

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA-LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGIA**



**Monografía**

**Actividad insecticida contra larvas de *Spodoptera exigua* de dos formulaciones de Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN), usando oxido de zinc y glicerina. Campus Agropecuario, 2004-2005.**

**Previo a optar el título de Ingeniero en Agroecología Tropical**

**Presentado por:**

**Br. Sobeyda de los Ángeles Vargas Téllez**

**Tutora:**

**MSc. Carmen Marina Rizo Zeledón**

**León, noviembre del 2006**

## Índice General

Índice General.....	ii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimiento.....	v
Resumen.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	4
IV. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1 Virus Entomopatógenos.....	5
4.1.1 Modo de Acción y síntomas.....	6
4.2 Bioinsecticidas.....	7
4.3 Formulación de agentes de biocontrol.....	7
4.3.1 Formulación del virus.....	10
4.3.2 Técnica para formular virus.....	12
4.3.3 Materiales usados en la formulación.....	14
4.3.3.3 Otros materiales.....	16
4.3.3.3.1 Glicerina.....	16
4.3.3.3.2 Oxido de Zinc.....	17
4.4 Evaluación de formulados en Lepidópteros.....	17
4.4.1 Bioensayos.....	17
4.4.2. En dietas artificiales.....	18
4.4.3. Alimentación con gotas teñidas.....	18
4.4.4 Aplicación de capa sencilla sobre dieta.....	19
4.4.5 Incorporación a dieta artificial.....	19
4.5 Determinación de actividad insecticida: Dosis Letal Media (DL <sub>50</sub> ).....	20
5.3 Análisis probit.....	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. Etapa de Elaboración del formulado.....	22
5.1.1 Producción del virus.....	22

5.1.2 Preparación de la solución viral.....	22
5.1.3 Proceso de semi- purificación de la solución viral.....	23
5.1.4 Determinación de la concentración viral.....	23
5.2 Preparación de la mezcla o formulado .....	24
5.2.1 Formulado Glicerina –VPN .....	24
5.2.2 Formulado Oxido de zinc- VPN .....	24
5.2.3 formulado viral crudo .....	24
5.2.4 Determinación de la concentración viral de los formulados.....	25
5. 3 Etapa de la evaluación de la actividad biológica de cada formulado...	25
5.3.1 Preparación del colorante azul.....	25
5.3.2 preparación de las dosis.....	25
5.3.3 Bioensayo.....	25
5.3.4 Determinación de la DL <sub>50</sub> .....	26
5.3.5 Determinación de la Potencia relativa .....	26
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
VII. CONCLUSIONES .....	37
VIII. RECOMENDACIONES .....	38
IX . BIBLIOGRAFÍA .....	39
X. ANEXOS .....	41

## DEDICATORIA

**A Dios** por ser siempre el motor de mi vida, por escucharme siempre mis suplicas, por darme la fortaleza que necesito para seguir siempre adelante y no dejarme caer ante los obstáculos que se me presentan. Gracias señor por que a pesar de estar sola en esta tesis he sabido sacarla adelante y eso simplemente a sido por ti,

Pues tú eres el principal integrante de ella y tengo la fe de salir firme y triunfante de ella.

**A la Virgen** por ser mi Madre Santísima, mi refugio, y mi esperanza. Gracias por estar siempre conmigo y se que si siempre recurro a ti nada me fallara.

**A MI ESPOSO Y MI HIJA** por ser ahora una nueva parte de mi vida y la mas importante, pues para ellos quiero ser una profesional y brindarles una mejor vida sin dificultades, gracias por que ellos eran el gran vacío que tenia mi vida y ahora lo tengo todo, ya no estoy sola pues se que si necesito de un amigo y de un amor se a quien recurrir y es a mi esposo pues quiero que sepas lo mucho que te quiero, amo y respeto y anhelo siempre estar a tu lado. Y si necesito de una compañerita, de un apapacho, de un besito es simplemente recurrir a mi hermosa hijita Andrea, la niñita mas hermosa y tierna que en mi vida existe.

**A MI PADRE Y A MI MADRE** por ser ellos los que me inculcaron siempre que el estudio es lo más importante para llegar a ser alguien en la vida y ser respetados por la sociedad, por tenerme la confianza de que tarde pero seguro voy a darles el orgullo de darles mi titulo de ingeniera y poderlo poner junto a los títulos de mis hermanas. Gracias por que nosotros sabemos cuanto les costo a ustedes padres sacarnos adelante y pagarnos nuestros estudios hasta el final y eso hay que retribuirlo con logros y éxitos.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua por darme la oportunidad de estudiar una carrera profesional, de la cual dependerá mi futuro. Nunca me cerró las puertas sino fue siempre un escalón muy firme para que yo nunca cayera y culminara mis metas.

A mi tutora MSc. Carmen M. Rizo por su apoyo, tiempo y conocimientos brindados para poder realizar, culminar y defender mi tesis con toda la seguridad posible.

A todo el equipo del laboratorio de cría de insectos y reproducción de virus, a la Lic. Ivania Baca y Lic. Mirna Ortiz por que fueron siempre buenas compañeras de trabajo y siempre estuvieron atentas a enseñarme todo sobre el manejo de la cría y brindarme cualquier información que me fuese útil y necesaria.

En fin agradezco a todos los que de una u otra manera colaboraron para que yo realizara mi tesis.

## RESUMEN

El virus de la poliedrosis nuclear es una alternativa para el manejo de *Spodoptera*, por lo que estudiar el efecto de diferentes aditivos para su formulación es importante. El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad insecticida contra larvas de *Spodoptera exigua* de dos formulaciones virales a base de glicerina y óxido de zinc en condiciones de laboratorio y comparar la efectividad de ambas formulaciones con el virus crudo. El estudio se realizó en dos etapas, primero se elaboraron los formulados; para ello se mezcló en proporción 1:1 (volumen/volumen) los materiales inertes con el virus hasta obtener una consistencia homogénea. La segunda etapa fue evaluar la actividad biológica de los formulados a través de bioensayos, se usó la técnica de alimentación de gota teñida y después la técnica de contaminación de la dieta. El bioensayo consistió de cinco dosis, dos testigos y tres repeticiones. Se usaron 25 larvas neonatas de *Spodoptera exigua* por dosis. Los datos de mortalidad fueron analizados mediante el análisis de probit y se determinó la  $DL_{50}$ . Se usó el paquete estadístico SPSS. Se obtuvo la  $DL_{50}$  para el formulado de glicerina de 2563.385 para el bioensayo de gota teñida y de 2421.59 CIP/ml con el de contaminación de la dieta y con el formulado de óxido de zinc fue de 1574.08. Al compararlo con valores de  $DL_{50}$  de *Spodoptera exigua* realizados en 1992, se reportan de 50 a 300 CIP/ $\mu$ l, al compararlos indican que ha habido una pérdida de patogenicidad y virulencia. Sin embargo, al ser comparado con la  $DL_{50}$  del formulado crudo el valor fue mayor de 3763.068 CIP/ $\mu$ l, lo que indica que la cepa viral después de más de 15 años de "pase" ha disminuido su patogenicidad y virulencia. Por otro lado, al comparar los resultados de la  $DL_{50}$  de ambos formulados, para determinar la potencia relativa nos indica que la formulación con el óxido de zinc es 1.6 veces más potente que la formulación con glicerina. Esto indica que el aditivo y el proceso de formulación afecta menos la actividad insecticida del virus. Lo que sugiere que tiene mayores probabilidades para ser usado como un material inerte para la formulación del virus.

## I. INTRODUCCIÓN

La agricultura ha sido y continúa siendo la principal actividad económica de Nicaragua. En los años 40 y 50 el campesino sembraba diversos cultivos para su subsistencia. En los años 60 se intensificó la agricultura, debido al auge de la tecnología de la revolución verde; en este caso la siembra intensiva y extensiva del algodón en monocultivo, usando variedades de alto rendimiento basado en la utilización de fertilizantes y plaguicidas sintéticos y la excesiva mecanización para la siembra y las labores agrícolas en general. Esta tecnología importada de países industrializados, además de ser muy costosa vino a desplazar las técnicas locales adaptadas a las condiciones socioeconómicas de los productores.

Además, se provocó un cambio radical en el medio natural ya que se utilizaban plaguicidas, provocando así un sin número de afecciones a la salud, intoxicaciones, abortos en mujeres embarazadas, deformaciones congénitas y contaminación de leche materna en mujeres.

Debido a la creciente demanda de insumos químicos en la agricultura los nuevos plaguicidas siguen siendo una amenaza para el hombre y para el medio ambiente, razón que ha dado origen a la rápida búsqueda de alternativas como una respuesta simple, racional y económica a este problema. En las últimas décadas se ha desarrollado una creciente actividad científica dirigida a la búsqueda de medidas seguras para establecer sistemas de protección de cultivos. Uno de los esfuerzos para reducir el uso de insecticidas químicos fue la investigación de diferentes agentes de control biológico de insectos. El control biológico es un método específico y seguro para el ambiente, reduce la aparición de resistencia por insectos y está basado en microorganismos entomopatógenos tales como hongos, virus, nematodos, etc.

Uno de los principales organismos reguladores de plagas es el Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN), el cual es un insecticida microbial específico que

actúa por ingestión y regula larvas del orden Lepidóptero como el complejo *Spodoptera sp*, provocando la muerte al tercer o cuarto día de infección.

El uso del virus de la poliedrosis nuclear (VPN), representa una nueva alternativa ecológica para el manejo integrado de *Spodoptera* en diferentes cultivos y su uso contribuirá a la sostenibilidad y a la restauración de los agroecosistemas.

La UNAN-LEÓN, ha venido investigando desde los años 1986 el uso del Virus de la poliedrosis nuclear (VPN). Actualmente se producen tres cepas virales aisladas en *Spodoptera frugiperda*, *S. exigua* y *S. sunia*. Sin embargo, a pesar de las ventajas ecológicas que representa el empleo de estos virus para el control de *Spodoptera*, están poco desarrollados como productos bioinsecticidas, en parte, por su especificidad, pero sobre todo por la disponibilidad, estabilidad y fácil manejo del producto por los agricultores. Se requiere por tanto, que estos bioinsecticidas, lleven aditivos que los protejan de los diferentes factores ambientales como la radiación solar y la temperatura, principalmente, ya que inciden en la actividad biológica del virus asperjado sobre las hojas.

Es por esta razón que se investigará el uso de diferentes ingredientes inertes como aditivos para la formulación del VPN que permitan una mayor sobrevivencia de almacenamiento y efectividad para regular la población de plagas en los cultivos.

## I. OBJETIVOS

### 2.1 GENERAL

Evaluar la actividad Insecticida contra larvas de *Spodoptera exigua* de dos formulaciones virales a base de glicerina (formulación líquida) y óxido de zinc (formulación en polvo), en condiciones de laboratorio en el Campus Agropecuario, durante el período del 2004-2005.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración viral de una dosis del virus de *S. exigua* crudo, formulado con glicerina y con óxido de zinc, producido en el laboratorio de producción de VPN del CIRCB.
2. Analizar la respuesta de la mortalidad de las larvas expuestas a las dosis de los diferentes formulados virales.
3. Determinar la  $DL_{50}$  del virus crudo y de ambas formulaciones
4. Estimar la potencia relativa para comparar la efectividad de ambas formulaciones con respecto al virus crudo.

### III. HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN

#### **Hipótesis de investigación**

La formulación con glicerina y oxido de zinc mejora la actividad biológica del Virus de la poliedrosis nuclear para regular las poblaciones de *Spodoptera exigua* en diferentes cultivos de importancia en Nicaragua.

**Ho:** La actividad insecticida del formulado con oxido de zinc y glicerina es similar a la actividad del virus crudo.

**Ha:** La actividad insecticida del formulado con oxido de zinc y glicerina es diferente a la actividad del virus crudo.

## IV. MARCO TEORICO

### 4.1 Virus Entomopatógenos

Los virus Entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades infecciosas que se multiplican en los tejidos de los insectos hasta eventualmente ocasionar su muerte. Son parásitos intracelulares obligados, pues no pueden reproducirse fuera de la célula huésped, ya que necesitan de un organismo vivo para su multiplicación y diseminación, (Alves 1986; Evans y Entwistle, 1987, Rizo y Narváez, 2001)

Estos microorganismos son muy específicos y puede infectar solo una especie de insecto. Algunos tienen un rango de hospederos más amplio, el cual se puede extender a través de diferentes órdenes de insectos. Debido a que son organismos vivos, cada microorganismo entomopatógeno posee características propias y diferentes entre ellos. (Mc. Guire, M. R., *et al*, 2003)

Existen 13 familias de virus que son capaces de infectar insectos, pero los más estudiados para usarse como una estrategia de control biológico, son los que pertenecen a la familia Baculoviridae, los cuales presentan actividad contra insectos de los ordenes Coleóptera, Díptera, Lepidóptera, Neuróptera, Sifanáptera, Tisanura y Tricóptera. Los Baculoviridae se dividen en Virus de la Poliedrosis Nuclear, VPN y Virus de la Granulosis, VG (Behle, R y Tamez Guerra, 2003).

De la familia de los Baculoviridae, el grupo de virus más utilizado e investigado para el control de plagas es el Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN). El rango de hospederos susceptibles para los VPN es suficientemente amplio, como para que se conviertan en buenos candidatos para el control de insectos plagas de importancia económica en agricultura (Behle, R y Tamez Guerra, 2003).

#### 4.1.1 Modo de Acción y síntomas

Los virus contaminan a los insectos por vía oral. Normalmente estos son ingeridos con los alimentos presentes en los tallos y hojas, siendo el estado

larval el que presenta mayor predisposición (Lobo de Souza y Lecuona, 1996). Este proceso de infección depende de varios factores: susceptibilidad del insecto, edad o tamaño del insecto, disponibilidad del alimento, entre otros (Alves, 1986).

Después de la ingestión del alimento la infección se mueve directamente a las células epiteliales del intestino medio, liberándose la partícula viral o virión, por la acción de los jugos digestivos altamente alcalinos y por la actividad de las proteasas alcalinas. Estas partículas producen la infección primaria. Se fusionan a la membrana plasmática de la región apical de las microvellosidades del intestino medio y los nucleocapsides desnudos penetran al citoplasma de la célula. El genoma es liberado en el núcleo y comienza la replicación del virus. Durante el proceso de infección, dos formas de virus son producidas: Virus no incluido (NOV) y Virus incluido (OV) (Lobo de Souza y Lecuona, 1996). Los NOVs son nucleocapsides que brotan a través de la lámina basal y son los responsables de la infección secundaria en el hemocele, los OVs aparecen mas tarde en el ciclo de la infección como viriones envueltos y embebidos dentro de un cuerpo de inclusión (Evans y Entwistle, 1987).

Los síntomas aparecen después del tercer y cuarto día de infección de las larvas. Primero se observan manchas amarillas en el tegumento y la piel con apariencia oleosa, luego la larva reduce su movilidad, dejan de alimentarse y suben a la parte alta de las plantas, después se cuelgan de las hojas de las patas traseras y posteriormente se vuelven oscuras debido a la desintegración de los tejidos internos hasta la ruptura del tegumento. (Rizo, C. M., y Narvárez, C, 2001). En general, el insecto muere a partir del sexto o séptimo día, variando este período según la cepa viral, el insecto considerado y el ambiente al cual están expuestos (Lobo de Souza y Lecuona, 1996).

#### **4.2 Bioinsecticidas**

Los efectos indeseables de los insecticidas químicos han llevado a encausar las investigaciones a nivel de laboratorio y campo en el empleo de insecticidas microbiales. Para el desarrollo de estos microorganismos como agentes de control es necesario desarrollar sistemas de producción y formulaciones

adecuadas para cubrir las necesidades específicas del usuario final del producto bioinsecticida (Behle, R y Tamez Guerra, 2003

Se conocen como bioinsecticidas a todos los productos a base de organismos o productos de organismos con actividad tóxica a insectos, malezas (bioherbicidas) o agentes causales de enfermedades de plantas. Actualmente, se conocen alrededor de 1500 microorganismos o productos microbianos en la naturaleza con potencial como bioinsecticida. Dentro del grupo de bioinsecticidas se incluyen organismos multicelulares (nematodos), microorganismos (virus, hongos, bacterias y protozoarios), productos de fermentación microbiana o extractos de plantas, aceite neem, también conocido como azadiractina (Mc. Guire, M. R., *et al*, 2003, citado por Tamez Guerra *et al*, 2003).

Los bioinsecticidas se han convertido en una alternativa viable y segura para el ambiente. Además, que los insectos presentan muy baja resistencia a los mismos.

#### **4.3 Formulación de Agentes de Biocontrol**

La formulación de un plaguicida es definida como la composición resultante cuando el plaguicida candidato es mezclado con cualquier cosa incluyendo agua. Por lo tanto cualquier combinación de un biocida activo con un segundo material es técnicamente una formulación (Couth, e Ignoffo, 1981).

Angus y Luthy (1971), citado por Couch e Ignoffo, 1981, mencionan que el desarrollo de una formulación de un insecticida microbial va casi paralelo a la formulación de un insecticida químico. Por que ambos, químicos y patógenos de insectos, deben ser formulados para facilitar la mezcla y aplicación. La formulación básica de los patógenos de insectos y químicos puede ser 1. Líquidos (en suspensión acuosa o suspensión emulsificable); 2 polvo mojable; 3. polvo; 4 cebos; 5 granulados. Sin embargo, los patógenos de insectos son entidades vivientes insolubles y ellos no pueden ser formulados como polvos solubles.

Couch e Ignoffo, 1981, señalan que en el desarrollo comercial de la formulación básica de un entomopatógeno, la investigación se debe enfocar en mantener la viabilidad del patógeno y virulencia durante el proceso de producción y desarrollar una forma de producción la cual preserve y aumente estas propiedades. Para hacer esto, el conocimiento de la biología del patógeno y de la plaga blanco es esencial

En la investigación inicial las industrias consideraron que los efectos de temperatura, humedad y el sustrato (material inerte), son los mas importantes en la formulación de los entomopatógenos. Debido a que si no se puede manipular la temperatura, humedad y calidad (física y química) del material inerte, puede bajar la viabilidad y virulencia del patógeno. La estabilidad ambiental del patógeno afecta su alcance en el agroecosistema. Por ello el éxito de un insecticida microbiano como producto comercial, depende de su efectividad a concentraciones relativamente bajas (para competir comercialmente con los insecticidas químicos); su facilidad para producirse en grandes cantidades; su estabilidad durante el almacenado (vida de anaquel); y su sobrevivencia en campo desde su aplicación hasta su acción sobre la plaga que se desea controlar (Couth, T. L., e Ignoffo, C. M., 1981; Tamez-Guerra *et al*, 2003).

Tamez Guerra *et al*, 2003, mencionan que se ha tratado de contrarrestar al formular al agente activo con ingredientes que permitan darle estabilidad para mejorar su vida de almacenamiento, protección contra la radiación solar o adherencia para así evitar el lavado por lluvia; estos dos últimos con la finalidad de incrementar la actividad residual en el campo. Couch e Ignoffo, 1981, señalan que la formulación de un insecticida microbial con una vida media para almacenaje menor a 18 meses, es crítico para la industrialización. Por que si no es viable, virulento y estable por un periodo prolongado, la preparación es económicamente no comercializable. El control de inventario y la manipulación es costoso, haciendo la estabilidad por un período de tiempo, indispensable.

Uno de los primeros productos formulados fue el Bt. Al inicio en los primeros años de investigación para su formulación en forma de polvo mojable, fue difícil, debido a que se distribuían pobremente en los sistemas de aplicación, frecuentemente bloqueando las boquillas de las mangueras al asperjar y obteniendo por lo tanto, resultados erráticos. El polvo del Bt ha mejorado la eficacia al proveer una mejor distribución del ingrediente activo. Las formulaciones líquidas, principalmente concentrados acuosos, resuelven los problemas de mezcla y algunas dificultades en la distribución al asperjar; aunque, a causa de que las esporas y cristales del Bt son suspendidos en una cantidad en el medio de fermentación y estabilizados con ingredientes fungostáticos y bacteriostáticos, la estabilidad biológica a menudo falla.

Durante los años del 1975 a 1980 más atención se dio a la formulación agrícola de Bt, Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Heliothis* y ciertos hongos. Nuevos grupos de aditivos inertes que no se habían probado con biológicos se investigaron, tales como arcillas de diferentes tipos, aceite mineral, de maíz, aromáticos y alifáticos, como vehículos líquidos, tritón, atrox, entre otros, como emulsificante, botánicos como pulpa de cítricos, tuza de maíz, pulpa de trigo, entre otros. Las propiedades físicas importantes consideradas fueron: la capacidad de fluir, de mojarse, de dispersarse y suspenderse, con poca espuma y estabilidad física de almacenaje. Todas estas propiedades optimizaron la dilución del producto con agua para formar una suspensión homogénea y asperjable. Una vez que los atributos físicos deseables fueron satisfechos, la estabilidad biológica es estudiada con métodos acelerados para determinar efectos adversos en el patógeno. (Couth e Ignoffo, 1981).

Otras formas comunes de formular agentes de biocontrol, son mediante el empleo de ingredientes tales como aceites para formulaciones con hongos, polímeros naturales como salvado de trigo o avena para microsporidias, azúcares o derivados de alcoholes como el glicerol para el caso de virus, parafinas para algunas bacterias e incluso alginatos y arcillas para el caso de nematodos. (Burges, 1998).

#### **4.3.1 Formulación de Virus**

Como ya se ha mencionado la actividad insecticida de los virus entomopatógenos es afectada por factores biológicos y fisicoquímicos, ya sea en condiciones de campo o de laboratorio. Entre los factores biológicos que afectan la sobrevivencia de los virus se mencionan la estructura, composición química y fenología de las plantas, en particular la presencia de algunas sustancias en las hojas, edad y constituyentes de las dietas artificiales, así como el crecimiento de las plantas (reducción de la concentración aplicada en un área determinada); la genética y virulencia del agente de biocontrol de cada lote de producción, estadio larvario y comportamiento del insecto blanco, contaminación de la dieta artificial con otros microorganismos, genética y fisiología del insecto, multitropismo, prácticas culturales y proceso de infección del agente microbiano por un antagonista. Los factores fisicoquímicos más importantes son la radiación solar (provocando fotoinactivación), radicales libres y Ph, hora, método y equipo de aplicación, método de secado y formulación, temperatura en campo y de almacenamiento, lluvia y humedad, nicho ecológico (densidad y distribución de la plaga), agregación y precipitación de las partículas virales, y procesos de derivatización (Tamez-Guerra *et al*, 2003).

A pesar de que algunos virus son aplicados en campo sin formulaciones previa, la pérdida de la viabilidad y por tanto actividad de los mismos se ve reducida en corto tiempo. Esto representa una desventaja que presenta el empleo de bioinsecticidas por su baja actividad residual, principalmente debido a su susceptibilidad a la radiación solar o por remoción por lluvia y por tener una vida de anaquel limitada (Tamez-Guerra *et al*, 2003).

Por esto, para que los insecticidas virales tengan éxito en el mercado, uno de los puntos básicos se relaciona al desarrollo de formulaciones de los mismos. (Tamez-Guerra, McGuire y Behle, 2003). Además, al formulado se le pueden agregar fagoestimulantes (cuando el agente activo actúa por ingestión), feromonas (para atraerlo al sitio de aplicación) o agentes que incrementen la actividad insecticida del mismo, ejemplo los abrillantadores ópticos en el caso de ciertos baculovirus (Tamez-Guerra *et al*, 2003).

La mayoría de las formulaciones comerciales que se han registrados son en forma de polvos humectables y las que se encuentran disponibles en la actualidad en Estados Unidos de América son líquidas y algunas contienen glicerina como acarreador y estabilizador del virus (Tamez- Guerra, *et al* ,2003).

Las formulaciones comerciales de VPN y los virus de la granulosis son generalmente esprayados o secados en seco y diluidos con un material inerte o secado en frío con un carbohidrato, usualmente lactosa, secado por aspersion y por flujo de aire, es un método sencillo y barato, pero tiene como desventaja que el material (matriz y agente activo) se puede contaminar con facilidad. En ciertos casos se utiliza el secado por aire con el de cama de lecho fluido, durante el cual se combina la matriz con el agente activo (Tamez-Guerra, 2003). El secado por aspersion es sencillo y económico, pero no todos los agentes de biocontrol (especialmente los hongos) resisten el proceso de secado.

Cuando se seca en frío o por congelamiento (liofilización), tiene como ventaja que no afecta la viabilidad del agente activo y prolonga la actividad durante el almacén, pero es muy costoso. (Burges, 1981; Tamez-Guerra *et al*, 2003). También las suspensiones líquidas de virus de insectos se han mantenido frías o congeladas. Sin embargo, a causa de que las formulaciones comerciales son generalmente expuestas a un rango amplio de condiciones de almacenamiento en bodegas, etc., las preparaciones acuosas de virus son generalmente inestables e incapaces de actuar. Los niveles de humedad en las formulaciones final de virus de insectos son similares a los problemas en la formulación de BT, señalados anteriormente. Los requerimientos para almacenar formulaciones son usualmente más restrictivos y para asegurar una vida en estante adecuada la refrigeración es sugerida, especialmente para las formulaciones con altos contenidos de humedad (Couth e Ignoffo, 1981).

Reportes de formulaciones microcapsuladas con virus obtenidas mediante secado por aspersion a base de materiales inertes, mencionan un incremento

de la residualidad del baculovirus capsulado (Ignoffo y Batzer, 1971; Ignoffo y col, 1976 citado por Tamez- Guerra, *et al*, 2003). La adición de carbón o abrillantadores fluorescentes, empleados en la industria de detergentes, se han reportado como adherentes, protectores solares y/o potenciadores de la actividad de los baculovirus (Tamez- Guerra, *et al*, 2003).

## **4.3.2 Técnicas para formular virus**

### **4.3.2.1 Capsulación**

El proceso de capsulación se basa en el conocimiento del comportamiento fisicoquímico de los ingredientes naturales. Para ejemplificar, al mezclarse el almidón con agua a temperaturas menores de 40°C, ocurre un proceso reversible de hidratación, el cual ocasiona que las moléculas se expandan. Si las temperaturas son mayores (80° y 100°C), el proceso es irreversible. Este proceso es conocido como gelatinización. A temperaturas altas y concentraciones altas de almidón, si se emplea un tratamiento repetitivo de enfriamiento- secado, se forma un gel de constitución tridimensional. Este proceso es conocido como retrogradación. Durante este proceso la reasociación de las moléculas las vuelve insolubles en agua. El almidón pregelatinizado, cuando se combina con agua a concentraciones elevadas, puede atrapar otros agentes presentes en el agua mientras que ocurre la retrogradación, en este caso el agente activo. Como el producto final es insoluble, el agente activo queda atrapado en la matriz y evita que se libere al mezclarlo con agua (Rodees y Col.; 1990 citado por Tamez Guerra *et al*, 2003).

### **4.3.2.2 Capsulados en forma de Gránulos**

La elaboración de gránulos es muy sencilla, los materiales se seleccionan en base a su capacidad de formar matrices (por retrogradación) al combinarse con agua y generalmente se emplea una parte del material pregelatinizado en dos partes de agua, el agente activo y aceite. Entre la lista de ingredientes que se pueden emplear como matrices se encuentran una gran cantidad de harinas, almidones y proteínas. Este material es considerado como la matriz del granulo, el cual se añade al agente activo y otros aditivos deseados, (protectores solares, fago estimulantes, adherentes incluso preservadores Ej.: inhibidores del crecimiento de hongos).

El empleo de formulaciones granulares es muy apropiada para cultivos como el maíz. En donde el gránulo queda retenido en el cogollo de la planta, el mismo sitio donde inicia su alimentación la mayoría de las larvas de lepidópteros. Se ha comprobado que mediante el empleo de formulaciones granulares se obtiene un mejor control del gusano europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hubner), que el uso de aplicaciones asperjables de formulaciones de Bt en forma de polvos humectables. De igual manera el uso de VPV dirigido al cogollo en mezcla con aserrín o arena da iguales resultados que el virus crudo usado en maíz <sup>1</sup>

#### **4.3.2.3 Capsulados como microcapsulas**

La microcapsulación de agentes entomopatógenos tiene como objetivo mejorar su efectividad. Mejorar las propiedades físicas del formulado para facilitar su manejo, tener rangos de liberación mas controlados, estabilizar mejor al agente activo contra los factores ambientales y evitar una biodegradación rápida y poderlo dirigir mejor a las plagas que se quieran controlar.

#### **4.3.2.4 Capsulados como Adyuvantes**

Para prolongar la actividad residual del agente activo en el campo, se ha usado una mezcla de ingredientes alimenticios naturales (almidones), y aplicarlos como adyuvante, es decir, donde el agente capsulante se mezcla en el tanque aspersor con el agua y ahí se añade el ingrediente activo y se aplica directamente al cultivo. Estos adyuvantes pueden mejorar la estabilidad del agente activo al ambiente (proyección de rayos solares), incrementar la estimulación alimenticia (fago estimulante). Ampliar la cobertura del área a tratar (volumen-área), o mejorar la adherencia del material en el cultivo (resistencia al lavado por lluvia). Los materiales se deben seleccionar en base a dos propiedades básicas: la capacidad de fácil disolución en agua lo que en ocasiones requiere emplear valores de ph ácidos o alcalinos y el permitir que el

---

<sup>1</sup> Rizo, comunicación personal

agente activo se libere y pueda estar en contacto con las células del intestino medio. Estos factores son claves para todos aquellos bioinsecticidas cuyo modo de acción es por ingestión (virus y microsporidias). Otro factor importante que poseen estos ingredientes es que al ser mezclados con agua producen una solución espesa de mayor viscosidad. Esto generalmente ayuda a modificar el tamaño del diámetro de la gota de agua, mejorando la cobertura del área con la misma cantidad del producto.

Los polímeros naturales que se han probado como adyuvantes incluyen proteínas, harinas, almidones y productos leñosos (lignina).

### **4.3.3 Materiales usados en la formulación**

#### **4.3.3.1 Proteínas, harinas y almidones pregelatinizados**

Los materiales capsulantes que primero se evaluaron como adyuvantes en formulaciones fueron almidón y harina de maíz pregelatinizados. Estos materiales son solubles en agua y fácilmente aplicados por aspersion en cualquier tipo de cultivo.

Los ingredientes, por su estructura fisicoquímica al mezclarse en agua, después de aplicarse por aspersion forman una película gelatinosa sobre la hojas, la cual al secarse forma una red en la cual quedan atrapados esporas y cristales. A esto se le conoce como proceso de auto-capsulación. El empleo de almidón y de harina de maíz pregelatinizados como adyuvantes, ha demostrado que la actividad residual se puede incrementar de 3 días (sin formular) a 8 días (formulado). La caseína de lache y el gluten de trigo (solubilizado a pH alcalino), son otros materiales que incrementan la actividad residual en campo al emplearse como adyuvantes.

#### **4.3.3.2 La lignina**

Es otro material que se ha probado como adyuvante. La lignina es un polímero natural que se extrae de los tejidos leñosos de la planta. Este compuesto orgánico cuya estructura molecular presenta anillos aromáticos, es resistente al

daño por los rayos solares (actúa como filtro de rayos ultravioletas) y por lo mismo es un protector solar natural.

### **4.3.3.3 Otros Materiales**

#### **4.3.3.3.1 Glicerina**

La glicerina o propanotrihol es un polialcohol, compuesto por tres átomos de carbono y que tiene en cada uno un grupo alcohol, la cual es un líquido viscoso incoloro de sabor dulce. Producto secundario en la fabricación del jabón y buen agente humectante para la Industria alimentaria. Sus ésteres son sus derivados químicos más importantes. Algunos de ellos son: las grasas, la nitroglicerina, la dinamita, etc.

**Estructura Química.** Está compuesta de tres carbonos, ocho hidrógenos y tres oxígenos. Su estructura, tiene enlaces simples y es tetravalente. Su fórmula es  $\text{CH}_2\text{OH-CHOH-CH}_2\text{OH}$ .

**Propiedades físicas y químicas.** Es un líquido siruposo, incoloro e inodoro, con un sabor dulce a alcohol e insoluble en éter, benceno y cloroformo. De fórmula  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$  (1,2,3-propanotriol), y densidad relativa de 1,26. Tiene un punto de ebullición de  $290\text{ }^\circ\text{C}$  y un punto de fusión de  $18\text{ }^\circ\text{C}$ . La glicerina líquida es resistente a la congelación, pero puede cristalizar a baja temperatura. Es soluble en agua en cualquier proporción, y se disuelve en alcohol, pero es insoluble en éter y muchos otros disolventes orgánicos.

**Utilidad de la glicerina.** El uso más frecuente de la glicerina es en la elaboración de resinas alquídicas. Otras aplicaciones son la fabricación de medicinas y artículos de aseo, como pasta de dientes; como agente plastificante para el celofán y como agente humidificante de productos derivados del tabaco. Dado que existen otros productos más baratos, solamente el 5% de la producción industrial de glicerina se destina a la fabricación de explosivos derivados de ella. Por su afinidad con el agua y su viscosidad, la glicerina se utiliza para la tinta de los tampones de sellar. También se usa para lubricar la maquinaria que bombea los productos del petróleo, debido a su resistencia a disolverse en los líquidos del petróleo. Por

su alta viscosidad y ausencia de toxicidad, la glicerina es un excelente lubricante para las máquinas procesadoras de alimentos. Las grasas y aceites simples son ésteres de ácidos grasos y glicerina. Una vez obtenida como producto secundario en la fabricación del jabón después de haber tratado las grasas y aceites con álcali, la glicerina bruta se purifica por destilación.

Es una sustancia química muy usada en preparados cosméticos como parte de la base general de muchas cremas y lociones, fundamentalmente por su propiedad humectante. La glicerina se caracteriza por poseer alta afinidad con el agua, es capaz de "tomar" (adsorber) agua del aire, lógicamente bajo condiciones especiales de temperatura y humedad. La glicerina puede ayudar a otras sustancias a retener agua, sin que su rol sea activo, sino más bien como apoyo en la labor de mantener la humedad tanto en preparado cosmético como en la piel cuando es aplicado. Es usada en preparados destinados a cualquier zona del cuerpo ya que es inocua, también se la incluye en preparados de uso en bebés y niños ya que no es sensibilizante o alergizante.

#### **4.3.3.3.2. Óxido de zinc**

El óxido de zinc es un compuesto químico de color blanco, se le conoce como zinc blanco. Su fórmula es  $ZnO$  y es poco soluble en agua pero muy soluble en ácidos. Se le encuentra en estado natural en la cincita. Se usa como pigmento e inhibidor del crecimiento de hongos en pinturas, como relleno en llantas de goma y como pomada antiséptica en medicina. Alta capacidad calorífica. Acelerador y activador para la vulcanización del caucho. Pigmento protector de la radiación UV.

### **4.4 Evaluación de Formulaciones en Lepidópteros**

#### **4.4.1 Bioensayos**

Para poder evaluar el potencial de los baculovirus como agentes de control de plagas, es necesario conocer la actividad insecticida de los mismos. Los bioensayos permiten determinar la *virulencia* y *patogenicidad* de la cepa viral. La patogenicidad que no es más que la capacidad del patógeno para causar la

enfermedad y la virulencia es la capacidad de incidir sobre un gran número de individuos y producir una epizootia (Alves, 1986)

Existen muchos métodos para evaluar la actividad insecticida de formulaciones granulares, se dará una descripción de técnicas que pueden ayudar a realizar un bioensayo confiable. Estas técnicas son para ser usadas en pruebas de larvas de lepidópteros como son:

#### **4.4.2 En dietas artificiales**

Dentro de las técnicas mas empleadas para realizar los bioensayos con dietas artificiales se pueden mencionar la alimentación con gotas teñidas, inoculación sobre la dieta y por incorporación a dietas artificiales y capa superficial. También se pueden realizar bioensayos en plantas para evaluar la actividad de los agentes de control biológico.

Las dosis necesarias se determinan en base a la referencia que se tenga de la actividad insecticida del material a ensayar. Generalmente, las dosis se preparan realizando una serie de diluciones. Para cada dilución se recomienda emplear un promedio de 50 larvas, para tener datos representativos para el análisis estadístico e incluir uno o más controles, ej., control con agua y control con el material del formulado. Los bioensayos se pueden realizar con plantas (discos de hojas tratadas con los micro gránulos) y con dietas artificiales (alimentación con gotas teñidas) en forma individual y combinada.

**4.4.3 Alimentación con gotas teñidas** Para realizar los bioensayos de alimentación con gotas teñidas, el agua en la cual se realizan las diluciones se debe teñir con cualquier colorante para alimentos concentrados. Para determinar la cantidad necesaria de colorante en la dilución se recomienda realizar ensayos preliminares, con diferentes cantidades de colorante y exponiendo a las larvas a que se alimenten con el, hasta obtener la mínima concentración necesaria para observar perfectamente el color dentro de la larva. Una vez preparadas las diluciones en donde generalmente se usan tubos de ensayo, cada tubo se homogeniza perfectamente con la ayuda de un agitador para tubos (vortex). Posteriormente de cada dilución se toma una

muestra, con la ayuda de una pipeta pasteur y se van depositando gotitas de la solución alrededor del plato petri. El empleo de platos petri con cierre hermético es muy importante, puesto que evita el escape de las larvas, pero principalmente se evaporen las gotas.

Es necesario asegurarse que cada contenedor se cierre perfectamente tapándolo sin dañar a la larva y evitando que se escape durante el periodo de incubación. Esto es muy importante puesto que se ha observado que las larvas después de consumir la dieta empiezan a alejarse de la fuente de alimento. La incubación abarca un periodo de 4 a 7 días. Las larvas deben incubarse a temperaturas de 28 ± 5°C. Transcurrido el periodo de incubación, se cuenta el número de larvas vivas y muertas de cada dosis y se realiza un análisis estadístico para determinar la  $DL_{50}$  y  $DL_{90}$ . Este tipo de bioensayo está considerado como uno de los más controlados, puesto que cada larva consuma aproximadamente la misma cantidad de solución; Además, este bioensayo es exclusivamente con larvas neonatas.

**4.4.4 Aplicación de capa sencilla sobre dieta** Otro tipo de bioensayo se puede realizar aplicando una cantidad determinada de cada dilución sobre la superficie de la dieta artificial de cada contenedor. La solución se debe distribuir perfectamente sobre la superficie, evitando dejar sitios sin solución. Después de que la dosis se absorbe en la dieta se pone una larva en cada contenedor y se continúa con la incubación y análisis de datos descritos previamente.

**4.4.5 Incorporación a dieta artificial.** En este tipo de bioensayo se asegura que la larva se alimente de la dosis de prueba durante todo el periodo de incubación. Las diferentes dosis del material formulado, según sea el caso, se agregan directamente a la dieta artificial antes de solidificar. Las dosis deberán ser determinadas en base al volumen final de la mezcla dosis-dieta y se reporta en  $\mu\text{l/ml}$  de dieta. Cada dosis-dieta se homogeniza perfectamente con ayuda de una licuadora, teniendo cuidado de no contaminar el contenedor entre las diferentes dosis.

La mezcla dosis-dieta ya homogénea se distribuye en los contenedores hasta completar la cantidad necesaria de contenedores. Cuando la superficie este totalmente seca con ayuda de un pincel se coloca una larva por contenedor y se pone en incubación.

#### **4.5 Determinación de Actividad Insecticida: Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>)**

Los bioensayos para determinar la actividad insecticida de los baculovirus generalmente están basados en la determinación del porcentaje de mortalidad de las larvas del insecto huésped, a diferentes dosis de poliedros por peso o volumen determinados

##### **4.5.1 Análisis probit**

El análisis Probit es usado para analizar datos de bioensayos experimentales, tales como la proporción de insectos muertos por diversas concentraciones de un insecticida o a intervalos de tiempo diferentes a uno o más concentraciones de insecticidas (Finley, 1964, citado por Throne *et al*, 1995). Los resultados son reportados típicamente como una concentración, dosis o tiempo requerido para matar una cierta proporción de insectos probados, por ejemplo CL<sub>50</sub>, o DL<sub>50</sub> o TL<sub>50</sub>.

Si se toman muestras al azar de organismos y se exponen a una serie de dosis de un tóxico y se hace una gráfica de porcentajes de respuestas o muertes corregidos por mortalidad en el testigo versus dosis, la curva que resulta tiene forma sigmoideal o de S y no simétrico. De esta curva se pueden deducir varias dosis que producen el porcentaje de respuestas correspondientes: la dosis que produce mortalidad de k se llama dosis letal K .por ejemplo: las dosis que producen mortalidad de 30,50,80, 90% se referirá como DL<sub>30</sub> DL<sub>50</sub> DL<sub>80</sub> Y DL<sub>90</sub> , respectivamente.

Si se hace una gráfica de porcentajes de mortalidad versus el logaritmo (base 10) de dosis (en vez de dosis), se obtiene una curva simétrica, con el punto de inflexión en el 50% de mortalidad. La curva de respuestas se puede interpretar en términos del concepto de tolerancias individuales. La tolerancia individual es una característica del propio individuo respecto al tóxico utilizado. La tolerancia

es la dosis de tóxico inmediatamente por debajo de la suficiente para matar al organismo.

El objetivo del análisis es deducir la ecuación de respuesta y la fiabilidad de los parámetros estimados, la ecuación se escribe  $Y = a + bx$ , en donde  $a$  es el intercepto y  $b$  es la pendiente de la línea. La pendiente provee una indicación de la variabilidad de la respuesta, cuanto más alta es la pendiente, menor es la varianza en respuesta al tóxico.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Laboratorio de producción de virus del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos (CIRCB) de la UNAN-León, ubicado en el Campus Agropecuario al noroeste de la ciudad de León, carretera La Ceiba.

El estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en la elaboración de los formulados virales y la segunda en la evaluación de la actividad biológica de los mismos.

### 5.1 Etapa de Elaboración del Formulado

#### 5.1.1 Producción del virus

Para obtener el virus se infectaron en el laboratorio de producción de virus del Campus Agropecuario de la UNAN-León, 300 larvas del tercer estadio larval de *Spodoptera exigua*, provenientes de la cría de insectos. Después de 4 a 5 días se cosecharon todas aquellas larvas que murieron y que presentaron un color blancuzco descartando las que tenían un avanzado estado de putrefacción o melanización (Hunter, *et al*, 1987), esto con el objetivo de seleccionar las larvas de mejor calidad. De cada lote se cosechaban 150 LE, las cuales se colocaron en un vial, rotulando la información del lote de larvas, con la fecha de infectación y de cosecha. Se considerará una LE como una larva muerta en el último estadio larval, la cual contiene aproximadamente  $10^6$  CIP (Alves, 1986).

#### 5.1.2 Preparación de la solución viral

Las larvas recolectadas se maceraron con 25 ml de agua destilada y se filtró en una tela de organza para eliminar piel y residuos del insecto y obtener el líquido viral. Esta solución viral fue luego semipurificada a través de un proceso de centrifugación diferencial.

#### 5.1.3 Proceso de semi-purificación de la solución viral

Primeramente, se colocó la solución viral en los tubos de ensayo y se depositaron dentro de la centrifuga. Se centrifugó por un minuto a 3000 rpm,

obteniendo un sobrenadante y un precipitado, el cual contiene restos de cuerpos grasos y otras moléculas del insecto, éste se eliminó y el sobrenadante que contiene las partículas virales se sometió nuevamente a centrifugación por 10 min. a 6000 rpm, de nuevo se formó un precipitado y un sobrenadante en este caso el precipitado contiene los CIP y el sobrenadante se eliminó. A este precipitado se le agregó 2ml de agua destilada.

#### **5.1.4 Determinación de la concentración viral**

Las soluciones madres obtenidas del proceso de semipurificación fue la solución a partir de la cual se prepararon, de cada una, tres diluciones sucesivas 1:10, 1:100 y 1:1000, para evitar la aglomeración de las partículas y facilitar el conteo de los poliedros. Para que los poliedros no quedaran agrupados y se distribuyeran homogéneamente se agitó la solución madre en un Vortex.

De la dilución 1:1000 previamente mezclada en un agitador Vortex, se tomaron 20µl y se depositaron en la ranura del centro de la cámara de conteo de Neubauer, sobre la cual se colocó un cubre objeto. Esta cámara fue colocada sobre el microscopio de contraste de fase para proceder a realizar el conteo. El conteo se efectuó con el lente de 40X y se contaron 5 cuadros grandes, uno en cada esquina y otro en el centro de la radícula. Se contó el número de CIP en cada cuadro, esta operación se repitió dos veces y el valor fue promediado.

Para calcular la concentración de Cuerpos de Inclusión Poliedral (CIP) por mililitro, se multiplicó el número promedio de CIP observados por 5, que corresponde al número de cuadros grandes contados, luego por el factor de cámara que es 10000 ( $10^4$ ), y finalmente por el factor de dilución usado (1000), ( $N \times 10^4 \times 1000$ ).

#### **5.2 Preparación de la mezcla o formulado**

Los ingredientes inertes que se usaron para la realización del formulado son glicerina, óxido de zinc y agua, los cuales fueron mezclados con el ingrediente activo, VPN.

### **5.2.1 Formulado Glicerina-VPN**

Se uso la solución madre de virus semipurificado del lote A (150 LE de S Exigua, vial 1) y se mezcló con la glicerina en una proporción de 1:1 volumen/volumen. Estos ingredientes se mezclaron hasta obtener una consistencia líquida homogénea.

### **5.2.2 Formulado Oxido de Zinc-VPN**

Para elaborar este formulado se uso el virus semipurificado del lote B (150 LE S Exigua vial 2) y se mezcló con el oxido de zinc. Previamente se pesó la solución de virus para adicionar una cantidad similar y obtener una mezcla en una proporción 1:1 peso/volumen. Esta mezcla dio como resultado una pasta la que se dejo extendida en una bandeja sobre un plástico negro, colocando sobre la misma una lámpara de luz amarilla, para facilitar el secado. Se dejó por un período de 24 a 48 horas. Luego esta pasta seca se molió en una máquina, procurando que no se recalentara para que el virus no perdiera su calidad, hasta que quedo completamente pulverizado.

### **5.2.3 Formulado viral crudo**

Se utilizó una dosis de 150 LE, las cuales se sometieron a un proceso de semipurificación y luego a partir de la solución madre se prepararon 5 dosis y un testigo con agua. En cada una se uso el colorante azul, para diferenciar a través de la coloración en su interior que larva succiono la dosis, en la misma proporción que los anteriores bioensayos. Este virus se uso como testigo, para comparar la actividad biológica con los otros formulados.

### **5.2.4 Determinación de la concentración viral de los formulados**

Se tomó 1 ml de la solución viral más glicerina, a partir de la cual se prepararon las diluciones seriadas para efectuar el conteo de CIP. Del formulado en polvo se tomaran 0.5 gramos y se adicionó 1 ml de agua destilada, a partir de esta solución se prepararon las diluciones seriadas. El procedimiento descrito anteriormente se repitió con cada uno de los formulados para obtener la concentración de cada uno de ellos.

### **5.3 Etapa de evaluación de la actividad biológica de cada formulado**

#### **5.3.1 Preparación del colorante azul**

Se pesó 0.02 gramos de azul (colorante vegetal usado en pastelería) y 1 gramo de azúcar (como un fagoestimulante) y se adicionó 150 ml de agua destilada. Luego estos ingredientes se mezclaron y se pusieron en el vortex durante cinco minutos.

#### **5.3.2 Preparación de las dosis**

Para el formulado en polvo se pesaron 0.5 gramos y se mezcló con 1 ml de solución azul, se colocó en el vortex durante cinco minutos y se obtuvo la solución viral (solución madre). De la formulación viral en glicerina se tomó 1 ml y se le agregó 1 ml de colorante azul la cual se usó como la solución madre, a partir de la cual se prepararon 5 dosis, las cuales tenían una concentración entre  $10^2$  y  $10^3$  CIP/ $\mu$ l. Este procedimiento se repitió de igual manera para el formulado crudo (testigo).

#### **5.3.3 Bioensayo**

Para cada formulado la técnica de bioensayo usada fue la de alimentación de gota teñida. Se usaron larvas neonatas de *Spodoptera exigua*, obtenidas del laboratorio de cría de insectos del Campus Agropecuario. El bioensayo consistió de 5 dosis virales y dos testigos (agua más colorante azul y material inerte), con tres repeticiones. Cada dosis fue aplicada a 25 larvas.

Para cada bioensayo se tomó una muestra de cada dosis y con la ayuda de una pipeta Pasteur se depositaron gotitas de la dilución alrededor de un plato petri, (estos platos se rotularon con el tipo de formulado, dosis, número y especie de larva) en el centro de este se colocaron 100 de larvas neonatas, las que succionaron la dilución teñida. Estas larvas se identificaron por su color azul en el interior de su cuerpo o bien en su intestino medio. Luego 25 larvas teñidas fueron transferidas individualmente a un vaso con dieta artificial para su alimentación. Estas se revisaron diariamente en un período de siete días, realizando conteo de larvas vivas y muertas para determinar la actividad insecticida de cada solución.

Después de realizado estos bioensayos, se realizó una repetición para el formulado con glicerina, usando el método de contaminación de la dieta, preparando nuevas dosis similares a las usadas en el bioensayo anterior, usando una nueva formulación del virus con glicerina, con el objetivo de verificar los resultados obtenidos en el primer bioensayo realizado.

#### **5.3.4 Determinación de la DL<sub>50</sub>**

Los datos de mortalidad obtenidos de cada bioensayo fueron analizados mediante el análisis probit, para determinar la DL<sub>50</sub>, y la potencia relativa usando el paquete estadístico SPSS.

#### **5.35 Determinación de la Potencia relativa**

Los resultados de la DL<sub>50</sub>, CL<sub>50</sub> o TL<sub>50</sub> pueden variar en un mismo aislado con una población de insectos sometidos a los bioensayos y con las condiciones realizadas en el bioensayo. La potencia relativa se calcula relacionando la DL<sub>50</sub> del aislado de referencia o patrón con la DL<sub>50</sub> de la muestra que se evalúa. (Alves , 1986). La fórmula es:

$$PR = \frac{DL_{50} \text{ del aislado de referencia o patrón}}{DL_{50} \text{ de la muestra}} \times 1000$$

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Concentración viral de los formulados

La Tabla 1 muestra las concentraciones de la solución madre del virus de *S. exigua* usados para la formulación con glicerina y óxido de zinc. Se puede notar que tres de ellas tenían una concentración de CIP/ml en el margen de  $10^{10}$  y  $10^9$  y una dosis debería contener  $10^{11}$  CIP/ml para 7026 m<sup>2</sup>. Sin embargo, cabe destacar que el conteo de viriones no nos indica si el virión está viable o está inactivo, por lo que el efecto real del VPN formulado será analizado con los resultados de los bioensayos.

Tabla 1. Concentración estimada del virus de la Poliedrosis Nuclear de *Spodoptera exigua* usado para realizar la formulación viral. Campus Agropecuario. 2004-2005.

Formulación	Concentración de Solución madre (CIP/ml)
Virus crudo	$2.35 \times 10^{10}$
Virus con Glicerina (1)	$2.1525 \times 10^{10}$
Virus con glicerina (2)	$2.2069 \times 10^{10}$
Virus con Óxido de zinc	$7.52 \times 10^9$

### Comportamiento de la mortalidad de las larvas expuestas a los diferentes formulados virales

En la Tabla 2, se muestran los resultados de mortalidad de las larvas de *S. exigua* infectadas con el formulado viral a base de glicerina. Se obtuvo mayor mortalidad por VPN a medida que las dosis se incrementaban, tal como se esperaba. Cabe destacar que se observó en algunas larvas síntomas diferentes a las causadas por el VPN, las cuales manifestaron una apariencia similar a la mortalidad por bacterias, el integumento no se rompió y secretó un líquido aceitoso transparente.

Se observó, además, que al ser trasladadas individualmente a vasos conteniendo dieta las larvas no se alimentaron después de la ingestión de las

dosis y morían horas después, atribuyendo este hecho a un efecto sinérgico causado por el virus más la glicerina. Sin embargo, no existen reportes de efectos negativos de la glicerina en los insectos y se menciona que la glicerina es inocua y es utilizada en formulaciones de virus como un acarreador y estabilizador del virus (Tamez Guerra et al, 2003).

Tabla 2. Mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con una formulación viral a base de glicerina. CIRCB, UNAN-LEÓN. 2004.

Dosis	N° de insectos probados	Número de muertos		% de mortalidad	
		VPN	OTRO	VPN	OTRO
Control Glicerina + azul	75	6	45	8%	60
Control azul + agua	75	17	7	22.6%	9.3
$4.14 \cdot 10^2$	75	13	50	17.3%	66.6
$8.28 \cdot 10^2$	75	29	33	38.6%	44
$5.8 \cdot 10^3$	75	56	10	74.6%	13.3
$3.5 \cdot 10^4$	75	61	2	81.3%	2.6
$2.15 \cdot 10^5$	75	61	2	81.3%	2.6

Como se observa en la Tabla 2, el testigo con glicerina presentó una mortalidad por virus de 8%, el cual se considera bajo, pero hubo una mortalidad de 60% por otras causas, por ello se decidió repetir este bioensayo para confirmar los resultados observados.

Por otro lado, en el control donde se uso solamente el colorante azul, se obtuvo un 22.6% de mortalidad por contaminación con VPN, posiblemente a consecuencia de las condiciones del ambiente y un 9.3% de mortalidad por otras causas, como muerte por manipulación debido al tamaño de las larvas (neonatas) usadas en el bioensayo. Por otro lado, la presencia de hormigas y la contaminación de la dieta por levadura, afectaron los resultados.

Tabla 3. Mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* usando el método de contaminación de dietas a base de glicerina más VPN.

Dosis	N ° de insectos	Número de muertos		% de mortalidad	
		VPN	OTRO	VPN	OTRO
Control Agua	45	5	2	11.1	4.4
Control con Glicerina	39	8	4	20.5	10.25
$3.72 \times 10^2$	41	28	1	68.2	2.4
$7.43 \times 10^2$	44	25	0	56.8	0
$2.23 \times 10^3$	47	39	0	82.9	0
$2.23 \times 10^4$	43	37	0	86.0	0
$2.23 \times 10^5$	47	46	0	97.8	0

La Tabla 3 muestra los resultados de mortalidad del segundo bioensayo realizado con las larvas de *S. exigua*, usando el método de contaminación de la dieta, infectadas con el formulado viral a base de glicerina. Este bioensayo se realizó para confirmar los resultados obtenidos en el primer bioensayo mostrados en la Tabla 2. Se obtuvo un porcentaje de mortalidad ascendente a medida que la dosis se incrementa, en las dosis de 372 CIP/ml se dio una mortalidad de 68.2% y en la dosis más alta 223,000 CIP/ml se obtuvo una mortalidad de 97.8%. Se observó sin embargo, que la mortalidad en el testigo donde se uso agua es de 11 %, lo que es permisible para este tipo de bioensayos, pero para el testigo con glicerina se incrementó hasta un 20.5% la mortalidad por VPN.

Este resultado nos indica que la glicerina produce cierta sinergia incrementando la mortalidad en las larvas alimentadas con este formulado. En ambos bioensayos se presentó una mayor mortalidad en el testigo. Cabe destacar, sin embargo, que estos resultados no son concluyentes, puesto que se uso glicerina comercial y no de grado químicamente puro.

Tabla 4. Mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con una formulación viral a base de oxido de zinc. CIRCB, UNAN-LEÓN. 2004

Dosis	N ° de insectos	Número de muertos		% de mortalidad	
		VPN	OTRO	VPN	OTRO
Control Azul	75	25	6	33.3	8
Control Oxido + azul	75	5	5	6.6	6.6
$2.68 \cdot 10^2$	75	27	5	36	6.6
$5.37 \cdot 10^2$	75	24	6	32	1.3
$5.37 \cdot 10^3$	75	44	4	58.6	5.3
$3.76 \cdot 10^4$	75	70	1	93.3	8
$3.76 \cdot 10^5$	75	66	5	88	6.6

En la Tabla 4, se muestra la efectividad del formulado viral a base de oxido de zinc. Se observa que la mortalidad se incrementa como respuesta al incremento de la dosis y que en los testigos se presentó una mortalidad por virus principalmente. En el control con colorante azul hubo un 33.3% de contaminación por VPN y un 8% de mortalidad por otras causas como manipulación, fuga, etc.

En el segundo control con oxido de zinc se presentó una mortalidad de 6.6%, lo que nos indica que este causa muy poco efecto en la mortalidad de las larvas. Las larvas muertas se observaron secas y de tamaño pequeño y el integumento no se rompía.

La Tabla 5 muestra la efectividad del VPN crudo. Se observa siempre la misma tendencia de incremento de la mortalidad al incrementar la dosis, es notorio además que en la dosis  $4.0 \times 10^2$ , que es la mas baja, presentó un porcentaje de mortalidad de 41.3%, más alto que la dosis  $8.10 \times 10^2$ , esto podría explicarse por una agrupación de viriones en la dosis o bien por que las larvas succionaron una mayor cantidad de la solución viral. El control con

colorante azul presentó una contaminación de 9.3% equivalente a 7 larvas muertas y un 8% de mortalidad por otras causas o manipulación.

Tabla 5. Mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con una formulación viral cruda. CIRCB, UNAN-LEÓN. 2004

Dosis	Insectos probados	Número de muertos		Mortalidad (%)	
		VPN	OTRO	VPN	OTRO
control	75	7	6	9.3	8
$4.0 \cdot 10^2$	75	31	19	41.3	25.3
$8.10 \cdot 10^2$	75	14	44	18.6	58.6
$6.5 \cdot 10^3$	75	43	11	57.3	14.6
$3.9 \cdot 10^4$	75	63	8	84	10.6
$2.35 \cdot 10^5$	75	55	20	73.3	26.6

### 6.3 Dosis Letal 50 de los formulados virales

Tabla 6. Dosis- respuesta de larvas de *Spodoptera exigua* infectadas con dos formulaciones virales y el virus crudo. CIRCB, UNAN –LEÓN. 2004-2005.

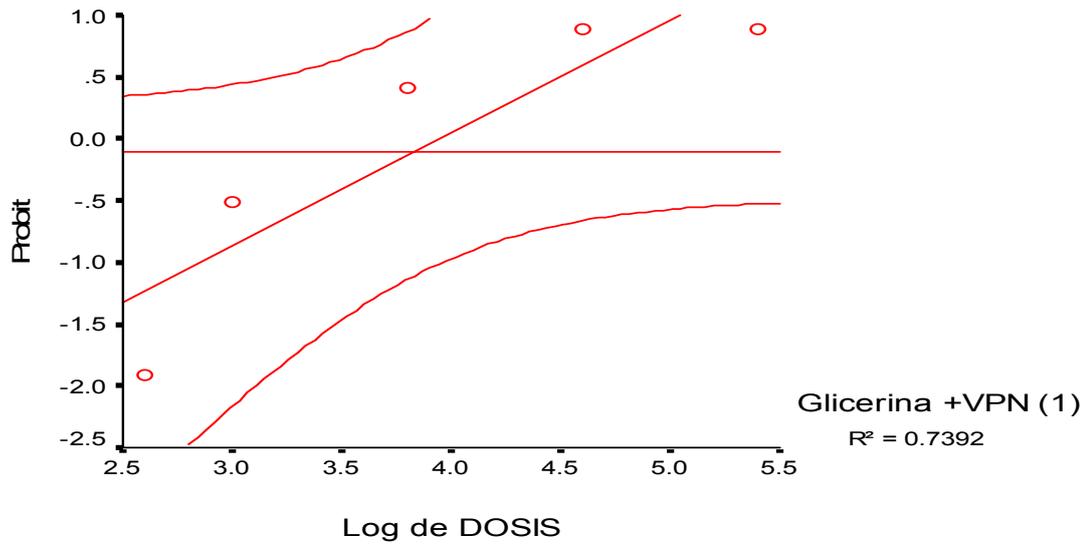
Formulación	DL <sub>50</sub>	Limite inferior	Limite superior	Pendiente	X <sup>2</sup>
Virus + Glicerina (gota teñida)	2563.385	.00004	56064.18	-2.1892	33.717
Virus + Glicerina (contaminación de dieta)	2421.5904	-	-	2.8929	4.912
Virus + Oxido de zinc	1574.0807	.00001	42127.37	-2.0532	13.698
Virus crudo	3763.068	.00000	11939099 116	1.1363	25.461

La Tabla 6, muestra los valores de la DL<sub>50</sub>, mostrando el grado de patogenicidad del virus crudo y el virus formulado. Estos valores son un punto de comparación entre los formulados y son los que determinan si un formulado es más o menos patogénico que el virus crudo. (Alves, 1986). Se observa que el límite inferior, en todos los casos, se desvía muy poco del valor del DL50, no ocurre lo mismo con el límite superior, que si se incrementa con respecto al valor de la DL50, lo que indica que hay cierta variación del estimado de la DL50.

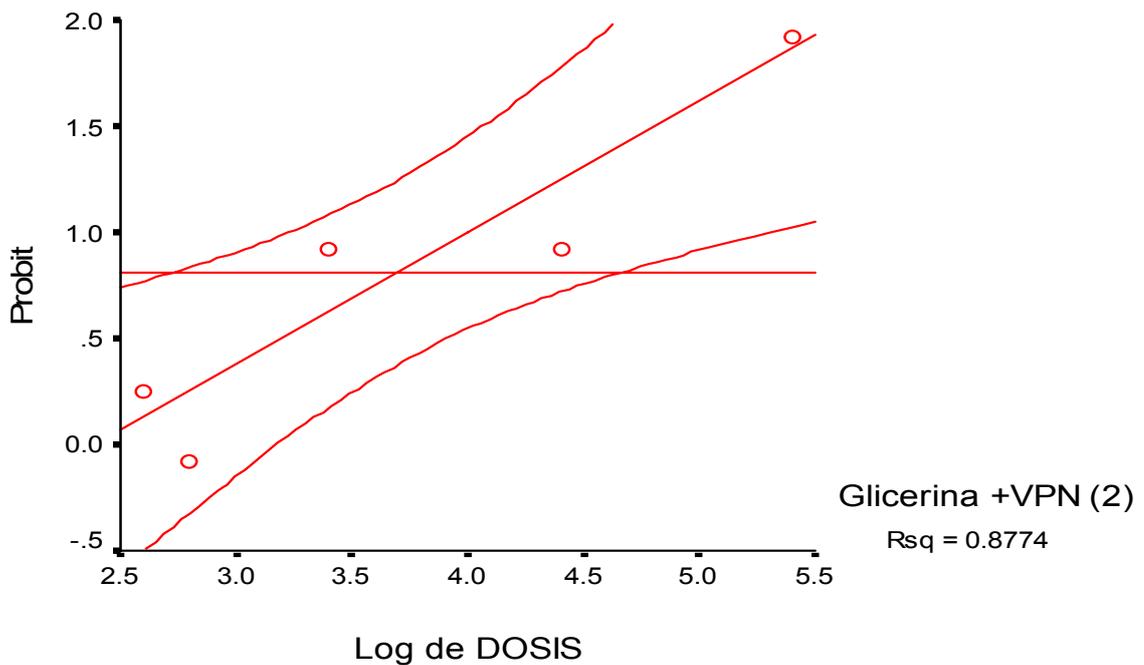
Los valores de la prueba de  $X^2$  de los bioensayos con glicerina fueron de 33.7 con el método de gota teñida y 4.9 con el de contaminación de la dieta. Este valor indica la bondad del ajuste de los datos observados a los esperados representados en la línea de regresión, el segundo ensayo por lo tanto presenta menos heterogeneidad en los datos obtenidos, Ibarra y León, reportan que los valores de  $X^2$  deben ser menores o iguales a 5.

La gráfica 1 y 2 muestran la línea de regresión que se ajusta más a los puntos de respuesta, mostrando los límites fiduciales, de los bioensayos realizados usando el formulado con glicerina con el método de gota teñida y contaminación de la dieta. La  $DL_{50}$  obtenida fue de 2563.385 CIP/ml, el valor de la pendiente es de -2.1892, este valor es bajo. Cuando se obtienen valores bajos indica que debe estrecharse el rango de la dosis probadas (Ibarra y León, 1993) para distribuir mejor el efecto de la mortalidad y lo opuesto cuando el valor de la pendiente es muy alto.

Los registros previos de los valores de  $DL_{50}$  de la cepa viral aislada de *Spodoptera exigua* son relativamente bajos, oscilando entre 50 a 300 CIP/ $\mu$ l (UNAN, 1992-04), lo que indica que es una cepa muy patogénica y virulenta. No obstante, en el Virus crudo resultó mucho mayor el valor de la  $DL_{50}$  de 3763.068., en la gráfica 4 se muestra la línea –respuesta. Este es un indicativo de pérdida de viabilidad del virus, ya que es una cepa que tiene 20 años de estar reproduciéndose en el laboratorio, pues se ha incrementado 12.5 veces más la  $DL_{50}$ . También podría indicar que la susceptibilidad de las larvas a la cepa viral se ha modificado,



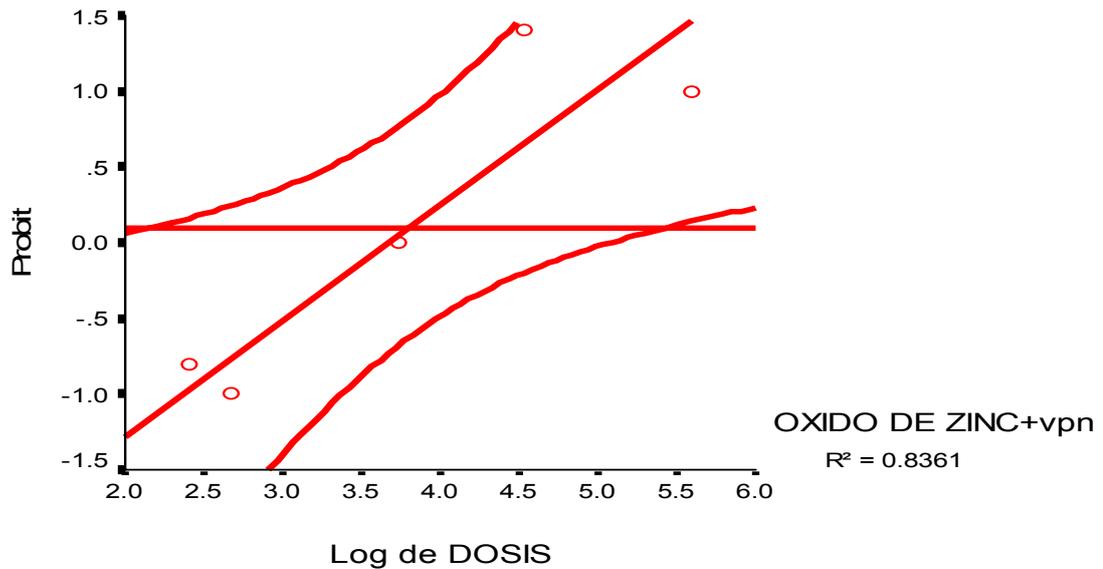
Gráfica 1. Dosis Respuesta de larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con formulado viral a base de glicerina. 2004. CIRCB. UNAN-LEÓN



Gráfica 2. Dosis respuesta de larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con un formulado viral a base de glicerina. CIRCB.UNAN-León,2004-2005

En la tabla 6, se muestran los valores de la  $DL_{50}$  de las dos formulaciones virales recién elaboradas, se observa que no hay una disminución de la actividad insecticida cuando la comparamos con la  $DL_{50}$  del virus sin formular o virus crudo.

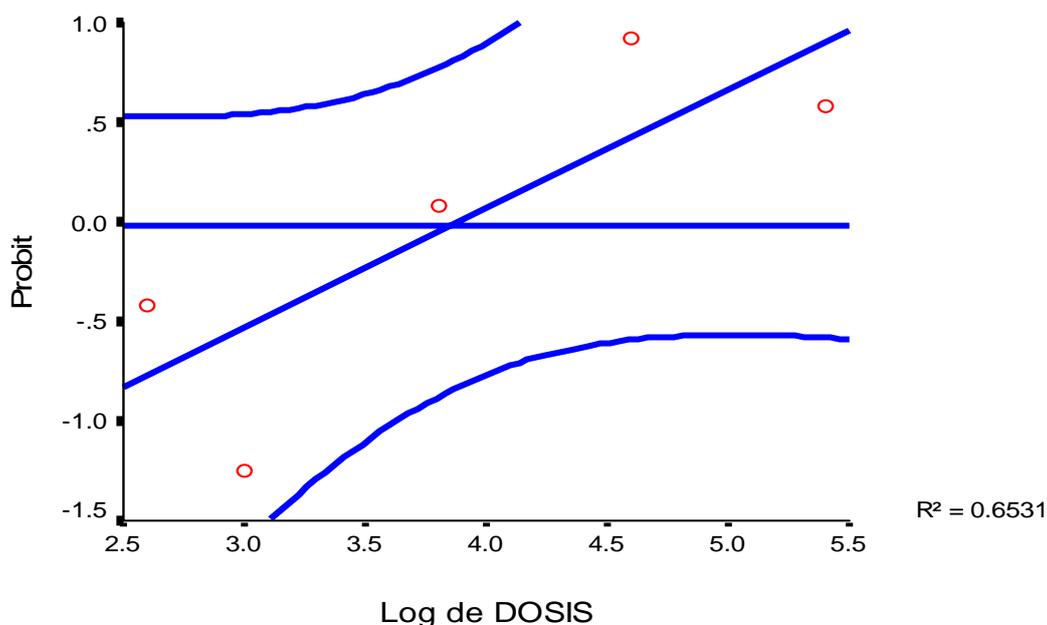
Al formular el virus con glicerina la  $DL_{50}$  fue de 2563.385 y 2421.59 CIP/ml, en ambos bioensayos, siendo la formulación con el óxido de zinc de 1574.08, obteniendo el menor valor, indicando una mayor patogenicidad. La Gráfica 3 muestra la línea de respuesta y los límites fiduciales de la respuesta de las larvas expuestas al formulado con óxido de zinc



Gráfica 3. Respuesta de larvas alimentadas con formulado viral a base de óxido de zinc. 2004. CIRCB.UNAN-LEÓN

Estas diferencias podrían ser a consecuencia del proceso de formulación lo que indica una tendencia a mejorar la actividad biológica del virus con estos aditivos. Por otro lado también se pueden dar diferencias a causa de la viabilidad de los lotes de virus utilizados. Estos valores de  $DL_{50}$  son similares a los encontrados por Lezama, 1995, no publicados, cuando formuló el virus con un ingrediente inerte Kaolín.

Este dato es interesante pues nos indica que debe de agregarse más virus a la formulación o bien menor cantidad de ingrediente inerte para incrementar la mortalidad, con el objeto de estandarizar el nivel de actividad de la formulación comercial (Ibarra, 1998).



Gráfica 4. Dosis respuesta de larvas de *S. exigua* alimentadas con virus crudo. CIRCB.2004. UNAN-LEÓN

#### 6.4 Potencia relativa de los formulados virales

Al comparar los resultados de la  $DL_{50}$  de ambos formulados, para determinar la potencia relativa nos indica que la formulación con el óxido de zinc es 1.6 veces más potente que la formulación donde se usó glicerina (Tabla 7). Debido a que el valor de la  $DL_{50}$  del virus crudo resultó el más alto, al comparar cada uno de los formulados con el virus crudo ambos son ligeramente mejores que el virus crudo.

Debido a estas diferencias es conveniente usar como valor estándar una muestra del mismo virus usado para la formulación y de esta manera poder detectar mejor los efectos del proceso de formulación. Por otro lado Alves, 1986 menciona que se debe mantener un patrón en condiciones constantes de

virulencia, esto se da cuando se mantiene almacenado a una temperatura de congelamiento -20°C., o 0°C.

Tabla 7. Estimado de la Potencia Relativa de las dos formulaciones basadas en oxido de zinc y glicerina vs el virus sin formular. Campus Agropecuario. 2004-2005.

Formulación	Potencia Relativa	Limites de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
Glicerina vs Oxido de zinc	1.6490	.11204	187.66210
Glicerina vs virus sin formular	.6005	.00029	5.34811
Oxido de zinc vs virus sin formular	.3657	.00002	3.19108

Aparentemente estos resultados indicarían una mejora de la actividad insecticida del virus al formularlos con glicerina y oxido de zinc, Sin embargo, estos ensayos son preliminares, por lo que se recomienda continuar evaluando, estandarizando las condiciones ambientales para obtener valores más precisos.

## VII. CONCLUSIONES

- La concentración de una dosis de virus usada para la formulación es ligeramente más baja ( $10^{10}$ ), en una potencia que lo recomendado. La concentración viral obtenida para el formulado de glicerina+vpn fue de  $2.1525 \times 10^{10}$  más bajo que la concentración final del formulado de óxido de zinc+vpn que fue de  $7.52 \times 10^9$ .
- Los valores obtenidos de  $DL_{50}$  el formulado de óxido de zinc fue más virulento y patogénico por presentar una  $DL_{50}$  1574.080 comparado con el de glicerina que tiene una  $DL_{50}$  2421.59 y el formulado viral crudo de  $DL_{50}$  3763.068.
- La potencia relativa nos indica que la formulación con el óxido de zinc es 1.6 veces más potente que la formulación donde se usó glicerina. Lo que indica que el efecto del aditivo y del proceso de formulación afecta menos la infectividad y la pérdida de actividad insecticida del virus. Lo que sugiere que esta formulación tiene mayores probabilidades para ser usado como material inerte para la formulación del virus.

## **X. RECOMENDACIONES**

1. Continuar estudiando el efecto de la glicerina como aditivo para formular el virus usando glicerina grado de laboratorio y no grado comercial.
2. Estudiar el comportamiento de los formulados en condiciones de campo.
3. Continuar estudiando la patogenicidad de la cepa viral cruda producida actualmente y compararla con una cepa recién colectada en el campo.
4. Mejorar las condiciones de los laboratorios de investigación para obtener resultados más confiables.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. **Alves, S. B.** 1986. Controle microbiano de insetos. Sao Paulo, Brasil, Editora Manole. 407 p.
2. **Angus y Luthy (1971)** citado por Tamez Guerra, et al 2003. Sistemas de producción de baculovirus del tipo poliedro nucleares (VPN). *In* Procesos Biotecnológicos, Galán *et al* Eds. Universidad Autónoma de Nuevo León. 86-108pp
3. **Behle, R y Tamez Guerra,** 2003. Sistemas de producción de baculovirus del tipo poliedro nucleares (VPN). *In* Procesos Biotecnológicos, Galán *et al* Eds. Universidad Autónoma de Nuevo León. 86-108pp
4. **Couth, T. L., e Ignoffo, C. M., 1981.** Formulation of insect pathogens. *In* Microbial control of pests and plant Diseases, Ed por Burges. 621-634pp
5. **Evans y Entwistle,** 1987. Viral diseases. *In* Epizootiology of insect diseases. 257-315pp.
6. **Hunter, F., Crook, N and Entwistle, P.** Viruses as Pathogens for the Control of Insects. *In* Microbial Methods for Environmental Bacteriology. Eds. J. M. Grainger and J. M Lynch. Academic Press. 321-346pp
7. **Ignoffo C. M, Couth, T. L. 1981.** The Nucleopolyhedrosis Virus of Heliothis Species as a Microbial Insecticide. *In* Microbial Control of pest and plant diseases. Ed Burges. 329-362pp
8. **Rizo C. M. y Narváez C.** 2002. Uso y producción de virus de la poliedrosis nuclear en Nicaragua. Revista Manejo Integrado de Plagas, no 61. CATIE, Costa Rica.90-96pp
9. **Lobo de Souza y Lecuona,** 1996. Virus Entomopatógenos. *In*. Microorganismos Patógenos empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. 73-86pp.

10. **Tamez-Guerra, McGuire y Behle, 2003.** Microcapsulación para mejorar la calidad de bioinsecticidas y técnicas para la evaluación de *Bacillus thuringiensis* y baculovirus en lepidópteros. *In* Procesos Biotecnológicos, Galán *et al* Eds. Universidad Autónoma de Nuevo León. 157-169pp
11. **Throne, J. E. D. K. Weaver y J. E. Baker. 1995.** Probit Analysis: Assessing Godness-of-fit based on backtransformation and residual. *Journal Entomology.* 88(5):1516.
12. **Mc Guire, M. R et al, 2003.** Formulación de bioplaguidas por capsulación. *In* Procesos biotecnológicos. Galán *et al* Eds. Universidad Autónoma de Nuevo León.(Folleto sin pagina)
13. **Mc Guire y Shassha, 1995, Mc Guire y Col 1990.** Citado por Tamez Guerra *et al.* Capsulación de agentes microbianos de control biológico para incrementar su vida de anaquel y actividad residual. *In* Procesos biotecnológicos. Galán *et al* Eds. Universidad Autónoma de nuevo León. 187-195pp
14. **Rodees y Col 1990,** Citado por Tamez Guerra. Capsulación de agentes microbianos de control biológico para incrementar su vida de anaquel y actividad residual. *In* Procesos biotecnológicos. Galán *et al* Eds. Universidad Autónoma de nuevo León.187-195pp
15. **Ignoffo y Batzer, 1971, Ignoffo y Col, 1976,** citado por Tamez Guerra *et al* 2003. Microcapsulación para mejorar la calidad de bioinsecticidas y técnicas para la evaluación de *Bacillus thuringiensis* y baculovirus en lepidópteros. *In* procesos biotecnológicos .Galán *et al* Eds. Universidad Autónoma de nuevo León.157-169pp

## ANEXO I

Tabla 1. Materiales inertes probados como componentes de las formulaciones básicas usadas con *Basillus thuringiensis*

<b>Polvos y Arcillas</b>	<b>Vehículo líquido</b>	<b>Emulsificante cont.</b>
1095 Marble dust	Aceite preformado en emulsión de agua	Triton X-35
Neosil A	Agua preformada en emulsión de aceite	Plurafac A-24
Arena Silica	Aceite mineral	Triton-N60
syloides	Aceite de maíz	Al-1364
celites	Sorbitol crudo	Atlox 848
Pyrax	Aceite aromático en spray	Atlox 849
Agsorb	Aceite alifático en spray	Atlox 3404/849
Arcilla Barden	Aceite emulsificado de semilla de algodón	Witconol H-31A
Arcilla Kaolin	Agentes suspendidos	Atplus 448
Arcilla Continental	Bentone-38	<b>BOTANICOS</b>
Celite	CAB-O-SIL	Pulpa de cítricos
Al-Sil-Ate	SOLOID	Walnut shells
Satintone		
Microcell	<b>EMULSIFICANTE</b>	Tuza de maíz
Talco	Atplus 300	Harina de maíz
Attigel	AL-1246	Salvado del trigo
Attaclay	El Tritón X-45	Pulpa de uva
Diluex	Triton X-363M	Pulpa de manzana
Emathlite	AL-1280	Cáscara de arroz
Lactosa	AL-1403	Cracked corn

**A N E X O    I I**

**ANALISIS PROBIT**

P R O B I T    A N A L Y S I S

DATA Information: **Potencia relativa entre formulados**

10 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of out-of-range group values.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 4 cases are in the control group.  
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

Group Information

FORMULAC	Level	N of Cases	Label
	1	5	glicerina
	2	5	oxido de zinc

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Natural Response rate to be estimated

The number of subjects in the CONTROL group    300.0  
 The number of responses in the CONTROL group    53.0  
 Parameter estimates converged after 11 iterations.  
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.	
DOSIS	.64223	.08613	7.45660	
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.	FORMULAC
glicerina	-2.18923	.49416	-4.43024	
zinc	-2.05322	.49233	-4.17040	oxido de

Estimate of Natural Response Rate = .000000 with S.E. = .16268

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 33.717    DF = 6    P = .000  
 Parallelism Test Chi Square = .135    DF = 1    P = .713

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Covariance(below) and Correlation(above) Matrices of Parameter Estimates

	DOSIS	NAT RESP
DOSIS	.00742	.81261
NAT RESP	.01139	.02647

Observed and Expected Frequencies

FORMULAC Prob	DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual
1 .30554	2.62	75.0	13.0	22.916	-9.916
1 .37631	2.92	75.0	30.0	28.223	1.777
1 .59008	3.76	75.0	56.0	44.256	11.744
1 .76703	4.54	75.0	61.0	57.527	3.473
1 .89166	5.33	75.0	61.0	66.874	-5.874
2 .31072	2.43	75.0	27.0	23.304	3.696
2 .38211	2.73	75.0	24.0	28.658	-4.658
2 .63393	3.73	75.0	44.0	47.545	-3.545
2 .81195	4.58	75.0	70.0	60.896	9.104
2 .93666	5.58	75.0	66.0	70.249	-4.249

Confidence Limits for Effective DOSIS

FORMULAC Prob	1 DOSIS	glicerina	95% Confidence Limits	
			Lower	Upper
.01	.61165		3.295528E-21	286.65118
.02	1.62540		2.609736E-19	511.17438
.03	3.02180		4.170445E-18	739.63536
.04	4.81785		3.349297E-17	978.03940
.05	7.04115		1.821618E-16	1228.89258
.06	9.72535		7.693574E-16	1493.72591
.07	12.90885		2.719085E-15	1773.70938
.08	16.63426		8.415908E-15	2069.86732
.09	20.94834		2.350330E-14	2383.17141
.10	25.90205		6.046389E-14	2714.58737
.15	62.37392		3.007226E-12	4679.39774
.20	125.41265		6.657945E-11	7268.20406
.25	228.33823		9.428046E-10	10677.01043
.30	391.09273		.00000	15182.59565
.35	643.92999		.00000	21186.41092
.40	1033.55093		.00000	29288.07169
.45	1633.61217		.00001	40415.04459
.50	2563.38517		.00004	56064.18077
.55	4022.33998		.00026	78781.38343
.60	6357.63885		.00185	113192.53155
.65	10204.43781		.01364	168451.66171
.70	16801.49762		.10841	264860.97795
.75	28777.23809		.96284	455216.88534
.80	52394.58248		9.98177	913416.45674
.85	105347.61551		126.40204	2480468.71728

.90	253684.29932	1984.50408	13545405.7344
.91	313673.76056	3512.76217	22423896.1077
.92	395024.68792	6244.27075	40561937.7222
.93	509026.25752	11138.34339	82133067.0393
.94	675651.03582	19946.26983	192478919.731
.95	933220.69865	35969.56852	547945610.645
.96	1363873.40725	65860.27325	2045080479.66
.97	2174513.19998	124783.12834	11462727517.8
.98	4042662.45385	255949.07551	129218477837
.99	10743014.8207	653873.19189	7142851365005

Confidence Limits for Effective DOSIS

FORMULAC 2 oxido de zinc

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.37559	5.194299E-22	214.35753
.02	.99810	4.107302E-20	382.82124
.03	1.85558	6.557180E-19	554.45960
.04	2.95847	5.262123E-18	733.72952
.05	4.32371	2.860190E-17	922.49349
.06	5.97198	1.207354E-16	1121.89266
.07	7.92685	4.265074E-16	1332.80194
.08	10.21449	1.319544E-15	1555.98944
.09	12.86360	3.683733E-15	1792.18527
.10	15.90550	9.473413E-15	2042.11598
.15	38.30153	4.705336E-13	3524.94552
.20	77.01130	1.040804E-11	5480.06252
.25	140.21412	1.473007E-10	8054.77607
.30	240.15568	1.580916E-09	11456.38617
.35	395.41376	.00000	15984.17984
.40	634.66568	.00000	22082.52429
.45	1003.14125	.00000	30433.53735
.50	1574.08071	.00001	42127.37126
.55	2469.97130	.00004	58994.77715
.60	3903.99258	.00029	84306.99408
.65	6266.17059	.00218	124393.65833
.70	10317.18280	.01755	192866.12942
.75	17671.04530	.15964	323602.18310
.80	32173.58935	1.73009	621147.19886
.85	64690.10267	23.97212	1541588.50101
.90	155778.21376	459.60959	6893533.88859
.91	192615.53929	866.56274	10713880.2423
.92	242570.15684	1657.24723	18013582.6843
.93	312574.33497	3213.48494	33554390.5587
.94	414892.49341	6318.06026	71622269.5606
.95	573056.56625	12616.31641	184131075.025
.96	837504.58245	25738.65074	616786891.742
.97	1335288.71514	54520.05811	3092249361.53
.98	2482450.57966	125194.31598	31137271598.5
.99	6596890.95324	359305.05096	1532105964293

Estimates of Relative Median Potency

FORMULAC	Estimate	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
1 VS. 2	1.6285	.11624	141.71611

Glicerina gota teñida

\* \* \* \* \* P R O B I T     A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

DATA Information

5 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 2 cases are in the control group.  
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Natural Response rate to be estimated

The number of subjects in the CONTROL group 150.0  
 The number of responses in the CONTROL group 23.0

Parameter estimates converged after 9 iterations.  
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.66706	.10166	6.56161

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-2.28957	.55089	-4.15616

Estimate of Natural Response Rate = .000000 with S.E. = .17686

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 19.740 DF = 2 P = .000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Covariance(below) and Correlation(above) Matrices of Parameter Estimates

	DOSIS	NAT RESP
DOSIS	.01034	.68322
NAT RESP	.01228	.03128

Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
2.62	75.0	13.0	21.995	-8.995	.29327
2.92	75.0	29.0	27.433	1.567	.36578
3.76	75.0	56.0	44.055	11.945	.58740
4.54	75.0	61.0	57.813	3.187	.77084
5.33	75.0	61.0	67.313	-6.313	.89751

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.88077	.	.
.02	2.25694	.	.
.03	4.10014	.	.
.04	6.42458	.	.
.05	9.25763	.	.
.06	12.63397	.	.
.07	16.59372	.	.
.08	21.18167	.	.
.09	26.44709	.	.
.10	32.44372	.	.
.15	75.61195	.	.
.20	148.12756	.	.
.25	263.74536	.	.
.30	442.77751	.	.
.35	715.61964	.	.
.40	1128.56149	.	.
.45	1753.64062	.	.
<b>.50</b>	<b>2705.95861</b>	.	.
.55	4175.43474	.	.
.60	6488.09305	.	.
.65	10231.98857	.	.
.70	16537.00065	.	.
.75	27762.42906	.	.
.80	49431.80071	.	.
.85	96839.34766	.	.
.90	225689.67178	.	.
.91	276862.64919	.	.
.92	345686.25169	.	.
.93	441264.08075	.	.
.94	579565.28542	.	.
.95	790938.11872	.	.
.96	1139717.70097	.	.
.97	1785842.62906	.	.
.98	3244312.78285	.	.
.99	8313412.90657	.	.

DATA Información: Bioensayo Glicerina método contaminación de la dieta

5 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 2 cases are in the control group.  
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Natural Response rate to be estimated

The number of subjects in the CONTROL group 84.0  
 The number of responses in the CONTROL group 13.0  
 >Warning # 13527  
 >Parameter estimates did not converge in maximum number of iterations.

Number of iterations = 20  
 Optimal solution not found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.80552	.51853	1.55348

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-2.72597	2.89292	-.94229

Estimate of Natural Response Rate = .508851 with S.E. = .39332

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 4.912 DF = 2 P = .086

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Covariance(below) and Correlation(above) Matrices of Parameter Estimates

	DOSIS	NAT RESP
DOSIS	.26887	.93567
NAT RESP	.19083	.15470

Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
2.57	41.0	28.0	26.020	1.980	.63465
2.87	44.0	25.0	29.730	-4.730	.67569
3.35	47.0	39.0	35.192	3.808	.74878
4.35	43.0	37.0	38.382	-1.382	.89260
5.35	47.0	46.0	45.689	.311	.97210

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	3.13403	.	.
.02	6.83149	.	.
.03	11.20023	.	.
.04	16.24600	.	.
.05	21.98518	.	.
.06	28.44187	.	.
.07	35.64589	.	.
.08	43.63176	.	.
.09	52.43813	.	.
.10	62.10751	.	.
.15	125.15298	.	.
.20	218.41721	.	.
.25	352.18340	.	.
.30	540.87159	.	.

.35	804.91924	.	.
.40	1173.78349	.	.
.45	1690.83382	.	.
.50	2421.59042	.	.
.55	3468.17061	.	.
.60	4995.89590	.	.
.65	7285.32737	.	.
.70	10841.94530	.	.
.75	16650.69984	.	.
.80	26848.16000	.	.
.85	46855.45718	.	.
.90	94418.52988	.	.
.91	111828.93652	.	.
.92	134399.81152	.	.
.93	164509.85812	.	.
.94	206178.44236	.	.
.95	266729.65778	.	.
.96	360956.50909	.	.
.97	523569.42347	.	.
.98	858393.01466	.	.
.99	1871107.34098	.	.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*  
 DATA Information: Bionessayo **Oxido de zinc método de gota teñida**

5 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 2 cases are in the control group.  
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Natural Response rate to be estimated

The number of subjects in the CONTROL group 150.0  
 The number of responses in the CONTROL group 30.0

Parameter estimates converged after 13 iterations.  
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.62710	.18360	3.41563

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.99954	1.08849	-1.83699

Estimate of Natural Response Rate = .000000 with S.E. = .36582

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 13.698 DF = 2 P = .001

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Covariance(below) and Correlation(above) Matrices of Parameter Estimates

	DOSIS	NAT RESP
DOSIS	.03371	.92871
NAT RESP	.06237	.13382

Observed and Expected Frequencies

	DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
	2.43	75.0	27.0	23.755	3.245	.31673
	2.73	75.0	24.0	29.013	-5.013	.38683
	3.73	75.0	44.0	47.467	-3.467	.63289
	4.58	75.0	70.0	60.580	9.420	.80773
	5.58	75.0	66.0	69.957	-3.957	.93276

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.30120	.	.
.02	.81951	.	.
.03	1.54653	.	.
.04	2.49364	.	.
.05	3.67790	.	.
.06	5.11971	.	.
.07	6.84219	.	.
.08	8.87090	.	.
.09	11.23388	.	.
.10	13.96170	.	.
.15	34.34121	.	.
.20	70.22186	.	.
.25	129.71440	.	.
.30	225.07520	.	.
.35	375.06915	.	.
.40	608.92300	.	.
.45	973.14194	.	.
.50	1543.69601	.	.
.55	2448.76648	.	.
.60	3913.46257	.	.
.65	6353.48807	.	.
.70	10587.56062	.	.
.75	18371.10941	.	.
.80	33935.26442	.	.
.85	69391.77798	.	.
.90	170680.99965	.	.
.91	212125.97846	.	.
.92	268630.96171	.	.
.93	348280.14083	.	.
.94	465455.41584	.	.
.95	647923.92108	.	.
.96	955629.37210	.	.
.97	1540867.12147	.	.
.98	2907823.10255	.	.
.99	7911654.66583	.	.