

RECOBRIMENTO DE POLIEDROS DE Baculovirus anticarsia COM PARTÍCULAS COLOIDAIS\*

CLÁUDIA MEDUGNO\*\*  
VIVIANE NAKANO\*\*\*  
GASPAR GONZÁLEZ\*\*\*\*

O recobrimento homogêneo e irreversível de poliedros de Baculovirus com partículas finas de diferentes minerais pode oferecer proteção contra a ação deletérea da fração ultravioleta da luz solar. O presente trabalho descreve a preparação e caracterização de corpos de inclusão poliédricos de Baculovirus anticarsia heterofloculados com cristais cúbicos positivamente carregados de  $\text{CaF}_2$ , usados como sistema modelo. Os poliedros são recobertos irreversivelmente, conforme medidas de mobilidade eletroforética. Sóis de atapulgita também mostram algum grau de deposição, que pode ser observada por microscopia eletrônica de varredura.

1 INTRODUÇÃO

Os Baculovirus são usados como agentes de controle biológico para grande número de pragas de lepidópteras com importância agrônômica. No Brasil, é crescente o uso de B. anticarsia (AgNPV) para o combate de Anticarsia gemmatalis, o principal desfolhador da cultura de soja (19).

A inativação do vírus a campo pela fração UV-B (280-320 nm) (6) da luz solar é apontada como o principal fator que li-

\*Trabalho apresentado na FENABIO/BIOLATINA 91.

\*\*EMBRAPA/CNPDA - Jaguariuna - SP.

\*\*\*Bolsista do CNPq.

\*\*\*\*PETROBRÁS - Centro de Pesquisa - Rio de Janeiro - RJ.

mita o uso do Baculovirus como inseticida (3,4,11, 12, 16, 18). Diferentes materiais têm sido adicionados às formulações para proteger os Baculovirus da inativação: moléculas que absorvem seletivamente UV-B, usadas em cosméticos, como o ácido p-aminobenzóico (21, 22); branqueadores fluorescentes, que absorvem no UV e emitem no espectro visível, como o derivado de estilbeno Tinopal (15); minerais como negro de fumo e dióxido de titânio, encapsulados (1, 2, 8,9) ou não (15). A eficácia desses compostos tem sido motivo de controvérsia. Em trabalho recente, KILLIPCK (14) não foi capaz de reproduzir, a campo, os resultados de MARTIGNONI (15) e SHAPIRO (22), que usaram lignossulfonato de sódio e riboflavina, respectivamente. Uma possibilidade é que os depósitos sejam redistribuídos pela chuva, separando o vírus do agente protetor. A maioria dos trabalhos refere-se à mistura do vírus com os mais diversos adjuvantes, e a interação físico-química entre as partículas não tem sido investigada.

A hipótese do presente trabalho é que o revestimento da superfície dos poliedros com partículas minerais finas, revestimento este homogêneo e irreversível, pode prover uma proteção mais efetiva contra a radiação UV. O nível de proteção irá depender das propriedades de espalhamento de luz do mineral usado.

Uma das alternativas para cobrir a superfície dos corpos de inclusão poliédricos é a heterocoagulação, fenômeno que ocorre quando se misturam dispersões de partículas com cargas elétricas de sinais opostos. Devido à atração eletrostática, as partículas se unem. Do ponto de vista teórico, a heterocoagulação é um processo simples, que foi recentemente revisto por HARLEY et al (7). O presente trabalho descreve a preparação e caracterização de poliedros recobertos com  $\text{CaF}_2$  e atapulgita.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

Toda água utilizada foi bidestilada em equipamento Pyrex. Sais de  $\text{KNO}_3$ , NaF e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  são de qualidade P.A., e foram usados sem purificação adicional.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Purificação dos poliedros

Larvas criadas massivamente são infectadas no 5º instar, e deixadas apodrecer, a temperatura ambiente, em recipiente completamente vedado, durante aproximadamente um mês. A massa assim obtida é filtrada em tela de nylon e diluída até 10 g/l (massa seca). A suspensão é então centrifugada a 12 000 xg em centrífuga contínua Sharples, modelo T-1. Purificações adicionais são feitas com água bidestilada; após 15 minutos de centrifugação a 3 000 xg, o sobrenadante é descartado, bem como a parte inferior do precipitado, pesadamente contaminada. A massa de poliedros é dispersa em água destilada e novamente centrifugada a 3 000 xg. Essa operação é repetida inúmeras vezes, até a observação microscópica indicar preparação de elevada pureza. A dispersão é mantida sob refrigeração até o momento do uso (25).

### 2.2.2 Mobilidade eletroforética

A velocidade eletroforética das partículas foi determinada em um equipamento Rank Brother, por observação microscópica de uma cela de secção transversal retangular, contendo eletrodos de platina nas extremidades, adaptados à cela por meio de juntas de vidro. As partículas se movem sob a ação de campo elétrico, e é registrado o tempo gasto para percorrer uma distância fixa; cada quadrado do retículo da lente tem  $31,7 \mu$  de lado. As mobilidades foram medidas no nível estacionário, e representam a média de pelo menos 20 determinações do tempo de trajeto; o potencial aplicado variou de 20 a 80 volts; a distância entre os eletrodos é de 7,61 cm. O eletrólito usado para preparar as suspensões foi 5 mM de  $\text{KNO}_3$ . O ajuste de pH foi feito com 0,1 M de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{KOH}$ .

### 2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

A caracterização morfológica dos poliedros e dos poliedros recobertos foi feita em microscópio eletrônico de varredura - JEOL - JXA 840 A, após a metalização das amostras sólidas por deposição de cromo em metalizador - tipo JEOL - modelo JEE-

4X. A amostra para análise ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), foi fixada sobre porta-amostra metálico de alumínio e recoberta por fina camada de cromo (cerca de 150 Å de espessura) a fim de torná-la condutora. As fotomicrografias representam imagens de elétrons secundários obtidos por câmera fotográfica Pentax - MX, acoplada ao microscópio eletrônico de varredura JEOL-JXA 840 A, operando a 20 KV.

#### 2.2.4 Preparação de sóis de fluoreto de cálcio

Injeta-se 10 ml de uma solução 0,4 molar, por meio de uma seringa de vidro Pyrex, sobre uma solução 0,2 molar de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , diluída em 500 ml de água. O recipiente é então selado com filme de plástico e a dispersão agitada por 24 horas.

#### 2.2.5 Preparação de sóis de atapulgita

Atapulgita é um mineral inorgânico coloidal, espessante, essencialmente inerte, que não incha em água. Os cristais têm o formato de agulha e são quimicamente descritos como silicato de magnésio e alumínio hidratado. O sol foi obtido pesando-se 3,33 g de Attagel 50 e 0,05 g de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_4$ , que foram em seguida dispersos em 100 ml de água, com equipamento Ultra Turrax.

#### 2.2.6 Heterofloculação

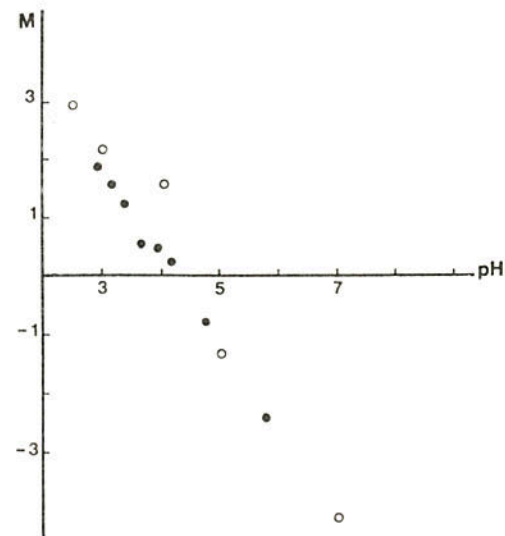
Foram adicionadas quantidades crescentes da dispersão coloidal (sol) de  $\text{CaF}_2$  a 5 ml de vírus contendo  $1,46 \cdot 10^7$  poliedros/ml, contados em câmara de Neubauer e diluídos em 200 ml de  $8 \cdot 10^{-3}\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$ . A mistura foi usada para medidas de mobilidade eletroforética.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Medidas de carga superficial são importantes para combinar poliedros com carregadores e diluentes no desenvolvimento de formulações. Também, permitem avaliar reprodutibilidade entre preparações, quantificar a interação com surfactantes, superfícies e outras partículas. Pela técnica da mobilidade ele-

troforética é possível observar os poliedros intactos, sem nenhum tipo de desnaturação. Um dos mais difíceis problemas no estudo de superfícies biológicas é o estabelecimento de superfícies limpas e reprodutíveis (10). Essa questão é particularmente relevante para o sistema em estudo, se for levado em conta que o método de purificação envolve uma etapa de digestão microbiológica não controlada (13, 25). Embora as superfícies biológicas difiram consideravelmente, elas apresentam cargas da mesma ordem de grandeza (carga líquida negativa, à pH 7,0) (10). Portanto, a determinação de um ou dois valores de mobilidade não é suficiente para caracterizar tais superfícies. A Figura 1 apresenta os resultados de mobilidade eletroforética de duas preparações de poliedros, purificadas apenas com água destilada. As diferenças encontradas são pouco significativas, o que indica preparações reprodutíveis. SMALL (23) encontrou resultados similares para três outras espécies de Baculovirus.

FIGURA 1 - MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DE POLIEDROS DE B. anti-carsia VERSUS pH, EM MICRA/SEG/VOLT/CM

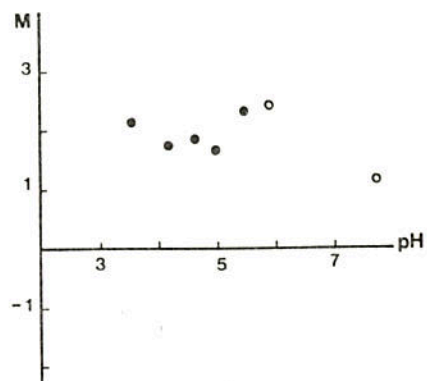


Os pontos representados por círculos cheios foram medidos em equipamento Rank Brother (17) e os círculos vazados, em Zeta Sizer.

As partículas de maior interesse para o recobrimento de poliedros são as argilas, material relativamente barato, disponíveis em grande quantidade, e fácil de manusear. Porém, uma dispersão coloidal de argila é um sistema bastante complexo por que estão expostas diferentes superfícies cristalográficas, que podem originar cargas opostas (20). Dessa forma, para o estudo inicial da heterocoagulação, foi escolhido o colóide de  $\text{CaF}_2$ , que permite a preparação rápida e reprodutível de partículas pequenas, cúbicas, com estreita faixa de distribuição, e positivamente carregadas em ampla faixa de pH.

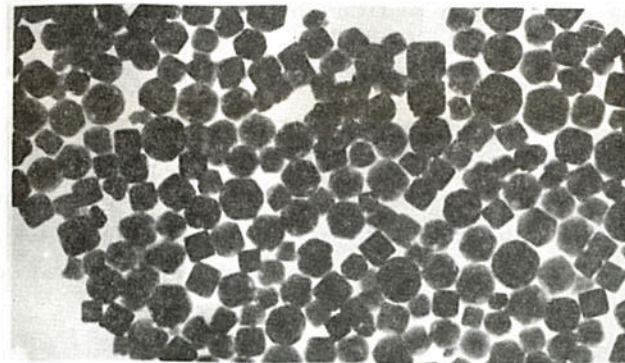
A Figura 2 mostra os resultados de mobilidade eletroforética, cujos pontos vazados foram reproduzidos de GONZÁLEZ (5), que empregou o método de deslocamento da camada limite.

FIGURA 2 - GRÁFICO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA EM MICRA/SEG / VOLT / CM VERSUS pH, PARA SOLUÇÃO DE  $\text{CaF}_2$



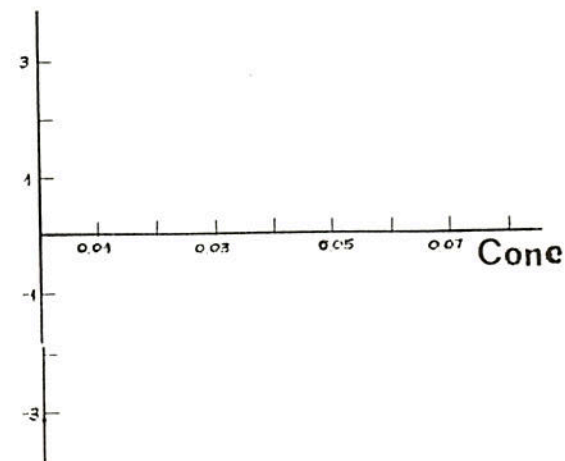
A Figura 3, reproduzida do trabalho de GONZÁLEZ (5), mostra os cristais cúbicos de  $\text{CaF}_2$ , e foi obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

FIGURA 3 - FOTOMICROGRAFIA DE PARTÍCULAS COLOIDAIS DE  $\text{CaF}_2$  - TAMANHO MÉDIO 200 nm



Concentrações crescentes dos cristais coloidais de  $\text{CaF}_2$  foram adicionados à poliedros de AgNPV, mantidos à uma concentração fixa e pH 5,5. A Figura 4 mostra os resultados de mobilidade eletroforética: devido ao seu tamanho, da ordem de 2,2 micra, as partículas de  $\text{CaF}_2$  não podem ser visualizadas através do microscópio acoplado ao equipamento de mobilidade, e os valores obtidos correspondem à superfície dos poliedros.

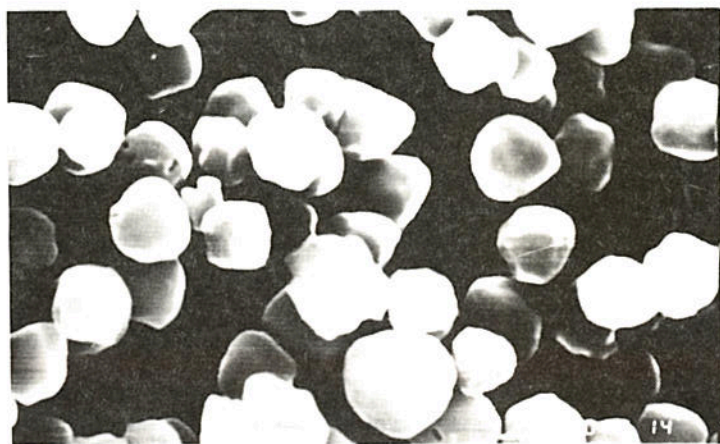
FIGURA 4 - MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DE POLIEDROS DE AgNPV, EM MICRA/SEG/VOLT/CM VERSUS CONCENTRAÇÃO DE CRISTAIS DE  $\text{CaF}_2$ , EM mg/100 ml



Observa-se que, à baixas concentrações de  $\text{CaF}_2$ , a mobilidade é negativa, com valores próximos àqueles dos poliedros purificados (Figura 1). À medida que se aumenta a concentração de  $\text{CaF}_2$ , há um correspondente aumento na mobilidade. Os resultados indicam que o recobrimento ocorre em uma faixa muito estreita de concentração de  $\text{CaF}_2$ , a partir da qual as medidas se tornam praticamente constantes. A irreversibilidade da heterocoagulação foi confirmada dispersando-se os poliedros recobertos em água destilada, recuperando-os por centrifugação e dispersando-os novamente. As sucessivas medidas de mobilidade mantiveram-se constantes.

A heterocoagulação pode ser visualizada nas Figuras 5, 6 e 7. A Figura 5 mostra resultados de microscopia eletrônica de varredura de poliedros purificados, sendo possível observar unidades bem delimitadas, com superfícies lisas.

FIGURA 5 - MEV DE POLIEDROS PURIFICADOS - AUMENTO 9.500 x



As Figuras 6 e 7 mostram poliedros heterocoagulados com  $\text{CaF}_2$ . A mistura permaneceu em contato por 6 horas, e a seguir foi seca, moída, e analisada por microscopia eletrônica de var

redura. Observa-se a agregação de partículas muito pequenas em volta dos poliedros.

FIGURA 6 - MEV DE POLIEDROS HETEROCOAGULADOS COM  $\text{CaF}_2$  - AUMENTO 7.000 x

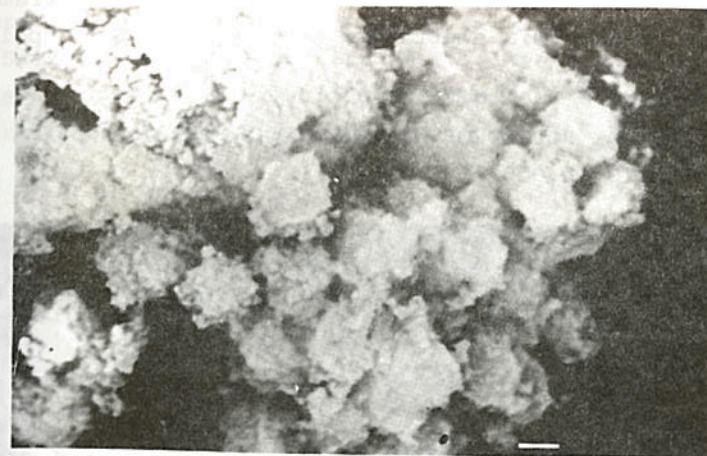
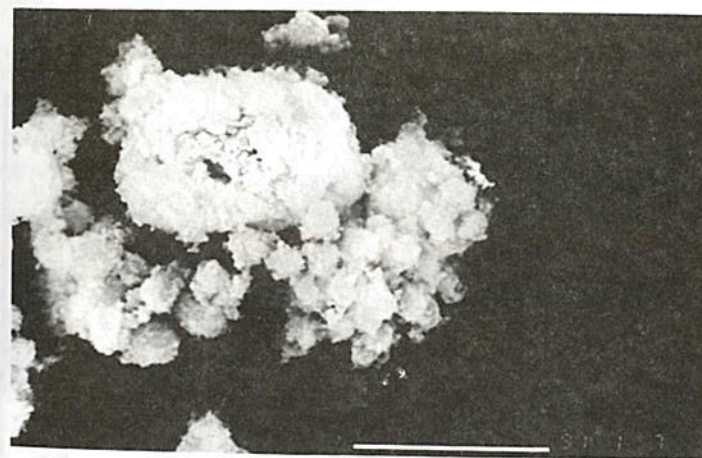


FIGURA 7 - MEV DE POLIEDROS HETEROCOAGULADOS COM  $\text{CaF}_2$  - AUMENTO 3.300 x



Com o objetivo de verificar a heterocoagulação em um sistema real, 50 ml de atapulgita dispersa em água foram misturados a 50 ml de suspensão contendo cerca de 25 mg de poliedros (massa seca). O pH da mistura resultante foi mantido entre 6,5 e 7,0. Após seis horas de contato, a mistura foi filtrada em Millipore e seca sob sílica gel. As Figuras 8 e 9 mostram os resultados de microscopia eletrônica de varredura dos poliedros tratados com atapulgita.

FIGURA 8 - MEV DE POLIEDROS MINERALIZADOS COM ATAPULGITA - AUMENTO 12.000 x

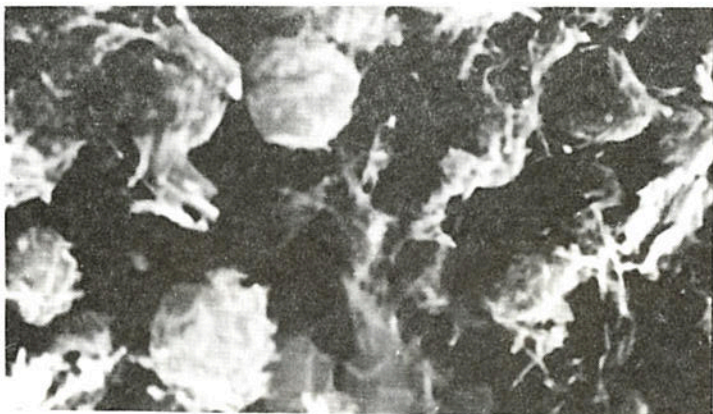


FIGURA 9 - MEV DE POLIEDROS MINERALIZADOS COM ATAPULGITA - AUMENTO 11.000 x



#### 4 CONCLUSÃO

É possível obter superfícies reprodutíveis de poliedros de B. anticarsia extraídos de lagartas com infecção terminal.

Sóis de  $\text{CaF}_2$  e de atapulgita recobrem poliedros de B. anticarsia, conforme evidenciado por microscopia eletrônica de varredura.

Sóis de  $\text{CaF}_2$  recobrem irreversivelmente poliedros de B. anticarsia, conforme evidenciado por medidas de mobilidade eletroforética.

#### Abstract

The homogeneous and irreversible coating of Baculovirus polyhedra with fine particles of different minerals can offer protection against the UV deleterious action. The present work describes an inclusion body preparation and characterization, and a further heterocoagulation with cubic and positive crystals of  $\text{CaF}_2$ , used as a model system. The polyhedra are irreversible coatings, as demonstrated by electrophoretic mobility measurements. Atapulgite sols also present some degree of coating, as seen by scanning electron microscopy.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 BULL, D.L., RIDGWAY, R.L., HOUSE, V.S., PRYOR, N.W. Improved formulations of the Heliothis nuclear polyhedrosis virus. Journal of Economic Entomology, College Park, v. 69, n. 6, p. 731-736, 1976.
- 02 BULL, D.L. Formulations of microbial insecticides: microencapsulation and adjuvants. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, College Park, v. 10, n. 5, p. 11-20, 1978.
- 03 BULLOCK, H.R., HOLLINGSWORTH, J.P., HARTSTACK JR, A.W. Virulence of Heliothis polyhedrosis virus exposed to monochromatic ultraviolet irradiation. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 16, p. 419-422, 1970.
- 04 CANTWELL, G.C. Inactivation of biological insecticides by radiation. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 2, p. 138-140, 1967.
- 05 GONZÁLES, G. Heterocoagulação e sua importância na produção de petróleo. Boletim Técnico da Petrobrás, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 19-24, 1988.

- 06 GRIEGO, V.W., MARTIGNONI, M.E., CLAYCOMB, A.E. Inactivation of nuclear polyhedrosis virus (Baculovirus subgroup A) by monochromatic UV radiation. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 49, n. 3, p. 709-710, 1985.
- 07 HARLEY, S., THOMPSON, D.W., VINCENT, B. The adsorption of small particles into larger particles of opposite charge: direct electron microscope studies. Colloids and Surfaces, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 163-176, 1992.
- 08 IGNOFFO, C.M., BATZER, O.F. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. Journal of Economic Entomology, College Park, v. 64, n. 4, p. 850-853, 1971.
- 09 IGNOFFO, C.M., HOSTETTER, D.L., SMITH, D.B. Gustatory stimulant, sunlight protectant, evaporation retardant: three characteristics of a microbial insecticidal adjuvant. Journal of Economic Entomology, College Park, v. 69, n. 2, p. 207-210, 1976.
- 10 JAMES, A.M. Molecular aspects of biological surfaces. Chemical Society Reviews, London, v. 8, n. 3, p. 389-418, 1979.
- 11 JAQUES, R.P. The persistence of a nuclear polyhedrosis virus in the habitat of the host insect, Trichoplusia ni. Canadian Entomologist, Ottawa, v. 99, n. 8, p. 785-794, 1967.
- 12 JAQUES, R.P., HUSTON, F. Tests on microbial decomposition of polyhedra of the nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, Trichoplusia ni. Journal of Invertebrate Pathology, v. 14, p. 289-290, 1969.
- 13 JAQUES, R.P. Stability of entomopathogenic viruses. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, College Park, v. 10, p. 99-116, 1977.
- 14 KILLICK, H.J. Influence of droplet size, solar ultraviolet light and protectants, and other factors on the efficacy of baculovirus sprays against Panolis flammea (Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae). Crop Protection, Guildford, v. 9, n. 1, p. 21-28, 1990.
- 15 MARTIGNONI, M.E., IWAI, P.J. Laboratory evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of Douglas-Fir-Tussock moth baculovirus. Journal of Economic Entomology, College Park, v. 78, n. 4, p. 982-987, 1985.
- 16 MCLEOD, P.J., YEARIAN, W.C., YOUNG III, S.Y. Inactivation of Baculovirus heliothis by ultraviolet irradiation, dew, and temperature. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 30, p. 237-241, 1977.
- 17 MEDUGNO, C.C., CASTRO, M.L. de, GONZALEZ, G. Etapas do desenvolvimento de uma formulação pó molhável para o Baculovirus anticarsia: secagem e caracterização da superfície do poliedro. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE FORMULAÇÕES DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 2., Campinas, 1989. 1 v.
- 18 MORRIS, O.N. Effect of sunlight, ultraviolet and gamma radiation and temperature on the infectivity of nuclear polyhedrosis viruses. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 18, p. 292-294, 1971.
- 19 MOSCARDI, F. Development and use of soybean caterpillar baculovirus in Brasil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5., 1990. Proceedings ... Glen Osmond : University of Adelaide, Department of Entomology, 1990, p. 184-187.
- 20 OLPHEN, H.C. Van. An introduction to clay colloid chemistry: for clay technologists, geologists and soil scientists. New York : Interscience, 1966. 301 p.
- 21 SHAPIRO, M., AGIN, P.P., BELL, R.A. Ultraviolet protectants of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus. Environmental Entomology, College Park, v. 12, n. 3, p. 982-985, 1983.
- 22 SHAPIRO, M. Effectiveness of B vitamins as UV screens for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus. Environmental Entomology, College Park, v. 14, n. 6, p. 705-708, 1985.
- 23 SMALL, D.A., MOORE, N.F. Measurement of surface charge of baculovirus polyhedra. Applied and Environmental Microbiology, v. 53, n. 3, p. 598-602, 1987.
- 24 SMIRNOFF, W.A. The effect of sunlight on the nucleopolyhedrosis virus of Neodiprion swainei with measurement of the solar energy received. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 19, p. 179-188, 1972.
- 25 VAN DER GEEST, L.P.S. A method for the purification of polyhedra. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 11, p. 502, 1968.