

**II ENDA**

# **II encontro nacional de analistas de formulações de defensivos agrícolas**

**16 a 19 de outubro de 1989 - CATI - Campinas - SP**

PAINÉIS

Etapas do desenvolvimento de uma formulação pó molhável para o Baculovirus anticarsia: secagem e caracterização da superfície do poliedro. Claudia C. Medugno\*, Marina L. Castro\*; Gaspar González \*\*.

Baculovirus anticarsia é um patógeno usado para o controle da Anticarsia gemmatalis, o mais importante desfolhador da cultura da soja. A aplicação do vírus em larga escala requer o desenvolvimento de uma formulação que atenda as exigências de qualidade de qualquer defensivo químico convencional. As primeiras etapas selecionadas para o estudo de uma formulação pó molhável foram a caracterização da superfície quanto a morfologia (MEV) e carga, e a influência do método de secagem na dispersibilidade das partículas. O vírus foi obtido no CNPSo, por criação massal de lagartas infectadas no 5<sup>o</sup> instar, coletadas em fase terminal, e mantidas a 18° C até o momento do uso. A purificação dos poliedros foi feita pelo método de van der Geest, com pequenas modificações. As dispersões resultantes apresentam uma distribuição de tamanho entre 1.6 e 1.9 micra, permanecendo invariável quando a preparação foi armazenada até 8 meses sob refrigeração. As dispersões foram secas por liofilização, spray dryer e estufa (27°C). O processo de secagem provoca diferentes alterações nas propriedades superficiais das partículas, que se refletem no seu estado de agregação quando os poliedros são dispersos novamente em água.

-----  
(\* CNPDA/EMBRAPA; \*\* CENPES/PETROBRÁS)

## 1. - Introdução

A rápida proliferação no país da cultura da soja, propiciou um ambiente favorável à multiplicação de pragas. A Anticarsia gemmatalis é o principal desfolhador dessa cultura, causando redução da área foliar ou sintetizante, o que acarreta redução substancial na produção de grãos. O Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSo) iniciou, em 1979, um programa de controle biológico visando reduzir os problemas decorrentes do uso excessivo de produtos químicos. O programa resultou na implantação, bem sucedida, do uso de um vírus de poliedrose nuclear (VPN) de Anticarsia gemmatalis, também referido como V de Aq ou Baculovirus anticarsia (1). A utilização do patógeno foi feita de forma simples, com a maceração de lagartas mortas, coagem e aplicação, com a obtenção de resultados satisfatórios. A seguir, o CNPSo desenvolveu um processo para a formulação do vírus: adição de caulin ao acerado, secagem ao ar com circulação forçada e controle de temperatura, moagem. O método é simples e de baixo custo, e está sendo usado em pequena e média escala, nos diversos laboratórios regionais do país. Atualmente, em termos de área atingida, este é o maior programa de uso de vírus de inseto a nível mundial. O CNPSo estima que, em 1989, foram catados cerca de 600 000 hectares.

No entanto, a expansão do uso do vírus requer o desenvolvimento de formulações com características que atendam às exigências de qualidade de qualquer defensivo químico convencional: a capacidade de fluir, molhar, dispersar e suspender com pouca formação de espuma, e de se manter estável nas condições de estocagem. As formulações inseticidas biológicas devem possuir algumas características adicionais. Assim, quando aplicado na área alvo, o patógeno deve se molhar rápida e uniformemente, e permanecer viável por um período eficiente de tempo. A formulação não pode interferir com o processo de infecção e, se possível, deve aumentar a chance de transmissão da doença. Além, é fundamental a manutenção da viabilidade e virulência durante as etapas do processo. O produto deve apresentar uma vida de prateleira superior a 18 meses. É necessário que a tecnologia de aplicação seja compatível com as já existentes no mercado. E, mais importante, o custo da formulação e a disponibilidade dos componentes deve resultar em um produto de preço competitivo.

A forma final do defensivo representa um compromisso entre as propriedades físicas e químicas do ingrediente ativo, a eficiência agrônômica, e fatores ligados à sua produção e comercialização. Por exemplo, a estabilidade bioquímica de preparações purificadas de Baculovirus anticarsia está diretamente relacionada com as condições de umidade e temperatura. Atividade significativa em preparações de poliedros podem estar presentes após congelamento por 20 anos. No entanto, à medida que a temperatura se eleva, a virulência é gradualmente perdida. Assim, suspensões líquidas de vírus purificado devem ser mantidas frias ou congeladas. Na faixa entre 38-40° C é observada uma significativa perda de atividade no período de semanas. À temperaturas acima de 50°C, a atividade viral é perdida em horas ou minutos (2). Com exceção das preparações com acetona, a estabilidade das formulações secas tem sido consideravelmente maior que as que utilizam água como veículo, como por exemplo, as formulações flowable. Esses argumentos justificam a seleção de uma formulação seca para o vírus purificado. A formulação pó molhável, selecionada para ser desenvolvida no Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura (CNPDA), um projeto do qual este trabalho faz parte, é produzida e estocada na forma sólida, e suspensa em água apenas no momento da aplicação.

Essencialmente, um pó molhável é composto pelo princípio ativo, surfactantes, inertes, e possíveis adjuvantes, como os agentes de adesão, que conferem as características de deposição em folhas, filtros solares, compostos gustatórios para a atração de insetos, etc. A qualidade de uma formulação pó molhável é julgada pela rapidez da molhabilidade quando misturada em água, e pela estabilidade da suspensão formada quando a formulação é diluída nas condições de aplicação no campo. O principal componente de uma formulação é o princípio ativo, e é essencial o conhecimento de suas propriedades físico-químicas. A menor unidade a ser considerada pelo formulador é o poliedro, ou corpo de inclusão. Esse grupo de vírus caracteriza-se pela formação de massas proteicas no interior do núcleo das células infectadas. As partículas de vírus estão oclusas na matrix de forma randômica, sem interferir na regularidade da estrutura cristalina. Para as diversas espécies, o tamanho varia de 0.5 até 15 micra, com um formato irregular, semelhante a um cubo, tetraédro ou dodecaedro. A maioria dos vírus usados comercialmente tem sido formulados como pó molhável, e a secagem constitui uma etapa importante no desenvolvimento do produto. Neste trabalho, foram

utilizadas técnicas de caracterização de superfície, como primeira etapa do desenvolvimento de uma formulação. Também, foram comparados os efeitos de tres métodos diferentes de secagem sobre as propriedades de dispersibilidade dos poliedros.

## 2 - Materiais e Métodos

Poliedros de Baculovirus anticarsia foram produzidos no CNPSo por criação massal de larvas infectadas no 5 instar (cerca de 2 cm), com uma suspensão contendo  $1,0 \cdot 10^7$  poliedros, e mantidas à 28°C, em dieta artificial. Após 6 a 10 dias, quando as larvas estavam infectadas terminalmente, eram coletadas e armazenadas a -18°C, até o momento do uso. Os poliedros foram purificados pelo método de van der Geest (1968), substituindo-se as duas etapas de centrifugação em sacarose por centrifugação diferencial com solução 0.1% de dodecil sulfato de sódio (SDS). O material resultante é armazenado na forma de suspensão concentrada, a 5°C.

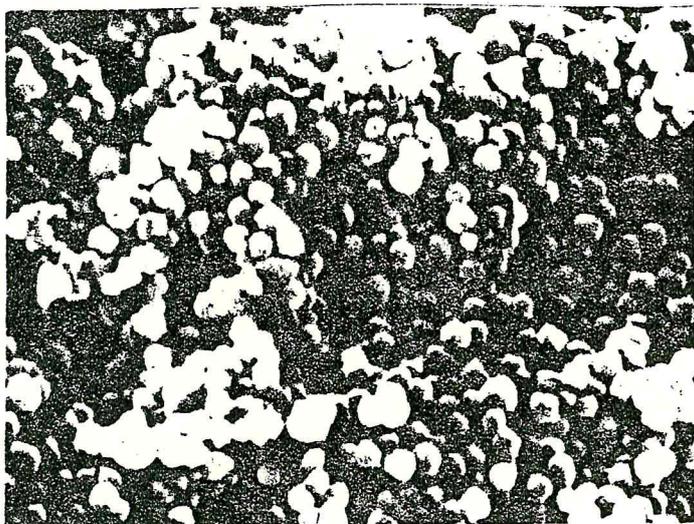
A caracterização morfológica dos poliedros foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV), após a metalização das amostras sólidas por deposição de crômio em equipamentos JEE-4X (metalizador) e Hitachi S450. O microscópio óptico utilizado foi um Nikon Fluorfoth tipo 114. A distribuição de tamanho de partículas foi efetuada em um equipamento Malvern 3600 E, por difração a laser de baixa potência, otimizado para pós dispersos em meio líquido. As amostras são adicionadas no tanque de aço inox do equipamento, onde são agitadas e bombeadas por um caminho de circulação até a cela. A dispersão das amostras é auxiliada por agitação e ultrasom.

As medidas de mobilidade eletroforética foram efetuadas em um equipamento Mark II, com microscópio binocular (Rank Brothers, Cambridge, England), em uma cela cilíndrica, equipada com um eletrodo de platina; o potencial aplicado variou de 20 a 80 volts, e a distância entre os eletrodos foi de 8,27 cm. Cada quadrado do retículo tem 27,5 micra de lado. As mobilidades foram medidas no nível estacionário, e representam a média de pelo menos 20 determinações do tempo de trajeto. As suspensões foram preparadas em solução 1mM de KNO<sub>3</sub>, e o pH foi ajustado com soluções 0,1M de HCl e NaOH.

As amostras foram secas a partir de uma suspensão estoque, armazenada a 5° C, por tres métodos diferentes: a) secagem por mini Spray Dryer Buchi modelo BU 190, temperatura de alimentação 85° C; temperatura de saída 40° C; concentração de sólidos no fluxo de entrada igual a 5 %; b) secagem ao ar, em Estufa Fanem, mantida a 27° C; c) secagem por liofilização, em um equipamento Virtis; cerca de 3 g da suspensão foram rapidamente congeladas com uma mistura de acetona/gelo seco, permanecendo a vácuo por cerca de 12 horas.

### 3 - Resultados

#### 3 - 1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)



Uma suspensão concentrada de poliedros foi seca à 27° C, e a observação mediante MEV (foto 1) permite distinguir poliedros bem formados, de tamanho aproximado 2 micra. Embora se observe muitos agregados, estes não aparecem como um floco ou coágulo, mas é possível observar que as partículas mantem sua integridade, com contornos nítidos.

Foto 1 - MEV de Baculovirus anticarsia, aumento de 2500 X.

#### 3 - 2 Distribuição de tamanho

Na figura 1 obseva-se o histograma obtido para a suspensão de poliedros purificados. É interessante notar que esses poliedros, desde sua formação nos núcleos dos diversos tecidos da lagarta, nunca foram submetidos à secagem. Todas as partículas estão distribuidas entre 1.6 e 1.9 micra de diâmetro. Os resultados confirmam os valores de tamanho observados por MEV. Amostras da suspensão original, armazenadas a 5° C por um período de tempo que variou de 1 dia a 8 meses,

apresentam padrões de distribuição idênticos ao da figura 1, indicando que, caso haja formação de flocos, eles são rapidamente quebrados nos primeiros instantes de agitação ultrassônica a que são submetidas as amostras.

Figura 1 - Histograma da suspensão de poliedros purificados.

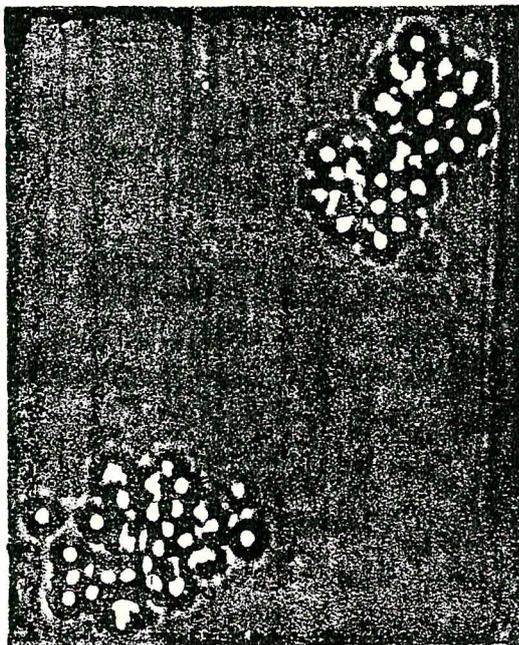
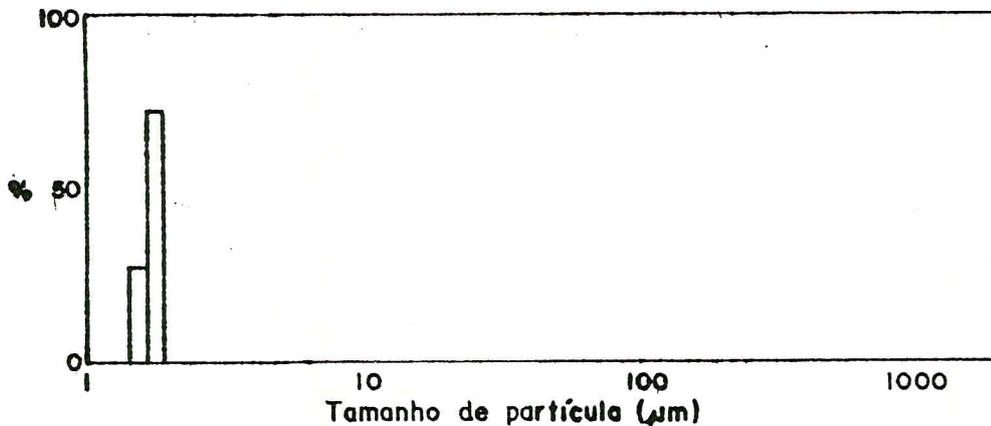
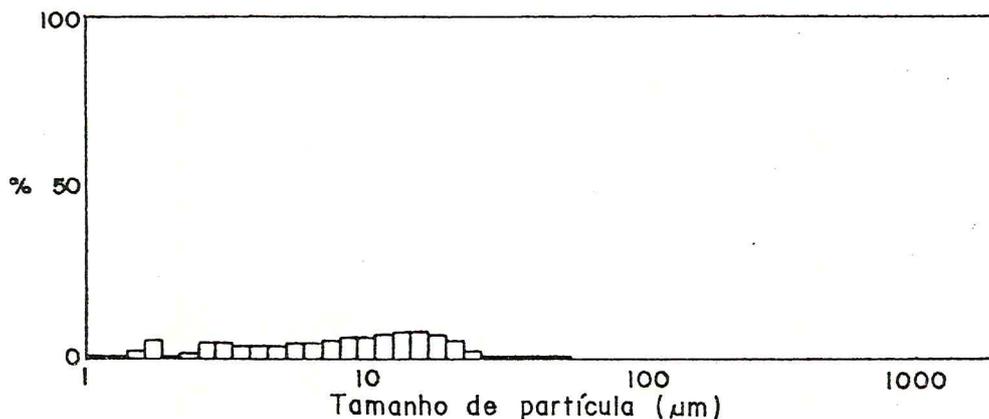


Foto 2 - Microscopia óptica de poliedros agregados. aumento de 1000 X.

Microscopia óptica confirma a existência de poliedros isolados, monodispersos. Quando o material é seco à 27° C até peso constante, há uma modificação radical no histograma, com o aparecimento de barras para diversos tamanhos, sem que haja uma distribuição de partículas definida, conforme pode ser visto na figura 2. O histograma mostra uma equivalência entre as barras, e não há preponderância de nenhum tamanho de partícula na faixa de 1.6 até 27 micra, indicando a formação de agregados de

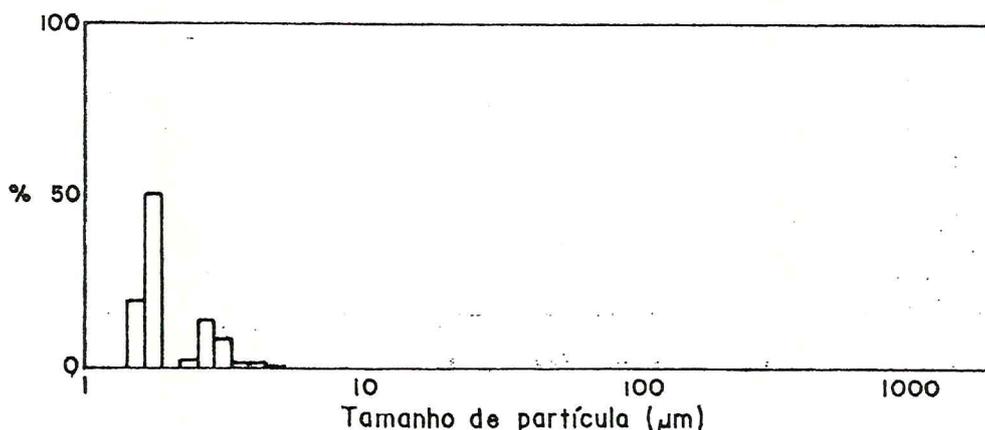
poliedros, o que é confirmado por microscopia óptica comum (foto 2).

Figura 2 - Histograma de poliedros secos a 27°C, e resuspenso em água.



O histograma de um material submetido a secagem por spray apresenta uma distribuição de tamanho mais estreita, com a nítida predominância de partículas de tamanho entre 1.6 e 1.9 micra (figura 3). O histograma de uma dispersão de poliedros submetidos à liofilização apresentou um comportamento intermediário em relação às amostras anteriores. Há predominância de partículas com 1.6 e 1.9 micra de diâmetro, e os agregados alcançam um máximo de 8 micra, figura 4.

Figura 3 - Histograma de poliedros secos por spray dryer e resuspenso em água.



Cada uma das amostras, de cada processo de secagem, foi deixada no tanque, com agitação ultrassônica e circulação forçada, por diversos períodos de tempo, e a análise dos histogramas revela que os agregados formados em cada caso, apresentam diferenças acentuadas na dispersibilidade. Assim, mesmo após 30 minutos de permanência no tanque, o histograma da amostra seca à 27°C não se alterou significativamente. Para o material seco por

spray, submetido às mesmas condições de agitação, por 10 minutos, houve uma modificação no histograma, com o aumento, em altura, das barras em 1.6 e 1.9 micra, e a concomitante redução das barras de maior tamanho, indicando a quebra dos aglomerados (figura 5).

Figura 4 - Histograma de poliedros secos por liofilização e resuspensos em água.

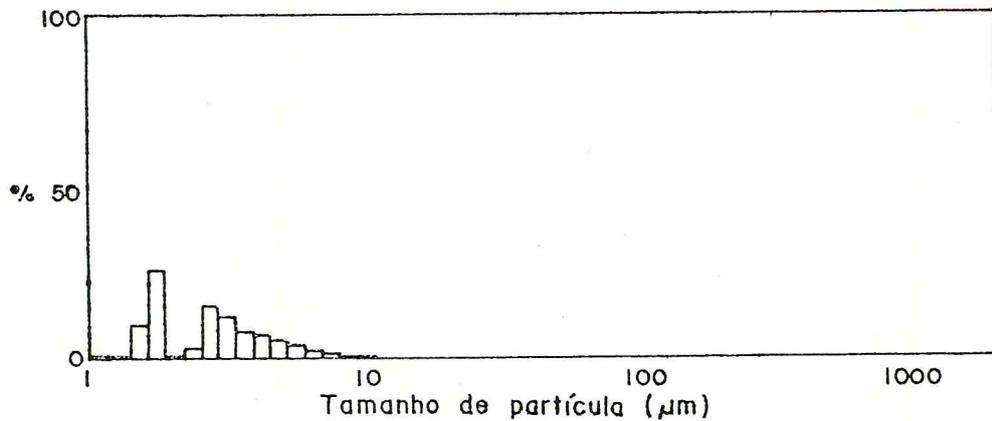
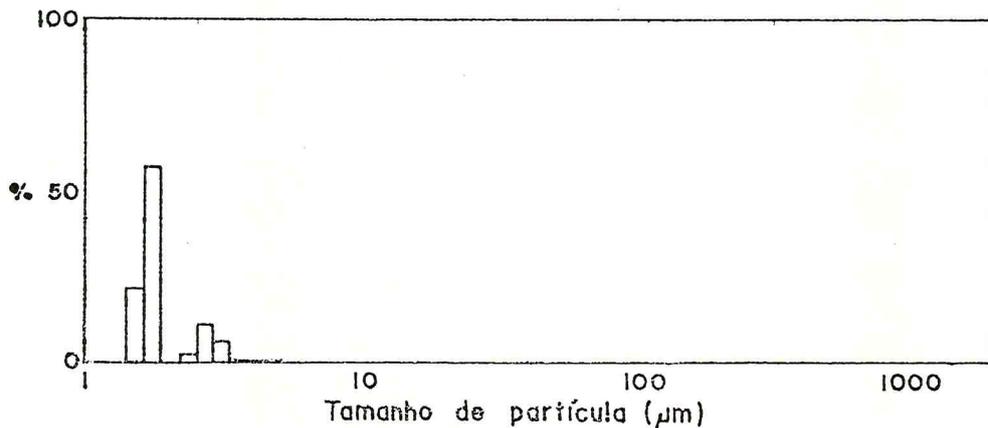


Figura 5 - Histograma de poliedros secos por spray dryer, resuspensos em água, e deixados sob agitação ultrasonica por 10 minutos.



### 3 - 3 Mobilidade eletroforética

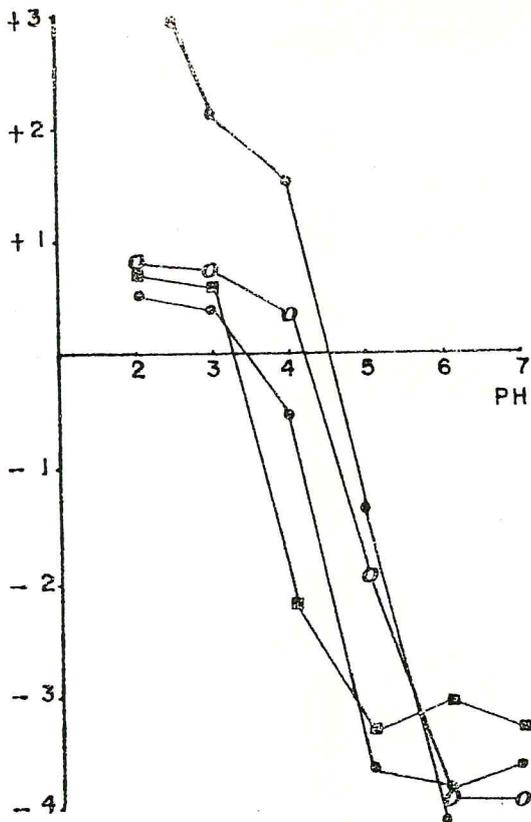
Poliedros em suspensão adquirem uma carga elétrica como resultado da ionização de grupos superficiais. Com a técnica de eletroforese, as partículas são examinadas livres,

monodispersas. A aplicação de um campo elétrico em tal sistema, causa um movimento tangencial de uma fase em relação à outra, a uma velocidade que depende do potencial no plano de cisalhamento, o potencial zeta. A técnica permite medir a carga no poliedro intacto, sem qualquer forma de denaturação. A mudança da mobilidade de uma superfície ionogênica com o pH do meio de suspensão é, essencialmente, uma titulação dos grupos superficiais carregados (5). Este parâmetro pode ser transformado em potencial zeta utilizando-se a equação de Smoluchowski. Estudos recentes tem utilizado medidas de potencial zeta para outras espécies de baculovirus (4). A Tabela 1. mostra os resultados de mobilidade eletroforética para o Baculovirus anticarsia, e também os valores encontrados por SMALL, 1987, para Spodoptera littoralis, Tricoplusia ni GV e Tricoplusia ni NPV.

pH	<u>T. ni GV</u>	<u>T. ni NPV</u>	<u>S Litt NPV</u>	<u>B. antic.</u>
2.0	+0.55	+0.72	+0.79	-
2.5	-	-	-	+2.99
3.0	+0.41	+0.69	+0.69	+2.13
4.0	-0.52	-2.13	+0.37	+1.59
5.0	-3.69	-3.34	-1.96	-1.32
6.0	-3.83	-3.03	-3.63	-4.16
7.0	-3.65	-3.17	-3.99	-

Tabela 1 - Mobilidade eletroforética vs pH para 4 espécies de baculovirus

A tabela mostra que há algumas diferenças pouco significativas entre os resultados aqui apresentados e os das outras preparações. Assim, a mobilidade eletroforética a pH mais baixo que o ponto isoelétrico é maior para o Baculovirus anticarsia. As mobilidades são semelhantes em pH maior que o ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico, determinado a partir de gráficos de mobilidade versus pH, também variou muito pouco para os diversos virus estudados NPV de B. anticarsia está eletricamente neutro a pH 4.5; NPV de S. littoralis, a pH 4.2; NPV de T. ni, a 3.2; GV de T. ni, a 3.45.



SMALL, 1987, relaciona a maior carga e o maior ponto isoelétrico de S. littoralis ao maior tamanho de poliedro dessa espécie (1.1 a 1.5 micra) e, conseqüentemente, ao maior número de grupos ionizáveis. O B. anticarsia se ajusta a essa interpretação, ao lado de maior carga e maior ponto isoelétrico que a S. littoralis, também apresenta um diâmetro significativamente maior (1.6 a 1.9 micra).

Figura 6 - Determinação do ponto isoelétrico para quatro

baculovirus, por eletroforese. (○) GV de T.ni; (■) NPV de T. ni; (○) S.littoralis; (○) B. anticarsia.

#### 4 Discussão

Apesar do uso intensivo de baculovirus como agente de controle de pragas, há poucos estudos sobre as características superficiais dos poliedros, ou corpos de inclusão. No entanto, técnicas de superfície podem ser usadas para monitorar as modificações que ocorrem durante as diversas etapas de desenvolvimento de uma formulação. Foi visto que os poliedros de B. anticarsia estão compreendidos entre 1.6 e 1.9 micra de diâmetro. Essas dimensões excedem a maioria das partículas coloidais. Porém, ao se tratar um poliedro como um colóide é possível definir, pelo menos em parte, os fatores físico-químicos envolvidos em fenômenos como estabilidade contra agregação, adesão à superfícies e interação com outras partículas. Por exemplo, a forte adesão de B. anticarsia a superfícies carregadas negativamente (6), como o vidro, a pHs inferiores a 4.5, pode ser explicadas por resultados de mobilidade eletroforética. Medidas de cargas são importantes também para orientar na seleção do inerte. A estabilidade de um sistema coloidal

depende da existência de forças repulsivas que impeçam sua coagulação, devido às forças atrativas London-van der Waals. Para um sistema homogêneo (poliedros em água), na ausência de outros componentes, as forças de repulsão são de natureza eletrostática e, quando duas dispersões são misturadas, a estabilidade do sistema resultante vai depender da carga superficial de cada espécie envolvida. Dessa forma, dispersões de carga oposta serão instáveis, e a atração eletrostática entre as partículas, somada à atração de London-van der Waals, fará com que o sistema apresente heterocoagulação (7). Heterocoagulação significa agregação das partículas e formação de flocos que se separam facilmente do meio líquido, por sedimentação.

Foi visto que, quando uma suspensão de poliedros é seca por tres processos diferentes, há uma acentuada modificação no padrão de distribuição de tamanho, quando o material é redisperso em água. O conhecimento desses dados é importante para o formulador por diversos motivos. A manutenção das partículas no estado disperso representa um ítem importante no controle de qualidade, além de garantir a suspensibilidade dentro de limites exigidos por lei (8). A acentuada agregação que ocorre quando a dispersão é seca ao ar, resulta na formação de unidades de até 27 micras. Como a densidade dos poliedros está em torno de  $1.25 \text{ g/cm}^3$  (3), agregados desta dimensão sedimentam muito rapidamente, e suspensibilidades inferiores a 60% são obtidas. Informações sobre distribuição de tamanho servem para auxiliar na escolha dos adjuvantes. No caso de um pó molhável, uma grande diferença de tamanho entre os poliedros e o inerte, irá causar segregação das partículas quando a formulação é suspensa em água, afetando a sua distribuição no campo. Pequenas quantidades de material devem ser distribuídas em grandes áreas, e uma cobertura uniforme do ativo sobre a cultura aumenta a chance de sucesso no controle da praga. A composição diluída precisa manter-se em suspensão por um período de horas, ou algumas vezes, dias, em uma variedade de pulverizadores que podem ou não ser agitados. Os corpos de inclusão são o meio pelo qual o vírus é transmitido e persiste fora do hospedeiro. O modo mais comum de entrada de baculovirus em hospedeiros suscetíveis é per os. O sucesso da infecção depende da aquisição de uma dose efetiva para iniciar a replicação no inseto alvo, e essa aquisição será controlada pela distribuição da dose de vírus.

A seleção de um processo de secagem depende de muitos outros fatores. Uma análise de custo, por exemplo, favorece a secagem por spray, quando comparada à liofilização (9). Do ponto de vista da dispersibilidade, os resultados desse trabalho também favorecem essa técnica. Porém, resultados conclusivos requerem a complementação desses dados com ensaios biológicos de viabilidade e virulência.

## 5 - Conclusões

Poliedros de Baculovirus anticarsia tem uma tamanho compreendido entre 1.6 e 1.9 micra, medido por MEV, microscopia óptica e difração a laser.

Suspensões estocadas até 8 meses permanecem monodispersas.

A secagem ao ar de preparações purificadas de poliedros produz aglomerados resistentes, com tamanho até 27 micra, difíceis de redispersar.

A secagem por spray dryer resulta em um material pouco aglomerado e facilmente dispersível.

A mobilidade eletroforética de Baculovirus anticarsia é semelhante à descrita para outras preparações.

## 6 - Referências Bibliográficas

- (1) MOSCARDI, F. Utilização de Baculovirus anticarsia para o controle da lagarta da soja Anticarsia gemmatalis. Londrina, EMBRAPA-CNPSo, 1983.
- (2) LEWIS, F.B. & ROLLINSON, W.D. J. Econ. Entomol., 71:719, 1978.
- (3) van der GEEST, L.P.S. J. Invertebr. Pathol., 11; 502, 1968.
- (4) SMALL, D.A. & MOORE, N.F. Appl. Environ. Microbiol., 53:598, 1987.
- (5) JAMES, A M. Chem. Soc. Rev., 8: 389, 1979.
- (6) MEDUGNO, C.C. Desenvolvimento de uma formulação pó molhável para o Baculovirus anticarsia: relatório de pesquisa. Jaguariuna, EMBRAPA/CNPDA, 1988. (Projeto de Pesquisa n 039 86 009/3-PNP Defesa da Agricultura)

- (7) GONZÁLEZ, G. Heterocoagulação e sua importância na produção de petróleo. Separata de :Boletim Técnico da PETROBRÁS, Rio de Janeiro, 31 (1): 19-24,1988.
- (8) ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas. MB 8511 Métodos Físicos.s.i.
- (9) TAIRA, A. Comunicação pessoal. 1986. (Tanac S.A. Indústria de Tanino Montenegro, RS, Brasil)