorial design and working in a Glatt fluid bed brand GmbH D-01277. Factors evaluated were the inlet temperature, the pressure inside the chamber and the flow rate. The coating material consisted of a methacrylic acid polymer known as Eudragit® S100 and core 325 mesh powder was used. The system selected for the microencapsulation was top spray. The spray drying conditions were set flow rate of 4.12 mL/min (flow 8 rpm), inlet temperature of 80°C and pressure inside the chamber 1 and 3 bars. The microparticles showed homogeneous shapes and sizes, less than 100 microns. The conditions set for the top spray system can be applied to the development of microencapsulation processes of different active ingredients using as polymer Eudragit® S100.

**Key words:** Microencapsulation, microparticles, Eudragit®, Top spray, Bottom spray, critical factors

### Introducción

Las micropartículas son generalmente elaboradas con materiales poliméricos y pueden ser obtenidas por varios métodos físicos y químicos (1) dentro de los que se destaca el proceso de atomización (2, 3, 1). Este proceso se realiza en un equipo denominado lecho fluido y presenta ventajas tales como ser rápido y en un solo paso, aplicable a materiales sensibles al calor y fácil de escalar industrialmente (2, 3, 4). Además es posible controlar el tamaño de las partículas y su morfología por variación de los parámetros del proceso y de la formulación (5).

La encapsulación o recubrimiento de principios activos es de gran utilidad en diferentes industrias, ya que permite controlar la liberación de los constituyentes funcionales de una formulación y brinda protección frente a condiciones ambientales (6, 7, 8).

Durante el proceso de atomización (Spray drying), pequeñas gotas líquidas son secadas y endurecidas por una corriente de aire caliente. Un cambio extra en la superficie de las gotas por transferencia de calor y masa y un diferencial elevado de temperaturas entre el líquido y el aire (20°C a 200°C) produce una alta velocidad de secado inicial. El agua u otro solvente utilizado se evapora continuamente de la superficie de la gota, lo cual produce más y más secado. Se observa consecuentemente que la temperatura del aire disminuye y la humedad relativa del aire se incrementa (9).

La atomización en lecho fluido es un proceso tecnológico complejo que permite el ajuste de algunos parámetros que pueden afectar las propiedades fisicoquímicas del producto obtenido, siendo deseable la producción de una forma farmacéutica sólida con comportamiento controlable y predecible (10).

La atomización puede ser superior o inferior (Figura 1) y el uso de cada una de éstas depende de diferentes criterios como el proceso de granulación o encapsulación a realizar, las propiedades físicas de las materias primas a utilizar, los requerimientos del producto final, la productividad, el nivel de encapsulación o recubrimiento requerido y la capacidad requerida. La atomización superior es utilizada en granulación y atomización. La atomización inferior es utilizada en procesos de granulación, encapsulación con liberación controlada y atomización (11).

Para la atomización superior el polímero de recubrimiento usualmente está en solución acuosa y es rociado continuamente en forma descendente sobre la superficie del lecho fluidizado, como se observa en la figura 1a. Cada partícula recibe una pequeña cantidad de material de recubrimiento y cada tiempo pasa este hacia la región de rociamiento, en la cual coexisten las partículas fluidizadas y las gotas rociadas. Movimientos repetidos de y hacia la región de rociamiento producen una construcción gradual de una capa de recubrimiento relativamente uniforme circundante a cada partícula (8, 12).

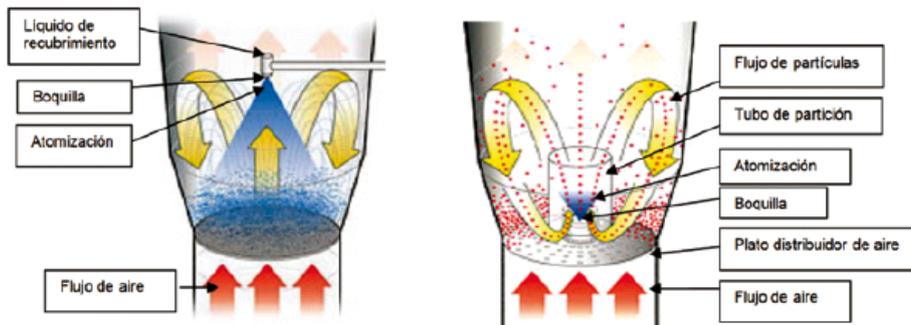


Figura 1. Sistema de atomización a. Superior o top Spray; b. Inferior o bottom spray(15)

En la atomización inferior la solución polimérica es rociada en un movimiento ascendente desde una boquilla localizada sobre el plato distribuidor en el fondo del inserto y hacia la tolva (Figura 1b). Las partículas secas caen por fuera del tubo divisorio luego fluyen en forma ascendente dentro de éste. La circulación de las partículas se repite hasta que la cantidad de recubrimiento deseado es depositado en la superficie de las partículas sólidas. Este proceso involucra humedad y secado en relación estrecha con el movimiento de las partículas, Figura 1 (13,14).

Los parámetros del proceso como la velocidad y la temperatura del aire de entrada, la velocidad del líquido atomizado, el tamaño de la boquilla, la presión y la temperatura de la cámara entre otros, afectan el rendimiento del proceso y la morfología de las partículas. Así lo demostró Cheow (16) cuando elaboraron nanoagregados de sílica y concluyeron que con una velocidad del líquido atomizado de  $0,18 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ , una velocidad de flujo de aire (presión interna de la cámara) de  $0,332 \text{ m}^3/\text{h}$ , una temperatura de  $120^\circ\text{C}$  y una concentración de la solución de alimentación de  $0,8\%(\text{w/w})$  se obtienen nanoagregados esféricos y huecos con tamaños menores a  $5 \mu\text{m}$ , con una morfología ideal para ser utilizada como vehículos de medicamentos para terapias inhalatorias. En otros estudios sobre la producción de partículas por atomización se identificó la temperatura de secado y la velocidad de flujo, como los dos parámetros que determinan la morfología de las partículas producidas por atomización (10, 17, 18).

En esencia, el recubrimiento por lecho fluido es un proceso complejo de transferencia de calor y masa que involucra diversos microprocesos, tales como la producción de gotas, la evaporación del solvente, la transferencia de calor, la dispersión de gotas y el comportamiento de las partículas en un lecho fluido. Sin embargo, es muy poco lo conocido sobre las interacciones entre estos microprocesos y como ellos se relacionan con el rendimiento del proceso, la uniformidad del recubrimiento y la ocurrencia de efectos sobre la superficie (12). Por tal razón para el escalamiento de un proceso de estas características, se deben determinar las condiciones de operación a escala de laboratorio para luego aplicarlas en producciones a gran escala.

Dentro de la amplia diversidad de materiales disponibles para la elaboración de micropartículas se destacan los polímeros del ácido metacrílico. Dentro de éstos se encuentran los Eudragit® que están disponibles en diferentes formas iónicas. Se presentan en forma de polvo blanco micronizado cuyo peso molecular promedio es 135.000. El Eudragit® S100 es pH-dependiente, siendo altamente soluble a valores de pH alcalino, debido a la neutralización de los grupos carboxilo (Figura 2) con la respectiva formación de la sal, y por lo tanto, exhibiendo el carácter de polielectrolito aniónico en solución (2,19).

Diferentes tipos de Eudragit® han sido ampliamente utilizados en la elaboración de micropartículas que permiten la liberación de principios activos a nivel intestinal, evitando la inactivación de fármacos en el estómago, gastroresistencia (2), por ejemplo, en

la preparación de micropartículas que permiten la administración oral de péptidos y proteínas, utilizándose Eudragit RS<sup>®</sup>100 por sus propiedades mucoadhesivas (20); además han generado un gran interés para el desarrollo de sistemas de administración oral de insulina (19) y en procesos de microencapsulación de partículas virales (21).

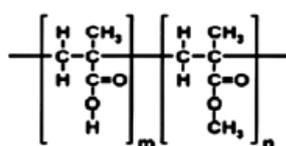


Figura 2. Estructura molecular de las unidades de repetición del Eudragit S100<sup>®</sup> con m = 1 y n = 2.

Considerando el alto potencial del Eudragit<sup>®</sup>S100 para la encapsulación de principios activos obteniendo beneficios como mayor estabilidad, liberación controlada por pH y bioadhesividad, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos sistemas de atomización en lecho fluido (superior e inferior) y diferentes factores del proceso, en la formación de micropartículas, como primera aproximación al desarrollo de un proceso eficiente de microencapsulación de diferentes principios activos.

#### Materiales y métodos

**Materiales:** Eudragit<sup>®</sup>S100 (Röhm GmbH & Co.) donado por Almapal S.A. (Colombia). Talco malla 325 calidad farmacéutica (Humedad 0,415%). Etanol al 96% (CIACOMEQ S.A.S). Fosfato dibásico de sodio anhidro (Sigma) y ácido cítrico (Merck).

**Preparación de la solución polimérica:** En 70 mL de solución tampón pH 8,0 se adicionó la cantidad correspondiente de polímero según el tratamiento, Tabla 1, y se mantuvo agitación constante hasta obtener una solución translúcida. Posteriormente se adicionaron 30 mL de etanol manteniendo la agitación.

**Elaboración de micropartículas por atomización (Spray drying):** Las micropartículas se elaboraron en un lecho fluido marca Glatt GmbH D-01277, que está equipado con una roseta a 1,0 mm para ajustar el flujo de aire.

En ensayos previos se fijaron los valores alrededor de los cuales debía realizarse la experimentación para la formación exitosa de micropartículas (datos no mostrados). Estos valores fueron: concentración del polímero del 5,0 %, concentración del núcleo del 1,5% (21) y presión de aleta expresada como ángulo de apertura con valor de 40°.

A partir de los resultados previos y la revisión bibliográfica se fijaron los parámetros de temperatura de entrada, presión interna de la cámara y velocidad de flujo, los cuales se variaron según la matriz de tratamientos que se presenta en la tabla 1, generada utilizando un diseño factorial con tres factores y dos niveles por factor. Estas condiciones se trabajaron en los dos sistemas: atomización inferior (BS) y atomización superior (TS). De cada tratamiento se realizó una sola corrida para cada sistema.

Tabla 1. Variables y niveles evaluados para la formación de micropartículas de Eudragit<sup>®</sup>S100 por atomización en lecho fluido

Factores	Niveles	
	Bajo	Alto
Temperatura de entrada (°C)	50	60
Presión interna de la cámara(bar) <sup>***</sup>	1	3
Flujo (rpm) <sup>***</sup>	8	16
Velocidad de flujo (ml/min)	(4,12)	(8,61)

<sup>\*\*\*</sup> (22)

<sup>\*\*\*</sup> (23,24)

Se evaluaron algunos parámetros cualitativos como obtención de producto seco, la homogeneidad y el tamaño de partícula, la pérdida de material en los filtros, la pérdida de material en la tolva y la fácil recuperación del producto. Estas características se calificaron con un valor de cero (0) cuando se obtuvo el comportamiento no deseado y con un valor de uno (1) cuando se obtuvo el comportamiento deseado, lo que permitió aplicar una matriz de decisión para seleccionar el tratamiento más promisorio.

#### Caracterización de las micropartículas

**Morfología y tamaño:** La forma y el tamaño de las micropartículas se evaluaron por microscopía. El tamaño se determinó por observación directa usando

un microscopio de luz Olympus CH3ORF100 equipado con un micrómetro, en el aumento de 10X.

Para la realización de esta actividad se tomaron las muestras obtenidas de la pared de la tolva para los diferentes ensayos y sistemas trabajados. Las muestras se observaron directamente al microscopio, antes y después de tamizar la muestra por una malla con tamaño de poro de 100  $\mu\text{m}$ .

### Resultados

#### Elaboración de micropartículas por atomización (Spray drying)

**Atomización inferior (Bottom spray).** La codificación de los tratamientos evaluados se presenta en la Tabla 2 y los resultados para cada uno de estos se presentan en la Tabla 3, donde se destaca que los tratamientos 3 y 4 no permitieron la formación de micropartículas.

La temperatura de entrada es importante para el proceso de microencapsulación, ya que ésta influyó

directamente en la temperatura interna del producto y la temperatura de salida, Tabla 3. Es así como las temperaturas de entrada de 50°C y 60°C generaron temperaturas internas del producto entre 17,3°C y 20,3°C y entre 20,1°C a 41,3°C respectivamente y temperaturas de salida de 19°C a 26°C y de 22°C a 40°C, respectivamente. Estos valores de temperatura son adecuados para el proceso de microencapsulación de principios activos sensibles a temperaturas altas como las partículas virales de Baculovirus, las cuales se inactivan a temperaturas mayores de 50°C (25).

Los resultados muestran que la velocidad de flujo (Flujo) influyó la temperatura interna del producto, la cual se redujo cuando el flujo se aumentó, lo cual puede ser aprovechado para minimizar el efecto de las altas temperaturas de entrada sobre principios activos sensibles a altas temperaturas (26).

La temperatura de entrada fijada en el equipo también influyó la temperatura dentro del equipo, observándose una relación directa entre las dos variables, Tabla 3.

Tabla 2. Tratamientos evaluados para la formación de micropartículas utilizando atomización inferior

TRATAMIENTOS	TE (°C)	Flujo (rpm)	Vel. Flujo (mL/min.)	PI (bares)
1	50	16	8,61	1
2	50	8	4,12	1
3	50	16	8,61	3
4	50	8	4,12	3
5	60	8	4,12	1
6	60	16	8,61	1
7	60	8	4,12	3
8	60	16	8,61	3

[TE]: temperatura de entrada, [PI]: presión interna de la cámara

Tabla 3. Variables respuesta en el proceso de atomización inferior

Tratamiento	FACTORES Y NIVELES				VARIABLES RESPUESTA		
	Flujo (rpm)	Velocidad de Flujo (mL/min.)	TE (°C)	PI (bar)	TE máx. (°C)	TIP (°C)	TS (°C)
1	16	8,61	50	1	54-55	18,8 - 20,2	19,0 - 19,0
2	8	4,12			57-80	17,6-20,3	23,0 - 26,0
3	16	8,61		3	N.D.	N.D.	N.D.
4	8	4,12			N.D.	N.D.	N.D.
5	8	4,12	60	1	60-64	38,7 - 41,3	35-40
6	16	8,61			68,0 - 68,0	20,9 - 20,9	22,0 - 22,0
7	8	4,12		3	62,0 - 64,0	28,8 - 29,6	25,0 - 26,0
8	16	8,61			79,0 - 79,0	20,1 - 20,1	23,0 - 23,0

[TE]: temperatura de entrada, [TIP]: temperatura interna del producto, [TS]: temperatura de salida, [PI]: presión interna de la cámara, [N.D]: No determinado por no obtenerse formación de partículas

Tabla 4. Matriz de decisión del proceso de microencapsulación en el sistema de atomización inferior (Bottom Spray).

Tratamiento	Sin Humedad	HT de MPs	MPs de menos de 100 µm	Pérdida de material en filtros	Pérdida de material en Tolva	Facilidad de Recuperación	Total	Observaciones
1	0	0	0	0	0	0	0	Falla proceso de secado
2	0	0	0	0	0	0	0	Falla proceso de secado
3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Falla proceso de secado
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Falla proceso de secado
5	1	1	1	1	1	1	6	Material seco
6	0	1	1	0	0	0	2	Falla proceso de secado
7	1	1	1	1	1	1	6	Material seco
8	0	0	0	0	0	0	0	Falla proceso de secado

[HT de MPs]: homogeneidad en el tamaño de las micropartículas, [N.D.]: No determinado por no obtenerse formación de partículas. Valor 0: comportamiento no deseado, Valor 1: comportamiento deseado

El proceso de atomización (spray drying) para microorganismos no debe alcanzar altas temperaturas para mantener la integridad del principio activo. Por ejemplo Liu y Liu (4) encontró la mayor estabilidad de la viabilidad del hongo *Beauveria bassiana* cuando se microencapsuló utilizando una temperatura de entrada de 60°C y una temperatura de salida de 30±2°C, en comparación a la atomización convencional que maneja una temperatura de entrada de 100°C y una temperatura de salida de 80±5°C. De igual forma en el estudio de Behle (22), se encontró que el nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV) puede presentar una pérdida mínima de actividad cuando se expone a altas temperaturas en el proceso de atomización por pocos minutos.

En la Tabla 4 se presenta la matriz de decisión utilizada para seleccionar el tratamiento más promisorio. Dentro de los parámetros calificados se incluyeron factores como la obtención de producto seco, la homogeneidad en el tamaño de las micropartículas, un menor tamaño de micropartículas (<100µm), la pérdida de material en filtros, la pérdida de material en la tolva y la fácil recuperación del producto.

En la matriz se puede observar que uno de los problemas que presentó el proceso de atomización inferior con una temperatura de entrada de 50°C, correspondiente a los ensayos 1, 2, 3 y 4 fue la

no formación adecuada de partículas, debido a que la suspensión del polímero y el núcleo fueron atomizados pero no se logró la evaporación completa de los solventes. Cuando la temperatura de entrada fue de 60°C, la velocidad de flujo de 8,61 mL/min y a presiones internas de la cámara de 1 y 3 bares, correspondientes a los ensayos 6 y 8 también se encontró humedad en la cámara de atomización, posiblemente porque bajo estas condiciones el proceso de secado no está bien controlado generándose condensación de agua (26), observándose presencia de la suspensión de recubrimiento en las paredes de la cámara de atomización y en el cilindro ubicado en la parte inferior.

No se detectó humedad en el sistema de atomización inferior cuando se trabajó con una velocidad de flujo de 4,12mL/min y temperatura de entrada de 60°C, con presiones interna de la cámara de 1 y 3 bares, condiciones que corresponden a los tratamientos 5 y 7. Esto indica que a estas condiciones, se controla el proceso de secado. Además utilizando estas condiciones la pérdida de material en los filtros y en la tolva fue menor y la recuperación del producto final se facilitó por encontrarse más seco que con los tratamientos restantes.

Los tratamientos con la calificación más alta fueron el 5 y el 7, para los cuales se empleó una temperatura de entrada de 60°C, una velocidad de

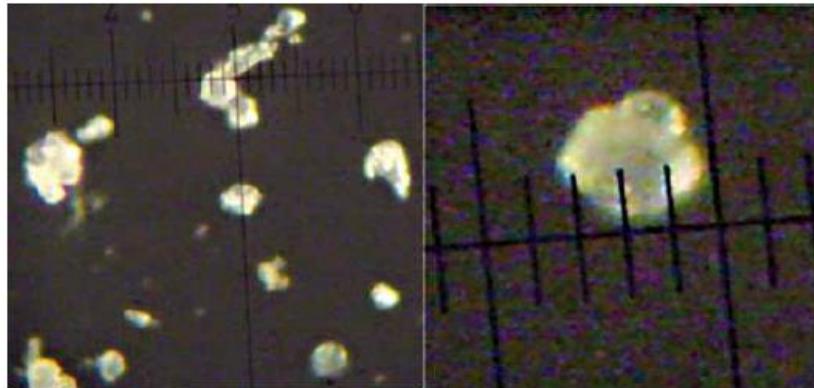


Figura 3. Micropartículas obtenidas por el sistema de atomización inferior (Bottom spray) 10X

flujo de 4,12mL/min (8rpm) y presiones internas de 1 y 3 bares respectivamente, por lo que se puede concluir que la presión no tuvo un efecto significativo en la respuesta, pero los dos factores restantes (temperatura y flujo) sí influyeron en el proceso. Sin embargo algunos autores han concluido que para el proceso de atomización inferior el parámetro más crítico es la fluidización del aire que depende de la presión interna de la cámara y de la selección del plato ubicado en la parte inferior de la tolva que distribuye el aire y logra una buena separación (elevación) de las partículas durante su movimiento (11).

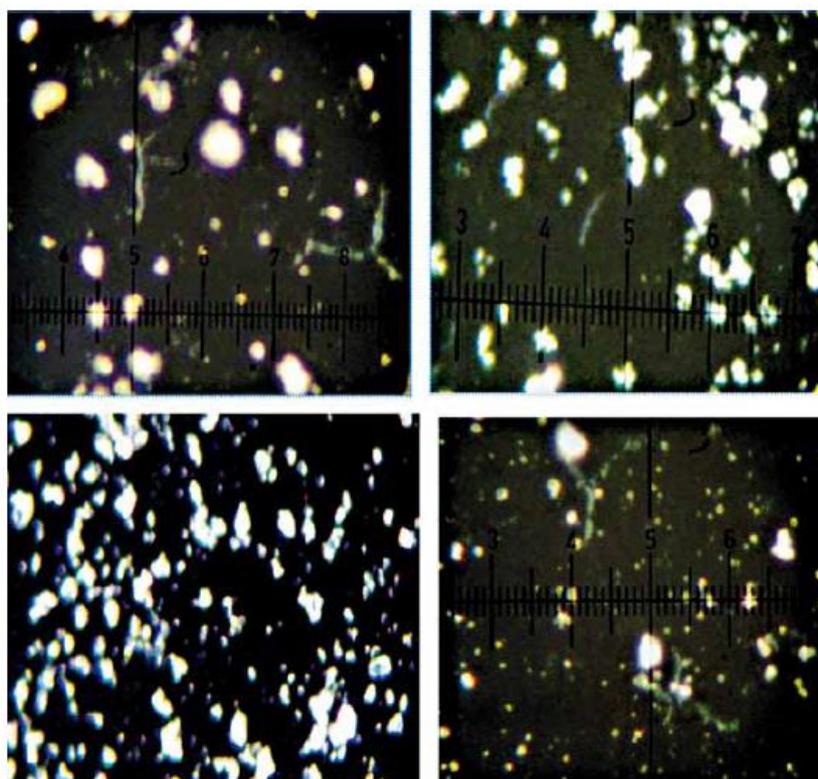
El establecimiento de estos parámetros es de gran importancia, así como lo concluyó Cheow (16) quien determinó que estas variables deben ser seleccionadas previamente para prevenir el exceso de humedad que se puede presentar en la cámara de atomización, lo cual se presentó en algunos de los tratamientos evaluados el presente estudio. El control de estos parámetros permite una buena circulación de las partículas y un adecuado proceso de microencapsulación, lo cual es importante en el sistema de atomización inferior (Bottom spray), en el cual la fluidización está dada por el flujo del aire en interacción con el movimiento de las partículas (13).

De acuerdo a la calificación de los tratamientos en la matriz de decisión, Tabla 4, se establecieron como condiciones a utilizar en el sistema de atomización inferior para la suspensión de Eudragit® S100 al 5%

utilizando como núcleo talco al 1,5%, una velocidad de flujo de 4,12mL/min (8rpm), presión interna de la cámara entre 1 y 3 bares y temperatura de entrada de 60°C. Estas condiciones evitan un exceso de humedad en la cámara, ya que un aumento en la humedad causa un bajo rendimiento del proceso y compactación de las micropartículas (16).

En el proceso de atomización inferior se pudo determinar que la pérdida de producto ocurre principalmente porque el proceso de secado no se controla adecuadamente, lo cual causa pérdida de la suspensión de recubrimiento y el material se deposita en las paredes del colector generándose una pérdida de producto en diferentes partes del equipo (27,5).

**Caracterización de las micropartículas.** Se obtuvieron micropartículas de diferentes tamaños y formas, presentándose formas irregulares y poco homogéneas en tamaño, Figura 3. Además se formaron aglomerados de partículas, posiblemente por coalescencia de las gotas durante la evaporación de los solventes y la fluidización de las mismas. Las micropartículas obtenidas por el proceso de atomización inferior mostraron un tamaño menor de 100 µm así como los obtenidos en diferentes trabajos como en la microencapsulación por atomización de conidios de *Beauveria bassiana* en el cual se obtuvieron micropartículas con tamaños entre 2,5 y 10µm (4) y de *Trichoderma harzianum* donde se obtuvieron tamaños entre 10 y 25 µm (26).



**Figura 4.** Fotografías de la micropartículas obtenidas por atomización inferior observadas al microscopio con un aumento de 10X (a) Micropartículas Tratamiento 1 (b) Micropartículas Tratamiento 5 (c) Micropartículas Tratamiento 6 (d) Micropartículas Tratamiento 7.

Una de las ventajas de la aplicación de técnicas de atomización (spray drying) en microencapsulación es que permite el ajuste del atomizador (presión interna de la cámara) y la velocidad de la bomba de alimentación (velocidad de flujo) para obtener partículas de tamaños pequeños o grandes según se requiera (26). En la figura 4 se muestran fotografías de la partículas obtenidas con los tratamientos 1, 5, 6 y 7, que corresponden a condiciones de presión interna de la cámara de 1 y 3 bares y velocidades de flujo de 4,12mL/min y 8,61mL/min, con temperaturas de entrada de 50°C y 60°C. Las micropartículas más homogéneas con respecto a forma y tamaño se obtuvieron con la condición de temperatura de entrada 60°C, velocidad de flujo 4,12mL/min y

presión interna de la cámara de 3 bares, ensayo 7, Figura 4d.

En el sistema de atomización inferior la calidad de la formación de la micropartícula depende del flujo de aire o fluidización, ya que una alta velocidad de flujo de aire dado por la presión interna de la cámara mejora la circulación de las partículas y asegura la transferencia de masa y calor. Es por esto que en este sistema la selección de la presión interna de la cámara es muy importante para que asegure un buen flujo de aire que no permita que la suspensión de recubrimiento se deposite en las paredes, lo que causa la pérdida de material y bajos rendimientos del proceso (13).

Tabla 5. Tratamientos evaluados para la formación de micropartículas utilizando atomización superior.

TRATAMIENTOS	TE (°C)	Flujo (rpm)	Vel. de flujo (mL/min)	PI (bar)
1	50	8	4,12	1
2	50	16	8,61	1
3	50	8	4,12	3
4	50	16	8,61	3
5	60	8	4,12	1
6	60	16	8,61	1
7	60	8	4,12	3
8	60	16	8,61	3
9	80	8	4,12	3
10	80	8	4,12	1
11	80	16	8,61	1
12	80	16	8,61	3

[TE]: temperatura de entrada, [PI]: presión interna de la cámara

Tabla 6. Variables respuesta en el proceso de atomización superior.

TRATAMIENTOS	FACTORES Y NIVELES		VARIABLES RESPUESTA				
	Flujo (rpm)	Velocidad de flujo (mL/min)	TE (°C)	PI (bar)	TE máx. (°C)	TIP (°C)	TS (°C)
1	8	4,12	50	1	N.D.	N.D.	N.D.
2	16	8,61		1	N.D.	N.D.	N.D.
3	8	4,12		3	N.D.	N.D.	N.D.
4	16	8,61		3	N.D.	N.D.	N.D.
5	8	4,12	60	1	82-98	18,4-19,7	22,0-22,0
6	16	8,61		1	84-84	13,9-13,9	19-19
7	8	4,12		3	115-120	14,1-15,1	21,0-21,0
8	16	8,61		3	88-109	8,9-9,5	17,0-19,0
9	8	4,12	80	3	80-85	33,6-38,3	22-28
10	8	4,12		1	80-85	40,6-51,2	18-35
11	16	8,61		1	105-120	20,8-30	24-25
12	16	8,61		3	91-100	8,7-8,7	15-15

[TE]: temperatura de entrada, [TIP]: temperatura interna del producto, [TS]: temperatura de salida, [PI]: presión interna de la cámara, [N.D.]: No determinado por no obtenerse formación de partículas

Además este método de atomización tiene que afectan la morfología de las micropartículas, la generación de altas velocidades que producen el choque de las partículas, así como la presencia de zonas muertas cercanas a la pared interna de la cámara de atomización, donde el proceso no se realiza adecuadamente porque las partículas se mueven muy lentamente y se producen micropartículas de tamaño y forma heterogénea (14), fenómeno que pudo presentarse con los tratamientos evaluados en el presente trabajo.

**Atomización superior (Top spray).** La codificación de los tratamientos evaluados se presenta en la Tabla 5 y los resultados para cada uno de estos

se presentan en la Tabla 6, donde se destaca que los tratamientos 1, 2, 3 y 4 no permitieron la formación de micropartículas.

En la Tabla 6 se observa que cuando la temperatura de entrada se ajustó 50°C no se determinan valores para las variables de respuesta porque no hay formación de micropartículas, posiblemente porque la suspensión fue asperjada pero la evaporación del solvente fue lenta y no se secaron las gotas formando partículas, por el contrario el material húmedo quedó en la superficie interna de la cámara. Estos tratamientos correspondieron a los codificados como 1, 2, 3 y 4.

Con una temperatura de entrada de 60°C se presentaron temperaturas internas del producto entre 8,9°C y 19,7°C y temperaturas de salida entre 17°C y 22°C. En general el proceso de atomización superior con esta temperatura no fue adecuado, ya que se presentó condensación de agua y depósito de suspensión líquida en la superficie interna de la cámara de atomización, resultados que corresponden a los ensayos 5, 6, 7 y 8.

Cuando se utilizó una temperatura de entrada de 80°C se obtuvieron temperaturas internas de producto entre 8,7°C y 40,6°C y temperaturas de salida entre 15°C a 28°C. Además al aumentar la velocidad de flujo se produjo condensación de agua y gotas de suspensión líquida en la superficie de la cámara de atomización, lo que causó una disminución de la temperatura interna del producto y un aumento de la temperatura de entrada máxima detectada por el equipo, la cual alcanzó los 120°C, en el tratamiento 11 y 100°C en el tratamiento 12. Es importante tener en cuenta que en el sistema de atomización superior (Top Spray) las variaciones en las velocidades de flujo del líquido y las velocidades de flujo del aire (presión interna de la cámara) determinan el proceso de secado de las gotas fluidizadas en el lecho de aire (12). Además se ha determinado en otros trabajos que el proceso de atomización superiores eficiente cuando se trabaja a temperaturas altas (11).

En el estudio de Horaczek y Viernstein (28) se encontró que para una buena actividad y longevidad de conidios de *Beauveria brongniartii* y *Metarhizium anisopliae* en un proceso de microencapsulación, el parámetro más importante y que debe ser controlado es la temperatura de salida del proceso, la cual depende de la temperatura de entrada y la velocidad de flujo.

En la microencapsulación por atomización (spray drying) de conidios de *Trichoderma harzianum* se determinó como relación óptima de la temperatura de entrada y la temperatura de salida: 60°C / 31°C, ya que cuando se trabajó con una relación de temperaturas de entrada/temperaturas de salida de 40°C/20°C apareció condensación de agua en la pared de la cámara de atomización, indicando que el proceso de secado no estaba bien controlado, además en este estudio se estableció que ajustando la velocidad de flujo (alimentación) y la temperatura de

entrada, se puede controlar la temperatura de salida y así minimizar el efecto de temperaturas altas sobre este principio activo(26).

En la matriz de decisión (Tabla 7) utilizada para calificar los tratamientos evaluados se observa que los parámetros a seleccionar en este proceso son la velocidad de flujo, la temperatura de entrada y la presión interna de la cámara para determinar las interacciones que ocurren entre estas condiciones y poder lograr un buen proceso de microencapsulación.

El ajuste de los tres factores afectó el desarrollo adecuado del proceso de atomización superior, ya que al trabajar con temperaturas de 50°C y 60°C y velocidad de flujo de 8,61 mL/min (16 rpm), correspondientes a los ensayos 1, 2, 3, 4, 6 y 8, el proceso de secado no fue eficiente, presentándose humedad en la cámara de atomización, pérdida de material (suspensión) y dificultad en la recuperación del producto.

En el sistema de atomización superior (Top spray) la velocidad de flujo, la presión interna de la cámara y la posición de la boquilla en la parte superior de la cámara de atomización fueron los parámetros que más influyeron en el proceso, posiblemente porque éstos determinan la distribución de la temperatura y la humedad de las partículas. Cabe destacar que para el proceso es importante la correcta preparación de la suspensión de recubrimiento, ya que características como una alta viscosidad y tensión superficial pueden causar pérdidas en el proceso de atomización, variación en la distribución de la temperatura sobre las partículas, afectando su diámetro y el área superficial en la cual ocurre la transferencia de masa de las gotas al medio dispersante (12).

Los tratamientos con la mayor calificación según la matriz de decisión (Tabla 7) fueron los tratamientos 9, y 10 que sugieren que para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 (5%) con talco como núcleo al 1,5% utilizando atomización superior, se debe trabajar con una velocidad de flujo de 4,12 mL/min (8 rpm) y con una temperatura de entrada de 80°C, siendo indiferente la presión interna de la cámara.

#### Caracterización de las micropartículas

Las micropartículas obtenidas por el proceso de atomización superior presentaron tamaños y formas homogéneas, encontrándose partículas esféricas

Tabla 7. Matriz de decisión del proceso de microencapsulación en el sistema de atomización superior (Top Spray).

Tratamiento	Sin Humedad	HT de MPs	MPs de menos de 100 $\mu\text{m}$	Pérdida de material en filtros	Pérdida de material en Tolva	Facilidad de Recuperación	Total	Observaciones
1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Falla proceso de secado
2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Falla proceso de secado
3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Falla proceso de secado
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Falla proceso de secado
5	1	1	0	0	1	1	4	Material seco
6	0	0	1	1	0	0	2	Falla proceso de secado
7	0	0	0	0	0	0	0	Falla proceso de secado
8	0	0	0	0	0	0	0	Falla proceso de secado
9	1	1	1	1	1	1	6	Material seco
10	1	1	1	0	1	1	5	Material seco
11	0	0	0	0	0	0	0	Falla proceso de secado
12	0	1	1	0	0	0	2	Falla proceso de secado

[HT de MPs]: homogeneidad en tamaño de micropartículas, [N.D.]: No determinado por no obtenerse formación de partículas. Valor 0: comportamiento no deseado, Valor 1: comportamiento ideal.

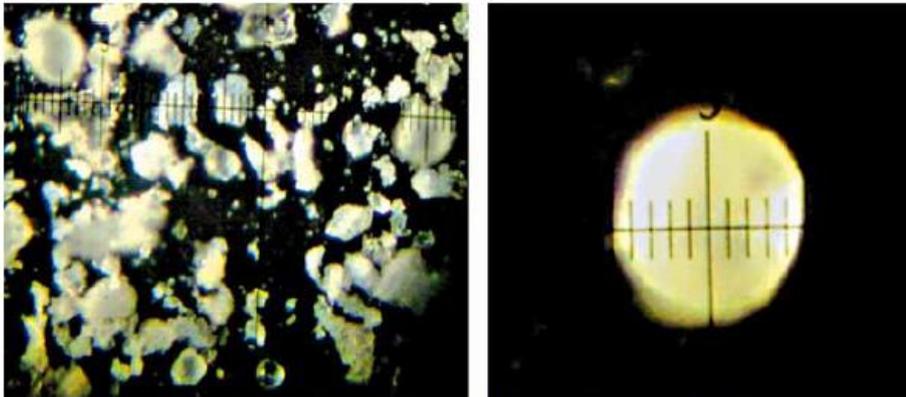
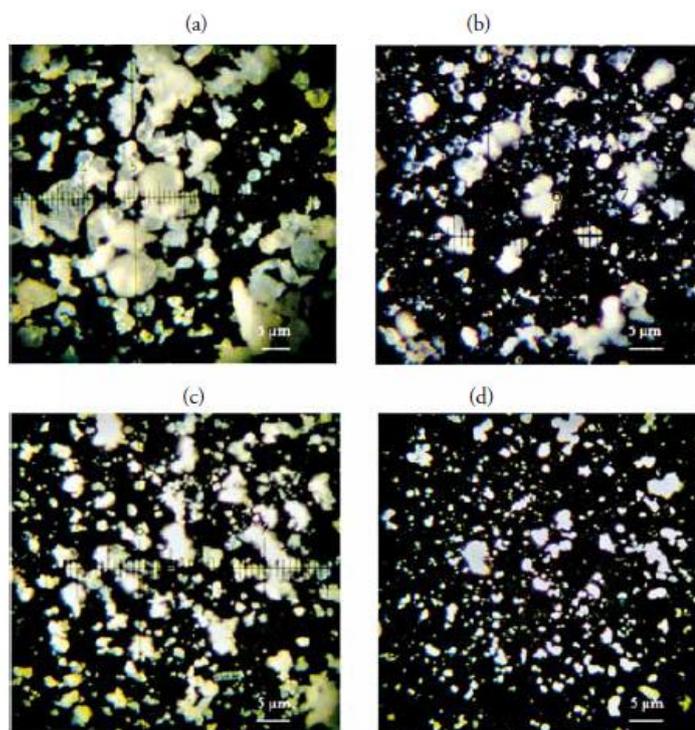


Figura 5. Micropartículas obtenidas por el sistema de atomización superior (Top Spray) 10X

(Figura 5), resultados similares a los obtenidos por otros autores utilizando atomización superior, en los cuales la morfología de las partículas es homogénea (29). La morfología de las micropartículas depende de diferentes factores como la naturaleza del material de encapsulación usado y de las condiciones

operacionales de secado como temperatura de entrada, concentración de sólidos, velocidad de flujo de aire o velocidad de alimentación (1).

El tamaño de las micropartículas obtenidas fue menor a 100  $\mu\text{m}$ , un pequeño tamaño que podría deberse a que la relación entre presión interna de



**Figura 6.** Fotografías de la micropartículas obtenidas con atomización superior observadas al microscopio con un aumento de 10X (a) Micropartículas tratamiento 5 (b) Micropartículas tratamiento 7 (c) Micropartículas tratamiento 9 (d) Micropartículas tratamiento 10.

la cámara y velocidad de flujo producen una fuerte atomización que genera gotas de tamaños pequeños y en consecuencia micropartículas pequeñas (16). Por ejemplo, en los tratamientos donde utilizó la mayor presión interna de la cámara (3 bares), se produjeron micropartículas más homogéneas en cuanto a forma y tamaño (Figuras 6b y 6c). En el proceso de atomización superior la velocidad de flujo y la presión interna de la cámara afectan la uniformidad del crecimiento de la capa de recubrimiento, ya que al incrementarse la presión interna de la cámara se incrementa el flujo de aire de enfriamiento y de secado, lo cual influye en la distribución de la temperatura sobre la partícula (12).

En el estudio realizado por Tajber (10), los factores más significantes que afectaron las características del

producto final fueron la temperatura de entrada, la velocidad de flujo de la bomba peristáltica y la concentración de los excipientes. Además se encontró que el parámetro que más influyó en el tamaño de partícula fue el flujo de aire, ya que a un alto flujo de aire se obtuvo un tamaño de partícula más pequeño.

Se han estudiado efectos de los parámetros de atomización en el sistema de atomización superior sobre las propiedades físicas de las micropartículas (11) y se ha observado que un aumento en la velocidad de flujo produce partículas grandes, como se obtuvo con el tratamiento 12 (Figura 5), en cual se trabajó con una velocidad de 8,61 mL/min.

Un incremento en la temperatura de entrada disminuye el tamaño de las micropartículas, como se observa en los tratamientos 9 y 10 (Figuras 6c

y 6d), en los cuales se utilizó una temperatura de entrada de 80°C en comparación con lo observado en los tratamientos 5 y 7 (Figuras 6a y 6b) en los cuales se utilizó una temperatura de entrada de 60°C. Un incremento en la presión interna de la cámara produce una disminución del tamaño de las micropartículas porque se generan gotas de tamaños pequeños, como se observa en los tratamientos 7 y 9 (Figura 6b y 6c), en los cuales se utilizó una presión interna de la cámara de 3 bares, en comparación con lo obtenido en el ensayo 5 (Figura 6a) en el cual se utilizó una presión interna de 1 bar.

Estudios desarrollados para evaluar los parámetros críticos del proceso de atomización superior han concluido que la presión interna de la cámara es el parámetro más crítico, seguido por la velocidad de flujo, la concentración de sólidos y la temperatura de entrada. Además se observaron interacciones significantes entre algunos de estos parámetros. En este sistema de atomización la fluidización del aire no es significativa. Sin embargo para que este proceso de atomización funcione correctamente se necesita un buen control de todos los parámetros involucrados para minimizar las variaciones en los productos obtenidos (11).

Se seleccionaron como condiciones óptimas para el proceso de atomización superior (Top spray) para la suspensión de Eudragit® S100 al 5% con talco como núcleo al 1,5%, una temperatura de entrada de 80°C, una presión interna de la cámara entre 1 y 3 bares y un flujo de 8 rpm que equivale a una velocidad de flujo de 4,12mL/min.

Los resultados para los dos sistemas de atomización ensayados evidencian que diferentes condiciones de atomización afectan el producto final, como lo reporta el trabajo de Yu (3), en el cual se investigaron cuatro parámetros de atomización: la temperatura de entrada del aire, la concentración de sólidos, la temperatura de alimentación y la velocidad de flujo y sus efectos en la eficiencia de encapsulación y el tamaño de las micropartículas de fosfolípidos. En dicho trabajo se obtuvieron como condiciones de óptimas de operación una temperatura de aire de entrada de 140°C, una temperatura de alimentación 30°C y una concentración de sólidos del 20%, además en este estudio se determinó que la velocidad de flujo no influyó la eficiencia del proceso.

Al evaluar el efecto de los dos sistemas de atomización en lecho fluido (superior e inferior) y los diferentes factores del proceso, en la formación de micropartículas, se seleccionó el sistema de atomización superior (Top Spray), con el cual se obtuvo una formación adecuada de micropartículas, las cuales presentaron menor tamaño y mayor homogeneidad en la forma. Las condiciones fijadas para dicho sistema fueron una velocidad de flujo de 4,12mL/min (8rpm), una temperatura de entrada de 80°C y una presión interna de la cámara entre 1 y 3 bares.

En el sistema de atomización superior (Top spray), la velocidad de flujo y la presión interna de la cámara influyen en la morfología de las micropartículas obtenidas y en el control del proceso de atomización (12). En el sistema de atomización inferior (Bottom spray) la calidad del recubrimiento depende principalmente del flujo de aire (fluidización) o sea de la presión interna del aire que produce el movimiento de las partículas (13).

### Conclusiones

Se demostró la factibilidad tecnológica para preparar micropartículas por atomización, utilizando como polímero Eudragit® S100 y talco como núcleo. Cuando se utilizó el sistema de atomización inferior (Bottom spray) se tuvo como condición crítica del proceso la presión interna de la cámara, la cual no favoreció la morfología de las partículas producidas. Cuando se utilizó el sistema de atomización superior (Top Spray) las condiciones críticas del proceso fueron la velocidad de flujo y la temperatura, cuyas interacciones favorecieron el secado y en consecuencia la homogénea morfología de las micropartículas y su menor tamaño.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Almapal-Colombia por su generosidad en proveer el polímero para el desarrollo del presente trabajo.

### Referencias

1. Li X., Anton N., Arpagaus C., Belleis F., Vandamme Th. 2010. Nanoparticles by Spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release* 147: 304-310
2. Beck R. C. R., Pohlmann A. R., Guerres S. 2004. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. *J. Microencapsula-*

- tion 21: 499-512
3. Yu C, Wang W, Yao H, Liu H. 2007. Preparation of Phospholipid Microcapsule by Spray Drying. *Drying Technology* 25: 695-702
  4. Liu Ch, Liu S-D. 2009. Low-Temperature Spray Drying for the Microencapsulation of the Fungus *Beauveria bassiana*. *Drying Technology* 27:747-753
  5. Bürki K, Jeon I, Arpagus C, Betz G. 2011. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. *International Journal of Pharmaceutics* 408: 248-256
  6. Winder R. S., Wheeler J J, Conder N, Orvos I S, Nevill R, Duan L. 2003. Microencapsulation: A Strategy for Formulation of Inoculum Bioccontrol. *Science and Technology* 13:155-169
  7. Fimi A, Cavallari C, Ospitali F. 2008. Raman and thermal analysis of indomethacin/PVP solid dispersion enteric microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70: 409-420
  8. Ronsse F, Pieters J, Dewettinck K. 2008. Modelling side-effect spray drying in top-spray fluidized bed coating processes. *Journal of Food Engineering* 86: 529-541
  9. Turchiulli C, Gianfrancesco A, Pelzer S, Dumoulin E. 2011. Evolution of particle properties during spray drying in relation with stickiness and agglomeration control. *Powder Technology* 208: 433-440
  10. Tajber L, Corrigan O, Healy A. 2009. Spray drying of budesonide, formoterol fumarate and their Composites—II. Statistical factorial design and *in vitro* deposition properties. *International Journal of Pharmaceutics* 367: 86-96
  11. Srivastava S, Mishra G. 2010. Fluid Bed Technology: Overview and Parameters for Process Selection. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 2: 236-246
  12. Ronsse F, Pieters J, G, Dewettinck K. 2009. Modelling heat and mass transfer in batch, top-spray fluidised bed coating processes. *Powder Technology* 190: 170-175
  13. Mafadi S, Hayert M, Poncelet D. 2003. Fluidization Control in the Wurster Coating Process. *Chem. Ind.* 57: 641-644
  14. Fitzpatrick S, Ding Y, Seiler Ch, Lovegrove C, Booth S, Forster R, Parker R, Jonathan S. 2003. Positron Emission Particle Tracking Studies of a Wurster Process for Coating Applications. *Pharmaceutical Technology* 70-78.
  15. Glatt. com [http://www.glatt.com/e/01\\_tecnologien/01\\_04\\_09.htm](http://www.glatt.com/e/01_tecnologien/01_04_09.htm) (consulta septiembre del 2010)
  16. Cheow W, Li S, Hadinoto K. 2010. Spray drying formulation of hollow spherical aggregates of silica nanoparticles by experimental design chemical engineering research and design 88: 673-685
  17. Kho K, Hadinoto K. 2010a. Effects of excipient formulation on the morphology and aqueous re-dispersibility of dry-powder silica nano-aggregates. *Colloids and Surfaces A. Physicochem. Eng. Aspects* 359: 71-81
  18. Kho K, Hadinoto K. 2010b. Aqueous re-dispersibility characterization of spray-dried hollow spherical silica nano-aggregates. *Powder Technology* 198: 354-363
  19. Villamizar L, Martínez F. 2008. Determination of the basic conditions for microencapsulation of an entomopathogenic Baculovirus by means of coacervation using Eudragit S100®. *VTAE* 15:123-131
  20. Lopodota A, Trapani A, Cutrignelli A, Chiaranini L, Pantucci E, Curci R, Mammali E, Trapani G. 2009. The use of Eudragit® RS100/cyclodextrin nanoparticles for transmucosal administration of glutathione. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72: 509-520
  21. Villamizar L, Barrera G, Cotes A, Martínez F. 2010. Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical, characterization, photostability and *in vitro* virus release. *J. Microencapsulation* 27:314-324
  22. Charpentier A, Gadielle P, Benoit P. 1999. Rhizobacteria microencapsulation: properties of microparticles obtained by spray-drying. *J. Microencapsulation* 16: 215-229
  23. Tamez P, McGuire M, Behle R, Shasha B, Pingal R. 2002. Storage Stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray dried formulations. *Journal of Invertebrate Pathology* 79: 7-16
  24. Behle R, Tamez-Guerra P, McGuire M. 2006. Evaluating conditions for producing spray-dried formulations of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedroviruses (AfMNPV). *Bioccontrol Science and Technology* 16:941-952
  25. Young S. 2005. Persistence of viruses in environment. <http://www.Agctr.isu.edu/s265/young.htm>. (consulta septiembre 2010).
  26. Jin X, Custis D. 2011. Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control* 56: 202-208
  27. 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
  28. Horaczek A, Vierstein 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
  29. Hede P, Bach P, Jensen A. 2008. Top-spray fluid bed coating: Scale-up in terms of relative droplet size and drying force. *Powder Technology*