

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE
VALPARAÍSO**

Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas

Instituto de Química

Tesis Para Optar al Grado de Licenciado en Química y Químico Industrial

**Desarrollo de Formulaciones de Pesticidas Botánicos
Derivados de Plantas Endémicas de la V Región**

Por :

Brunella Moggia Costa

Profesor Guía : Gonzalo Buono-Core Varas

Enero, 2001

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía Dr. Gonzalo Buono-Core V., por su gran apoyo, comprensión y confianza brindada a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A todo el personal del INIA de La Cruz, especialmente a la Sra. Alejandrina Ubillo y al Dr. Robinson Vargas M.

A mi amiga Vanessa Nuñez O., por su ayuda y por dedicar parte de su tiempo en el desarrollo de esta investigación.

A Sandro Nattero A., por sus aportes en el desarrollo escrito de esta tesis.

A mis padres y amigos que de alguna manera me apoyaron en este año.

Un agradecimiento especial al Gobierno Regional de la V Región por el financiamiento otorgado a esta tesis en el marco del programa del Fondo Nacional de Desarrollo Regional denominado "Aplicación Sistema de Financiamiento de Tesis Universitarias de Interés Regional", Código BIP N° 20124267-9.

RESUMEN

En esta tesis se estudió el desarrollo de distintos tipos de formulaciones de pesticidas botánicos a partir de extractos florales refinados de *Chrysanthemum coronarium*, como ingrediente activo.

Con el propósito de optimizar y estandarizar el proceso de refinamiento se obtuvieron extractos refinados con distintas cantidades de carbón activo, los que fueron caracterizados y sometidos a bioensayos para evaluar su eficiencia.

Se realizaron estudios sobre las propiedades químicas y físicas del extracto refinado, con el fin de determinar las condiciones adecuadas para el proceso de formulación.

Se elaboraron tres tipos de formulaciones líquidas a partir de un extracto refinado de *C. coronarium* como ingrediente activo, líquido miscible (LM), concentrado emulsionable (CE) y aerosol (A). Los mejores resultados se obtuvieron con solventes isoparafínicos y emulsificantes del tipo no-iónico.

Para evaluar la efectividad de las distintas formulaciones elaboradas se realizaron ensayos de eficiencia de tipo semicampo en plantas de poroto sobre estados adultos de Arañita bimaclada *Tetranychus urticae*. Se encontró que la más efectiva a una concentración de 5000 ppm es el concentrado emulsionable, formulada con el emulgador Dioleato de Polietilenglicol 400, con la cual se logró un 83 % de mortalidad a las 72 horas de aplicación.

No se observaron efectos fitotóxicos de las formulaciones sobre plantas de poroto.

CAPITULO 1. INTRODUCCION

Los insectos son los organismos vivientes más numerosos existentes en el planeta, y junto con un millón de especies descritas, constituyen alrededor de un 70% de todas las especies animales. Cercano al 1% es considerada una peste, las que atacan a humanos y animales domésticos transmitiendo enfermedades a éstos y plantas, destruyendo estructuras y compitiendo con el útil aprovisionamiento de alimentos. [1]

El método más utilizado en el control de plagas es el control químico el cual usa productos químicos para reducir o evitar el impacto negativo de insectos y otras plagas. Entre los productos se cuentan repelentes, atrayentes, quimioesterilizantes y pesticidas. [2]

Los pesticidas son productos que afectan al organismo tratado. De acuerdo al organismo que afectan se diferencian, pero debemos tener claro que los pesticidas que afectan a los insectos tienden a ser más tóxicos para el ser humano. Por esta razón es que se ha intensificado la búsqueda de pesticidas selectivos, con un bajo impacto ambiental y baja toxicidad en animales.

De acuerdo al organismo que afectan, los pesticidas se distinguen en: [2]

acaricidas (ácaros)

insecticidas (insectos)

molusquicidas (moluscos)

nematocidas (nemátodos)

rodenticidas (roedores)

fumigantes (amplia acción)

fungicidas (hongos)

bactericidas (bacterias)

viricidas (virus)

herbicidas (malezas)

Los insecticidas pueden clasificarse también según el sitio de acción:

Sistema nervioso: afectando el desarrollo normal de los potenciales de acción (impulso nervioso) por:

- a) Cambio en el potencial de membrana (hiperpolarización o depolarización mantenida)
- b) Inhibición del incremento de la permeabilidad del sodio.
- c) Inhibición de la disminución de la permeabilidad del sodio y aumento de la permeabilidad del potasio.
- d) Efectos sobre la transmisión sináptica.

Formación de la cutícula: Muchos artrópodos sufren procesos de mudación para renovar su exoesqueleto, este proceso es crítico ya que se producen muchos cambios fisiológicos, los cuales pueden ser alterados para fines de control de plagas. Existen algunos productos que cumplen esta función, los cuales alteran el proceso de muda impidiendo el buen desarrollo de ésta, produciendo así individuos mal desarrollados e inmaduros.

Imitadores e inhibidores de hormonas: Las hormonas juveniles (HJ) impiden al insecto madurar, así aplicándose HJ exógena a un insecto en el momento en que normalmente está ausente resulta en un desarreglo de la morfogénesis del adulto, como por ejemplo inhibición de la metamorfosis, adultos estériles. Este método de control es adecuado para las nuevas exigencias en cuanto a insecticidas, ya que sólo se produce daño en los artrópodos debido a que el sistema alterado es exclusivo de éstos.

Feromonas: Muchas fases del desarrollo del insecto o ácaro son estimulados y controlados por compuestos químicos; por ejemplo, la localización de la comida; sitios de ovoposición y parejas sexuales; alimentación; copulación; colocación de huevos y otros. [3]

Así se han creado y sintetizado compuestos que imitan estos efectos pero de una manera que interfieran en el desarrollo normal del artrópodo. Generalmente estos compuestos sintéticos son incluidos en cebos que además

poseen insecticidas, patógenos, etc, o simplemente son usados solos para evitar la localización de la pareja por saturación del ambiente con feromonas sexuales sintéticas.[4]

Los insecticidas pueden también clasificarse según su origen químico, sea este orgánico o inorgánico.

1.1 Insecticidas inorgánicos.

Estos productos han sido gradualmente reemplazados por los organosintéticos. Son relativamente no específicos y se deben emplear en grandes cantidades. Entre ellos están los arsenicales (arseniato de plomo, arseniato de calcio, arsenito de sodio) y los fluoruros inorgánicos (fluoruro de sodio, criolita). [2]

1.2 insecticidas orgánicos.

Aceites:

Los aceites minerales son productos derivados del petróleo y actúan por contacto. Entre estos se distinguen los Aceites de verano, altamente refinados y aplicables a árboles de hoja persistente, como los cítricos, con follaje, los Aceites de invierno, solamente aplicables a árboles en dormancia, sin hojas, prácticamente ya no se comercializan, y los Aceites superiores o supremos, que son menos fitotóxicos y más efectivos como insecticidas. Por ejemplo, se pueden aplicar en manzanos con "puntas verdes" para controlar áfidos, escamas y arañitas. Los aceites de mayor uso actual son de este tipo.

Se aplican diluidos en agua, formando una emulsión, en dosis de 1 a 3 ó más por ciento de aceite. Hay formulaciones de aceites emulsibles, las cuales requieren previa agitación en poca agua antes de vaciar al estanque; y también de aceites miscibles, las cuales producen una rápida emulsión con agua y no requieren de previa agitación. La calidad de los aceites se mide por su viscosidad, rango de destilación o ebullición y la tasa de residuo sulfonado. Los aceites de baja viscosidad son más seguros para usar que los de alta viscosidad. La fitotoxicidad aumenta a medida que crece el rango de destilación. El residuo no sulfonado se expresa en porcentaje y mide el grado de pureza. Los aceites de invierno tienen 50 a 90% de residuo no sulfonado, y los de verano 90 a 96%. [1] [2]

Insecticidas botánicos :

Estos productos se obtienen de plantas. Rotenona, piretro y neem son tres ejemplos. Rotenona proviene de plantas del género *Derris* y es bastante recomendada para diversos cultivos. El piretro se obtiene de plantas del género *Chrysanthemum* y ha sido ampliamente empleado en casas, industrias y almacenes por su baja toxicidad, amplia acción y rápido poder derribante. Sin embargo, presenta problemas de estabilidad ya que se hidroliza rápidamente en medio alcalino y es descompuesto por la luz.

Existe también una variedad de plantas que proporcionan insecticidas. De las flores, hojas y raíces pueden ser extraídos principios tóxicos y utilizados solos o en mezcla con otros tóxicos o compuestos auxiliares, como lo son los sinergistas. [1] [2] [4] [6]

Algunas plantas presentan mecanismos de defensa natural contra predadores y patógenos al producir sustancias que les protege contra ellos. Dichas sustancias pueden atacar bacterias dañinas, repeler insectos o interferir en sus ciclos reproductivos, evitar que germinen esporas de hongos y en muchas otras formas; actúan como protección natural de las plantas. Una nueva tendencia en la investigación de pesticidas consiste en aislar estas sustancias naturales de defensa, estudiar como actúan y después utilizarlas como pesticidas o bien diseñar insecticidas sintéticos, con base en las estructuras de estas sustancias.

El uso de los insecticidas botánicos ha declinado desde 1966 en los Estados Unidos en el cual alcanzo su mayor consumo. Actualmente las piretrinas son los únicos insecticidas naturales de uso significativo. [5]

En el ámbito internacional, entre las plantas con actividad plaguicida de mayor éxito, se ha documentado al árbol de Neem o Margosa (*Azadirachta indica*), el cual debido a sus excelentes características de adaptabilidad en diferentes agroecosistemas y efectividad para el combate de más de 200 especies de insectos de importancia económica, ya se encuentra distribuido en muchas partes del mundo. [7]

El aceite de Neem se extrae a partir de las semillas del árbol, que contiene el ingrediente activo *Azadirachtin* un nortriterpenoide perteneciente al grupo de limonoides. *Azadirachtin* posee buenas propiedades como insecticida, fungicida y bactericida, y también ejerce efectos reguladores en el desarrollo de los insectos. Existen en el mercado algunos productos formulados en base a extractos de Neem. Por ejemplo, Azatin-R es comercializado como regulador del crecimiento en insectos y Margosan-OR es utilizado como insecticida doméstico y para la aplicación de plantas ornamentales.

Aunque no se ha establecido con exactitud su modo de acción, se sabe que obstaculiza la muda en los insectos previniendo el normal funcionamiento de la ecdisona (hormona natural en insectos), así como también el desarrollo de la hormona Juvenil (HJ). [5]

Organosintéticos.

Piretroides:

Estos compuestos han sido sintetizados imitando la constitución química del piretro. Hoy tienen amplia aceptación por su rápido poder derribante y hay varios en desarrollo. Los primeros en usarse en Chile sólo actuaban por contacto y no selectivamente, pero están apareciendo nuevos productos con diversas aplicaciones y ventajas. Son poco tóxicos para mamíferos, muy tóxicos para insectos, de persistencia corta y más estables que las piretrinas naturales.

Los piretroides, derivados sintéticos de las piretrinas, típicamente ésteres de ácido crisantémico, son usados extensamente como insecticidas "ideales", debido a su alta potencia, baja toxicidad en mamíferos y alta biodegradabilidad. Sin embargo, el gran problema de estos compuestos es su baja selectividad (daño no solo a plagas, sino que a insectos benéficos también).

Las piretrinas por ser altamente biodegradables, precisan de sinergistas, que son compuestos que potencian la acción del insecticida, inhibiendo sistemas de degradación de la molécula insecticida (sistemas de detoxificación).

Muchos de los insecticidas han dejado de ser utilizados por sus indeseables cualidades para la salud humana como al medio ambiente; o han dejado de ser efectivos por el desarrollo de resistencia, que ha sido especialmente común en los últimos 30 años por el uso extensivo de pesticidas orgánicos sintéticos. [2]
[4]

Por estas razones hay una continua búsqueda de materiales naturales que afecten a los insectos de una manera tal que puedan ser usados en el control de plagas.

Una gran variedad de interacciones insecto-planta significativas, se conocen e involucran componentes de plantas que son tóxicos a insectos. De esta manera se hace necesario un programa de búsqueda de nuevos insecticidas de origen vegetal. Un excelente ejemplo de esto en insecticidas de origen vegetal, es el caso de Piretrina que fue el punto de partida de todos los insecticidas del tipo piretroides.

Dinitrofenoles o dinitros:

Este grupo actúa por contacto e ingestión. Varios de ellos sólo se pueden aplicar a árboles en dormancia, ya que de otra manera son fitotóxicos. El más conocido es el DNOC. [2]

Clorados:

El descubrimiento de la acción insecticida del DDT en 1939, inició un rápido auge en la síntesis de pesticidas, aún cuando ya antes se vendía dinitrocresol (Alemania, 1892) y varios tiocianatos (USA, 1932). Los clorados contienen cloro, hidrógeno, carbono y ocasionalmente oxígeno y azufre. Todos son de contacto y parte importante de ellos tienen mucha persistencia una vez aplicados.

En Chile se ha prohibido la fabricación, comercialización y uso de DDT por acumularse en tejidos grasos de animales superiores, a pesar de poseer muy buenas cualidades como insecticida. Por otra parte, también se ha limitado el uso de un grupo de ellos (casi todos los ciclodienos) por su larga

persistencia que contribuye a contaminar los ecosistemas. Algunos acaricidas clorados tienen uso agrícola hoy. [2]

Organofosforados o fosforados:

Son moléculas que contienen fósforo. En el presente constituyen el grupo más numeroso de los insecticidas organosintéticos y presentan gran versatilidad de usos. Actúan por contacto e ingestión y también sistémicamente. Tienden a ser menos persistentes que los clorados, pero algunos son más tóxicos para el ser humano y sus animales domésticos. [2]

Carbamatos:

Estos compuestos son ésteres del ácido carbámico y similares a los fosforados en cuanto a usos y actividad. Los hay de contacto, ingestión y sistémicos, además de algunos altamente selectivos, como es el Pirimicarb que sólo actúa contra áfidos. [2]

1.3. Forma de penetración.

Se refiere a la manera en que los productos químicos llegan al organismo a controlar. Con frecuencia se habla de "modo de acción" término más adecuado para explicar el mecanismo causante de mortalidad. [2] Se distinguen entre estos:

Pesticidas de contacto. El producto permanece en la superficie aplicada o cae directamente sobre la plaga. Para actuar se requiere contacto y por ello la aplicación requiere buena cobertura.

Pesticidas estomacales, de ingestión o digestivos. El producto requiere ser ingerido por la plaga para actuar. Son efectivos contra plagas masticadoras.

Pesticidas sistémicos. Estos productos penetran en el tejido tratado, para posteriormente traslocarse con la savia a otros órganos de la planta. Son efectivos contra plagas chupadoras.

Pesticidas translaminares. Estos productos penetran la lámina de la hoja pero no tienen actividad sistémica o ésta es muy limitada. Son eficaces para minahojas y la mayor parte de las plagas chupadoras.

Fumigantes. Como ya se indicó, llegan a la plaga como gases tóxicos de gran poder de difusión, razón por la cual se les emplea para plagas de difícil accesibilidad.

1.4. Modo de Acción.

El término se refiere a la forma en que actúa el producto químico para causar la muerte del organismo. Aún cuando se ha investigado mucho en este campo, queda una enormidad por aprender sobre el exacto modo de acción. La razón es que los procesos biológicos son muchos, variados, complejos e interdependientes. Además la acción mortal de un producto puede envolver varios a muchos de dichos procesos. [2] [4] [6]

Venenos físicos. Actúan físicamente, como por ejemplo los aceites minerales que excluyen el aire para la plaga, y otros por acción abrasiva y absorbente corroen el integumento y causan pérdida de humedad (Ejemplo: Silica aerogel).

Venenos Protoplasmáticos. Causan desórdenes en el protoplasma celular, como los arsenicales que precipitan las proteínas.

Inhibidores metabólicos. Alteran el metabolismo de diversas maneras. Los venenos respiratorios desactivan enzimas respiratorias (Ejemplo: denitrofenoles). Otras son: inhibidores de] metabolismo de carbohidratos (Ejemplo: flúor acetato de sodio); análogos hormonales; inhibidores de síntesis de quitina (Ejemplo: diflubenzuron).

Venenos nerviosos o agentes neuroactivos. Este es el grupo más numeroso de insecticidas, actúan de diferentes maneras sobre el sistema nervioso, en pequeñas cantidades.

1.5. Toxicidad

Cabe recordar aquí que los pesticidas son "venenos útiles" y por lo tanto al utilizarlos hay riesgos de envenenamiento. Estos riesgos están estrechamente relacionados con su toxicidad a mamíferos y por ello éste es un aspecto estudiado para cada producto, a través de experimentación con ratas y conejos. En laboratorio se suministra el producto sobre estos animales de diversas maneras para obtener información sobre: [2]

toxicidad oral aguda

toxicidad dermal aguda

toxicidad por inhalación

toxicidad crónica por alimentación.

1.6. Fitotoxicidad.

La fitotoxicidad es también un factor importante que se debe tener presente al seleccionar el pesticida para controlar un determinado problema sanitario. Esta se refiere al daño que el producto o su formulación puede causar a la planta. Varía según la especie o cultivar de planta, el estado de desarrollo de la planta, la temperatura y humedad al momento de la aplicación y poco después, horas o días. Para evitarla se debe, primero leer las indicaciones de fitotoxicidad en la etiqueta, luego usar los pesticidas en los cultivos para los cuales se recomienda, y por último evitar dosis superiores a las indicadas en la etiqueta o recomendadas por los especialistas. [2]

1.7. Sinergismo:

Este término denota la propiedad que tienen ciertos productos de aumentar la toxicidad de algunos pesticidas. La mezcla de dos productos resulta en un efecto letal mayor sobre la plaga, que la suma tóxica de cada componente por separado. Es un fenómeno positivo, ya que se alcanza un control de mayor eficacia, aunque también podría aumentar la toxicidad para mamíferos. Es sinónimo de potenciación. Se habla de activación cuando existe sinergismo de una sustancia no tóxica, a una determinada dosis, pero que aumenta el efecto del tóxico con que va mezclada.

El sinergismo puede teóricamente ocurrir a través de la interacción del sinergista con algunos de los varios procesos que determinan la habilidad del insecticida para penetrar el organismo y ser subsecuentemente transportado al sitio blanco del organismo a la concentración suficiente para causar un efecto tóxico. Sin embargo, muchos de los sinergismos conocidos consisten en la habilidad del sinergista para interferir con el metabolismo de detoxificación del insecticida.

Es sabido que el grado de duración de la acción del insecticida depende de su velocidad de metabolización. Uno de los sistemas de mayor importancia en el metabolismo de insecticidas es la oxidasa de acción múltiple (MFO), que oxida sustratos para hacerlos más polares.

Hay que recordar que los sinergistas en general son compuestos que no son tóxicos o no muestran toxicidad por sí mismos, pero ellos aumentan la toxicidad de un insecticida químico cuando están en combinación con él.

El aceite de sésamo, uno de los primeros sinergistas usados comercialmente, es activo porque contiene sesamin I y sesamolín II. Otro sinergista que es ampliamente usado es el piperonil butóxido y se encuentra en la mayoría de las formulaciones comerciales que contienen piretrinas naturales o piretroides sintéticos. [2] [4] [5] [6]

1.8. Formulaciones

La formulación de un insecticida es el producto final que adquiere el usuario. Consta de:

El ingrediente activo (IA) o producto tóxico propiamente tal (a veces es más de uno),

Un diluyente inerte, que actúa como vehículo o acarreador,

Aditivos: son sustancias químicas que mejoran la estabilidad, uso y eficacia del ingrediente activo en la formulación. [1] [2]

Dentro de los aditivos existen los: Mojantes que reducen la tensión superficial de las gotas de la aspersion y permiten un mejor contacto con el vegetal y mayor cobertura de la superficie tratada; Dispersantes que son sustancias coloidales que retardan la sedimentación, por ejemplo, de polvos mojables; Emulsificantes que facilitan las emulsiones estables al mezclar ciertas formulaciones con agua como por ejemplo jabones y detergentes; Penetrantes, aceites livianos que se agregan para facilitar la penetración de cutículas cerosas de insectos; Humectantes que retardan la evaporación del agua, algo muy frecuente en herbicidas; y por último Adherentes que mejoran la adhesión al follaje.

Para formular un pesticida se deben tener en cuenta las propiedades físicas y químicas del extracto refinado que se utilizará como ingrediente activo ya que este es el que posee las propiedades biológicas , estas son :

Estado físico que define lo que ocurre con nuestro ingrediente activo a temperatura ambiente, condiciona su almacenamiento y nos dan la primera pista de la técnica química en el proceso de formulación .

Punto de fusión que indica la temperatura a la cual el ingrediente activo se vuelve líquido .

Punto de ebullición el que indica la temperatura a la cual el ingrediente activo ebulle, ya que la mayoría de los pesticidas tienen puntos de ebullición bajos, en el proceso de formulación se debe trabajar a una temperatura lejana del punto de ebullición del ingrediente activo.

Densidad que es necesaria conocerla ya que dependiendo de la densidad del ingrediente activo se puede elegir mejor el tipo de formulación a realizar .

Viscosidad que es la capacidad del ingrediente activo a fluir en un volumen y tiempo determinado, esta es importante en todos los funcionamientos de manejos, requisito fundamental para la elección de equipos de aplicación de las formulaciones .

Solubilidad la cual es de gran interés económico, generalmente se desea que la formulación un grado muy alto de solubilidad, para preparar concentraciones altas en solventes económicos como kerosene.

Estabilidad ya que las formulaciones deben resistir efectos de degradación existentes en el almacenamiento , proceso de formulación y en el medio ambiente después de ser aplicadas .

Olor y color estas no tienen mucha importancia en aplicaciones agrícolas , pero si pueden ser significantes en aplicaciones orgánicas , la anulación de estos se debe realizar en el proceso de formulación con agentes enmascaradotes.

Toxicidad esencialmente en mamíferos y fitotoxicidad en plantas. Los solventes afectan considerablemente la fitotoxicidad .

Tamaño de partícula se debe tener en cuenta al realizar formulaciones en polvo o con polvos acarreadores . Se mide en mallas , generalmente se utiliza malla 200 .
[1]

Existen distintos tipos de formulaciones, incluso para un mismo producto, lo que permite seleccionar uno específico para cada situación.

1.8.1. Formulaciones secas

Polvos secos o polvos dísperibles (PD). El ingrediente activo (IA) seco viene en baja concentración, pulverizado o mezclado con polvo inerte (tierra de infusorios, talco, criolita, harina). Tienen uso limitado al follaje, se aplican secos y presentan riesgos de deriva.

Gránulos (G). El IA viene impregnado en gránulos como arena fina (0,2 a 1,5 mm). Vehículos son caolín o tierra de infusorios. Usados en tratamientos al suelo y muy poco en el follaje.

Polvos mojables (PM). El IA sólido va mezclado con polvo acarreador (talco, criolita, trumao cernido) y un agente humectante (que facilita la mezcla en agua). Se aplican como aspersión (rocío) con agua, o como polvos secos mezclados con otros pesticidas o material inerte. Son de amplio uso agrícola, requieren agitación mecánica para no decantar durante la aplicación.

Polvos solubles (PS). El IA y el material acarreador son sólidos. Se asperjan con agua, con la que forman una solución y por lo tanto no requieren agitación.

Cebos tóxicos. El IA va mezclado con una sustancia atractiva para el insecto u otra plaga. Algunos vienen listos para aplicar, a veces en forma de pelets. Otros pueden prepararse poco antes de usar. Son relativamente específicos.

Tabletas. El IA va con material inerte en forma de tableta.

1.8.2. Formulaciones líquidas

Concentrados emulsionables o líquidos emulsibles (CE, LE). El IA viene con un solvente (alcohol, kerosene, hidrocarburos) y un agente

emulsionante. Este ayuda la mezcla con agua (ejemplo: caseinato de Calcio). Se aplican con agua con la cual forman una emulsión. Son de amplio uso agrícola y de fácil dosificación.

Líquidos solubles, concentrado soluble (LS, LM). El IA va con un solvente y un surfactante. Este facilita la mezcla con agua, con la cual forman una solución.

Líquido miscible (LM). El IA en forma líquida se diluye en un solvente orgánico.

Microcápsulas. El IA va en pequeñísimas cápsulas de cera o plástico suspendidas en agua. El IA se libera gradualmente. Su uso va en aumento, especialmente para aplicaciones al suelo y aéreas.

Suspensiones dispersibles o concentradas ("flowables") (LM, F). El IA en alta concentración (50-70%) va con humectante y otros coadyuvantes, que al mezclar con agua forman una suspensión.

Aerosoles. El IA viene listo a aplicar en forma de rocío fino (0, 1 a 50 micrones) expelido en gas.

1.8.3. Formulaciones gaseosas

Los fumigantes en realidad pueden expenderse al estado sólido (tabletas), líquido o gaseoso. Se caracterizan porque el IA actúa como gas tóxico con un alto poder de difusión y su aplicación requiere cuidados especiales de hermetismo, ventilación, temperatura, tiempo de exposición, indicadores de peligro, humedad, concentración. Se usan en granos almacenados, en el suelo previo a la siembra de almácigos, en tratamientos de postcosecha.[1] [2]

1.8.4 Dosificación:

Es importante aplicar las dosis adecuadas de los pesticidas, las cuales vienen en las etiquetas generalmente indicando un rango. Frecuentemente se expresan en: [2]

gr, kg, cc o L por hectárea, especialmente para cultivos bajos.
gr, o cc por 100 litros de agua para árboles, arbustos y vegetación densa.
1 bombona para determinado volumen o espacio (caso de fumigantes).

1.8.5 Equipos de aplicación:

Existe gran variedad de equipos para aplicar pesticidas. Aquí sólo se mencionarán algunos tipos generales. [1] [2]

Equipos de aplicación terrestre:

Espolvoreadoras
Eparcadores de gránulos
Nebulizadores
Atomizadores (a veces llamados nebulizadores)
Pulverizadores (asperjadores)

Aplicación aérea:

Avionetas
Helicópteros.

1.9 Plagas agrícolas en Chile:

La información pertinente a insectos, ácaros y otras plagas en Chile es muy amplia por lo cual se presenta aquella que refleja los problemas entomológicos más frecuentes en cultivos bajos, frutales y comercio internacional.

1.9.1 Arañita bimaclada *Tetranychus urticae koch*

La arañita bimaclada es una plaga de importancia económica primaria, cosmopolita de amplia distribución en el país, especie fitófaga cuya alimentación consta de especies vegetales de interés agrícola.

Como hospedantes primarios las principales especies son: Ají, alfalfa, camotes, ciruelo, damasco, duraznero, frambuesa, poroto, frutilla, limonero, maíz, manzano, melón, pepino, peral, zapallo.

Como hospedantes secundarios las principales especies son: Apio, cerezo, guindo, Kiwi, nogal, pepino de ensalada, rosal, vid y numerosas plantas ornamentales, flores y malezas gramíneas y de hoja ancha [8].

Arañita bimaclada es de la clase arachnida, pertenece a la orden *Acari* y a la familia *Tetranychidae*. Su nombre común es arañita roja. La arañita bimaclada es de cuerpo ovalado, no presenta segmentación o anillado superficial, tiene 4 pares de patas a excepción de las larvas, que tienen 3 pares. Su tamaño varía desde diminuto a pequeño, variación microscópica hasta 1cm de diámetro. La hembra es generalmente de mayor tamaño que el macho. La arañita es de color amarillo verdoso, y se puede reconocer por la presencia de dos manchas oscuras que tienen en el cuerpo (Figura 1) [11].

Figura 1. Huevos y adultos de Arañita bimaclada (*Tetranychus urticae*).



El ciclo biológico dura aproximadamente 11 a 12 días, incluye los estadios de huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto (Figura 2). Entre los periodos ninfales existen estados de reposo que reciben respectivamente los nombres de: protocrisálida, deutocrisálida y tritocrisálida, en estos periodos de inactividad, el ácaro se fija al substrato y forma una nueva cutícula. Los huevos son diminutos, esféricos, translúcidos, blancos o hialinos generalmente ubicados en el envés de las hojas, tallos verdes o sobre los frutos, aislados y protegidos por tenues hilos sedosos secretados por la hembra.

Larvas se originan al eclosionar los huevos, son de aspecto amarillo verdoso, son ovaladas, y poseen tres pares de patas.

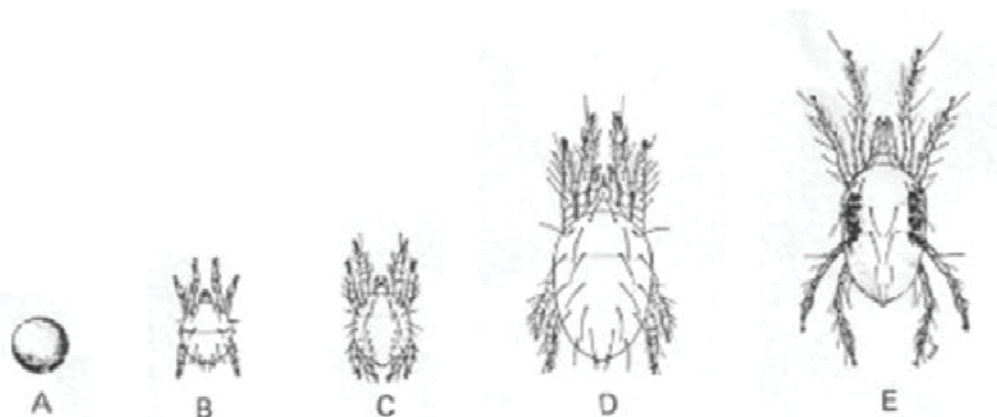
Protoninfas su coloración es amarillo verdoso, su tamaño es mayor que el de las larvas, son ovaladas y más activas. Poseen cuatro pares de patas.

Deutoninfas son similares a las protoninfas pero tienden a estar quietas.

La hembra produce feromonas sexuales, que induce en los machos un comportamiento de vigilancia para preapareamiento. El macho madura antes y se localiza próximo a la hembra hasta que ella emerge totalmente, la copulación tiene lugar inmediatamente después de haber emergido.

Adultos llegan a medir entre 0.6 y 0.8 mm., son ovalados y de coloración amarillo verdosa, las hembras son más grandes y voluminosas que los machos. Durante el otoño se ocultan en lugares protegidos y es donde la hembra entra en receso tornándose de color anaranjado-rojizo; ésta es la forma inactiva bajo la cual pasa el invierno en ambientes descubiertos. A inicios de la Primavera reanuden su actividad alimentándose de la cubierta herbácea para después trasladarse a otros sitios, con su color definitivo verde-amarillo con dos manchas oscuras en el idiosoma.

Figura 2. Estados de desarrollo de la Arañita bimaculada (*Tetranychus urticae*).



Bajo condiciones de invernadero, la hembra continua su actividad y postura, sin presentarse la forma inactiva rojiza. Forma colonias muy abundantes en hojas y tallos protegidas con abundantes telas sedosas, las que también le sirven para ser dispersadas por el viento. Al inicio de la infestación, el envíos de las hojas parasitadas aparece como si estuviera cubierto por un polvo blanquecino. Luego las hojas presentan un moteado clorótico, seguido de palidez, amarillamiento y manchas bronceadas y rojizas (Figura 3) [8].

Finalmente ocurre defoliación prematura, pérdida de calidad de la cosecha y menores rendimientos. En ataques muy severos las plantas detienen su crecimiento y eventualmente mueren.

Figura 3. Efecto del daño producido por la Arañita bimaçulada (*T. Urticae*).



1.9.2. Pesticidas usados

Para combatir esta plaga se utilizan acaricidas que son productos fitosanitarios, algunos de estos que se encuentran en el mercado son: Acaristop SC50, Acarol 500 EC, Cyhexatin 60 flow, Dicofol 25WP, Morestan 70% WP, Omite 6E, Omite 30W y Stopper [10].

Algunas de las consecuencias que implica la utilización masiva de pesticidas sintéticos de amplio espectro para el control de plagas y enfermedades son:

Desarrollo de resistencia en plagas y enfermedades a los productos fitosanitarios.

Aparición de nuevas plagas

Eliminación de la etomofauna beneficiosa.

Contaminación medioambiental

Daños accidentales derivados de su mal uso y aplicación.

Por otra parte el uso de productos fitosanitarios da lugar a la acumulación de residuos en alimentos, lo que plantea una serie de problemas en la comercialización de los

productos vegetales en función de la legislación de los distintos países de destino, cada vez más restrictiva al respecto.

La gravedad de los trastornos producidos por la aplicación de productos insecticidas en trabajadores agrícolas, deberían aliviarse o reducirse con el uso de estos productos naturales ya que lo demuestran estudios realizados por la Universidad Católica de Valparaíso en conjunto con el Centro Experimental de Entomología de La Cruz (INIA).

Se ha demostrado así que el *Chrysanthemum coronarium* que se encuentra en abundancia en forma silvestre en nuestra Quinta Región presenta efectos letales y subletales en especies como ácaros y artrópodos.

Todos estos estudios han demostrado también la potencialidad de estos extractos naturales para ser desarrollados en formulaciones comerciales, para uso en plagas urbanas y agrícolas.

La formulación del pesticida a partir de un extracto botánico de la especie silvestre de la Quinta región, *Chrysanthemum coronarium* como ingrediente activo de interés urbano y agrícola, deberá ser específica para cada área de interés, siendo así más eficiente y teniendo una mínima toxicidad y fitotoxicidad.

1.10. *Chrysanthemum coronarium*

Nombre común: Garland Chrysanthemum, Crown Daisy
Familia: Asteraceae
Floración : Anual
Origen : Mediterráneo
Germinación : 5-10 días
Color : Amarilla (Figura 4) y Blanca con Amarillo (Figura 5).
Forma : Pétalos ovalados sobrepuestos (dos corridas de no más de 15 pétalos)
Dimensiones : 30-100 cm de Alto, 2-4 cm de Diámetro, disco interno de 14 15 mm

Terreno : Soleado y Arenoso

Figura 4. *C.coronarium* amarillo.



Figura 5. *C.coronarium* blanco-amarillo.



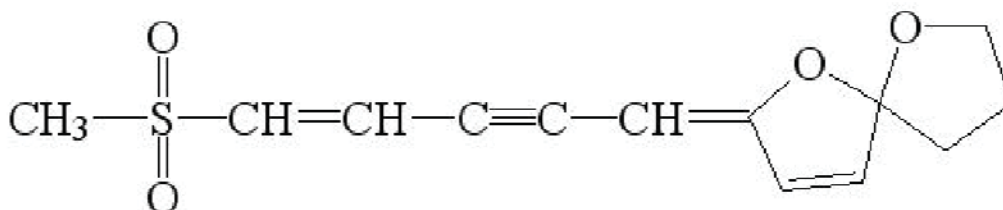
Es una planta silvestre y de jardín que se conoce desde el siglo XVII, nativa del Mediterráneo por sus condiciones climáticas ya que sus brotes deben crecer en cultivos soleados y en condiciones frías para ser plantadas directamente con semillas donde hay ya más flores.

La especie *C. coronarium* en Chile, es conocida comúnmente como Manzanillón, catalogada como maleza, que se encuentra presente en forma abundante en orillas de calles, caninos y sitios eriazos .

En estudios realizados sobre la parte aérea de *Chrysanthemum coronarium* particularmente hojas y tallos, se logró aislar varios acetilenos, sesquiterpenos lactonas como spiroacetales, sulfóxidos acetilénicos, cariofileno, Isocariofileno canfor, α y β farneseno, spiro enol éter. Teniendo propiedades insecticidas conocidas los cuatro últimos. [4] [5] [6]

Sulfóxido acetilénico (Figura 6): Posee actividad de hormona antijuvenil (anti-JH) sobre ninfas de insecto del algodoncillo, dando finalmente un desarrollo precoz con adultos estériles. [5]

Figura 6. Sulfóxido acetilénico aislado desde *C. coronarium*



Spiro enol éter cis y trans (Figura 7): Se encuentra en mayor proporción en la forma de isómero cis en el *C coronarium* cerca del 0.01 % en la planta fresca, el cual posee actividad " antifeeding " detención de la alimentación, sobre machos del quinto instar larval de *Bombix mori* (gusano de seda). [4]

Figura 7a. 1,6-Dioxaspiro-4,4-nona-2,8-dien, 7-(2,4-hexadiinliden).

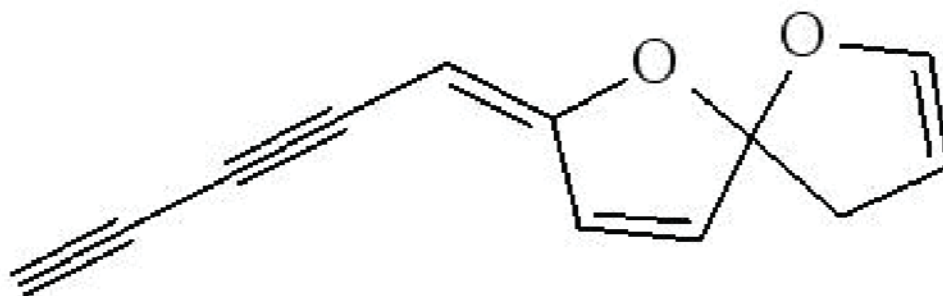
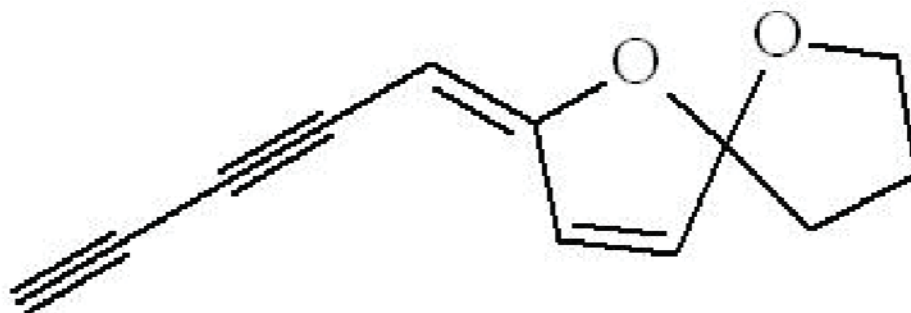
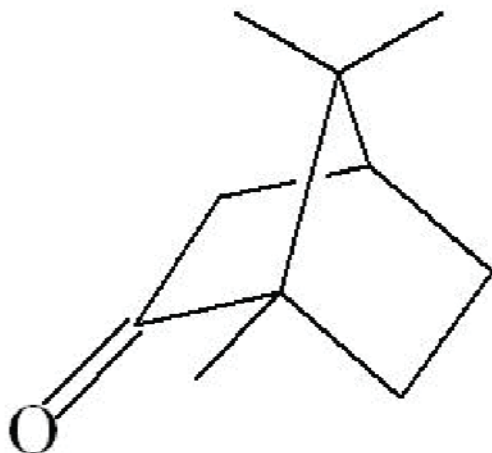


Figura 7b. 1,6-Dioxaspiro-4.4-non-3-en, 2-(2,4-hexadiinliden).



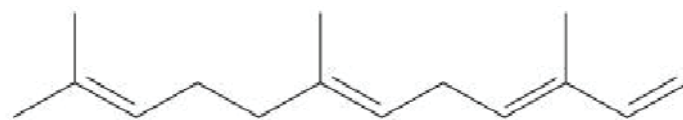
Canfor (Figura 8): Por estudios realizados se sabe que tiene propiedades repelentes en insectos y en grandes cantidades puede ser tóxico .

Figura 8. Estructura del Canfor.

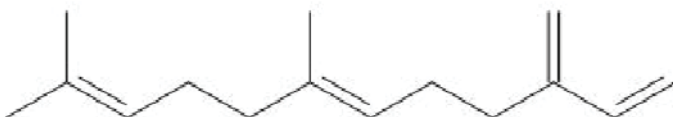


El α - y β - farneseno (Figura 9): Es un constituyente de muchos aceites esenciales , actúa como feromona para determinados insectos .

Figura 9. Estructuras del α -farneseno y β -farneseno



α -farneseno



β -farneseno

En estudios realizados sobre la parte aérea de *Chrysanthemum coronarium* particularmente hojas y tallos, se logró aislar varios acetilenos, sesquiterpenos lactonas como spiroacetales , nuevos sulfóxidos acetilénicos, canfor, cariofileno, Isocariofileno . [4] [5] [6]

Se han encontrado otros compuestos con actividad biológica, como un sulfóxido acetilénico el cual posee actividad de hormona antijuvenil (anti-JH) sobre ninfas de insecto del algodoncillo, dando finalmente un desarrollo precoz con adultos estériles. [5]

También se encontró en esta planta el spiro enol éter (tanto en sus isómeros cis- como trans-) encontrándose en mayor proporción la forma cis en el *C. coronarium* (cerca del 0.01 % en la planta fresca), el cual posee actividad "antifeeding", detención de la alimentación, sobre machos del quinto instar larval de *Bombix mori* (gusano de seda). [4]

Como la especie *C. coronarium* en Chile es silvestre, conocida comunmente como Manzanillón, catalogada como maleza, que se encuentra presente en forma abundante en orillas de calles, caminos y sitios eriazos, se ha investigado la toxicidad letal y sub-letal, de un extracto de sus flores sobre artrópodos que son plagas sobre cultivos de invernadero o a campo abierto en Chile, como por ejemplo la arañita bimaclada (*Tetranychus urticae*) y plagas domésticas, como la mosca (*Musca domestica*). [5]

1.11. Impactos ambientales

Los pesticidas botánicos son más seguros para el medio ambiente que los pesticidas sintéticos, debido a que sus principios activos tienen la propiedad de degradarse e incorporarse al ciclo de descomposición natural. Mientras que los pesticidas sintéticos, tales como: organoclorados, carbamatos y organofosforados, entre otros, pueden permanecer por largo tiempo en el ambiente, además, muchos de ellos son capaces de penetrar hasta la pulpa de un alimento, representando un riesgo muy alto para la salud pública. De esta forma, se podrán disminuir los residuos de agroquímicos en suelos, agua y productos alimenticios. También se logrará disminuir la toxicidad crónica en seres humanos y animales.

En el ámbito agrícola, cuando existe resistencia de las plagas a los pesticidas sintéticos, la primera respuesta de los productores ante este hecho, es aumentar las dosis las frecuencias de aplicación. Esta situación, además de traer como consecuencia la pérdida del rendimiento y el aumento de costos

en las estrategias de control, provoca un daño medioambiental irreparable y consecuencias nefastas en la salud de la población.

Las formulaciones elaboradas a partir de extractos florales de *Chrysanthemum coronarium*, que crecen como maleza, no ponen en crisis el drástico agotamiento del recurso y su respectivo impacto en la naturaleza, como también no tienen toxicidad sobre los enemigos naturales

CAPITULO 2. HIPOTESIS DE TRABAJO

Se ha demostrado que la especie *Chrysanthemum coronarium* presenta actividad tóxica In Vitro e In Vivo en insectos y ácaros, por lo que se desarrollarán distintas formulaciones con este, para combatir plagas agrícolas existentes en la Quinta Región.

CAPITULO 3. OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar una formulación de pesticidas de origen natural derivado del *Chrysanthemum coronarium*, existentes en la Quinta Región, para uso en plagas agrícolas.

CAPITULO 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Formular un pesticida para uso en plagas agrícolas a partir de extractos florales de la especie *Chrysanthemum coronarium*:

- a)Formulación como líquido miscible.
- b)Formulación como concentrado emulsionable.
- c)Formulación como aerosol.

Evaluar la actividad biológica del extracto refinado y de las distintas formulaciones sobre la Arañita bimaculada (*Tetranychus urticae* K.)

CAPITULO 5. METODOLOGIA DE TRABAJO.

5.1. Recoleccion y secado de flores de *C. coronarium*.

La recolección las flores, se realizó en dos periodos: Primer período entre Octubre y Diciembre de 1999 y un segundo período entre Septiembre y Noviembre del 2000. Estas fueron secadas en invernadero a una temperatura de 40°C, durante dos días. Una vez secas las flores se realizó la molienda en una picadora eléctrica 320 *Moulinex* MOULINETTE. El polvo de flores se almacenó en frascos de plástico blancos.

5.2. Extracción.

Las flores secas y molidas fueron sometidas a un proceso de extracción continua tipo Soxhlet. Se pesó aproximadamente 120 gr. de flor y se colocó en un envoltorio cerrado de papel filtro. En un Soxhlet de 750 ml de capacidad se refluó con 1.5 lt de hexano durante 6 horas. Posteriormente se evaporó el solvente en un rotavapor a una temperatura no mayor de 55°C, obteniéndose un extracto viscoso y anaranjado oscuro a temperatura ambiente. Se almacenó refrigerándolos en frascos oscuros. Dicho extracto se ha identificado como **extracto crudo**.

5.3. Refinación.

El extracto crudo obtenido aproximadamente 6 gr. en la extracción fue sometido a una etapa de refinación con metanol utilizándose enfriamiento del extracto a -70 °C mediante un baño de isopropanol con hielo seco, con agitación constante durante 1 hora, todo esto con el propósito de eliminar ceras, productos de bajo punto de fusión y pigmentos. Se filtró por gravedad, y se evaporó el metanol en rotavapor a una temperatura entre 50 y 60 °C y se obtuvo un extracto de color amarillo.

5.4. Determinación cantidad carbón activo.

Se tomaron 5 porciones cada una de 2 gr del extracto obtenido anteriormente, purificado con metanol a - 70°C , se disolvieron en 50 ml de metanol, a las cuales se les agregaron cantidades distintas de carbón activo, obteniéndose 5 soluciones identificadas como:

Solución 1 : 0.13 gr carbón activo

Solución 2 : 0.26 gr carbón activo

Solución 3 : 0.58 gr carbón activo

Solución 4 : 0.78 gr carbón activo

Solución 5 : 1.04 gr carbón activo

Las soluciones metanólicas se agitaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se filtraron por gravedad y se evaporó el metanol en rotavapor a una temperatura entre 50 y 60 °C. Con los extractos refinados obtenidos se prepararon 5 soluciones de 3000 ppm en hexano, con los cuales se realizó bioensayos con arañita bimaclada y caracterizaciones químicas y físicas.

5.4.1. Caracterización química

Se tomaron alícuotas para su análisis cromatográfico en un Cromatógrafo de Gases con detector de FID (detector de ionización de llama), acoplado a un equipo de integración. Bajo las siguientes condiciones:

T° inyector y detector : 250° C.

Columna Cromatografica: DB-1(metil silicona) (15mts*0.25mm*0.25µm)

Programación : T° de inicio 100° C

T° final 250° C con rampa de 15 minutos.

Velocidad de calentamiento 10° C / min.

Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)

T° inyector y detector : 250° C.

Columna Cromatografica:DB-5(5%fenil-95%metilsilicona)(30mts*0.25mm*0.25µm)

Programación : T° de inicio 100° C

T° final 250° C con rampa de 15 minutos.

Velocidad de calentamiento 10° C / min.

5.4.2. Caracterización física

Para evaluar los efectos de la cantidad de carbón sobre el color de los extractos a estos se les determinó sus espectros UV bajo las siguientes condiciones:

Concentración: 1µl/ml

Solvente : metanol

Equipo : Espectrofotómetro UV/Vis Hewlett-Packard Modelo HP-8452A

5.4.3. Bioensayos

Las condiciones de los bioensayos fueron las siguientes: T° 26 ± 2 °C, H: 65 ± 15 %, Fotoperíodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Para evaluar los efectos de la cantidad de carbón sobre la actividad de los extractos, se prepararon 5 soluciones de 3000 ppm con hexano. Se realizaron pruebas de efectividad, mediante la aplicación directa de 4ml desde la torre de Potter, sobre discos de hoja de poroto en placas de Petri con 10 arañas bimacladas adulta cada uno. Se realizaron 3 repeticiones para cada ensayo.

5.5. Caracterización del extracto utilizado en las formulaciones

5.5.1. Caracterizaciones químicas

Se recogió una alícuota para su análisis cromatográfico en un Cromatógrafo de Gases con detector de FID (detector de ionización de llama), acoplado a un equipo de integración. Bajo las mismas condiciones utilizadas anteriormente.

5.5.2. Caracterizaciones físicas

Viscosidad: Se determinó en un viscosímetro Brookfield RV, a una velocidad de 50 RPM y con un spindle N°5, para esto se tomaron 20 ml de extracto refinado .

Color: Para evaluar los efectos de la cantidad de carbón sobre el color del extracto a este se le determinó su espectro UV bajo las siguientes condiciones:

Concentración : 1 μ l/ml

Solvente : metanol

Equipo : Espectrofotómetro UV/Vis Hewlett-Packard Modelo HP-8452A

Solubilidad :

1. Se pesan 0.5 gr de extracto refinado en 5 tubos de ensayo, enumerados del 1 al 5.
2. Con una micropipeta se agregan a cada tubo de ensayo 2 ml de cada uno de los siguientes solventes: hexano,tolueno,xileno,aguarras e Isopar-G a temperatura ambiente.
3. Se calientan suavemente los tubos en que no se observa disolución.
4. En los tubos donde no se observa disolución, se agregan 2 ml de solvente y se repite el proceso de calentamiento.
5. A aquellos tubos que aún contienen soluto sin disolver, se agregan incrementos adicionales solvente hasta consumir 10 ml de cada solvente.
6. Los tubos en los cuales se observa disolución se refrigeran a 0° C durante 4 horas.

7. Se agregan incrementos de 2 ml a aquellos tubos que han mostrado cristalización y se repite el paso (f) hasta consumir 10 ml de solvente.
8. Los resultados de estos ensayos se expresan en una tabla: (Nº de incrementos de 2ml agregados v/s solubilidad máxima g/ml).

5.6. Elaboración de las formulaciones

5.6.1. Aerosol.

Fue envasado por la empresa Aerosol, con una concentración de 2500 ppm de extracto refinado como ingrediente activo, 49.75% de solvente Isopar-G y 50% de propelente propano/butano.

5.6.2. Líquido miscible

Se pesó 1 gr de extracto refinado de *Chrysanthemum coronarium* como ingrediente activo a los que se les agregó 100 ml de solvente hexano y se mantuvo con agitación constante por 15 minutos. Se obtuvo una concentración de 10000 ppm, la cual se diluyó para obtener soluciones de 1000, 3000 y 5000 ppm. Estas 4 formulaciones se envasaron en frascos de vidrio oscuro etiquetados.

5.6.3. Concentrado emulsionable

Se seleccionó el solvente y agente emulsionable a mezclar con el ingrediente activo, para preparar un concentrado emulsionable al 50%. La selección del solvente se realizó en base a criterios de solubilidad y toxicidad Este solvente es Isopar-G.

Para la selección del emulsificante, se tomaron 7 balones y se les agregó 1 gr de extracto refinado, 1 ml de solvente Isopar-G y se agitó durante 10 minutos. Luego se le agregó 0.05 ml de emulgador a cada balón, y se diluyó con 200 ml de agua. La mezcla se mantuvo con agitación constante durante 2 horas. A las distintas formulaciones se les identificó con la sigla CE enumerados del 1 al 7, los emulgadores usados fueron:

CE-1: Nonil fenol poliglicol eter, Harting

CE-2: Dioleato de Polietilenglicol 400, Italquim

CE-3: Nonil fenol etoxilado, Shell
CE-4: Alquil fenol etoxilado, Rhenium
CE-5: Monooleato de Sorbitan, Rhenium
CE-6: Alcohol etoxilado C₁₂-C₁₅, Shell
CE-7: Alcohol graso etoxilado C₁₂-C₁₄, Rhenium

5.7. Bioensayos (INIA, Centro Experimental de Entomología de La Cruz)

Se estudió el ciclo de vida de la Arañita Bimaculada (*Tetranychus urticae*), para lo cual se colocaron 10 arañas adultas en una hoja de poroto y se observó durante 15 días, identificando los distintos estados de desarrollo.

Se realizaron ensayos de eficiencia mediante la aplicación directa sobre hojas de tomate colocadas en una placa de Petri con una esponja húmeda y se les aplicó mediante la torre de Potter 5 ml de hexano y 3 hojas de tomate a las que se les aplicó 5ml de extracto de 5000 ppm de concentración. Se colocaron 10 arañas adultas. A partir de estos resultados se decidió trabajar con Arañita bimaculada *Tetranychus Urticae*, en plantas de poroto mediante aplicación directa (Figura 10).

Figura 10. Bioensayos de formulaciones sobre plantas de poroto.



5.7.1 Líquido miscible

Se realizaron ensayos de aplicación directa en plantas de poroto. Para esto se aplicó desde la torre de Potter 5 ml de cada una de las formulaciones de líquido miscible (LM) de 1000, 3000, 5000 y 10000 ppm de concentración en hexano, sobre hojas conteniendo 10 arañas adultas cada una. Se observaron resultados a 24 y 48 hrs. Se realizaron 5 repeticiones para cada ensayo, usando como testigo hexano.

5.7.2 Concentrado emulsionable

Se realizaron los ensayos de eficiencia de 4 Concentrados Emulsionables, al 50%, en Isopar-G, identificados como CE de 1 a 4. Cada formulación fue preparada diluyendo con agua para obtener una concentración de ingrediente activo de 5000 ppm. Se realizaron ensayos de aplicación directa en plantas de poroto. Para esto se aplicó desde la torre de Potter 5 ml de cada formulación, sobre hojas conteniendo 15 arañas adultas cada una. Se observaron resultados a 24, 48 y 72 horas. Se realizaron 6 repeticiones para cada ensayo, usando como testigos soluciones que contenían solventes y el respectivo emulgador.

5.7.3. Aerosol

Se realizaron ensayos de aplicación directa en plantas de poroto. Para esto se aplicó por 10 segundos el aerosol desde 25 cm de distancia, el volumen rociado fue aproximadamente 5 ml, sobre hojas conteniendo 10 arañas adultas cada una. Se observaron resultados a 24 y 48 hrs. Se realizaron 5 repeticiones para cada ensayo, usando como testigo un blanco que contenía toda la formulación menos el ingrediente activo.

5.8. Evaluación de los resultados de los bioensayos.

La mortalidad observada en cada tratamiento, a partir de un grupo homogéneo de individuos, debe ser corregida. Esta corrección involucra la mortalidad de los individuos causada por la exposición al pesticida; como también, la mortalidad observada en el grupo de control (testigo).

La corrección del porcentaje de mortalidad está dada por la siguiente fórmula (Abbott):

$$\frac{(\% \text{ Mortalidad en tratamiento} - \% \text{ Mortalidad en testigo}) \times 100}{(100 - \% \text{ Mortalidad en testigo})}$$

No se justifica hacer ésta corrección cuando el porcentaje de mortalidad en el testigo es inferior al 5% y cuando supera el 20%. En este último caso, se recomienda repetir el ensayo. Una vez corregidos los resultados se ajustarán al modelo estadístico: Andeva y Test de Tukey.

5.8.1 Análisis de varianza (ANDEVA):

Este análisis permite probar la significancia de la diferencia entre dos o más medias muestrales:

H₀= $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$; Hipótesis nula.

H₁, μ_1 , μ_2 y las μ_3 no son todas iguales; Hipótesis alternativa.

Cuanto más se acerque la razón F a 1, más inclinados estaremos a aceptar la hipótesis nula. A la inversa, a medida que crece la razón F , estaremos más inclinados a rechazar H_0 y a aceptar H_1 .

Se compara el valor crítico de F tabulado (para los grados de libertad correspondientes), con el valor de F calculado.

F tabulado $>$ F calculado: se acepta H_0 .

F tabulado $<$ F calculado: se acepta H_1 .

5.8.2. Test de Tukey:

El test de Tukey es aplicable a pares de medias; necesita de un solo valor para juzgar la significancia de todas las diferencias, este valor crítico se conoce como "T". Todos los pares de medias constituyen una familia y la tasa de error es familiar, como lo es el coeficiente de confianza cuando se construyen estimaciones de intervalo de diferencias.

Este procedimiento consiste en el cálculo de un valor crítico mediante la siguiente ecuación y su aplicación a diferencias entre todos los pares de medias:

$$T = q_{\alpha}(p, f_e) \times \sqrt{\frac{\overline{S^2}}{n}}$$
$$T = q_{\alpha}(p, f_e) \times \sqrt{\frac{\overline{S^2}}{n}}$$

Donde :

$$q_{\text{tabla}} \equiv \alpha : 0.05$$

p : n tratamientos

f_e : grados de libertad del error

\bar{S}^2 : promedio de las varianzas

n : nº repeticiones.

Este procedimiento sirve para evaluar entre que tratamientos existen diferencias significativas.

CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1. Extracción y Refinamiento

En la etapa de extracción continua mediante un sistema Soxhlet de la parte floral del *C. coronarium* con hexanos se obtiene un extracto crudo muy viscoso, semisólido a temperatura ambiente y de un color amarillo anaranjado oscuro intenso. El rendimiento de extracto crudo en esta primera etapa es de un 5% por peso de flor seca.

En la siguiente etapa de refinación el extracto crudo se somete a un nuevo tratamiento de extracción con metanol a -70°C , donde se obtiene un extracto líquido a temperatura ambiente de una coloración amarilla intensa, con un rendimiento de un 2.5% por peso de flor seca. Esta etapa, la cual se realiza con el objeto de eliminar productos no activos de bajo punto de fusión, ceras y productos colorantes, da lugar a un extracto de mejor calidad. Sin embargo, aún presenta un alto grado de coloración y una baja solubilidad en solventes hidrocarbonados, características no recomendables en ingredientes activos para ser utilizados en la elaboración de formulaciones. Por esta razón es que se requiere de una segunda etapa de refinamiento, que involucra el tratamiento con carbón activado, para remover en forma más eficiente los componentes coloreados del extracto. Con el fin de estandarizar y optimizar esta etapa del refinamiento del extracto, se utilizaron diferentes cantidades de carbón activado y se evaluó su efecto sobre la coloración, composición química y bioactividad de los extractos obtenidos.

El análisis cromatográfico de las soluciones obtenidas del tratamiento con diferentes cantidades de carbón activo, demostró que la composición química de los extractos no varía en forma significativa, manteniéndose la relación entre los compuestos considerados activos (spirocetal enol éteres) y el resto de los componentes. Del mismo modo, los rendimientos de esta etapa de purificación no se vieron afectados mayormente por las diferentes cantidades de carbón activo utilizadas.

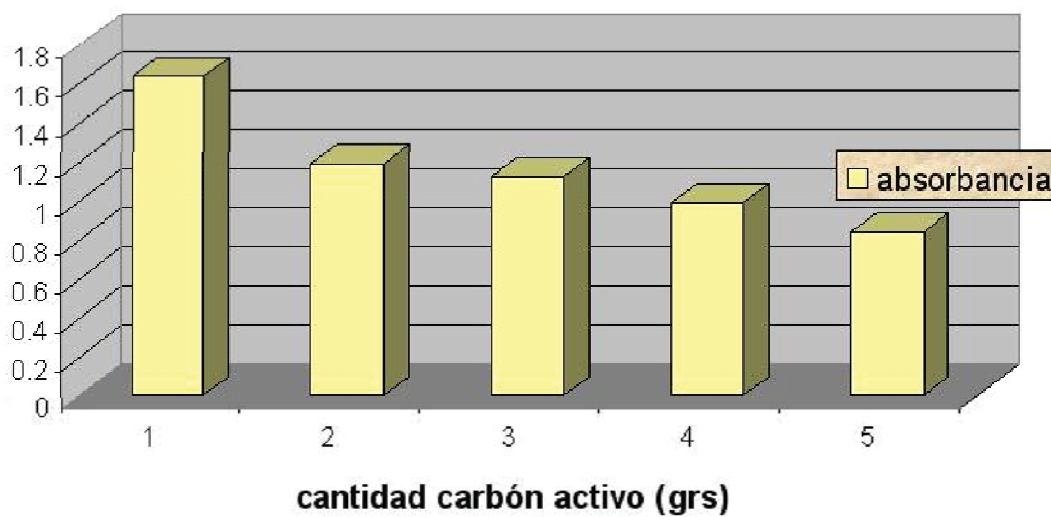
Se realizó la caracterización física mediante la determinación de los espectros de absorción U.V para evaluar en forma cuantitativa la influencia del carbón activo en la

coloración de los extractos refinados. Para esto se midió la absorbancia a una longitud de onda de 320 nm de soluciones metanólicas de los extractos tratados con carbón (Tabla 1 y Gráfico 1).

Tabla 1. Absorbancia de los extractos refinados con distintas cantidades de carbón activo.

gr. C activo/2 gr extracto	Absorbancia λ 320 nm
0.13	1.64
0.26	1.19
0.52	1.13
0.78	0.99
1.04	0.84

Gráfico 1. Efecto de la cantidad de carbón activo sobre la coloración del extracto



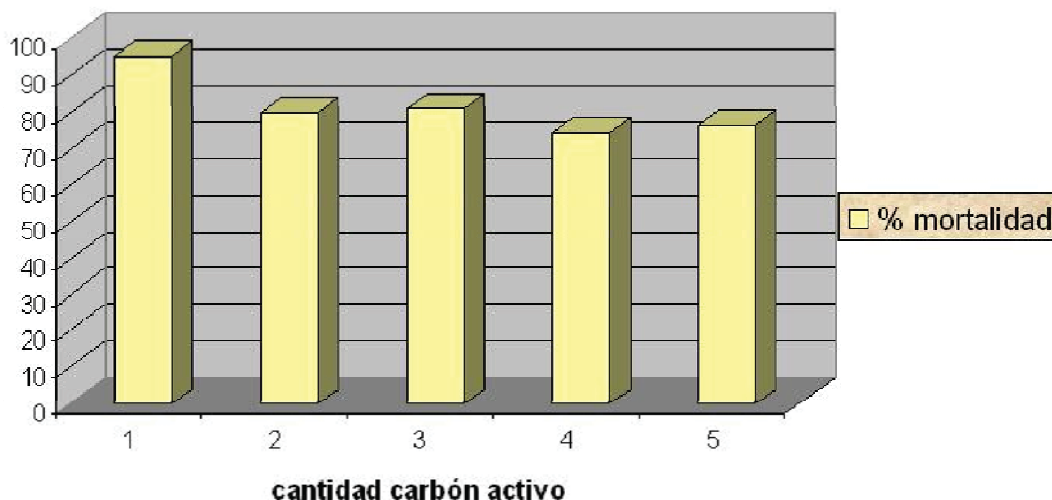
Los resultados muestran que existe una relación inversamente proporcional entre la cantidad de carbón agregado y la absorbancia a 320 nm de los extractos. De esto se puede deducir que la función principal del carbón activo en el proceso de refinamiento es remover los pigmentos responsables de la coloración de los extractos.

Para medir la efectividad de los extractos obtenidos de los diferentes tratamientos con carbón activo se realizaron bioensayos con arañas adultas en plantas de poroto, mediante aplicación directa de 4 ml de soluciones de 3000 ppm en hexano y observando mortalidad a las 48 horas (Tabla 2 y Gráfico 2).

Tabla 2. Efecto de la cantidad de carbón activo en los extractos de *C.coronarium* sobre la mortalidad de Araña bimaclada.

Extractos refinados	% Mortalidad promedio
1	95.3 a
2	79.7 a
3	80.7 a
4	74.3 a
5	76.3 a

Grafico 2. Efecto de la cantidad de carbón activo en los extractos de *C.coronarium* sobre mortalidad de Araña bimaclada.



El porcentaje mayor de mortalidad a las 48 horas, se observa con el extracto refinado usando la menor cantidad de carbón activo (0.13 g Carbón/2 g extracto), razón por la cual se decidió utilizar este tratamiento en los extractos a utilizar en la elaboración de las formulaciones.

Caracterización de los extractos utilizados en las formulaciones.

Antes de proceder a la elaboración de formulaciones, es necesario determinar las características físicas y químicas del ingrediente activo a utilizar, en nuestro caso el extracto refinado del *C. coronarium*.

6.2. Caracterización Física.

El extracto refinado fue caracterizado determinando las siguientes propiedades físicas: estado físico, color, olor, densidad, viscosidad y solubilidad en distintos solventes. Los resultados de estas mediciones se muestran en la tabla 3 y 4.

Tabla 3. Resultados caracterizaciones físicas del extracto refinado de *C.coronarium*.

Estado físico	Color	Olor	Densidad	Viscosidad
---------------	-------	------	----------	------------

Líquido	Amarillo pálido	Floral intenso	1.196 gr/ml	376 cps
---------	-----------------	----------------	-------------	---------

Para los ensayos de Solubilidad, se seleccionaron 6 solventes del tipo hidrocarburo de uso industrial, tanto alifáticos como aromáticos. obteniéndose los resultados presentados en la siguiente tabla:

Tabla 4. Resultados obtenidos de los ensayos de solubilidad del extracto refinado de *C.coronarium*.

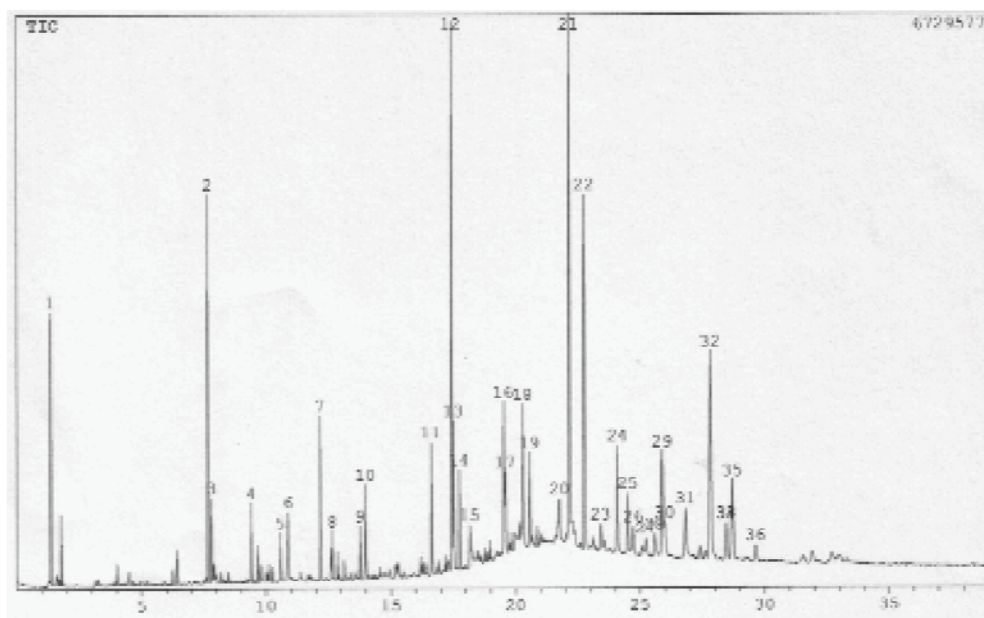
Incrementos 2 ml agregados	Tolueno	Xileno	Nafta	Hexano	Isopar-G	Aguaras
2	SI	SI	NO	NO	NO	NO
4			NO	NO	SI	NO
6			NO	NO		NO
8			NO	Si		NO
10			NO			NO
Solubilidad máx gr/ml	0.25	0.25	_____	0.06	0.13	_____

Con esta caracterización podemos notar que la mayor solubilidad se obtuvo, con Tolueno y Xileno, seguido del Isopar-G el cual se escogió para las formulaciones de concentrado emulsionable ya que tiene baja toxicidad, costo relativamente bajo y es muy utilizado en las industrias.

6.3. Caracterización Química

En la caracterización química mediante análisis cromatográfico se observó la presencia de 30-35 compuestos en el extracto refinado (Figura 11).

Figura 11. Cromatograma del extracto refinado de *C.coronarium*



Mediante el uso de la técnica de GC-MS, se identificaron tentativamente los siguientes compuestos:

Tabla 5. Componentes identificados por GC-MS del extracto refinado del *C.coronarium*

Nº peak	Nombre Compuesto	Tiempo Retención (min)	% Relativo
2	Canfor	7.67	5.21
7	β Farneseno	12.2	2.21

8	α Farneseno	12.7	0.70
10	3,7-dimetil-1,5-octadien-3,7-diol	13.99	1.47
11	1,6-Diaxospiro-(4,4)-nona-2.8-dien-7-(2,4-hexadiinilideno)	16.61	2.00
12	1,6-Diaxospiro-(4,4)-non-3-en-2-(2,4-hexadiinilideno)	17.46	9.20
13	1,6-Diaxospiro-(4,4)-non-3-en-2-(2,4-hexadiinilideno)	17.54	2.57
21	N.N.	22.19	15.21
22	N.N.	22.78	10.21

6.4. Elaboracion de formulaciones

6.4.1. Líquido miscible

Al preparar los líquidos miscibles, se utilizó hexano como solvente, aunque no tiene la solubilidad mayor, lo cual se explica, ya que tiene una baja toxicidad, bajo costo.

Es importante destacar que la mayor parte de esta formulación es solvente que debe volatilizarse lo más posible, por esta razón es que no se utilizó el solvente Isopar-G que tiene una solubilidad mayor, pero es menos volátil.

Se elaboraron 4 formulaciones de líquidos miscibles de 10000, 5000, 3000 y 1000 ppm designados con la sigla LM₁₀, LM₅, LM₃, LM₁, respectivamente. Se evaluó la eficiencia de los líquidos miscibles LM₁₀, LM₅ y LM₃ mediante aplicación directa a plantas de poroto con araña bimaclada adulta.

Los resultados de mortalidad a 24 y 48 horas se expresan en la siguiente tabla:

Tabla 6. Efecto de las formulaciones líquidos miscibles sobre mortalidad de Arañita bimaclada a 24 y 48 horas.

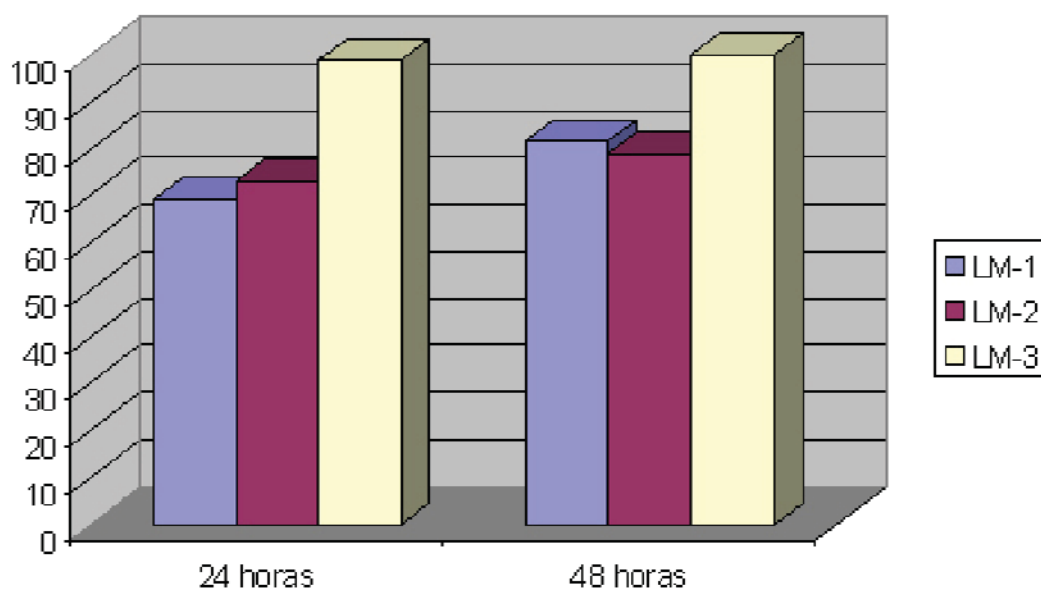
Líquido miscible	24 horas	48 horas
LM ₃ (3000 ppm)	69.33 b A	81.33 b A
LM ₅ (5000 ppm)	72.89 b A	78.89 b A
LM ₁₀ (10000 ppm)	98.78 a A	100 a A

Las letras diferentes y minúsculas indican diferencias significativas entre medias comparadas verticalmente.

Las letras diferentes y mayúsculas indican diferencias significativas entre medias comparadas horizontalmente.

Andeva, Tukey

Grafico3. Efecto de las distintas formulaciones líquidos miscibles sobre porcentaje mortalidad de Arañita bimaclada a 24 y 48 horas.



No se observa diferencia significativa entre los distintos líquidos miscibles respecto a su tiempo de aplicación. Se observa diferencia significativa entre la formulación LM₁₀, respecto a las otras dos.

La más eficiente es la formulación LM₁₀, ya que presenta un mayor % de mortalidad a las 24 y 48 horas (Figuras 12 a y 12 b).

Figura 12 a. Hoja de poroto aplicada con líquido miscible.



Figura 12 b. Hoja de poroto testigo líquido miscible.



6.4.2. Concentrado emulsionable

En la elaboración de los concentrados emulsionables al 50% se utilizaron 7 emulgadores distintos, por lo que cada formulación fue identificada con la sigla CE enumerados de 1 a 7. Estos emulgadores fueron elegidos sobre la base que se utilizó como solvente Isopar-G ya que este produce la mejor solubilidad del extracto refinado, es menos tóxico, no tiene olor y es relativamente económico, lo que es irrelevante ya que la cantidad que se utiliza es mínima.

El criterio utilizado para escoger el mejor emulsificante fue visualizar que se mantuviera la emulsión sin agitación y que no se rompiera con facilidad al finalizar la formulación. Esto se realizó observando la mezcla del ingrediente activo, solvente, emulsificante y agua, después de las 2 horas de agitación y los 15 minutos de reposo.

Las formulaciones en las cuales no se formaron 2 fases y la emulsión perdura se aprobaron estas fueron CE-1, CE-2, CE-3 y CE-4. En las restantes CE-5, CE-6 y CE-7 se rompió la emulsión, por lo que se mantuvo la agitación por 2 horas más. Se dejó reposar y no hubo cambio entonces se descartaron estas formulaciones.

Se evaluó la eficiencia de las formulaciones CE-1, CE-2, CE-3 y CE-4, mediante la aplicación directa sobre plantas de poroto con arañita bimaclada adulta. Los resultados de mortalidad obtenidos a 24, 48 y 72 horas, se expresan en la Tabla 7:

Tabla 7. Efecto de las distintas formulaciones concentrados emulsionables sobre porcentaje mortalidad de Arañita bimaclada a 24, 48 y 72 horas.

Concentrado emulsionable	24 horas	48 horas	72horas
CE-1	52.2 b B	66.2 ab AB	71.2 a A

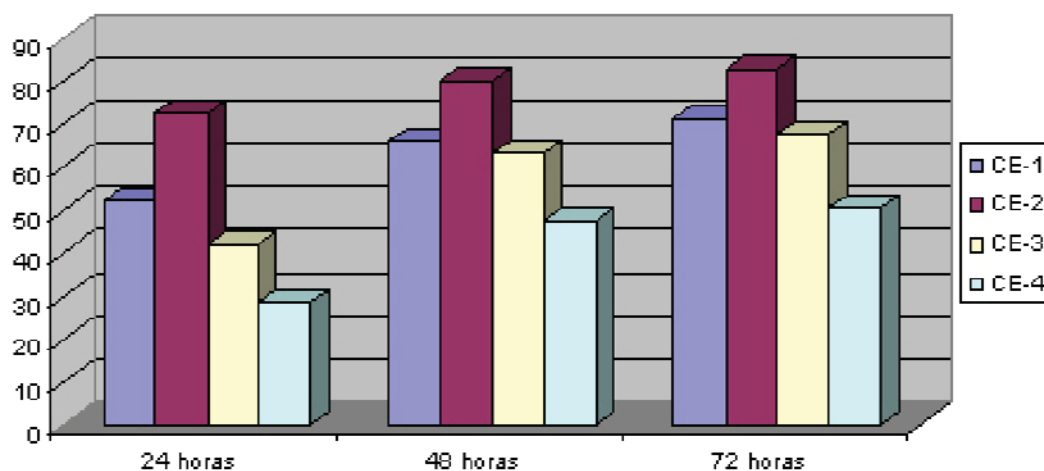
CE-2	72.5 a A	80.2 a A	82.8 a A
CE-3	42.3 bc B	63.3 ab A	67.8 a A
CE-4	28.5 c B	47.3 b A	50.7 b A

Las letras diferentes y minúsculas indican diferencias significativas entre las medias comparadas verticalmente.

Las letras diferentes y mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias comparadas horizontalmente.

Andeva, Tukey.

Gráfico 4. Efecto de las distintas formulaciones concentrados emulsionables sobre porcentaje mortalidad de Araña bimatulada a 24, 48 y 72 horas.



En estas formulaciones se nota una clara relación entre la concentración del extracto, el emulgador utilizado y la efectividad, ya que el emulsificante debe reducir la tensión superficial entre líquidos inmiscibles o entre líquidos y superficies que presentan sólidos como precipitados, o sea este debe cumplir la función de formar una especie de puente entre la parte polar y la no polar de nuestra formulación. Esto se logró

ya que el emulsificante tiene una estructura molecular orientada hacia la fase miscible y la otra hacia la parte inmiscible.

Se escogió el solvente adecuado debido a que con este se logró una completa solubilidad del extracto, ya que esto es una condición necesaria para el uso del emulsificante.

El emulsificante fue compatible con el ingrediente activo y solvente ya que no se produjo ninguna reacción química, la cual podría haber reducido la efectividad o un cambio físico en la formulación. Por el contrario, es posible que este emulsificante esté actuando como un “ayudante” que mejora la calidad de la formulación ya que permite una mejor penetración del ingrediente activo a través de una membrana al sistema biológico del ácaro.

Una característica específica de los emulsificantes no iónicos es duplicar la efectividad de una formulación, razón por la cual se utilizaron este tipo de emulsificantes.

La formulación menos efectiva fue la CE-4, ya que muestra diferencias significativas con todas las otras y un bajo porcentaje de mortalidad a todas las horas de realizada la aplicación. Además, porque se notaba en su emulsión un pequeño precipitado naranja, el cual no desapareció luego de una prolongada agitación.

La formulación más efectiva fue la CE-2, ya que no muestra diferencia significativa a las diferentes horas de aplicación, con un alto % de mortalidad (Figura 13 a y 13 b).

Figura 13 a. Hoja de poroto aplicada con concentrado emulsionable.



Figura 13 b. Hoja de poroto testigo concentrado emulsionable.



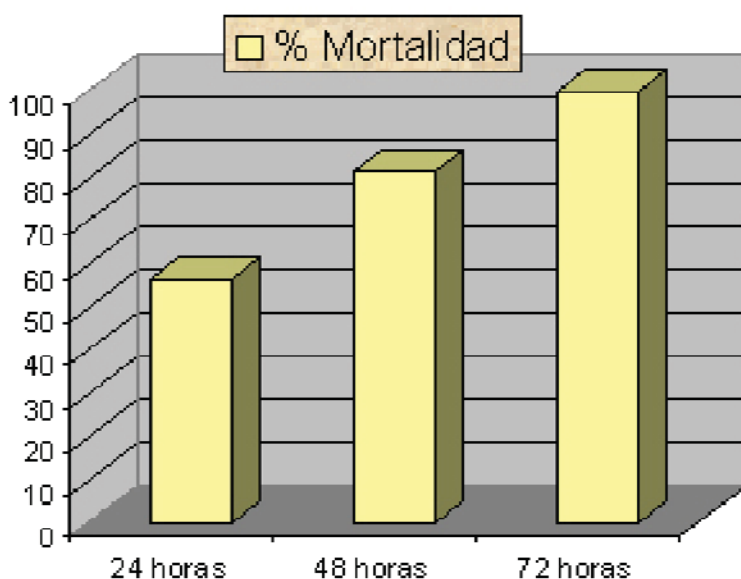
6.4.3. Aerosol

Se preparó una solución del extracto refinado de una concentración de 5000 ppm en Isopar-G la cual se envió para ser envasado

por una empresa externa. La formulación aerosol se preparó a una concentración 0.25% del ingrediente activo con propano/butano como propelente al 50%. Se evaluó su eficiencia mediante aplicación directa sobre plantas de porotos, a arañas bimaclada adulta.

Los resultados de mortalidad promedio mostraron a las 24 horas una mortalidad de un 56.3%, a las 48 horas un 81% y a las 72 horas un 100% de mortalidad.

Grafico 5. Efecto de la formulación Aerosol sobre la mortalidad de Araña bimaclada a 24, 48 y 72 horas.



Existe diferencia significativa entre la mortalidad a los distintos tiempos evaluados en la aplicación del aerosol. La mayor mortalidad (100%) se observó a las 72 horas de aplicado el aerosol (Figuras 14 a y 14 b). Aun que estos ensayos demuestran la efectividad de este producto aerosol, es necesario implementar una metodología adecuada para este tipo de bioensayos, y evaluar su eficiencia en otras plagas de tipo urbana.

Figura 14 a. Hoja de poroto aplicada con aerosol.



Figura 14 b. Hoja de poroto testigo aerosol.



CAPITULO 7 ESTIMACION COSTO DE FORMULACIONES

Esta estimación de costos se realizó con el propósito de comparar los precios de cada formulación realizada y para ver si es o no factible realizar cada una de estas formulaciones, como un producto para ser comercializado. Las estimaciones de cada formulación fueron realizadas para aquellos casos en los que se observó una mayor efectividad.

Los precios obtenidos de extracto refinado están referidos al precio del extracto refinado de piretrinas en U.S\$/gr.

- **Líquido miscible 10000 ppm LM10**

Tabla 9. Costo estimado de una formulación de Líquido miscible al 1%.

Componentes	Precio (\$)
10 gr extracto refinado	342
1 lt solvente hexano	750
Total costo LM10	1.092

- **Concentrado emulsionable al 50% CE**

Tabla 10. Costo estimado de una formulación Concentrado Emulsionable al 50%.

Componentes	Precio (\$)
-------------	-------------

500 gr extracto refinado	17.100
500 ml solvente Isopar-G	500
25 gr. emulsificante	38
Total costo CE 50%	17.638

- **Aerosol 0.25%**

Tabla 11. Costo estimado de una formulación Aerosol.

Componentes	Precio (\$)
0.625 gr. extracto refinado	43
125 gr. solvente Isopar-G	125
125 gr. propelente propano/butano	69
Total costo aerosol 0.25 %	237

Podemos notar que las formulaciones más convenientes son las concentrado emulsionable, si uno considera que el costo de envasado, es bastante menor en comparación con el del aerosol ya que este debe incluir envase adecuado, válvula, etc.

Otra razón es que los líquidos miscibles se venden para ser diluidos con un solvente orgánico, en cambio el concentrado emulsionable se disuelve con agua potable, la cual es más económica y por cierto no daña el medio ambiente.

CAPITULO 8 CONCLUSIONES

Los mejores resultados en la elaboración de las formulaciones a partir de los extractos florales de *Chrysanthemum coronarium* se obtienen con solventes isoparafínicos y emulgadores del tipo no-iónico.

En los bioensayos de semicampo, las formulaciones muestran una alta efectividad como acaricida, en términos de mortalidad de adultos de *Tetranychus urticae*.

Ninguna de las formulaciones utilizadas mostró fitotoxicidad sobre plantas de poroto.

Los resultados de este proyecto demuestran que es posible a partir de extractos florales de *C. coronarium*, obtener un producto acaricida, con una baja fitotoxicidad, bajo costo y no dañino para el medio ambiente.

CAPITULO 9 PROYECCIONES

Implementación de una metodología para probar la eficiencia, de las formulaciones aerosol en plagas urbanas.

Realizar bioensayos de campo con formulaciones del tipo líquido miscible y concentrados emulsionables, en otras plagas de importancia agrícola.

Evaluar la capacidad fungicida de la formulaciones con miras a su posible aplicación en el control de enfermedades como la *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas* que atacan los productos hortofrutícolas de importancia económica en la Quinta Región.

Diseño de una planta piloto para la elaboración de formulaciones de concentrado emulsionable. Para esto se debe considerar el diseño de una planta de extracción para la obtención del ingrediente activo (extracto refinado de *C. coronarium*) (Figura 15) [5], y una planta de formulación cuyo diagrama de flujo se muestra en la Figura 16 [1].

Figura 15. Diseño de una planta de extracción y concentración de *C. coronarium*.

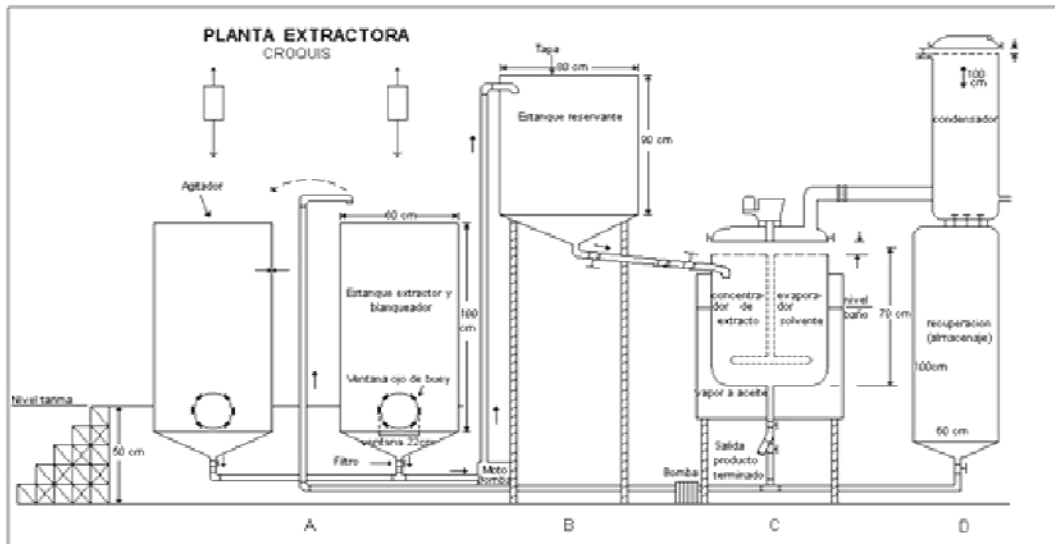
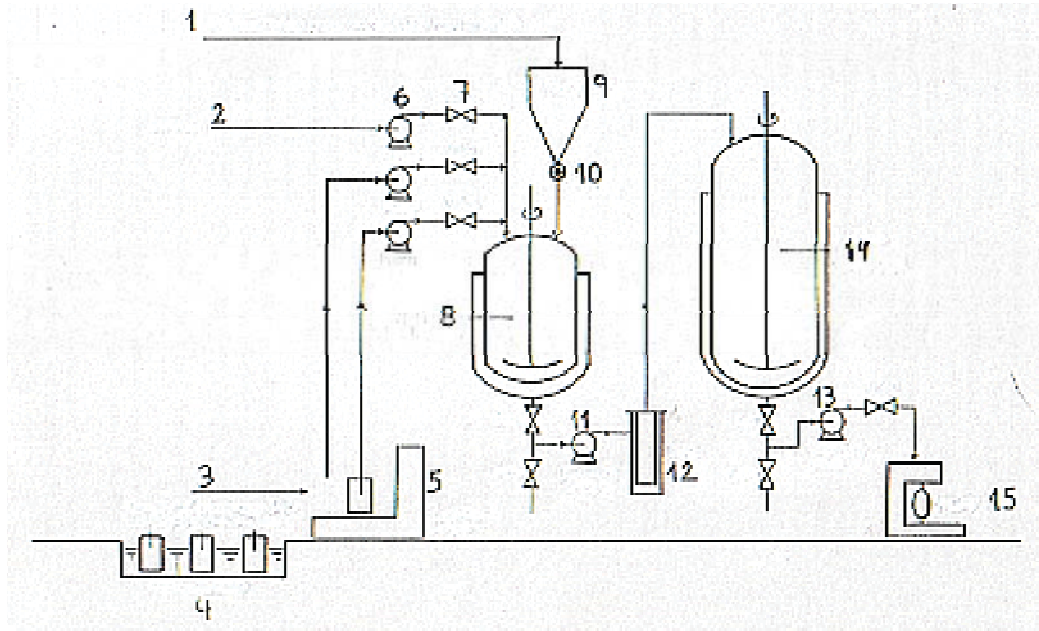


Figura 16. Diagrama de flujo de una planta de formulación de Concentrado Emulsionable.



Los números de la figura indican:

1 entrada de materias primas sólidas.

2 entradas de solventes.

3 materias primas líquidas.

4 baño termostático.

5 balanza.

6 bombas.

7 válvulas.

8 tanque de mezclado con camisa aislante.

9 contenedor para vaciado de materias primas sólidas.

10 válvula rotatoria.

11 bomba con medidor.

12 filtro.

13 bomba con medidor.

14 tanque de producto con camisa aislante.

15 envasado .

BIBLIOGRAFIA

United Nations Industrial Development Organization, "Formulation of pesticides in developing countries", New York 1983.

Apablaza Hidalgo Jaime, " Introducción a la entomología general y agrícola " , Ediciones Universitarias Católica de Chile. Santiago, 1995.

Apablaza Hidalgo Jaime , " Introducción a la entomología general y agrícola. Manual de laboratorio" . Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, 1994.

Saavedra V., Tesis " Determinación de la toxicidad de un extracto de *Chrysanthemum coronarium* sobre mosca doméstica y araña bimaclada " Universidad Católica de Valparaíso.1997.

Cabello G., Tesis " Determinación de efectos sub-letales producidos por extractos botánicos de la especie *Chrysanthemum coronarium* en plagas de interés agrícola: *Tetranychus urticae* ". Universidad Católica de Valparaíso, 1999.

Herrera S ., Tesis " Caracterización de los principios activos de un extracto floral de *Chrysanthemum coronarium* y determinación de su toxicidad sobre araña bimaclada (*T. Urticae*) ". Universidad Católica de Valparaíso, 1998.

J.T.Arnason, B.J.R. Philogéne , Peter Morand "Insecticides of Plant Origin". 5ª edición, ACS Symposium Series 387, American Chemical Society, 1989.

Gonzalez Roberto H. " Insectos y Acaros de importancia Agrícola y cuarentenaria en Chile ". Vértice Comunicación Publicitaria. Santiago, 1989.

Ripa Renato y Rodríguez Fernando " Plagas de cítricos, sus enemigos naturales y manejo. " Centro Experimental de Entomología de La Cruz.Santiago 1999.

AFIPA. A.G “ Manual Fitosanitario 1993-1994 “, Gredos Ltda. Editores.

<http://dermatology.cdlib.org/DOJvo13num1/centerfold/tetranychus-esp.html>