

## Avaliação do *Baculovirus spodoptera* submetido a diferentes soluções de pH

### *Baculoviruses Spodoptera evaluation under different pH solutions*

Wesley Botelho Sousa<sup>1</sup>; Karen Santos Silva<sup>2</sup>; Mateus Silveira Freitas<sup>3</sup>; Fernando Hercos Valicente<sup>4</sup>; Mônica Hitomi Okura<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Mestre em Inovação Tecnológica pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil. E-mail: wesley-415@hotmail.com

<sup>2</sup> Graduanda em Engenharia Química pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro Uberaba, Minas Gerais, Brasil

<sup>3</sup> Técnico de Laboratório pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro Uberaba, Minas Gerais, Brasil

<sup>4</sup> Pesquisador pela Embrapa Milho e Sorgo

<sup>5</sup> Professora do Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil. E-mail: moni@mednet.com.br

**RESUMO:** Um dos vírus patogênicos a insetos mais comuns e estudados é o baculovirus, pois possui maior potencial para ser usado como agente de controle biológico de pragas, principalmente para o cultivo do milho. As lagartas *Spodoptera frugiperda* são comumente utilizadas para produção *in vivo* de baculovirus, que é utilizado como biopesticida. Este trabalho tem como objetivo analisar interferências de diferentes parâmetros de pH, associados ao comportamento e resistência do *Baculovirus spodoptera*, assim é possível estabelecer o nível máximo suportado pelo vírus sem danificá-lo para a produção industrial. Utilizou-se o inóculo de baculovirus na concentração de aproximadamente  $2 \times 10^6$  pol/mL. Cada amostra dos diferentes pH foram mantidas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente (25°C). Após centrifugação, foi observado na solução resultante duas fases bem definidas, sobrenadante e precipitado onde continha a maioria dos corpos virais presentes na amostra. As fases foram separadas em tubos independentes, e o precipitado ressuspensionado em água purificada de forma a manter o volume de solução utilizado no início do processo. A contagem de poliedros do precipitado e sobrenadante da solução foi definida em câmara de Neubauer, e as leituras nos diferentes pH, comparadas com a amostra controle contendo a solução do baculovirus e água purificada. Verificou-se que em pH ácido, houve uma diminuição na contagem do baculovirus. Ocorreu uma degradação do vírus em pH 10. Em pH 7, estes mantiveram estáveis. Foi possível verificar que as concentrações de pH diferentes, interferem na manutenção do baculovirus.

**Palavras-chave:** *Spodoptera frugiperda*, *Baculovirus spodoptera*, concentrações de pH, controle biológico.

**ABSTRACT:** One of the most common pathogenic viruses and insects studied is the baculovirus, as it has the greatest potential for use as biological control agents of pests, mainly for maize cultivation. The *Spodoptera frugiperda* larvae are commonly used for *in vitro* production of baculovirus, which is used as biopesticides. This work aims to analyze interference of different pH parameters associated with the behavior and *Spodoptera* baculovirus resistance. We used the baculovirus inoculum at a concentration of approximately  $2 \times 10^6$  in / ml. Each sample of different pH were maintained at rest for 30 minutes at room temperature (25 ° C). After centrifugation, the resulting solution was observed in two well defined phases, and precipitated supernatant (containing most of the viral bodies present in the sample). The phases were separated into independent tubes, and the precipitate resuspended in purified water to maintain the volume of solution used at the start of the process. The polyhedra count the precipitate and the supernatant solution was set in a Neubauer chamber, and the readings on the different pH compared with the control sample containing the solution baculovirus and purified water. It was found that at acidic pH, there was a decrease in baculovirus count. There has been a degradation of viruses at pH 10. At pH 7, they were stable. It was possible to verify that different pH levels, interfere with the maintenance of the baculovirus.

**Keywords:** *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera baculovirus*, pH concentrations, biological control.

## INTRODUÇÃO

Segundo Souza et al. (2002) os *Baculovirus* pertencem à família *Baculoviridae*. Essa família é composta de vírus com uma fita dupla circular de DNA, que infectam um grande número de artrópodes e contêm os gêneros: nucleopoliedrovírus (VPN) e granulovírus (GV) (VALICENTE, TRULHER, BARROS, 2010).

No Brasil, a ocorrência de vírus VPN em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) foi detectada em 1978 (C.F. Andrade, não publicado). Os VPNs ocorreram em lagartas de *S. frugiperda* e foram relatados, identificados e purificados por Valicente e equipe (1989) que patentearam o isolado NR6 em 2006. Isolados do grupo dos VPNs têm sido obtidos de *Neuroptera*, *Trichoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera* e *Coleoptera*, além de *Thysanura* e *Homoptera* (GERK; KITAJIMA; SOUZA, 1997).

Conhecer o ambiente favorável ao desenvolvimento da espécie de *S. frugiperda* é crucial para a elaboração do controle desta praga. O fator principal para evolução desta lagarta é a temperatura, que influencia todas as fases do ciclo biológico. Com uma temperatura média de 25° C o ciclo da *S. frugiperda* é de 30 dias. Geralmente a fase de pupa ocorre no solo, preferencialmente solos arenosos, porém, em outros tipos de solos esta fase pode acontecer na planta do milho (VALICENTE et al., 2008; SARMENTO et al., 2012).

Em face ao intenso uso de produtos químicos para o controle da lagarta do cartucho do milho, o controle biológico com entomopatógenos se tornou uma opção viável em relação à preservação do meio ambiente. Devido às características que conferem total segurança à saúde humana e ao meio ambiente, o uso de *Baculovirus* é a melhor alternativa quando comparada aos inseticidas químicos (GERK; KITAJIMA; SOUZA, 1997). Se usado de maneira correta o *Baculovirus* pode ser eficaz no controle da *S. frugiperda*. Algumas características o tornam adequado ao uso em pragas na agricultura, como sua especificidade (compatíveis com outros inimigos naturais), não poluidor de rios e nascentes, além de não causar efeito tóxico sobre aplicadores (GERK; KITAJIMA; SOUZA, 1997; MOSCARDI; SOUZA, 2002; VALICENTE; TUELHER, 2009).

A lagarta do cartucho ao se alimentar da folha do milho contendo as partículas virais, ocorre a penetração dos corpos virais no sistema digestivo. O pH alcalino presente no intestino médio da lagarta quebra a matriz proteica de proteção do vírus, liberando os vírions, onde suas proteínas se ligam às proteínas presentes nas membranas das células epiteliais do intestino. Os nucleocapsídeos se deslocam pelo citoplasma celular, penetram no núcleo da célula, onde liberam o DNA viral, iniciando a transcrição dos genes e replicação do genoma do vírus (MOSCARDI; SOUZA, 2002).

Este trabalho tem como objetivo analisar interferências de diferentes parâmetros de pH associados à resistência do *Baculovirus spodoptera*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Teste de pH no *Baculovirus spodoptera*

#### Preparo das soluções

Para obtenção das soluções ácidas foram utilizados três ácidos diferentes, sendo: ácido ascórbico 0,5% g/v (pH 2,87), ácido acético 0,1% v/v (pH 3,40) e ácido clorídrico

0,01% (pH 3,16). Para soluções de pH 7 e pH 10 foram utilizadas soluções tampão para calibração de pHmetro.

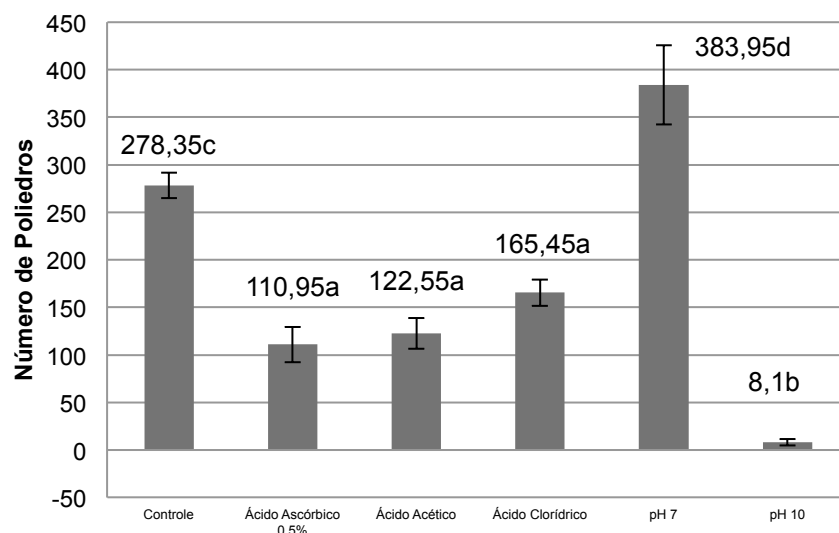
### Preparo do inóculo de *Baculovirus*

Para cada amostra das soluções testadas, foi adicionado o inóculo de *baculovirus* na concentração de aproximadamente  $2 \times 10^6$  pol/mL. Cada amostra dos diferentes pH, foram mantidas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente (25°C). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 2 minutos. Na solução resultante houve duas fases bem definidas, sobrenadante e precipitado. As fases foram separadas em tubos independentes, e o precipitado ressuscitado em 10 mL de água purificada, mantendo o volume de solução utilizado no início do processo. A contagem de poliedros do precipitado e sobrenadante da solução foi definida em câmara de Neubauer, e as leituras nos diferentes pH foram realizadas em sextuplicadas e comparadas com a amostra controle contendo a solução do *baculovirus* e água purificada.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH é um importante fator de estabilidade da formulação de *baculovirus*, considerando que as partículas virais são destruídas quando expostas a valores de pH alcalino (9,5-11,5), a taxa ideal para a formulação a base de baculovírus deve ser próximo a neutralidade para garantir a integridade da estrutura que protege o vírion. Verificou-se que as diferentes concentrações de pH interferem na manutenção do *B. spodoptera*. Observou-se (**Figura 1**) que não houve diferença na contagem de *Baculovirus* no processo testado nos tratamentos com ácidos ascórbico, acético e clorídrico, com exceção do tratamento controle, onde a contagem do precipitado foi superior a do sobrenadante.

**Figura 1.** Resultado da contagem do número de poliedros do *Baculovirus* após exposição de 30 minutos a diferentes concentrações de pH.



De acordo com a **Figura 1** a contagem do *Baculovirus* na solução de pH 7 foi acima da contagem controle. Este aumento do número de vírus em pH 7 pode ser explicado através do crescimento bacteriano presente neste tratamento, já que este nível de pH é considerado o ideal para a multiplicação de bactérias. A contagem na câmara de Neubauer de *baculovirus* é um processo impreciso, qualquer corpo de forma arredondada que acompanhe as dimensões do vírus, pode ser confundido com o mesmo, alterando o valor total estimado. Com isso, provavelmente houve erroneamente a contagem também destas bactérias juntamente com o *Baculovirus*, elevando a concentração final. Como a produção de nucleopoliedrovírus normalmente é realizada através do próprio hospedeiro (*Spodoptera frugiperda*), ocorre a contaminação de microrganismos do extrato bruto de vírus a partir da microbiota normal da lagarta, gerando uma instabilidade no armazenamento da formulação a base de baculovírus (RUIZ, 2015).

Os *Baculovirus* demonstraram sensibilidade na presença dos ácidos testados (ácido acético, ácido ascórbico e ácido clorídrico). No entanto, a solução de ácido clorídrico 0,01% afetou menos os *baculovirus* apresentando valores mais aproximados ao controle. Em pH 10, houve uma queda acentuada na contagem dos *baculovirus*, impossibilitando a contagem após 30 minutos de exposição.

Conforme Barros (2011), quando o *baculovirus* é ingerido pela lagarta, estes seguem no trato intestinal até o intestino médio onde o ambiente é altamente alcalino (pH 9,5 a 11,5) o que leva à dissolução do OB (poliedro no caso NPV e grânulos de GV) e liberação das partículas virais. Portanto, em pH 10 houve a dissolução do OB e não foi possível a contagem do *baculovirus*.

Batista Filho e colaboradores (1992), relataram que o orvalho depositado na superfície das folhagens de algodão possui pH alcalino (8,2 a 9,1), com isso, o contato do *Baculovirus heliothis* ao orvalho destas folhas, culminou com a perda da atividade viral.

## CONCLUSÃO

Foi possível verificar que as soluções dos três ácidos testados, tampão pH 7 e pH 10 interferem na presença e manutenção do baculovirus.

## AGRADECIMENTOS

À Embrapa pelas cepas de *baculovirus* cedidas. À Vitae Rural Biotecnologia pelo financiamento do projeto e para a FAPEMIG.

## REFERÊNCIAS

BARROS, M.C. de E.S. **Atividade de baculovirus selvagens em camundongos *in vivo* e *in vitro* e expressão da proteína do envelope do vírus da febre amarela (YFE) e da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) em célula de inseto.** 2011. 169 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

BATISTA FILHO, A. *et al.* Persistência de duas formulações de *Baculovirus anticarsia* sobre folhas de soja, em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 7, p. 1005 - 1009, jul. 1992.

GERK, A.O.; KITAJIMA, E.W.; SOUZA, M.L. Identificação e caracterização de isolado brasileiro do vírus de poliedrose nuclear da lagarta do cartucho do milho. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 26, n. 3, p. 507 – 515, 1997.

MOSCARDI, F., SOUZA, M. L.. Baculovírus para o controle de pragas. **Biociência & Desenvolvimento**. nº 24- janeiro/fevereiro 2002.

RUIZ, L. M. Q. **Uso de baculovirus como alternativa de control biologico de Spodoptera frugiperda en el cultivo del maiz: una revisión conceptual y de avances en su aplicación**. Universidad Abierta y a Distancia. Tese de Mestrado, 2015.

SOUZA, M. L. *et al.* Caracterização de Baculovírus utilizados no controle de pragas. **Biociência & desenvolvimento**, n. 24, p. 18 – 20, 2002.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. de S. Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovírus, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, dez. 2009.

VALICENTE, F. H. *et al.* Identificação e purificação de um vírus de poliedrose nuclear da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*. **An. Soc. Entomol. Bras.** v.18, 71-82 p., 1989.

VALICENTE, F. H.; TRULHER, E.de S.; BARROS, E. C. de. Processo de formulação do *Baculovirus spodoptera* em pó molhável. **Circular Técnica**, Sete Lagoas: Embrapa n.156, 2010.

Recebido em: 30/11/2016

Aprovado em: 18/10/2018