



MICROENCAPSULACIÓN DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EN MATRICES BIOPOLIMÉRICAS CON SECADO POR ASPERSIÓN PARA EL CONTROL DE *Hyphantria cunea* (DRURY) †

[MICROENCAPSULATION OF *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) IN BIOPOLYMERIC MATRICES USING SPRAY-DRYING TO CONTROL *Hyphantria cunea* (DRURY)]

Lucia Leticia Palacios-Cortez, Fatima Lizeth Gandarilla-Pacheco, Lilia Hortencia Morales-Ramos, Sergio Manuel Salcedo-Martínez, Myriam Elías-Santos, María Elizabeth Alemán-Huerta and Isela Quintero-Zapata*

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México, C.P. 66450. E-mails: lupaco61@yahoo.com.mx, fatimagandarilla84@gmail.com, lhmoralesr@yahoo.com, sergio.salcedomr@uanl.edu.mx, maria.alemanhr@uanl.edu.mx, myriam.eliassn@uanl.edu.mx, isela.quinterozp@uanl.edu.mx

* Corresponding author

SUMMARY

Background. The formulation of agents of biological origin with insecticidal activity is one of the most effective methods for the control of lepidopteran pests due to their feeding forms. The insecticidal activity of *B. thuringiensis* is widely known, which is why it is believed that native strains of this bacillus could have toxic activity on larvae of the cobweb worm, *H. cunea*. **Objective.** To prepare by means of the spray drying technique microencapsulated formulations of a native strain of *B. thuringiensis* with toxic activity on *H. cunea*. **Methodology.** The experimental design was completely randomized and the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The strain selected for the formulation is a key Mexican strain GM-10 belonging to the aizawai variety and presented an LC_{50} of 0.007 ng cm^{-2} in artificial diet, and a LT_{50} of 80.83 h. To prepare the formulations, a phago-stimulant was first selected by means of food preference tests with powdered leaves of walnut, blackberry, ash, loquat and walnut shell powder and a commercial phage-stimulant (Coax[®]), and ash was selected with 61.4% of the larvae attracted. Once the phagostimulant was selected, encapsulated formulations were developed with a mixture of polymers (Capsul[®]-bovine gelatin), as a base. Several formulations were then made to select an adhesion additive, and the ingredients tested were guar gum, core[®] gum and xanthan gum. **Results.** Food preference bioassays to establish the affinity of *H. cunea* for some of the formulations showed that the larvae had a similar affinity for feeding on all formulations ($p \geq 0.05$), while in the trials to select an adherent for the formulation xanthan gum presented the best adherence ($p \leq 0.05$). **Implications.** The evaluated formulations preserved their toxic activity after microencapsulation with an LC_{50} of less than 0.05 ng cm^{-2} of *B. thuringiensis*. **Conclusion.** These results show the feasibility of using the spray drying method to obtain an effective formulation for the treatment of the immature stages of *H. cunea*. **Key words:** *Bacillus thuringiensis*; phagostimulant; *Hyphantria cunea*; microencapsulation; spray drying.

RESUMEN

Antecedentes. La formulación de agentes de origen biológico con actividad insecticida es uno de los métodos más eficaces para el control de lepidópteros plaga debido a sus formas de alimentación. La actividad insecticida de *B. thuringiensis* es ampliamente conocida por lo que se cree que cepas nativas de este bacilo podrían tener actividad tóxica sobre larvas del gusano telarañero, *H. cunea*. **Objetivo.** Elaborar mediante la técnica de secado por aspersión formulados microencapsulados de una cepa nativa de *B. thuringiensis* con actividad tóxica sobre *H. cunea*. **Metodología.** El diseño experimental fue completamente al azar y las medias se compararon con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$). La cepa seleccionada para la formulación es una cepa mexicana clave GM-10 pertenece a la variedad *aizawai* y presentó una CL_{50} de 0.007 ng cm^{-2} en dieta artificial, y un TL_{50} de 80.83 h.

† Submitted December 30, 2021 – Accepted March 11, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4156>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

Para elaborar las formulaciones primero se seleccionó un fagoestimulante mediante pruebas de preferencia alimenticia con hoja pulverizadas de nogal, mora, cenizo, níspero y polvo de cáscara de nuez y un fagoestimulante comercial (Coax[®]), y se seleccionó el cenizo con 61.4% de las larvas atraídas. Una vez que se seleccionó el fagoestimulante se desarrollaron formulaciones encapsuladas con una mezcla de polímeros (Capsul[®]-gelatina bovina), como base. Después se realizaron varias formulaciones para seleccionar un aditivo para adherencia, y los ingredientes probados fueron goma guar, goma core[®] y goma xantana. **Resultados.** Los bioensayos de preferencia alimenticia para establecer la afinidad de *H. cunea* para alguna de las formulaciones mostraron que las larvas tuvieron una afinidad similar de alimentación sobre todas las formulaciones ($p \geq 0.05$), mientras que en los ensayos para seleccionar un adherente para la formulación la goma xantana presentó la mejor adherencia ($p \leq 0.05$). **Implicaciones.** Los formulados evaluados conservaron su actividad tóxica después de la microencapsulación con una CL_{50} menor a 0.05 ng cm^{-2} de *B. thuringensis*. **Conclusión.** Estos resultados muestran la viabilidad de utilizar el método de secado por aspersión para obtener un formulado efectivo para el tratamiento de los estadios inmaduros de *H. cunea*.

Palabras clave: *Bacillus thuringensis*; fagoestimulante; *Hyphantria cunea*; microencapsulación; secado por aspersión.

INTRODUCCIÓN

Hyphantria cunea es un insecto nativo de Norteamérica. En la actualidad en el continente asiático, específicamente en China, es un problema severo por los daños causados en bosques, árboles frutales y cultivos agrícolas debido a su amplio rango de hospederos (Zhang *et al.*, 2017). Las larvas pueden alimentarse de más de 600 especies de plantas; sin embargo, el cenizo, olmo y el nogal pecanero parecen ser su dieta preferida en América (Showalter y Ring, 2017). El nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch) se considera un cultivo de alto valor económico por su fruto, la nuez, así como por su madera en la fabricación de muebles finos, y en otros subproductos como aceites y carbón (Reyes-Vázquez y Morales-Landa, 2019). *H. cunea* se considera una plaga secundaria de la nuez ya que no ataca a la fruta, pero es una plaga voraz y un defoliador que afecta de forma indirecta los rendimientos de producción, diversos reportes señalan que el control de estas plagas y enfermedades pueden representar hasta el 15 % de los costos de producción del cultivo (Cervantes - Vázquez *et al.*, 2018). Las estrategias para el manejo de esta plaga incluyen el uso de pesticidas convencionales, depredadores, parasitoides, entomopatógenos, productos botánicos y mecanismos moleculares (Edosa *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019). El uso de agentes de control biológico como parte de una estrategia de manejo integrado de plagas, podría reducir la dependencia del control químico. Algunos hongos, bacterias y nematodos con actividad entomopatógena se han evaluado contra esta plaga (Edosa *et al.*, 2019; Showalter y Ring, 2017). *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* se ha reportado como un agente eficaz para el control de *H. cunea* (Saruhan *et al.*, 2014). Sin embargo, la mayoría de los entomopatógenos no son estables en condiciones ambientales y están sujetos a daños por la radiación UV, lluvias, temperaturas desfavorables, entre otros (Khorramvatan *et al.*,

2014); entonces es necesario recurrir a procesos de formulación altamente eficaces para asegurar la persistencia del ingrediente activo. El método de secado por aspersión utilizado para encapsular compuestos es económico, flexible, y se obtienen partículas uniformes de buena calidad, donde el material activo queda atrapado dentro de una matriz protectora. La tecnología de encapsulación tiene éxito con una amplia gama de ingredientes activos en la industria farmacéutica y en la industria alimentaria. También en la formulación de agentes de control biológico, en especial agentes microbianos, ya que proporcionan las condiciones adecuadas para obtener una mejor persistencia y eficiencia de los agentes de control biológico en el medio ambiente y productos con una vida útil más larga (Vemmer y Patel, 2013). La mejora en estas características proporciona un manejo más seguro del bioinsecticida, reduce las dosis o el número de aplicaciones en el campo, es posible agregar adyuvantes en la formulación para proporcionar características tales como propiedades de adhesión o fagoestimulantes, así como protegerlos de efectos ambientales para prolongar la efectividad y la persistencia para hacerlos más competitivos (Muñoz-Celaya *et al.*, 2012).

La actividad insecticida de *B. thuringiensis* es ampliamente reconocida en distintos ordenes de insectos por lo que se cree que cepas nativas de este bacilo podrían tener actividad tóxica sobre *H. cunea*. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar formulaciones microencapsuladas, con *B. thuringiensis* como ingrediente activo, mediante el método de secado por aspersión utilizando una matriz polimérica basada en una mezcla de almidón modificado (Capsul[®]) y gelatina bovina, con la incorporación de adherentes para evaluar su factibilidad como alternativa para el control de *H. cunea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hyphantria cunea

Las larvas de *H. cunea* se obtuvieron del área de cría masiva de insectos del Instituto de Biotecnología, FCB-UANL. La dieta artificial Shorey, se utilizó para el crecimiento y desarrollo de larvas de *H. cunea*. La cría se mantuvo entre 26-28 °C con una humedad relativa (HR) entre un 70-80%, y un fotoperiodo de 14 h luz y 10 h oscuridad (Ríos-Diez *et al.*, 2012).

Selección de cepas de *B. thuringiensis*

La cepa de *B. thuringiensis* clave GM-10 var. *aizawai* se utilizó, así como la cepa de referencia HD-1 var. *kurstaki*, ambas procedentes de la colección de entomopatógenos del Instituto de Biotecnología, FCB-UANL. Estas cepas se propagaron en agar nutritivo (BD, N. J., USA), para obtener el complejo espora-cristal, el cual se almacenó a -20°C.

Actividad insecticida de *B. thuringiensis*

Para determinar la actividad insecticida de *B. thuringiensis* sobre *H. cunea* se obtuvieron CL₅₀, CL₉₀ y TL₅₀ por medio de bioensayos de acuerdo con la metodología propuesta por Iracheta *et al.* (2000) con la incorporación del complejo proteínico espora-cristal en nanogramos de proteína activa de *B. thuringiensis* cm⁻² (Bt cm⁻²) de la dieta de Shorey, en siete concentraciones para determinar la CL₅₀ y CL₉₀, durante 5 d. Para establecer el tiempo letal medio (TL₅₀) la mortalidad se registró diario en los 5 d consecutivos. Todos estos valores se evaluaron usando un análisis Probit Polo Plus ver. 1.0 (LeOra Software 2003). El diseño experimental fue completamente al azar con siete tratamientos y cuatro repeticiones. Todos los experimentos en este estudio se realizaron en al menos tres ocasiones.

Selección de fagoestimulantes por preferencia alimenticia

Los agentes fagoestimulantes se evaluaron para lo cual se prepararon soportes granulares a partir de una mezcla prediseñada de dos polímeros como matriz encapsulante en relación 1:1; almidón modificado (Capsul[®], UL[®], USA) y gelatina bovina (Rosas-García *et al.*, 2004). Seis alternativas con carácter fagoestimulante se seleccionaron con base en los hospederos aceptados dentro de la alimentación de *H. cunea* (hojas de nogal, cenizo, mora, níspero y la cáscara de nuez) en proporción del 4% p/p; se colocaron en

charolas de aluminio en un horno de tiro forzado a 40-45°C durante 5 días. Después se procesaron en un molino de perlas, y se tamizaron por malla No. 30 hasta obtener un polvo fino. Como control positivo se utilizaron las hojas de nogal frescas sin procesar, como control negativo la mezcla de Capsul[®]-Gelatina sin fagoestimulante, además de un fagoestimulante comercial en polvo (Coax[®], CCT Corp.). Formulaciones granulares se prepararon con mezcla de polímeros, fagoestimulante y agua bidestilada hasta formar gránulos, estos se colocaron sobre charolas de aluminio y se deshidrataron en un horno de tiro forzado a 40-45 °C durante 24 h. Los gránulos se desmoronaron a mano en condiciones de esterilidad y se tamizaron en malla No. 6 para obtener uniformidad en el tamaño de partícula.

Bioensayos de preferencia alimenticia para *H. cunea*

Estos ensayos se llevaron a cabo por el método de dos alternativas; se colocaron 25 mg de cada formulación granular para comparar, en lados opuestos de una placa Petri de 5 cm, y en el centro de la misma se colocaron 10 larvas neonatas de *H. cunea*, 6 placas por cada par de combinación. El bioensayo de dos alternativas se basó en un diseño completamente al azar de 336 pares de comparaciones distribuidas en 28 tratamientos (polímero- hoja de nogal; polímero-cenizo; polímero-níspero; polímero-cáscara de nuez; polímero-Coax[®]; polímero-mora; polímero-hoja de nogal; nogal-cenizo; nogal-níspero; hoja de nogal-cáscara de nuez; nogal-Coax[®]; hoja de nogal-mora; cenizo-níspero; cenizo- cáscara de nuez; cenizo-Coax[®]; cenizo-mora; cenizo-hoja de nogal; níspero-nuez; níspero-Coax[®]; níspero-mora; níspero-hoja de nogal; cáscara de nuez-Coax[®]; cáscara de nuez-mora; cáscara de nuez-hoja de nogal; Coax[®]-mora; Coax[®]-hoja de nogal; mora-hoja de nogal y el control). Los resultados se analizaron con ANDEVA y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), donde se comparó la media del número de larvas sobre cada pila con su error estándar; se utilizó el programa SPSS Statistics (SPSS Inc., versión 17.0, IBM[®], New York).

Formulados elaborados mediante secado por aspersión

La cepa de *B. thuringiensis* se propagó en un biorreactor de 14 L de capacidad (New Brunswick Scientific, N. J., USA), con un medio de cultivo a base de melaza (20%) y harina de soya (20%) a 30°C, pH 7, 1 VVM de aireación y 500 rpm de agitación, con 1% de inóculo (Chong-Rodríguez *et*

al., 2011). La recuperación del extracto de *B. thuringiensis* se realizó por el método de secado por aspersión (Bowen Engineering, Inc., N. J., USA), a temperatura de entrada a 100-120°C y temperatura de salida de 70-90°C. Los formulados microencapsulados se prepararon con base en una matriz polimérica de gelatina bovina al 5% y almidón modificado (Capsul[®], UL[®], USA), con la incorporación de diferentes adyuvantes como agentes adherentes al 2%. Estos fueron goma guar, goma core[®] (Shree Jee Chemicals, Haryana, IN) y goma xantana, además se elaboró un formulado sin adherente. A todos los formulados se les incorporó el fagoestimulante al 4%, seleccionado en el paso anterior (Tabla 1). Cuatro tratamientos con *B. thuringiensis* al 10% y cuatro tratamientos sin *B. thuringiensis* se obtuvieron. Además, se utilizó la mezcla sin *B. thuringiensis* y sin aditivo adherente. Los ocho tratamientos se resuspendieron en agua destilada suficiente y se procesaron utilizando el método de secado por aspersión, bajo las mismas condiciones de secado que en el proceso anterior. Para verificar la viabilidad del ingrediente activo, después del secado, se realizó una cuenta de esporas a todos los tratamientos para confirmarlo.

Preferencia alimenticia de los formulados microencapsulados

La preferencia de *H. cunea* a los formulados se evaluó por el método de dos alternativas, tal como sigue; 25 mg de cada formulado microencapsulado

por comparar, en lados opuestos de una placa Petri de 5 cm, y en el centro de la misma se acomodaron 10 larvas neonatas de *H. cunea*, 5 placas por cada par de combinación. El bioensayo se basó en 360 pares de comparaciones distribuidas en 36 tratamientos, así como un análisis estadístico (ANDEVA).

Actividad insecticida de formulados microencapsulados

A los tratamientos con *B. thuringiensis* se les evaluó la actividad insecticida mediante bioensayos utilizando larvas neonatas de *H. cunea*, este se realizó calculando la cantidad del formulado seco a reconstituir en agua estéril, (ng de proteína activa de Bt cm⁻²) con base en la cuenta de esporas para incorporarse a la dieta artificial. Siete concentraciones se utilizaron hasta encontrar la CL₅₀ y la mortalidad se analizó 5 d después de la exposición para obtener este valor. Para el análisis Probit de los resultados se utilizó Polo Plus ver. 1.0 (LeOra Software, 2003).

Adherencia de las formulaciones

La adherencia de las formulaciones se evaluó en 10 portaobjetos por tratamiento, 8 tratamientos más los controles, en total se evaluaron 12 tratamientos. Los controles fueron: agua bidestilada; un adherente comercial (Bionex[®], Arysta LifeScience, Méx.) más *B. thuringiensis* al 10% y la mezcla de

Tabla 1. Elaboración de formulados asperjables de *Bacillus thuringiensis* GM-10 con aditivo adherente para el control de *Hyphantria cunea*.

T ¹	Complejo espora-cristal de ² <i>B.t</i> GM-10 (%)	Fagoestimulante Cenizo (%)	³ Capsul [®] (%)	Gelatina (%)	Aditivo (%)
T1	⁴ Bt	4	79	5	2 GG ⁶
T2	⁴ Bt	4	79	5	2 GX ⁷
T3	⁴ Bt	4	79	5	2 GC ⁸
T4	⁴ Bt	4	81	5	S/A ⁹
T5	⁵ Bt	4	89	5	2 GG ⁶
T6	⁵ Bt	4	89	5	2 GX ⁷
T7	⁵ Bt	4	89	5	2 GC ⁸
T8	⁵ Bt	4	91	5	S/A ⁹

¹T : Tratamiento

²*B.t* GM-10: *Bacillus thuringiensis* cepa GM-10

³ Capsul[®]: almidón modificado

⁴Bt: con *B.thuringiensis*

⁵Bt: sin *B. thuringiensis*

⁶GG Goma Guar

⁷GX: Goma Xantana

⁸GC: Goma Core[®]

⁹S/A: sin aditivo

polímeros Capsul®-Gelatina (T4+Bionex®); un adherente comercial (Bionex®, Arysta LifeScience, Méx.) sin *B. thuringiensis* y la mezcla de polímeros Capsul®-Gelatina(T8+Bionex®); y por último un formulado comercial (Dipel®). Todos los portaobjetos se llevaron a peso constante, después se humedecieron ligeramente y se les aplicó por extensión en superficie, 20 mg del tratamiento a evaluar en cada portaobjeto, estos se dejaron secar por 24h a temperatura ambiente y luego se lavaron con 25 mL de agua bidestilada por portaobjeto. Una bureta de 100 mL se utilizó para esto, a un flujo constante. Para obtener el peso remanente adherido de cada tratamiento, se secaron en una estufa a 40°C y luego se pesaron. Los resultados se analizaron con ANDEVA, así como una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), donde se comparó la media del peso adherido y su error estándar con SPSS Statistics (SPSS Inc., versión 17.0, IBM®, New York).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto tóxico de *B. thuringiensis* cepa GM-10 para *H. cunea* (Tabla 2) donde una dosis de 0.007 ng cm⁻² se observó como la concentración adecuada para eliminar el 50% de la población (CL₅₀), mientras que la CL₉₀ fue 0.058 ng cm⁻², y la TL₅₀ fue de 80.83 h (3.3 d). Estos resultados se consideran apropiados para el control de esta plaga; aunque se trata del ingrediente activo sin formular, partiendo de este dato como referencia para compararlo con el formulado pasando por proceso de microencapsulación. Resultados similares de CL₅₀ se obtuvieron para la cepa HD-1, sin embargo, el TL₅₀ se extiende más de 5 días para matar la mitad de la población.

En estudios similares con otros lepidópteros se reportó la CL₅₀ para cepas aisladas del estado de Yucatán, México donde reporta una CL₅₀ de 108.1319 ng cm² para la cepa nativa yuc-5 de *B. thuringiensis* con actividad insecticida sobre larvas de *Trichoplusia ni* (Ornelas-Pérez *et al.*, 2013). En otro estudio, se reportan valores de CL₅₀ de 137.2 y 197.2 ng cm⁻² sobre *Spodoptera frugiperda* (Vázquez-Ramírez *et al.*, 2015).

La búsqueda de nuevas cepas de *B. thuringiensis* y su actividad insecticida siempre será importante si se considera el grado de adaptación de las especies de la clase insecta. El conocimiento que se tiene es resultado de programas para la caracterización de nuevas serovariedades capaces de expresar proteínas insecticidas con altos grados de toxicidad (Muñoz-Celaya *et al.*, 2012). En nuestro estudio se seleccionaron dos cepas de la colección de *B. thuringiensis*, la cepa HD-1 y GM-10 pertenecientes a las variedades *kurstaki* y *aizawai*, respectivamente.

La cepa HD-1 se considera un estándar comercial de la variedad *kurstaki* (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017), esta cepa resultó relevante debido a que presentó una toxicidad de 20 hasta 200 veces mayor que las cepas conocidas. Lo cual la convirtió en la base de la mayor parte de los productos comerciales contra diversas plagas de insectos lepidópteros de importancia en agricultura, mientras que la cepa GM-10 var. *aizawai* es una cepa nativa del noreste de México que ha mostrado actividad insecticida sobre lepidópteros como *Diatrea saccharalis* (Rosas-García *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos muestran que la cepa GM-10 presentó una mayor toxicidad que la cepa HD-1 así como un tiempo letal menor que el estándar por lo cual se seleccionó como la idónea para los ensayos de formulación.

Tabla 2. Concentración y tiempo letal de *H. cunea* a la toxina activa de *B. thuringiensis*.

Cepa		Susceptibilidad (95% CL) ¹	pendiente ± EE	X ² (gl) ²	(X ² /gl) ³
HD-1	CL ₅₀ ⁽⁴⁾	0.010 (0.004-0.016)	1.62±0.48	1.20 (4)	0.300
	CL ₉₀ ⁽⁴⁾	0.060 (0.032-0.435)			
	TL ₅₀ ⁽⁵⁾	125.04 (107.15-158.40)	2.57±0.36	1.10 (3)	0.366
GM-10	CL ₅₀ ⁽⁴⁾	0.007 (0.001-0.013)	1.39±0.46	1.073 (4)	0.268
	CL ₉₀ ⁽⁴⁾	0.058 (0.029-0.739)			
	TL ₅₀ ⁽⁵⁾	80.83 (68.43-98.92)	1.97±0.28	0.39 (2)	0.196

¹LC: límites de confianza

²(gl): grados de libertad

³(X²/gl): heterogeneidad

⁴CL: concentración letal expresada en nanogramos de proteína activa de Bt/cm² de dieta artificial

⁵ TL: tiempo letal expresado en horas

El mecanismo de acción de *B. thuringiensis* como insecticida se basa en la producción de un cuerpo paraesporal conocido como cristal de naturaleza proteínica el cual está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas o proteínas Cry, y para que un insecto susceptible pueda morir por la acción de estas toxinas es necesario que sean ingeridas debido a que tienen afinidad por las células del epitelio intestinal donde se activan y causan una serie de poros al provocar un desequilibrio osmótico una vez que se insertan en la membrana provocando la muerte del insecto (Xu *et al.*, 2014).

Debido a este mecanismo donde es necesaria la ingestión del ingrediente activo en el caso de lepidópteros se considera esencial el uso de fagoestimulantes para asegurar la ingestión por parte del insecto para evitar que el insecto ingiera dosis subletales del patógeno lo que ocasiona baja mortalidad (Rosas-García, 2008). Estas sustancias tienen como función estimular la ingestión por medio del gusto ya que un sabor agradable para el insecto blanco se considera esencial para la correcta actividad del entomopatógeno en cuestión, en este caso, de *B. thuringiensis*.

En este estudio los ensayos para seleccionar los fagoestimulantes mostraron que la principal atracción del insecto es hacia la hoja de cenizo, además el análisis estadístico, mostró alta diferencia significativa entre los soportes utilizados ($p \leq 0.001$). Después por medio de la prueba de Tukey se verificó esta diferencia al agrupar varios niveles de significancia, donde el polvo de hoja de cenizo fue el fagoestimulante con mayor aceptación por las larvas de *H. cunea*, reportándose medias de hasta 6.14 larvas atraídas.

El polvo de hoja de mora también resultó significativo con 5.17 larvas atraídas, sin embargo, el cenizo fue el seleccionado para continuar con los estudios de formulación y microencapsulación. En este ensayo se utilizaron hojas de nogal fresco solo como testigo (Tabla 3).

Una importante cantidad de sustancias se han probado como fagoestimulantes obteniéndose resultados diferenciados dependiendo de la naturaleza del compuesto y del insecto a tratar, incluso existen productos que son comercializados con este fin como por ejemplo Coax[®], Pheast[®], Entice[®], Gusto[®], Konsume[®], Mo Bait[®] los cuales han sido evaluados en diversos estudios sobre lepidópteros de importancia agrícola, sin embargo, la respuesta a cada uno de estos productos puede variar de un insecto otro (Rosas-García, 2008).

Tabla 3. Selección de los soportes granulares con carácter de fagoestimulante para *Hyphantria cunea*.

Suporte fagoestimulante	Media del número de larvas \pm EE ¹	Rango de preferencia
Hoja de Nogal fresca	8.62 \pm 0.241 ^a	T ²
Cenizo	6.14 \pm 0.403 ^b	1 ^o
Mora	5.17 \pm 0.460 ^{bc}	2 ^o - 3 ^o
Coax [®]	4.64 \pm 0.425 ^{bcd}	2 ^o - 3 ^o - 4 ^o
Cáscara de nuez	4.48 \pm 0.396 ^{bcd}	2 ^o - 3 ^o - 4 ^o
Níspero	4.17 \pm 0.420 ^{cd}	3 ^o - 4 ^o
Nogal	3.57 \pm 0.358 ^{cd}	3 ^o - 4 ^o
Polímero	3.05 \pm 0.432 ^d	4 ^o

Los tratamientos con letras distintas tuvieron diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$).

¹ EE: error estándar

² T: Testigo

La búsqueda de fagoestimulantes adecuados es uno de los retos a superar para lograr que una formulación que además de poseer características de toxicidad aceptable tenga la palatabilidad suficiente para ser atractiva para el insecto blanco. En otro trabajo similar se estudiaron las preferencias alimenticias del gusano de la bolsa *Thyridopteryx ephemeraeformis* (Lepidoptera: Psychidae) en larvas de primer estadio en la elección de hospederos y larvas de penúltimo instar mediante dos pruebas de elección. Los resultados mostraron una preferencia general por el sauce negro (*Salix nigra* Marshall) por parte de las larvas de primer estadio independientemente del hospedero de origen; mientras que las larvas de penúltimo estadio mostraron preferencia por el hospedero de cría anterior, lo cual sugiere la inducción de preferencia del hospedero (Ward *et al.*, 1990).

En este estudio las larvas de *H. cunea* mostraron una preferencia general, no inducida, lo que garantiza que el fagoestimulante elegido presentará el efecto deseado en la formulación, es decir, la atracción del mayor número de larvas posibles. Además del uso de fagoestimulantes un formulado requiere un soporte inerte para el ingrediente activo, el cual generalmente es un polímero (Rosas-García, 2008). Los polímeros como la gelatina, almidón, celulosa, alginatos, entre otros han sido de los más extensamente estudiados para la microencapsulación debido a sus excelentes propiedades como su biocompatibilidad y baja toxicidad (Khorramvatan *et al.*, 2014).

La selección del vehículo utilizado como soporte en una formulación se considera uno de los puntos críticos ya que su correcta elección va a estar relacionado con su capacidad residual. Numerosos

Tabla 4. Evaluación de los formulados asperjados sobre la preferencia alimenticia de *Hyphantria cunea*.

Tratamientos	Formulados	Media del número de larvas \pm EE ⁸	Rango de preferencia
Testigo	Hoja de Nogal	7.63 \pm 0.497 ^a	1°
8	Bt S/A ¹	4.78 \pm 0.470 ^b	2°
1	Bt GG ²	4.70 \pm 0.474 ^b	2°
3	Bt GC ³	4.68 \pm 0.487 ^b	2°
5	sBt GG ⁴	3.93 \pm 0.484 ^b	2°
2	Bt GX ⁵	3.70 \pm 0.481 ^b	2°
4	Bt S/A ¹	3.48 \pm 0.442 ^b	2°
7	sBt GC ⁶	3.15 \pm 0.363 ^b	2°
6	sBt GX ⁷	2.85 \pm 0.503 ^b	2°

¹Bt S/A: Sin *B. thuringensis*/sin aditivo

²Bt GG: *B. thuringensis*+ Goma guar

³Bt GC : *B. thuringensis*+ Goma Core[®]

⁴ sBt GG : Sin *B. thuringensis* + Goma guar

⁵Bt GX : *B. thuringensis*+Goma xantana

⁶sBt GC : Sin *B. thuringensis*+Goma Core[®]

⁷sBt GX : Sin *B. thuringensis*+Goma xantana

⁸EE: error estándar; Los tratamientos con letras distintas tienen diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

trabajos han hecho uso de los polímeros como el soporte idóneo (Rosas-García *et al.*, 2004; Rosas-García y de Luna Santillana, 2006; Torres-Ortega *et al.*, 2006), en este estudio se seleccionaron como soportes una mezcla de Capsul[®] y gelatina bovina, y como aditivos la goma guar, goma xantana y goma core[®]. El Capsul[®] es un almidón modificado utilizado para la encapsulación en la industria alimentaria, mientras que la gelatina bovina es un polímero de naturaleza proteica empleado como aditivo con propiedades de adherencia.

Las gomas generalmente son polisacáridos utilizados en la industria alimentaria para espesar y estabilizar alimentos, además de mejorar la retención de humedad. Un buen soporte para formulación posee ciertas características una de las importantes incluye proteger al ingrediente activo

para que este pueda llegar intacto a su blanco, otra característica básica, en el caso de formulaciones comestibles es que no debe modificar la palatabilidad. La formulación es la combinación de sustancias de tal manera que el activo, a la par de los aditivos y/o adyuvantes, formen un producto estable, y de fácil aplicación.

En el ensayo de preferencia alimenticia de los formulados el análisis estadístico mostró alta diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.001$); y la prueba de Tukey arrojó dos niveles de significancia (Tabla 4). Esta diferencia estuvo dada principalmente por el control positivo ya que solo presentó dos niveles de significancia, uno correspondiente al control y el otro nivel a los tratamientos que contuvieron el fagoestimulante seleccionado, observándose que entre estos no existieron diferencia significativa, aun así los tratamientos 8, 1 y 3, en este orden, fueron los que atrajeron más larvas respecto a los demás, sin embargo el tratamiento 8 es el correspondiente al formulado sin *B. thuringiensis* y sin aditivo agregado, pero con fagoestimulante en su preparación.

La microencapsulación de los que sí contienen aditivo podría evitar la atracción por parte del insecto por lo que es necesario comparar si la presencia de estos inhibe la atracción de las larvas a alimentarse. Por lo anterior, se realizó también una comparación entre los formulados con los aditivos sin *B. thuringiensis* para medir la aceptación de un aditivo en particular por las larvas de *H. cunea* y no se encontró diferencia significativa. El número de larvas mayormente atraídas ocurrió en T5 el cual tuvo como aditivo la goma guar con un promedio de 43.1% de larvas atraídas, mientras que el tratamiento con goma core[®] y goma xantana mostraron respectivamente 39.1 y 32.8% de larvas atraídas ($p = 0.094$).

En otro estudio similar se diseñaron diversas matrices microencapsulantes a partir de compuestos naturales biodegradables y se evaluó su actividad fagoestimulante contra *Argyrotaenia sp.*, un lepidóptero plaga del aguacate. Los autores encontraron la misma tendencia, es decir, que los soportes o aditivos de la formulación no influyeron en la preferencia de larvas; mientras que el fagoestimulante si estableció diferencias en consumo mayor o menor que el formulado (Rosas-García y de Luna-Santillana, 2006). Estos resultados indican que el éxito del formulado en lo que respecta a la ingestión depende en gran medida del fagoestimulante utilizado, tal como se comprobó en nuestro estudio.

Tabla 5. Actividad insecticida de las formulaciones asperjables de *B. thuringiensis* GM-10 contra *Hyphantria cunea*.

Tratamientos	Composición (%) ⁶	⁽¹⁾ CL ₅₀ (95% LC) ²	Pendiente ± EE ³	X ² (gl) ⁴	(X ² /gl) ⁵
T1	⁷ <i>B.t</i> G.M-10 (10), Cenizo (4), Capsul (79), Gelatina (5), Goma guar (2)	0.047 (0.021-0.126)	1.33±0.26	5.47 (5)	1.09
T2	⁷ <i>B.t</i> G.M-10 (10), Cenizo (4), Capsul (79), Gelatina (5), Goma xantana (2)	0.041 (0.026-0.070)	1.57±0.27	4.33 (6)	0.722
T3	⁷ <i>B.t</i> G.M-10 (10), Cenizo (4), Capsul (79), Gelatina (5), Goma core [®] (2)	0.044 (0.026-0.092)	1.98±0.33	6.86 (6)	1.144
T4	⁷ <i>B.t</i> G.M-10 (10), Cenizo (4), Capsul (79), Gelatina (5)	0.016 (0.006-0.035)	1.38±0.32	7.57 (6)	1.26

¹ CL₅₀: Concentración letal expresada en nanogramos de proteína activa de Bt cm⁻² de dieta artificial.

²LC: límites de confianza

³EE: error estándar

⁴ gl: grados de libertad

⁵ X² /gl: heterogeneidad

⁶ %: porciento

⁷*B.t* G.M-10: *Bacillus thuringiensis* cepa GM-10

Además, se analizaron los tratamientos asperjados que contenían 10% de *B. thuringiensis* (Tabla 5) para determinar si se mantuvo la actividad insecticida después de pasar por las altas temperaturas del aspersor, y la CL₅₀ encontrada se mantuvo en valores por debajo de 0.05 ng de Bt/cm². El tratamiento 4, el cual no contenía aditivo, presentó la mejor actividad tóxica con 0.016 ng de Bt/cm², manifestando que la actividad insecticida de los tratamientos no se ve afectada por el proceso de secado.

En un estudio similar se prepararon formulados en gránulos, con Capsul[®], pectina y gelatina como soportes; el ingrediente activo en concentraciones del 3-10 % donde se encontró que la formulación del 3 % del complejo spora-cristal fue tan efectivo como el control comercial Dipel[®] formulado al 20%. Estas reducciones en el porcentaje del ingrediente activo y el mantenimiento o aumento de la actividad toxica mostraron que cuando se conjuntan el soporte y el principio activo adecuados las formulaciones pueden mejorar la efectividad del formulado (Torres-Ortega *et al.*, 2006).

Debido a que en el proceso de secado por aspersión la muestra entra en contacto con el aire caliente del secado, se consideró adecuado corroborar la viabilidad después del proceso de microencapsulación. Los resultados mostraron que

los formulados elaborados con *B. thuringiensis* no presentaron pérdida de viabilidad manteniendo promedios de 11.6 a 13.8 UFC/mL⁻¹. Esto asegura que el proceso de microencapsulación es seguro y confiable para la elaboración de este tipo de formulados.

Otro parámetro que se considera importante en la elaboración de una formulación para lepidópteros es la adherencia debido a que la determinación de éste en el desarrollo de formulaciones de *B. thuringiensis* asperjables y con características adherentes, tiene como finalidad la formación de una película con el plaguicida encapsulado sobre la superficie de la hoja que logre garantizar una actividad residual mayor, aún en temporada de lluvias, lo cual puede ser de gran ayuda cuando se trata de cultivos de campo. En este estudio se evaluaron las propiedades adherentes de los diferentes formulados en portaobjetos.

El tratamiento 2 (Bt GX), presentó la mejor adherencia con el mayor peso de partículas adheridas al portaobjetos, con un solo nivel de significativa con respecto al resto de los tratamientos incluyendo al adherente comercial. Entre los diferentes tratamientos existió una alta diferencia significativa ($p \leq 0.001$) y la prueba de Tukey, mostró tres niveles de significancia (Tabla 6), donde nueve de los formulados compartieron el mismo nivel.

Tabla 6. Determinación de las propiedades adherentes de los formulados asperjados y comerciales.

Tratamientos	Composición	¹ Media ± EE ²	Rango de Adherencia
³ T2	Bt +GX	3.19 ± 2.02 ^a	1°
⁴ Bionex®	¹⁵ n/a	1.32 ± 0.96 ^b	2°
⁵ T6	sBt +GX	0.88 ± 1.01 ^{bc}	3°
⁶ T3	Bt+ GC	0.80 ± 0.37 ^{bc}	4°
⁷ Bionex® +Bt	¹⁵ n/a	0.68 ± 1.09 ^{bc}	5°
⁸ T5	sBt+ GG	0.48 ± 0.29 ^{bc}	6°
⁹ T7	sBt+ GC)	0.45 ± 0.35 ^{bc}	7°
¹⁰ T4	Bt+ S/A	0.36 ± 0.13 ^{bc}	8°
¹¹ DIPEL®	¹⁵ n/a	0.32 ± 0.10 ^{bc}	9°
¹² T8	sBt +S/A	0.31 ± 0.17 ^{bc}	10°
¹³ T1	Bt +GG	0.24 ± 0.14 ^{bc}	11°
¹⁴ Testigo	¹⁵ n/a	0.00 ± 0.01	12°

¹Media del peso adherido (mg) a los portaobjetos

²EE: error estándar

³T2 (Bt +GX): *B. thuringensis*+Goma xantana

⁴Bionex®: Adherente comercial

⁵T6 (sBt +GX): Sin *B. thuringensis*+Goma xantana

⁶T3 (Bt+ GC): *B. thuringensis*+ Goma Core®

⁷Bionex® +Bt: Adherente commercial + *B. thuringensis*

⁸T5 (sBt+ GG): Sin *B. thuringensis* + Goma guar

⁹T7 (sBt+ GC): Sin *B. thuringensis*+Goma Core®

¹⁰T4 (Bt+ S/A): *B. thuringensis*/sin aditivo

¹¹DIPEL®: formulado comercial

¹²T8 (sBt +S/A): Sin *B. thuringensis*/sin aditivo.

¹³T1 (Bt +GG): *B. thuringensis*+Goma guar

¹⁴Testigo: Agua destilada estéril

¹⁵n/a: No aplica

Los tratamientos con letras distintas tienen diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

Los experimentos diseñados para determinar la susceptibilidad de la cepa GM-10 han demostrado que *B. thuringensis* controla eficazmente a *H. cunea*, con resultados prometedores para usarse en el control de esta plaga. La microencapsulación por la técnica de secado por aspersión sobre la cepa GM-10 mostró que el cenizo fue el mejor fagoestimulante de acuerdo con el número de larvas atraídas, razón por la cual se eligió para los ensayos de formulación. El formulado diseñado consistió en una mezcla de polímeros (Capsul®-gelatina) como base y de acuerdo con los resultados obtenidos en ensayos de adherencia la goma xantana mostró los mejores resultados en este rubro, demostrando que con la técnica y los materiales utilizados es posible obtener un producto final con actividad tóxica sobre larvas de *H. cunea* el cual en futuras investigaciones deberá ser evaluado en invernadero y campo para validar su efectividad en las condiciones más cercanas a las que tendría en su uso extensivo.

Funding. No financial support was received from any organization to conduct this research.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest related to this publication.

Compliance with ethical standards. The research work did not involve experimentation with human subjects. The work was carried out in accordance with the respective regulations of the Institute of Biotechnology of the Faculty of Biological Sciences at the facilities of the Autonomous University of Nuevo León.

Data availability. The data is available with the corresponding author (isela.quintero@uanl.edu.mx) upon duly justified request.

Author Contribution Statement (CRediT). L.L. Palacios-Cortez- Investigation, Writing-original draft, Data curation., F.L. Gandarilla-Pacheco- Conceptualization, Writing- review& editing., L.H. Morales-Ramos -Methodology, Supervision, Resources., S.M. Salcedo-Martínez- Formal analysis, Resources., M. Elías-Santos- Conceptualization, Validation., M.E. Alemán-Huerta- Software, Visualization., I. Quintero-Zapata- Supervision, Project administration, Resources.

REFERENCIAS

- Cervantes-Vázquez, M.G., Orona- Castillo, I., Vázquez -Vázquez C., Fortis- Hernández M. y Espinoza-Arellano J.J. 2018. Análisis comparativo de huertos de nuez pecanera (*Carya illinoensis* Koch en la Comarca Lagunera. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9, pp. 25-35. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.845>.
- Chong-Rodríguez, M.J., Maldonado-Blanco, M.G., Hernández- Escareño, J.J., Galán-Wong, L.J. and Sandoval-Coronado, C.F. 2011. Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability, and toxic activity using different liquid media. *African Journal of Biotechnology*, 10, pp. 5736-5742. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2264>.
- Edosa, T. T., Jo, Y. H., Keshavarz, M., Sang Anh, Y., Young Noh, M. and Han Y. S. 2019. Current status of the management of fall webworm *Hyphantria cunea*: Towards the integrated pest management development. *Journal of Applied Entomology*, 143, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1111/jen.12562>.
- Iracheta, M. M., Pereyra-Alfárez, B., Galán-Wong, L. J. and Ferré J. 2000. Screening for *Bacillus thuringiensis* crystal proteins active against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76, pp. 70-75. doi: 10.1006/jipa.2000.4946.
- Khorramvatan, S., Marzban, R., Ardjmand, M., Safekordi, A. and Askary, H. 2014. The effect of polymers on the stability of microencapsulated formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Bt-KD2) after exposure to ultraviolet radiation. *Biocontrol Science and Technology*, 24, pp. 462-472. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.871503>.
- Muñoz-Celaya, A.L., Ortiz-García, M., Vernon-Carter, E.J., Jauregui- Rincón, J., Galindo, E. and Serrano-Carreón, L. 2012. Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices. *Carbohydrate Polymers*, 88, pp. 1141-1148. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.030>.
- Ornelas-Pérez, J.F., Maldonado-Blanco, M.G., Pérez-González, O., Elías-Santos, M., Lozano- Contreras, M.G. y Sandoval-Coronado, C.F. 2013. Evaluación de la actividad tóxica de cepas nuevas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de Yucatán contra *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomología Mexicana*, 12, 376-380. <http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2013/CB/376-380.pdf>.
- Polo Plus: Probit and Logit analysis. *LeOra Software*, Petaluma, CA, 2003.
- Reyes-Vázquez, N.C. y Morales-Landa, J.L. 2019. *Agronomía sustentable y aprovechamiento alternativo de la nuez*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (<https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/671/1/LIBRO%20NUEZ%20Noreste.pdf>).
- Ríos-Díez, J.D., Siegfried, B. and Saldamando-Benjumea, C.I. 2012. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from central Colombia to Cry1Ab and Cry1Ac Entotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*, 3, pp. 281-293. <https://doi.org/10.3958/059.037.0304>.
- Rosas-García, N.M. 2008. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Entomología*, 10, pp. 49-63. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77610105>
- Rosas-García, N.M. y de Luna-Santillana, E. J. 2006. Diseño de una matriz microencapsulante a partir de compuestos biodegradables para la elaboración de un bioinsecticida. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 22, pp. 135-142. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37022304>.
- Rosas-García, N.M., Arévalo-Niño, K., Galán-Wong, L.J. and Morales-Ramos, L.H. 2004. Evaluation of feeding stimulants combined with polymers to develop formulations against *Diatraea saccharalis* (F). *Southwestern Entomologist*, 29, pp. 153-158.
- Schowalter, T.D. and Ring, D.R. 2017. Biology and management of the fall webworm, *Hyphantria cunea* (Lepidoptera:

- Erebidae). *Journal of Integrated Pest Management*, 8, pp. 1-6. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmw019>.
- Saruhan, I., Akça, İ. and Kushiyeve, R. 2014. Toxicity of some biopesticides to the Fall Webworm, *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 24, pp. 255-257.
- Torres-Ortega, J. A., Rosas-García, N. M., Garza-Molina, R. y Leal-Castillo, M. 2006. Diseño de una formulación insecticida biodegradable a base de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista TuRevista Digi.U@t*, 5, 26.
- Vázquez-Ramírez, M. F., Rangel-Núñez, J. C., Ibarra J. E. y del Rincón-Castro, M. C. 2015. Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. *Interciencia*, 40, pp. 397-402. <http://www.redalyc.org/pdf/339/33938675006.pdf>.
- Vemmer, M. and Patel, A. 2013. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67, pp. 380-389. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>.
- Villarreal-Delgado, M.F., Villa-Rodríguez, E.D., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Parra-Cota, F.I. y De los Santos-Villalobos S. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36, pp. 95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>.
- Ward, K.E., Ramaswamy, S. and Nebeker T.E.1990. Feeding preferences and their modification in early and late instar larvae of the bagworm, *Thyridopteryx ephemeraeformis* (Lepidoptera: Psychidae). *Journal of Insect Behavior*, 3, pp.785-795.
- Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z. and Sun M. 2014. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, 6, pp.2732-2770. <https://doi.org/10.3390/toxins6092732>.
- Xu, C., Wei, H., Wang, L., Yin, T. and Zhuge Q. 2019. Optimization of the cry1Ah1 sequence enhances the hyper-resistance of transgenic poplars to *Hyphantria cunea*. *Frontiers Plant Science*, 10, pp. 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00335>.
- Zhang, Y., Zhao, D., Yan, X., Guo, W., Bao, Y., Wang W. and Wang X. 2017. Identification and characterization of *Hyphantria cunea* aminopeptidase n as a binding protein of 1 Cry1Ab35 Toxin. *International Journal of Molecular Science*, 18, pp. 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms18122575>.