

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Obtención de Genotipos

- 5 A partir de larvas de un cultivo de pastura en el Departamento de Córdoba (Colombia) se aisló un nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* (NPV003) y un granulovirus de *S. frugiperda* (VG008) (Gómez et al., 2010). Del nucleopoliedrovirus NPV003 se obtuvieron poliedros purificados que contenían diversos genotipos de manera natural.
- 10 Los cuerpos de oclusión de múltiples nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* cepa SfMNPV003 de la familia Baculoviridae, género Alphabaculovirus, fueron depositados bajo el número PTA-123204, el 13 de junio de 2016, en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA.
- 15 El proceso de obtención de genotipos puros se describe en la FIG. 2, donde se muestra cómo, a partir de la suspensión viral purificada de NPV003 se infectaron larvas de *S. frugiperda* por ingesta oral y se extrajo hemolinfa de las larvas infectadas en el momento del ciclo en el cual se encontraban los viriones brotados (con única nucleocápside y genoma único).
- 20 Mediante diversas diluciones se infectaron células de insecto de la línea Sf9 (línea celular de *S. frugiperda*). Después se seleccionaron células individuales, las cuales contenían un solo genotipo en su interior y estos se multiplicaron mediante inyección en larvas, de las cuales se purificaron las variantes genotípicas individuales después de la muerte de los
- 25 individuos. A partir de los genotipos individuales se realizaron mezclas de los genotipos previamente seleccionados por su actividad insecticida.

Inicialmente se liberaron los viriones derivados de los cuerpos de oclusión mediante tratamiento con soluciones de pH alcalino y se inyectaron en larvas. En el proceso de

30 infección ocurrió la co-oclusión de los genotipos seleccionados. Paralelamente, se

obtuvieron las mezclas de los genotipos realizando mezclas de los cuerpos de oclusión que contienen las variantes seleccionadas de manera individual.

Ejemplo 2. Actividad insecticida de las mezclas virales

5

La actividad insecticida fue evaluada mediante bioensayo siguiendo la metodología de la gota descrita por Hughes y Wood (1981) y utilizando la Concentración Letal 50 (CL₅₀) determinada previamente para el virus nativo NPV003, correspondiente a 1×10^5 CI/mL. Los tratamientos correspondieron al virus nativo NPV003, la mezcla sintética No. 1, la
10 mezcla sintética No. 2 y un testigo absoluto. Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento, cada una con 15 larvas neonatas, en un diseño completamente al azar y la mortalidad se evaluó a los 7 días después de la inoculación. Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA y una prueba de diferencia mínima significativa DMS (95%).

15 Como resultados del ensayo, el testigo absoluto presentó una mortalidad del 6,66%, mientras que los tratamientos evaluados mostraron porcentajes de mortalidad significativamente superiores ($p > 0,05$). Con el virus nativo NPV003 se alcanzó la mortalidad esperada para la concentración utilizada, con un valor del 53,33%, en tanto que con las mezclas ensayadas (mezclas sintéticas 1 y 2), se evidenció un aumento
20 significativo ($p = 0,0168$) de la actividad insecticida, con valores del 80% y 70% para las mezclas 1 y 2 respectivamente.

Los resultados se muestran en la Tabla 8, los cuales confirmaron el efecto potenciador de las mezclas sintéticas con potencial para ser utilizadas como ingrediente activo de las
25 composiciones bioinsecticidas.

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de *S. frugiperda* tratadas con el virus nativo NPV003 y dos mezclas sintéticas ajustadas a 1×10^5 CI/mL

Repetición	NPV003	Mezcla 1	Mezcla 2	Testigo
1	53,00	67,00	73,00	6,66

2	46,00	87,00	73,00	6,66
3	60,00	87,00	66,00	6,66
Promedio	53,00	80,33	70,66	6,66

Ejemplo 3. Estabilidad de las composiciones en condiciones de almacenamiento

Para una composición formulada según la Tabla 4 (No SfNPV003-2 a base de la mezcla viral mezcla No 1 - mezcla de genotipos de NPV003 y granulovirus formulada denominada Mezcla-f), se empacaron muestras de 0,5 g en bolsas metalizadas de 2 cm de ancho x 4 cm de largo y se sellaron al vacío. Como tratamientos control se utilizaron el aislamiento nativo NPV003 formulado (fórmula No SfNPV003-1 (NPV003-f)) y sin formular (NPV003-nf).

Nueve muestras de cada tratamiento se almacenaron en una incubadora a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. La actividad insecticida fue evaluada mediante bioensayo antes y después de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento, siguiendo la metodología de la gota descrita por Hughes y Wood (1981) y utilizando la CL_{90} determinada previamente para cada inóculo viral.

Para medir el contenido de contaminantes, se adicionaron 9 mL de Tween 80® al 0,1% a una de las muestras y se realizaron diluciones decimales hasta 1×10^{-5} . De las tres últimas diluciones se sembraron 100 μL en cajas de Petri:

- i) para la evaluación de mohos en medio agar-papa-dextrosa suplementado con Tritón al 0,1% (agar PDA + Tritón),
- ii) para la cuantificación de levaduras en medio agar extracto de levadura y malta (agar YM), y
- iii) para el recuento de bacterias contaminantes en medio agar nutritivo.

Cada dilución se sembró por triplicado. El resultado se expresó como recuento de unidades formadoras de colonia de contaminantes por gramo de producto (UFC/g). El diseño experimental fue completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo y todas las mediciones se realizaron por triplicado.

5

Como se observa en la FIG. 5, el virus nativo NPV003 presentó una pérdida del 33% de su actividad insecticida cuando fue almacenado como suspensión viral sin formular durante tres meses a 28°C. Por el contrario, el virus nativo NPV003 y la mezcla viral (mezcla No 1 - mezcla de genotipos de NPV003 y granulovirus formulada denominada Mezcla-f), los dos
10 formulados como un polvo mojabable, sólo evidenciaron una pérdida de actividad del 11% cuando fueron sometidos a las mismas condiciones que el virus NPV003 sin formular, lo que demuestra el efecto estabilizador que brinda la formulación durante el período de almacenamiento.

15 Para las condiciones del estudio, la formulación redujo en un 66% la inactivación viral después de tres meses de almacenamiento a la temperatura de 28°C efecto que podría magnificarse a temperaturas más bajas o bajo condiciones de refrigeración.

La cinética de la pérdida de eficacia versus tiempo de almacenamiento para la mezcla
20 formulada se ajustó a una cinética de orden 1 con un coeficiente correlación del 0,98. Con la ecuación obtenida para este modelo matemático se estimó la vida útil del producto, considerando como la eficacia mínima aceptable un 70%. Con base en esta información, el producto sería estable por 8 meses almacenado a 28°C, es decir sin requerir cadena de frío para su transporte y almacenamiento, lo que reduce los costos de distribución y provee una
25 ventana de tiempo suficiente para la comercialización del bioinsumo.

En cuanto al contenido de contaminantes, y como se evidencia en la FIG. 6, el contenido de microorganismos aumenta directamente proporcional al tiempo de almacenamiento en el tratamiento correspondiente a la suspensión del virus nativo NPV003 sin formular, con
30 un incremento superior a una unidad logarítmica. Por el contrario, en los dos tratamientos

formulados probados (el virus nativo NPV003 y la mezcla viral en forma de polvo mojable), se presentó una reducción significativa de los contaminantes la cual fue inversamente proporcional al tiempo de almacenamiento.

- 5 Este comportamiento posiblemente se debe al efecto del proceso de formulación, que implica la remoción de agua del producto hasta una humedad final inferior al 5% en el producto. El proceso de secado causa la muerte de los microorganismos, reduciendo la carga de contaminantes en dos unidades logarítmicas y posteriormente la baja humedad que reduce el metabolismo microbiano evita la proliferación de contaminantes como
- 10 bacterias y hongos que aún permanezcan viables en la formulación.

La disminución de contaminantes en el formulado, puede estar asociada con la mayor estabilidad de la actividad insecticida, considerando que los microorganismos pueden afectar negativamente la integridad de las partículas virales durante el almacenamiento.

15

Ejemplo 4. Ensayo de Fotoestabilidad frente a la radiación UV *tipo B*

- Los tratamientos evaluados para este ensayo fueron el virus nativo NPV003 sin formular (suspensión acuosa), el virus nativo NPV003 formulado como polvo mojable según la
- 20 formula No SfNPV003-2 de la Tabla 4 y la mezcla viral formulada (Mezcla No 1), también formulada como SfNPV003-2. Se prepararon suspensiones y se ajustaron a una concentración de 2×10^7 CI/mL.

- Se dispusieron 200 µL de cada suspensión en 5 pozos de una fila de una microplaca de 96
- 25 pozos de fondo plano. La microplaca se irradió con una lámpara monocromática (longitud de onda 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.

30

Cada 2 horas y 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 µL de una solución de sacarosa al 4% que contenía un colorante azul de alimentos al 1% y se llevó a
5 cabo un bioensayo para determinar la actividad insecticida siguiendo la metodología de la gota descrita por 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
10 siguiente ecuación (Shapiro, 1989):

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

en donde:

15 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
20 diferencias entre tratamientos fueron evidenciadas mediante una prueba DMS (95%).

En la FIG. 7 se presentan los resultados de ensayo, en la cual se puede observar que el virus NPV003 sin formular, presentó una pérdida progresiva y significativa de la actividad a medida que aumentó el tiempo de irradiación, con una inactivación del 49% después de 6
25 horas de exposición a la lámpara UVB.

El virus nativo NPV003 formulado como polvo mojable según la formula No SfNPV003-2 mostró una inactivación del 11,6%, en tanto que la mezcla viral, formulada también según la formula No SfNPV003-2, una inactivación del 5,8%, lo que confirma el efecto

fotoprotector de la formulación, la cual permitiría prolongar la persistencia de las partículas virales en el ambiente.

5 Cabe destacar que la eficacia final después de 6 horas de irradiación, fue significativamente mayor para el producto formulado a base de la mezcla viral con respecto al formulado a base del virus nativo NPV003, lo que sugiere también que posiblemente la mezcla viral contribuye a la mayor fotoestabilidad del producto formulado.