

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 521**

51 Int. Cl.:

**A01N 25/28** (2006.01)

**A01N 57/16** (2006.01)

**A01P 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2010 E 10706878 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2403333**

54 Título: **Formulaciones de clorpirifós en microcápsulas**

30 Prioridad:

**04.03.2009 US 157339 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**12.11.2014**

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)  
9330 Zionsville Road  
Indianapolis, IN 46268-1054, US**

72 Inventor/es:

**WILSON, STEPHEN y  
BOUCHER, RAYMOND**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 521 521 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones de clorpirifós en microcápsulas

**Campo de la invención**

5 Varios aspectos y realizaciones se refieren en general a formulaciones de plaguicidas microencapsulados que exhiben propiedades biológicas, comerciales y/o medioambientales ventajosas.

**Antecedentes**

10 Mitigar las poblaciones de insectos es esencial para la agricultura moderna, el almacenamiento de alimentos y la higiene. Actualmente las formulaciones de insecticidas encapsulados que son seguras y efectivas juegan un papel significativo en la mitigación de la población de insectos. Las propiedades de las formulaciones de insecticidas encapsulados útiles incluyen buena eficacia contra las plagas diana, incluyendo buena toxicidad inicial contra los insectos diana, facilidad de manipulación, estabilidad, baja toxicidad hacia  $2.500 \text{ mg.kg}^{-1}$  y tiempos de resonancia ventajosos en el medio ambiente. Se ha mostrado que algunas de estas propiedades están en desacuerdo entre sí y, con frecuencia, diseñar formulaciones de insecticidas útiles implica crear formulaciones con características que reflejen un equilibrio entre estas propiedades.

15 Dada la gran utilidad e importancia de los insecticidas encapsulados hay una necesidad urgente y continua de nuevas formulaciones de insecticidas que exhiban propiedades físicas, químicas, biológicas y medioambientales ventajosas. Varios aspectos y realizaciones descritas en la presente memoria buscan abordar esta necesidad.

**Sumario**

20 Un aspecto es una formulación plaguicida que comprende un plaguicida tipo organofosfato y un polímero, donde el polímero forma una pared de una cápsula la cual encapsula al menos parcialmente al plaguicida tipo organofosfato para formar una microcápsula, teniendo la pared un espesor medio de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 25 nm, teniendo dicha microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente  $2 \mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente  $6 \mu\text{m}$  (6 micrómetros) y el plaguicida tipo organofosfato es clorpirifós y la microcápsula incluye aproximadamente al menos entre aproximadamente 15 por ciento en peso y aproximadamente 35 por ciento en peso de clorpirifós, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado. En una realización, la pared de la microcápsula tiene un espesor medio de entre aproximadamente 8 nm y aproximadamente 12 nm, teniendo dicha microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente  $2 \mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente  $6 \mu\text{m}$  (6 micrómetros), y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

30 Los plaguicidas tipo organofosfato incluyen, por ejemplo, acefato, azinfós-metilo, clorfenvinfós, cloretoxifós, clorpirifós-metilo, diazinón, dimetoato, disulfotón, etoprofós, fenitrotión, fentión, fenamifós, fostiazato, malatión, metamidofós, metidatión, ometoato, oxidemetón-metilo, paratión, paratión-metilo, forato, fosmet, profenofós y triclorfón. Según la invención, la microcápsula incluye el plaguicida tipo organofosfato clorpirifós. La microcápsula incluye aproximadamente al menos entre aproximadamente 15 por ciento en peso y aproximadamente 35 por ciento en peso de clorpirifós, donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

35 En una realización, la microcápsula se forma mediante una policondensación interfacial entre al menos un monómero soluble en aceites seleccionado, por ejemplo, del grupo que consiste en: diisocianatos, poliisocianatos, di(cloruros de ácidos), poli(cloruros de ácido), cloruros de sulfonilo y cloroformiatos; y al menos un monómero soluble en agua seleccionado, por ejemplo, del grupo que consiste en: diaminas, poliaminas, dioles solubles en agua y polioles solubles en agua.

40 En una realización, la microcápsula exhibe una toxicidad mayor que aproximadamente  $5.000 \text{ mg.kg}^{-1}$  en ratas hembra y un valor  $\text{LC}_{50}$  para la mitigación inicial de pulgones del algodón (APHIGO) de menos que aproximadamente 30 ppm de clorpirifós. En aún otra realización, la microcápsula exhibe una toxicidad mayor que aproximadamente  $2.500 \text{ mg.kg}^{-1}$  en ratas hembra y un valor  $\text{LC}_{50}$  para la mitigación inicial de gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG) de menos que aproximadamente 400 ppm de clorpirifós.

45 Otro aspecto es un método para sintetizar una microcápsula con propiedades insecticidas, que comprende las etapas de proporcionar un insecticida tipo organofosfato y al menos un monómero; mezclar el insecticida tipo organofosfato y al menos un monómero; y formar una microcápsula, donde el monómero forma un polímero, el polímero que forma una pared, donde la pared engloba al menos parcialmente una porción del insecticida, para formar una microcápsula, teniendo la pared un espesor medio de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 25 nm, y teniendo la microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente  $2 \mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente  $6 \mu\text{m}$  (6 micrómetros) y el plaguicida tipo organofosfato es clorpirifós y la microcápsula incluye aproximadamente al menos entre aproximadamente 15 por ciento en peso y aproximadamente 35 por ciento en peso de clorpirifós, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado. En una realización, el polímero que comprende al menos una porción de la pared de la microcápsula se forma mediante la policondensación interfacial de al menos un monómero soluble en aceites seleccionado del grupo que incluye:

diisocianatos, poliisocianatos, di(cloruros de ácidos), poli(cloruros de ácido), cloruros de sulfonilo y cloroformiatos; y al menos un monómero soluble en agua seleccionado del grupo que incluye: diaminas, poliaminas, dioles solubles en agua y polioles solubles en agua.

5 En una realización, la microcápsula con propiedades insecticidas se forma mediante un polímero que al menos parcialmente engloba un insecticida tipo organofosfato, es decir clorpirifós. El polímero forma una pared de una cápsula que al menos parcialmente rodea una porción de clorpirifós y la pared tiene un espesor medio de entre aproximadamente 8 nm y aproximadamente 12 nm, mientras que la microcápsula tiene un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  (6 micrómetros). Se describe que la microcápsula incluye del orden de al menos 10 por ciento en peso de clorpirifós. En aún otra realización, la pared de polímero de la microcápsula rodea al menos parcialmente al menos un plaguicida tipo organofosfato.

10 Aún otro aspecto es un método para mitigar una población de insectos, que comprende las etapas de: proporcionar una formulación insecticida en partículas, donde dichas partículas incluyen: un insecticida tipo organofosfato, y un polímero; donde el polímero forma una pared de una cápsula la cual encapsula al menos parcialmente al plaguicida tipo organofosfato para formar una microcápsula, en la cual la pared de la microcápsula tiene un espesor medio de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 25 nm, y la microcápsula tiene un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  (6 micrómetros); y aplicar dicho insecticida encapsulado a una superficie, por ejemplo a las hojas, tallos o tronco de una planta, y el plaguicida tipo organofosfato es clorpirifós y la microcápsula incluye aproximadamente al menos entre aproximadamente 15 por ciento en peso y aproximadamente 35 por ciento en peso de clorpirifós, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

15 Una realización es un método para mitigar una población de insectos, que incluye las etapas de: formar una microcápsula con propiedades insecticidas, la microcápsula incluye una pared formada mediante la policondensación interfacial entre al menos un monómero soluble en aceites seleccionado del grupo que consiste en: diisocianatos, poliisocianatos, di(cloruros de ácidos), poli(cloruros de ácido), cloruros de sulfonilo y cloroformiatos; y al menos un monómero soluble en agua seleccionado del grupo que consiste en: diaminas, poliaminas, dioles solubles en agua y polioles solubles en agua; y al menos un insecticida tipo organofosfato se selecciona del grupo que consiste en: clorpirifós, en el cual el componente de la pared polimérica rodea al menos parcialmente una porción del insecticida para formar una microcápsula. En una realización, la microcápsula incluye del orden de entre aproximadamente 15 por ciento en peso y aproximadamente 35 por ciento en peso de clorpirifós.

20 En una realización, la microcápsula usada para mitigar a una población de insectos tiene una pared con un espesor medio de entre aproximadamente 8 nm y aproximadamente 12 nm, teniendo dicha microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  (6 micrómetros).

25 En aún otra realización se usa un insecticida tipo organofosfato microencapsulado para mitigar una población de insectos con un índice de toxicidad mayor que aproximadamente 5.000  $\text{mg.kg}^{-1}$  en ratas hembra y un valor  $\text{LC}_{50}$  para la mitigación inicial de insectos, tales como pulgones del algodón, de menos que aproximadamente 30 ppm de clorpirifós. En aún otra realización, la microcápsula tiene un índice de toxicidad mayor que aproximadamente 2.500  $\text{mg.kg}^{-1}$  en ratas hembra y un valor  $\text{LC}_{50}$  para la mitigación inicial de insectos, tales como gusanos soldado de la remolacha, de menos que aproximadamente 400 ppm de clorpirifós.

30 En la descripción detallada que sigue se pondrán de manifiesto características y ventajas adicionales de la invención, y en parte serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica a partir de esa descripción o serán reconocidas practicando la invención que se describe en la presente memoria, incluyendo la descripción detallada que sigue, las reivindicaciones, así como los dibujos adjuntos.

35 Se ha de entender que tanto la descripción general precedente como la descripción detallada siguiente presentan realizaciones de la invención, y se pretende que proporcionen una visión general o marco para entender la naturaleza y el carácter de la invención como se reivindica. Los dibujos acompañantes se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la invención, y se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva. Los dibujos ilustran varias realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios y operaciones de la invención.

#### Breve descripción de las figuras

40 Fig. 1, valores de  $\text{LC}_{50}$  (ppm de clorpirifós) representados en función de DAT, medidos para varias formulaciones insecticidas, cuando se ensayan respecto a la eficacia contra gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG).

Fig. 2, valores de  $\text{LC}_{50}$  (ppm de clorpirifós) representados en función de DAT, medidos para varias formulaciones testigo y en forma de microcápsulas de clorpirifós, ensayadas respecto a la eficacia contra pulgones del algodón (APHIGO).

#### 55 Descripción detallada

Con el fin de promover la comprensión de los principios de la nueva tecnología, ahora se hará referencia a las realizaciones preferidas de la misma, y para describirla se usará un lenguaje específico. No obstante, se entenderá

que de este modo no se pretende ninguna limitación del alcance de la nueva tecnología, estando tales alteraciones, modificaciones y otras aplicaciones de los principios de la nueva tecnología contemplados como normalmente se le ocurriría a un experto en la técnica con la cual se relaciona la nueva tecnología.

5 En una realización, la invención proporciona una formulación de plaguicidas microencapsulados que al menos incluye un plaguicida para el exterminio o mitigación de al menos una plaga. En algunas formulaciones el plaguicida es o al menos incluye al menos un plaguicida tipo organofosfato. En la presente memoria se describe que los plaguicidas tipo organofosfato incluyen, pero no se limitan a, los siguientes compuestos y varios derivados de los mismos: acefato, azinfós-metilo, clorfenvinfós, cloretoxifós, clorpirifós-metilo, diazinón, dimetoato, disulfotón, etoprofós, fenitrotión, fentión, fenamifós, fostiazato, malatión, metamidofós, metidatión, ometoato, oxidemetón-metilo, paratión, paratión-metilo, forato, fosmet, profenofós y triclorfón, e insecticidas similares.

10 La vaina de la microcápsula puede formarse mediante un polímero el cual cubre completa o parcialmente un núcleo rico en plaguicida. La vaina de la microcápsula puede estar compuesta por una pared, en la cual la pared está constituida por un polímero. Algunos polímeros adecuados que pueden usarse para construir la pared de la microcápsula incluyen al menos un tipo de monómero unido conjuntamente para formar el polímero. En una realización, la pared de polímero se forma mediante la policondensación interfacial de un monómero que es principalmente soluble en agua y otro monómero que es principalmente insoluble en agua.

15 Monómeros adecuados principalmente insolubles en agua que pueden usarse para formar la pared de la microcápsula incluyen, pero no se limitan a, compuestos tales como diisocianatos, poliisocianatos, di(cloruros de ácidos), poli(cloruros de ácido), cloruros de sulfonilo y cloroformatos, y similares. Monómeros adecuados principalmente solubles en agua que pueden usarse para formar la pared de la microcápsula incluyen, pero no se limitan a, compuestos tales como diaminas, poliaminas, dioles solubles en agua y polioles solubles en agua.

20 La pared que comprende al menos una porción de la vaina de algunas microcápsulas tiene un espesor medio de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 25 nm, la microcápsula también puede tener un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  (6 micrómetros) En algunas realizaciones, la pared de la microcápsula tiene un espesor medio de entre aproximadamente 8 nm y aproximadamente 12 nm, teniendo dicha microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  (6 micrómetros).

25 Cuando se usa en la presente memoria, el término “aproximadamente” implica más o menos diez por ciento del valor o intervalo de valores especificado. Por ejemplo, “aproximadamente” 12, incluye valores que varían de 10,2 a 13,2; aproximadamente 10 por ciento en peso engloba la formación que incluye entre 9 y 11 por ciento en peso; y similares.

30 Las microcápsulas según varios aspectos y realizaciones exhiben buena toxicidad hacia las poblaciones de insectos diana y valores de  $\text{LD}_{50}$  en el intervalo de mayor que aproximadamente 2.500  $\text{mg.kg}^{-1}$  medidos en ratas hembra. En una serie de realizaciones, la microcápsula tiene un valor de  $\text{LD}_{50}$  en el intervalo de mayor que aproximadamente 5.000  $\text{mg.kg}^{-1}$  medido en ratas hembra, típicamente estos valores se expresan en términos de la cantidad de plaguicida en la formulación como una fracción del peso corporal del mamífero de ensayo. En aún otra realización, estas microcápsulas exhiben valores  $\text{LD}_{50}$ , medidos en ratas hembra, en el intervalo de aproximadamente 2.500  $\text{mg.kg}^{-1}$  de insecticida activo. Las microcápsulas también son efectivas para matar, inhibir o repeler plagas. Algunas realizaciones se adaptan bien para tratar o mitigar una población de insectos entrando en contacto con el insecto. Por ejemplo, una formulación incluye aproximadamente 25 por ciento en peso de clorpirifós y tiene un valor de  $\text{LC}_{50}$  de aproximadamente 30 ppm de clorpirifós contra pulgones del algodón (APHIGO) cuando la preparación de la microcápsula se aplica a una población de insectos o a un área adyacente a una población de insectos.

35 En aún otra realización, la microcápsula es útil para el tratamiento de insectos mascadores tales como los gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG). En una realización, la formulación incluye aproximadamente 25 por ciento en peso de clorpirifós y tiene un valor de  $\text{LC}_{50}$  de aproximadamente 450 ppm para la mitigación inicial de gusanos soldado de la remolacha y de menos que aproximadamente 400 ppm de clorpirifós cuando una preparación de la microcápsula se aplica a un área adyacente a una población de insectos. En aún otra realización, la formulación incluye aproximadamente 25 por ciento en peso de clorpirifós y tiene un valor de  $\text{LC}_{50}$  de aproximadamente 50 ppm contra pulgones del algodón (APHIGO) cuando una preparación de la microcápsula se aplica a plantas en una concentración final de menos que aproximadamente 30 ppm de clorpirifós. En aún otra realización, la microcápsula es útil para el tratamiento de insectos mascadores tales como los gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG). En una realización, la formulación incluye aproximadamente 20 por ciento en peso de clorpirifós y es tan efectiva como Lorsban® para la mitigación inicial de gusanos soldado de la remolacha cuando se aplica en una tasa de entre 185 – 1.000 ppm de clorpirifós. La misma formulación es más efectiva que Lorsban® para mitigar gusanos soldado de la remolacha cinco días después de su aplicación.

40 Otro aspecto de la invención es un método para sintetizar una microcápsula con propiedades insecticidas. En una realización, el método comprende las etapas de proporcionar un insecticida, por ejemplo, un insecticida tipo organofosfato, y al menos una molécula que pueda usarse para formar un revestimiento el cual cubra al menos parcialmente al insecticida formando al menos una barrera parcial entre el insecticida y el medio ambiente. En una

realización, el revestimiento, vaina o al menos los componentes de la pared de la microcápsula, están formados por un monómero el cual puede hacerse reaccionar con un monómero similar o diferente para formar un polímero que forme la pared de la microcápsula. Las etapas adicionales pueden incluir mezclar conjuntamente el insecticida y los componentes que forman la pared y hacer reaccionar al menos alguno de los componentes para formar una estructura pared que cubra o revista o secuestre al menos parcialmente el insecticida dentro de una porción de la microcápsula.

En una realización, el insecticida proporcionado para formar la microcápsula es un organofosfato tal como clorpirifós.

En una realización, el polímero que comprende al menos una porción de la pared de la microcápsula se forma mediante una policondensación interfacial entre al menos un monómero soluble en aceites seleccionado del grupo que incluye: diisocianatos, poliisocianatos, di(cloruros de ácidos), poli(cloruros de ácido), cloruros de sulfonilo y cloroformiatos; y al menos un monómero soluble en agua seleccionado del grupo que incluye: diaminas, poliaminas, dioles solubles en agua y polioles solubles en agua.

En una realización, se forma una microcápsula con propiedades insecticidas mediante un polímero que al menos parcialmente engloba un insecticida tipo organofosfato, tal como clorpirifós. El polímero forma una pared que al menos parcialmente rodea una porción de clorpirifós y la pared tiene un espesor medio de entre aproximadamente 8 nm y aproximadamente 12 nm. En otra realización, la pared tiene un espesor medio de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 25 nm. En una realización, la microcápsula tiene un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  (6 micrómetros).

Aún otro aspecto es un método para mitigar una población de insectos, que comprende las etapas de: proporcionar una formulación insecticida en partículas, donde dichas partículas incluyen: un insecticida tipo organofosfato, y un polímero; donde el polímero forma una pared de una cápsula la cual encapsula al menos parcialmente al plaguicida tipo organofosfato para formar una microcápsula, en la cual la pared de la microcápsula tiene un espesor medio de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 25 nm, y la microcápsula tiene un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  (6 micrómetros); y aplicar dicho insecticida encapsulado a una superficie, por ejemplo a las hojas, tallos o tronco de una planta.

Una realización es un método para mitigar una población de insectos, que incluye las etapas de: formar una microcápsula con propiedades insecticidas, la microcápsula incluye una pared formada mediante la policondensación interfacial de al menos un monómero soluble en aceites seleccionado del grupo que consiste en: diisocianatos, poliisocianatos, di(cloruros de ácidos), poli(cloruros de ácido), cloruros de sulfonilo y cloroformiatos; y al menos un monómero soluble en agua seleccionado del grupo que consiste en: diaminas, poliaminas, dioles solubles en agua y polioles solubles en agua; y al menos un insecticida tipo organofosfato se selecciona de clorpirifós, en el cual el componente de la pared polimérica rodea al menos parcialmente una porción del insecticida para formar una microcápsula. En una realización, la microcápsula incluye del orden de aproximadamente al menos 10 por ciento en peso de clorpirifós. En una realización, la microcápsula usada para mitigar a una población de insectos tiene una pared con un espesor medio de entre aproximadamente 8 nm y aproximadamente 12 nm, teniendo dicha microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (2 micrómetros) a aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  (6 micrómetros).

En aún otra realización se usa un insecticida tipo organofosfato microencapsulado para mitigar una población de insectos que tiene un índice de toxicidad mayor que aproximadamente 5.000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  en ratas hembra y un valor de  $\text{LC}_{50}$  para la mitigación inicial de insectos, tales como pulgones del algodón (APHIGO), de menos que aproximadamente 30 ppm de clorpirifós. En aún otra realización, la microcápsula tiene un índice de toxicidad mayor que aproximadamente 2.500  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  en ratas hembra y un valor de  $\text{LC}_{50}$  para la mitigación inicial de insectos, tales como gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG), de menos que aproximadamente 400 ppm de clorpirifós.

Un enfoque muy exitoso tomado por los productores de plaguicidas para crear formulaciones de insecticidas que exhiban un equilibrio de propiedades ventajosas ha sido encapsular compuestos insecticidas con materiales que exhiban baja o ninguna toxicidad hacia la población de insectos diana y/o que sean más estables y/o más fáciles de manipular que el insecticida solo. En general, estas formulaciones encapsuladas exhiben al menos una propiedad deseable en relación con el insecticida no encapsulado.

Las formulaciones en partículas, que incluyen microcápsulas que incluyen al menos un compuesto tóxico para al menos una especie de insecto, especialmente una especie de insecto que sirve como vector de enfermedades de seres humanos o animales o es una amenaza para especies de plantas comercialmente importantes, son de gran importancia. Los compuestos que son tóxicos incluyen, pero no se limitan a, organofosfatos tales como acefato, azinfós-metilo, clorfenvinfós, cloretoxifós, clorpirifós, clorpirifós-metilo, diazinón, dimetoato, disulfotón, etoprofós, fenitrotión, fentión, fenamifós, fostiazato, malatión, metamidofós, metidatión, ometoato, oxidemetón-metilo, paratión, paratión-metilo, forato, fosmet, profenofós, triclorfón e insecticidas similares.

Los compuestos organoclorados son otra clase de moléculas con propiedades insecticidas e incluyen compuestos tales como heptacloro, dicloro-difenil-tricloroetano, dicofol, endosulfano, cordano, mirex y pentaclorofenol. Otra clase de insecticidas y repelentes de insectos son los piretroides. Estos compuestos son similares al compuesto piretro

que se encuentra en la naturaleza, e incluyen, por ejemplo, aletrina, bifentrina, cipermetrina, deltametrina, permetrinas, praletrina, resmetrina, sumitrina, tetrametina, tralometrina, transflurina e imiprotrina. Aún otra clase de insecticidas es similar al compuesto nicotina que se encuentra en la naturaleza. Además de la nicotina, esta clase de insecticidas y repelentes de insectos incluye los siguientes compuestos: acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, nitenpiram, tiacloprid y tiametoxamo.

Los métodos y compuestos para formar partículas incorporan cualquier método que puede usarse para formar una vaina, capa, revestimiento o pared. En general, el ingrediente activo en tales partículas está principalmente localizado dentro de la pared aunque para formar una partícula no se requiere necesariamente la cobertura completa del ingrediente activo; las partículas incluyen formulaciones en las cuales al menos una porción del ingrediente activo es contigua con la pared o incluso cae fuera de al menos una porción de la pared.

Un método para formar una partícula que incluye formar una pared completa o total, la cual actúa para separar total o parcialmente un insecticida de la masa de disolvente o del medio ambiente, es la policondensación interfacial de monómeros. Brevemente, una mezcla de monómeros se condensa para formar una pared polimérica en presencia de al menos un insecticida. Una pared que comprende un polímero forma esencialmente la frontera externa de la partícula; el insecticida puede estar principalmente concentrado dentro de la partícula enlazado por una pared continua o discontinua que forma el contorno externo de la partícula. Los monómeros que pueden usarse para formar partículas mediante el procedimiento de policondensación interfacial pueden incluir monómeros principalmente solubles en aceites o una serie de tales monómeros y un monómero soluble en agua o una serie de tales monómeros solubles en agua. Los monómeros solubles en aceites incluyen, por ejemplo, compuestos seleccionados del grupo que comprende: diisocianatos, poliisocianatos, di(cloruros de ácidos), poli(cloruros de ácido), cloruros de sulfonilo y cloroformiatos, y similares. Los monómeros solubles en agua incluyen, por ejemplo, compuestos seleccionados del grupo que comprende: diaminas, poliaminas, dioles solubles en agua y polioles solubles en agua.

Para formar un insecticida o un repelente de insectos con propiedades deseables se requieren varias propiedades. Estas propiedades incluyen toxicidad hacia insectos o al menos el efecto de repeler a los insectos diana o limitar su desarrollo y/o capacidad de reproducirse. Aún otra propiedad deseable es una toxicidad baja o idealmente ausente hacia otros animales tales como mamíferos, especialmente seres humanos, o hacia plantas o especies de insectos no diana, especialmente especies beneficiosas.

Otra propiedad deseable es una vida media predecible, y en la mayor parte de los casos larga, de eficacia contra las plagas diana. Las formulaciones de plaguicidas que retienen eficacia contra las poblaciones de plagas diana durante largos períodos de tiempo pueden necesitar ser aplicadas menos frecuentemente o en menores cantidades iniciales con el fin de mitigar plagas diana, permitiendo de este modo ahorros de mano de obra, energía y materiales. Al contrario, las formulaciones que tienen vidas medias largas que, por ejemplo, se extienden significativamente después de la estación de crecimiento de cultivos específicos o de los períodos máximos de infestación de las plagas diana pueden considerarse una molestia medioambiental en ciertas circunstancias.

Aún otra propiedad deseable es un período de permanencia como residuo predecible y en la mayor parte de los casos largo. Aplicar formulaciones plaguicidas que exhiban un largo período de permanencia como residuo puede dar lugar a ahorros de coste ya que son necesarias menos aplicaciones durante el curso de una estación de crecimiento o un período de infestación largo. Aunque es posible identificar las propiedades ideales de un insecticida ideal debido a diferencias en cómo tienen que usarse, no hay ningún plaguicida ideal. El objetivo entonces es crear un plaguicida con propiedades específicas que pueda usarse cuando sea necesario en varias condiciones únicas.

En la presente memoria se describen plaguicidas microencapsulados en forma de partículas que poseen un espesor de pared y tamaños de partícula que contribuyen a su utilidad en varias condiciones. Inesperadamente, estas realizaciones incluyen formulaciones de insecticidas con tamaños de partícula y espesores de pared que dan lugar a partículas que exhiben una actividad destructora muy alta que incluye la actividad de contacto con los insectos diana, valores de toxicidad LD<sub>50</sub> contra ratas hembra del orden de aproximadamente 2.500 mg.kg<sup>-1</sup> y en algunos casos mayores y favorables valores de permanencia de residuos.

Ahora se hará referencia en detalle a una realización o a realizaciones de la invención, ejemplos de los cuales se ilustran en los dibujos acompañantes. Siempre que sea posible, se usarán los mismos números de referencia a lo largo de las figuras y tablas para referirse a los mismos compuestos o a compuestos semejantes, a composiciones, dispositivos y similares.

### Ejemplos

Será evidente para los expertos en la técnica que pueden hacerse varias modificaciones y variaciones de la presente invención sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Así, se pretende que la presente invención cubra las modificaciones y variaciones de esta invención siempre que entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y de sus equivalentes.

**Materiales y métodos**

## Materiales y métodos

5 Con referencia ahora a la tabla 1, en la misma puede verse un resumen de las propiedades químicas y físicas de algunas formulaciones nuevas y testigo que incluyen clorpirifós y microcápsulas. Estas cápsulas se produjeron por policondensación interfacial como se ejemplifica mediante un procedimiento modelo.

Tabla 1. Formulaciones en cápsulas

Número de lote	CCS-0	CCS-1	CCS-2	CCS-3
Diámetro diana de la cápsula ( $\mu\text{m}$ )	3	3	6	6
Espesor diana de la pared de la cápsula (nm)	5	10	5	10
Clorpirifós (% en peso)	15,522	15,419	15,574	15,522
Producto aromático de la gama de xileno <sup>1</sup>	9,313	9,251	9,344	9,313
Polimetileno polifenilisocianato (g) <sup>2</sup>	0,165	0,330	0,083	0,165
Etilendiamina (g) <sup>3</sup>	0,040	0,079	0,020	0,040
Poli(alcohol vinílico) GL03 PVA (g) <sup>4</sup>	2,275	2,275	1,400	1,400
Arcilla bentonita (g) <sup>5</sup>	0,455	0,455	0,455	0,455
Goma xantana (g) <sup>6</sup>	0,057	0,057	0,057	0,057
Tensioactivo polimérico (g) <sup>7</sup>	1,266	1,266	0,779	0,779
Agua (g)	32,470	32,926	33,266	33,445
Diámetro medido de la cápsula ( $\mu\text{m}$ )	3,3	3,5	6,2	5,9

<sup>1</sup> Aromatic 100 (g), Exxon Mobile Corp., Fairfax, VA.

<sup>2</sup> PAPI® 27, Dow Plastics, Midland, MI

<sup>3</sup> Sigma-Aldrich

<sup>4</sup> Gohsenol GL03 (g), de Wippou Gohsei

<sup>5</sup> Veegam®, RT Vanderbilt, Inc.

<sup>6</sup> Kelzan® S, Kelco, Co.

<sup>7</sup> Atlox® 4913, Croda.

10

15 Testigos:

Lorsban 4E – NAF-163

Pyrinex ME – una suspensión comercial de cápsulas de clorpirifós comercializada en Europa por Bayer.

## Preparación de suspensiones de microcápsulas

20

Los pesos representativos de los componentes usados para la preparación de suspensiones de cápsulas se suman en la anterior sección de materiales. El procedimiento de preparación fue como sigue: la cantidad indicada de monómero isocianato PAPI 27 (Dow Chemical) se añadió a un frasco de 0,12 L (4 onzas) de boca ancha. Se añadió a PAPI 27 una mezcla aromática que incluía 62,5% en peso de clorpirifós para dar 25 g de fase orgánica. La mezcla se agitó formando remolinos hasta que fue homogénea. Se preparó una fase acuosa compuesta de las cantidades indicadas de poli(alcohol vinílico) (PVA, Gohsenol GL03, Nippon Gohsei), Veegum® (R.T. Vanderbilt) y Kelzan S® con suficiente agua desionizada para dar 35 g de fase acuosa total. La fase acuosa se añadió a la fase orgánica para dar una mezcla de dos fases. Esta mezcla se emulsionó usando un mezclador Silverson L4RT-A de alta velocidad usando un montaje de mezclado estándar equipado con un tubo de mezclado de 1,91 cm (3/4 pulgadas) y un cabezal de emulsionamiento de uso general. El emulsionamiento se consiguió mezclando en primer lugar a una velocidad relativamente baja (~1000 rpm) con la punta del montaje de mezclado localizada en la fase acuosa para introducirla en la fase orgánica hasta que estuviera bien emulsionada. A continuación, se aumentó la velocidad en incrementos discretos. El mezclador se paró después de cada aumento de la velocidad y se hizo una medida del tamaño. Este procedimiento se continuó hasta que se obtuvo el tamaño de partícula deseado. Para alcanzar el tamaño deseado se requirió típicamente una velocidad de ~ 4500-7500 rpm. La amina reticulada (etilendiamina (EDA), Aldrich) se añadió gota a gota como una disolución acuosa al 10% mientras se agitaba a una velocidad reducida que mantuvo un buen mezclado. Tras la finalización de la adición de la amina, la suspensión de cápsulas resultante se agitó durante un minuto adicional, se añadió la cantidad indicada de Atlox 4913 (Uniqema) y se realizó una breve homogeneización final para completar la preparación de la suspensión de cápsulas.

35

Ajustando cuidadosamente el período de tiempo que la mezcla se agitó y/o ajustando la velocidad del mezclador, es posible producir formulaciones de insecticidas tipo organofosfato encapsulados de tamaño de cápsula variable que tenga un intervalo de espesores de vaina.

- 5 Similarmente, la cantidad de monómero, agentes reticulantes, agentes humectantes, agente amortiguador del pH y agentes similares se ajustó para crear formulaciones de insecticidas tipo organofosfato encapsulados que tienen espesores variables de cápsula y vaina.

Medida del tamaño de partícula en suspensiones de microcápsulas

- 10 Las distribuciones de tamaño de partícula de la suspensión de cápsulas se determinaron usando un analizador de tamaños de partícula por difusión de luz Malvern Mastersizer 2000 equipado con una unidad para muestras de pequeño volumen y usando un paquete informático versión 5.12. Antes de la medida, las muestras se sacudieron o agitaron bien para asegurar la homogeneidad. La distribución de la mediana del volumen (VMD) se da para cada formulación en la sección de materiales anterior.

Cálculo del espesor de la pared de la cápsula

- 15 El cálculo de las cantidades de los componentes de la pared de la cápsula necesario para conseguir un espesor de pared diana se basó en la fórmula geométrica que relaciona el volumen de una esfera con su radio. Si se supone una morfología núcleo-vaina, con el núcleo compuesto de componentes insolubles en agua no formadores de pared (clorpirifós, disolvente) y la vaina constituida por los materiales polimerizables (monómeros solubles en aceites y agua), entonces se obtiene la ecuación (1), que relaciona la relación del volumen del núcleo ( $V_c$ ) y el volumen del núcleo más el volumen de la vaina ( $V_s$ ) con sus respectivos radios, en la que  $r_s$  es el radio de la cápsula incluyendo la vaina e  $l_s$  es el espesor de la vaina.
- 20

$$\frac{V_c + V_s}{V_c} = \left( \frac{r_s}{r_s - l_s} \right)^3 \quad (1)$$

La resolución de la ecuación (1) para el volumen de la vaina da:

$$V_s = V_c \left( \left( \frac{r_s}{r_s - l_s} \right)^3 - 1 \right) \quad (2)$$

- 25 Sustituyendo las masas ( $m_i$ ) y las densidades ( $d_i$ ) por sus respectivos volúmenes ( $m_s/d_s = V_s$  y  $m_c/d_c = V_c$ , donde el subíndice s o c se refiere a la vaina o al núcleo, respectivamente) y resolviendo respecto a la masa de la vaina da:

$$m_s = m_c \frac{d_s}{d_c} \left( \left( \frac{r_s}{r_s - l_s} \right)^3 - 1 \right) \quad (3)$$

- 30 Comparando las ecuaciones (2) y (3) puede verse que el efecto de la relación de densidades  $d_s/d_c$  es aplicar un factor de corrección constante cuando se usan las masas para calcular las cantidades de componentes de la pared necesarias para producir una cápsula del tamaño y espesor de pared deseados. Cuando la relación de densidades permanece constante para una serie de cápsulas, como en el presente estudio cuando se usaron los mismos materiales para el núcleo y la vaina en todas las preparaciones, la eliminación de la relación de densidades sólo afecta al valor absoluto del espesor de la pared, no a las diferencias relativas. Puesto que las diferencias relativas son de importancia primaria, la aproximación de la eliminación del término de relación de densidades se utilizó para simplificar los cálculos, dando la ecuación (4):

$$m_s \approx m_c \left( \left( \frac{r_s}{r_s - l_s} \right)^3 - 1 \right) \quad (4)$$

- 35 Haciendo las sustituciones  $m_c = m_o - m_{OSM}$ ,  $m_s = m_o + (f_{WSM/OSM})m_{OSM} - m_c$ , y  $f_{WSM/OSM} = m_{WSM}/m_{OSM}$  (la relación de monómero soluble en agua a monómero soluble en aceites), en la que  $m_o$  es la masa total de los componentes

oleosos (clorpirifós, disolvente, monómero soluble en aceites),  $m_{OSM}$  es la masa de monómero soluble en aceites, y  $m_{WSM}$  es la masa de monómero soluble en agua, y resolviendo respecto a  $m_{OSM}$  da:

$$m_{OSM} = \frac{m_O \left( \left( \frac{r_S}{r_S - l_S} \right)^3 - 1 \right)}{f_{WSM+OSM} + \left( \frac{r_S}{r_S - l_S} \right)^3} \quad (5)$$

5 Para la determinación de  $m_{OSM}$ , se usó la cantidad total de  $m_{WSM}$  en el cálculo como una convención. En el presente estudio, el monómero soluble en agua se usó sobre una base en peso equivalente 1:1 relativa al monómero soluble en aceites para todas las preparaciones de suspensiones de cápsulas.

Ensayos biológicos usados para medir la actividad contra especies representativas de postes comúnmente infestados

10 Pyrinex CS® es una marca comercial registrada de Bayer Corporation. El compuesto es una forma encapsulada de clorpirifós. El material usado como testigo en el experimento dado en la presente memoria fue fabricado por Makhteshim Chemical Works, Be'er Sheva, Israel. Según una Ficha de Datos de Seguridad de Materiales proporcionada por el proveedor, Pyrinex CS tiene una toxicidad oral, valor de  $LD_{50}$  de  $> 20.000 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

15 Lorsban 4E es un concentrado emulsionado de clorpirifós, comercializado por Dow Agro Sciences, Indianápolis, Indiana, EE.UU. Según una Ficha de Datos de Seguridad de Materiales disponible a través del proveedor, Lorsban 4E tiene un valor de  $LD_{50}$  en ratas hembra de aproximadamente  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

20 Lorsban 4E y Pyrinex CS se seleccionaron para usar como testigos en muchos de los ensayos porque estas formulaciones representan dos extremos en formulaciones de clorpirifós. Lorsban es un concentrado emulsionado conocido por tener una excelente actividad destructora, y un valor de  $LD_{50}$  en ratas hembra de aproximadamente  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ , mientras que Pyrinex tiene un valor de  $LD_{50}$  en ratas hembra del orden de aproximadamente  $20.000 \text{ mg.kg}^{-1}$  y una mala actividad destructora. Los datos de toxicidad de Lorsban y Pyrinex son de las Fichas de Datos de Seguridad de Materiales de las dos formulaciones.

25 Actividad contra gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG): se pulverizaron plantas en un estadio de crecimiento de 4-5 hojas verdaderas con un pulverizador de pista calibrado para suministrar el equivalente de  $200 \text{ L/Ha}$  a través de una boquilla Teejet 8003 EVS a  $2,7 \text{ atm}$  ( $40 \text{ psi}$ ). Para las evaluaciones a tiempo cero las plantas se dejaron secar antes de cosechar el tejido de las hojas. Para los ensayos de material residual, las plantas se dejaron envejecer en un invernadero ( $26,7\text{-}37,8^\circ\text{C}$ , humedad relativa  $70\text{-}80\%$ ). Se cortaron discos de hojas de  $3 \times 3 \text{ cm}$  de las plantas pulverizadas y se colocó un disco de hoja en cada pocillo de una bandeja de bioensayos de 32 pocillos que tenía una capa fina de agar en el fondo. Se colocaron larvas de gusano soldado de la remolacha de segundo instar en el centro de cada disco de hoja y la bandeja se cubrió con una tapa de plástico. Las larvas se mantuvieron en una cámara medioambiental a  $25^\circ\text{C}/\text{HR } 40\%$ . La mortalidad se puntuó a las 24 horas después de la infestación y una larva se consideró muerta si no podía moverse cuando se la pinchaba. Los datos se analizaron usando una transformación probit log-dosis para determinar los  $LC_{50}$  y  $LC_{90}$  y sus intervalos de confianza del  $95\%$ .

35 Actividad contra pulgones del algodón (APHIGO). Se introdujeron pulgones del algodón en plantones de calabacín colocando pequeñas piezas de hojas de calabacín infestadas de pulgones de la colonia de laboratorio (*Aphis Gossypii*) sobre el cotiledón de los calabacines. Se dejó que los pulgones se dispersaran sobre las hojas durante 24 horas antes del tratamiento. Las plantas de calabacín fueron rociadas con la disolución de ensayo usando un pulverizador aerógrafo manual Devilbis. Las plantas se rociaron hasta que se observó escorrentía. La mitigación se puntuó a las 24 horas seleccionando aleatoriamente una hoja de cada planta y contando el número de pulgones vivos presentes. Los datos se analizaron usando una transformación probit log-dosis para determinar los  $LC_{50}$  y  $LC_{90}$  y sus intervalos de confianza del  $95\%$ . Para determinar la mitigación residual se rociaron plantas de calabacín no infestadas y se dejaron envejecer en un invernadero a  $26,7\text{-}32,2^\circ\text{C}/\text{HR } 70\text{-}80\%$ . A continuación, las plantas se infestaron como se describió anteriormente y la mitigación se puntuó 24 horas después como se ha señalado.

Métodos representativos usados para medir residuos de varias formulaciones ensayadas

45 Procedimiento: se diluyeron las formulaciones para dar  $1 \text{ kg}$  de clorpirifós/ $200 \text{ L}$  de volumen de pulverización y se pulverizaron sobre 12 plantas en la etapa de 2-3 hojas (cotiledón). Las plantas se transportaron a un invernadero ( $26,7\text{-}32,2^\circ\text{C}/\text{HR } 70\text{-}80\%$ ) y se aplicó un volumen de pulverización de  $200 \text{ L/Ha}$  a una tasa de  $1 \text{ kg}$  de ingrediente activo/Ha.

Muestreo: se separaron tres cotiledones de la serie de tratamientos los días 0, 3, 7 y 14 después del tratamiento (DAT). Las hojas se pesaron, se colocaron en una botella de vidrio de  $0,03 \text{ L}$  ( $1 \text{ onza}$ ) a la cual se añadieron  $10 \text{ mL}$

de acetonitrilo. Las botellas se taparon y se agitaron mediante sacudidas durante 45 minutos en una mesa de agitación para que el acetonitrilo cubriera la hoja completa durante la agitación. Se pasó una muestra de acetonitrilo a través de un filtro de jeringa de PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$  (0,45 micrómetros) a un vial de LC y se envió para analizar.

5 Análisis: para medir la concentración de clorpirifós en el extracto se usó GC/MS. No se requirió concentrar las muestras.

Métodos usados para medir la toxicología de varias fórmulas en el ensayo límite en ratas hembra a una dosis de 2.000  $\text{mg.kg}^{-1}$

10 El objetivo del estudio fue determinar el potencial de la sustancia de ensayo para producir efectos letales a una dosis fija. Se administró una dosis inicial de 2.000  $\text{mg.kg}^{-1}$  a un único animal hembra. Puesto que el animal inicial sobrevivió tras la dosis, la sustancia de ensayo se administró secuencialmente a 4 hembras adicionales de modo que se trataron un total de cinco animales.

Ensayo límite a 5.000  $\text{mg.kg}^{-1}$

15 Se administraron dosis secuencialmente a tres animales adicionales con 5.000  $\text{mg.kg}^{-1}$ . Puesto que el animal inicial sobrevivió tras la dosis, la sustancia de ensayo se administró secuencialmente a dos ratas hembras adicionales. Puesto que todos los animales sobrevivieron, el ensayo se terminó y los valores de  $\text{LD}_{50}$  se consideraron mayores que 5.000  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

Especie de ensayo

20 Para este estudio se usaron ratas que pesaban 113,0 – 143,2 g al inicio del estudio. A las ratas se les administró dosis comenzando a la edad de aproximadamente dos meses y se les hizo una necropsia entre 2 y 3 semanas después.

Raza y justificación

25 En este estudio se usaron ratas hembra F344/DuCrI debido a su aceptación general y adecuación para los ensayos de toxicidad oral aguda, la disponibilidad de datos históricos y la fiabilidad del proveedor comercial. Los animales de ensayo se obtuvieron de Charles River Laboratories Inc. (Raleigh, Carolina del Norte). La edad de los animales al inicio del estudio fue 8-11 semanas.

Estado físico y aclimatación

30 Cada animal fue evaluado por un veterinario de laboratorio, o un técnico entrenado de animales/toxicología bajo la supervisión directa de un veterinario de laboratorio, para determinar el estado general de salud y la aceptabilidad para los fines del estudio tras la llegada al laboratorio (completamente acreditado por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International – AAALAC International).

Alojamiento

35 Se alojaron dos a tres animales por jaula en jaulas de acero inoxidable, en habitaciones diseñadas para mantener condiciones adecuadas (temperatura, humedad y fotociclo), y se aclimataron al laboratorio durante al menos una semana antes del inicio del estudio. Los animales fueron alojados uno por jaula en jaulas de acero inoxidable. La humedad relativa se mantuvo dentro del intervalo de 40-70%. La temperatura media de la habitación se mantuvo a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  (con una variación máxima permisible de  $\pm 3^\circ\text{C}$ ). En todas las habitaciones de los animales se mantuvo un fotociclo de luz/oscuridad de 12 horas con encendido a las 6:00 a.m. y apagado a las 6:00 p.m. El aire de las habitaciones fue renovado aproximadamente 12-15 veces/hora. Las jaulas tenían suelos de malla de alambre y estaban suspendidas por encima de papel absorbente. Las jaulas contenían un alimentador colgante y un sistema de riego tipo válvula lixit activada por presión.

40

Aleatorización e identificación

Las ratas se asignaron aleatoriamente a los grupos de dosificación usando un programa de ordenador. Las ratas fueron identificadas vía un número de código transmitido mediante un transpondedor implantado subcutáneamente (BioMedic Data Systems, Seaford, Delaware).

45 Alimentación y agua

50 A los animales se les proporcionó dieta certificada para roedores LabDieta nº 5002 (PMI Nutrition International, St Louis, Missouri) en forma de pelets. La comida y agua municipal se proporcionaron a voluntad. Los análisis de la alimentación fueron realizados por PMI Nutrition International para confirmar que la dieta proporcionaba una adecuada nutrición y para cuantificar las concentraciones de contaminantes seleccionados. El agua potable obtenida de la fuente de agua municipal fue periódicamente analizada por el departamento municipal de agua respecto a parámetros químicos y contaminantes biológicos. Además, se llevaron a cabo análisis específicos de contaminantes químicos a intervalos periódicos por una instalación de análisis independiente. No se encontró ningún contaminante

que pudiera impactar adversamente en los resultados o en la interpretación de este estudio ni en los alimentos ni en el agua.

#### Bienestar animal

5 De acuerdo a los reglamentos sobre bienestar animal del Ministerio de Agricultura de EE.UU., Subcapítulo A, Partes 1-4, el cuidado de los animales y las actividades requeridas para llevar a cabo este estudio fueron revisadas y aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). El IACUC ha determinado que las actividades propuestas estaban en completo acuerdo con estas Normas Finales. El Cuidado de los Animales y las Actividades de Uso aprobadas por el IACUC a emplear en este estudio fueron Acute Tox 01, DCO 01 y Animal ID 01.

#### 10 Cálculo de las dosis

Las dosis individuales se calcularon sobre la base de los pesos corporales iniciales (en ayunas). Todas las dosis fueron administradas volumétricamente después de corregir respecto al peso específico.

#### Dosificación

15 Se administraron dosis secuencialmente a animales individuales. El intervalo de tiempo entre administraciones de dosis se determinó por el inicio, duración y gravedad de los signos tóxicos. El tratamiento de un animal en la siguiente dosis se retrasó hasta que se consiguió una confianza razonable de supervivencia del animal al que previamente se había administrado una dosis. A cada animal se le administró una dosis por intubación oral usando una aguja de sondar con punta de bola de acero inoxidable unida a una jeringa apropiada. El volumen máximo administrado de una sola vez dependió del tamaño del animal. El volumen no excedió de 10 mL/kg.

#### 20 Observaciones diarias

Este examen se realizó típicamente con los animales en sus jaulas y se diseñó para detectar anomalías clínicas significativas que fueran claramente visibles tras un examen limitado, y para monitorizar la salud general de los animales. Para estas observaciones los animales no fueron tomados con la mano a menos que se considerara necesario. Las anomalías significativas que podrían observarse incluyen, pero no se limitan a: 25 disminución/aumento de la actividad, comportamiento repetitivo, vocalización, descoordinación/cojera, lesiones, función neuromuscular (convulsiones, fasciculaciones, temblores, sacudidas), respiración alterada, piel y membranas de las mucosas azules/pálidas, lesión ocular aguda (ruptura), alteraciones de la consistencia fecal y cantidad fecal/urinaria. Además, todos los animales fueron observados al menos dos veces por día respecto a morbilidad, mortalidad y la disponibilidad de alimentos y agua.

#### 30 Observaciones clínicas detalladas

Se llevó a cabo una observación clínica detallada (DCO) en todas las ratas antes de la administración del material a ensayar para comparar con las observaciones registradas a lo largo del estudio. Los animales fueron observados un mínimo de dos veces el día de tratamiento. Durante el estudio se hizo una DCO cada día (incluyendo los fines de semana y los días festivos). Las observaciones manuales y en campo abierto incluyeron un cuidadoso examen físico según un formato establecido. Para DCOs calificadas sólo se registraron observaciones diferentes que las que típicamente se esperaban. Las observaciones estaban basadas en el diccionario, y el diccionario contenía la mayor parte de las anomalías físicas y neurológicas comunes vistas en estudios de toxicidad. Puesto que no todas las observaciones potenciales estaban contenidas en el diccionario, también se permitieron descripciones de texto libre.

#### Patología

40 Los animales enviados vivos para ser sometidos a necropsia se anestesiaron mediante la inhalación de dióxido de carbono, las tráqueas fueron expuestas y se sujetaron y los animales fueron sacrificados por decapitación. Un patólogo veterinario, ayudado por un equipo de individuos entrenados, realizó una necropsia completa de todos los animales. La necropsia incluyó un examen de los tejidos externos y de todos los orificios. Los ojos fueron examinados in situ por aplicación de una platina de vidrio humectada a cada córnea. La cavidad craneal se abrió y se examinaron el cerebro, la glándula pituitaria y los tejidos cervicales adyacentes. La piel se separó de los cuerpos y las cavidades torácicas y abdominales se abrieron y las vísceras se examinaron. Todos los tejidos y armazones óseos se desecharon.

#### Estadísticas

50 Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los pesos corporales. Después de que se administrara cada nivel de dosis, los resultados a corto y largo plazo se introdujeron en el programa OECD 425 AOT. Cuando se emplearon criterios de parada, se calcularon los LC<sub>50</sub> y los intervalos de confianza del 95%.

Ejemplo 1

Resultados y discusión

5 En la tabla 2 se presentan los datos primarios de residuos de insecticida en algodón para varias formulaciones testigo y experimentales. Los datos se analizaron en Minitab suponiendo una degradación de primer orden y ajustando a una línea por medio de una representación de log (residuo medio) frente al tiempo (días).

Tabla 2. Datos de residuos recogidos de ensayos de formulaciones nuevas en forma de microcápsulas y de formulaciones testigo. Se hicieron medidas inicialmente y 6 y 13 días después de la aplicación.

		Peso inicial de las hojas			Análisis CPF inicial			Residuo mg/kg			
Formulación	Conc. de ingrediente activo	1	2	3	1	2	3	1	2	3	Media
Lorsban 4E	44,1% en peso	0,621	0,475	0,591	51	48	32	410,6	505,3	270,7	457,9
Pyrinex CS	250 g/L	0,509	0,571	0,672	65	60	92	638,5	525,4	684,5	616,1
CCS-0	20,1% en peso	0,661	0,853	0,446	53	29	74	400,9	170,0	829,6	615,3
CCS-1	19,9% en peso	0,873	0,557	0,728	66	102	62	378,0	915,6	425,8	573,2
CCS-2	20,4% en peso	0,655	0,67	0,461	59	75	39	450,4	559,7	423,0	477,7
CCS-3	20,3% en peso	0,668	0,548	0,534	68	79	98	509,0	720,8	917,6	715,8
		Peso de las hojas			Análisis el día 6			Residuo mg/kg			
Formulación	Conc. de ingrediente activo	1	2	3	1	2	3	1	2	3	Media
Lorsban 4E	44,1% en peso	0,999	1,008	1,259	1,1	1,4	1,2	11,0	13,9	9,5	11,5
Pyrinex CS	250 g/L	1,303	1,207	1,244	22	30	34	168,8	248,6	273,3	230,2
CCS-0	20,1% en peso	1,351	1,121	1,157	0,6	0,7	1,3	3,3	6,2	11,2	7,3
CCS-1	19,9% en peso	1,108	1,051	1,356	6,8	6,1	5,9	61,4	58,0	43,5	54,3
CCS-2	20,4% en peso	1,186	1,096	1,496	1,5	2,6	2,3	12,6	23,7	15,4	17,2
CCS-3	20,3% en peso	1,419	1,183	1,007	2,1	3,8	3,7	14,8	32,1	36,7	27,9
		Peso de las hojas			Análisis el día 13			Residuo mg/kg			
Formulación	Conc. de ingrediente activo	1	2	3	1	2	3	1	2	3	Media
Lorsban 4E	44,1% en peso	1,45	1,021	1,027	0,7	0,5	1	4,8	4,9	9,7	6,5
Pyrinex CS	250 g/L	1,09	1,261	1,245	11,9	16,8	26,8	109,2	133,2	215,3	152,6
CCS-0	20,1% en peso	1,029	1,264	1,334	0,8	1,1	1,2	7,8	9,5	9,0	8,8
CCS-1	19,9% en peso	1,603	1,09	1,296	1,5	1,1	1,1	9,4	10,1	8,5	9,3
CCS-2	20,4% en peso	1,343	1,297	1,305	1	0,6	0,8	7,4	4,6	6,1	6,1
CCS-3	20,3% en peso	1,168	1,41	1,13	0,8	0,9	0,7	6,8	6,4	6,2	6,5

La vida media de clorpirifós se calculó a partir de la pendiente de la línea ajustada (-,693/pendiente); los datos recogidos para varias formulaciones testigo y experimentales que incluyen clorpirifós se muestran en la tabla 3. Los datos se expresan en unidades de días.

Tabla 3. Vida media del ingrediente activo, clorpirifós, en varias formulaciones insecticidas nuevas y testigo

Formulación	Vida media (días)
Lorsban 4E	2,2
Pyrinex CS	6,9
CCS-0	2,2
CCS-1	2,2
CCS-2	2,1
CCS-3	1,9

5

Las representaciones gráficas para Lorsban 4E y CCS-0 no son tan lineales como las otras representaciones gráficas, esto puede ser porque parte del clorpirifós se volatilizó o fotolizó entre, antes o poco después de la medida del día 6. Por estas razones, es posible que CCS-0 y Lorsban 4E tengan vidas medias similares las cuales sean más cortas que las indicadas en este estudio y podrían estimarse mejor usando los dos primeros puntos. Aunque las vidas medias son útiles para comprender el perfil de liberación de la cápsula, el fin del estudio fue comparar las concentraciones de residuos de las formulaciones encapsuladas. Cada una de las formulaciones experimentales ensayadas tienen valores de residuos comparables a o menores que los de la formulación testigo Lorsban 4E. Pyrinex es una cápsula muy gruesa; y es muy diferente de las formulaciones experimentales en cápsulas y tiene una vida media mucho más larga y mayores residuos a los 13 días. Las formulaciones experimentales en cápsulas (CCS-0, CCS-1, CCS-2, CCS-3) produjeron mayores residuos que Lorsban 4E, un concentrado emulsionado de clorpirifós comercializado por Dow, pero significativamente menos que Pyrinex CS, una formulación en forma de cápsulas de pared relativamente gruesa comercializada por Bayer.

10

15

Biología: los datos del ensayo de varias formulaciones que incluyen algunas formulaciones experimentales sobre gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG) se muestran en la tabla 4.

20 Tabla 4. Valores de LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> (ppm) de clorpirifós, determinados midiendo la capacidad de varias formulaciones de clorpirifós testigo y nuevas en microcápsulas para mitigar gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG).

Tratamiento	Tasa	0 DAT (n° de muertos)	LC <sub>50</sub> ppm	LC <sub>90</sub> ppm	4 DAT (n° de muertos)	LC <sub>50</sub> ppm	LC <sub>90</sub> ppm	7 DAT (n° de muertos)	LC <sub>50</sub> ppm	LC <sub>90</sub> ppm
L 4E	1000 ppm	40-40	529,43	828,1	31-40	716,02	1293,5	24-40	874,6	1813,7
	500 ppm	33-40			8-40			6-40		
	250 ppm	3-40			1-40			1-40		
	125 ppm	0-40			0-40			0-40		
CCS-0	1000 ppm	40-40	441,46	667,46	34-40	572,1	1068,69	14-40	1469,26	6889,13
	500 ppm	25-40			17-40			10-40		
	250 ppm	2-40			2-40			1-40		
	125 ppm	5-40			0-40			1-40		
CCS-1	1000 ppm	40-40	353,55	463,17	38-40	367,53	518,25	35-40	376,11	777,81

ES 2 521 521 T3

	500 ppm	38-40			35-40			31-40		
	250 ppm	2-40			3-40			7-40		
	125 ppm	3-40			1-40			2-40		
CCS-2	1000 ppm	40-40	379,99	549,7	34-40	541,41	960,9	33-40	656,33	1002,08
	500 ppm	33-40			21-40			14-40		
	250 ppm	3-40			1-40			0-40		
	125 ppm	0-40			0-40			0-40		
CCS-3	1000 ppm	40-40	299,58	450,59	35-40	542,41	1139,54	27-40	728,15	1526,94
	500 ppm	38-40			16-40			12-40		
	250 ppm	11-40			4-40			2-40		
	125 ppm	1-40			0-40			0-40		
Pyrinex	1000 ppm	36-40	681,66	1000,05	32-40	668,39	1286,75	28-40	730,82	1797,32
	500 ppm	6-40			10-40			10-40		
	250 ppm	9-40			3-40			3-40		
	125 ppm	1-40			0-40			1-40		

Los datos de ensayo de esas formulaciones sobre pulgones del algodón se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Datos recogidos midiendo la capacidad de varias formulaciones de clorpirifós testigo y nuevas en microcápsulas para mitigar pulgones del algodón (APHIGO). Los experimentos se replicaron 4 veces y los resultados se expresan como porcentaje (%) del testigo.

5

Tratamiento	Tasa	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	% del testigo
Lorsban 4E 0 DAT	400 ppm	0	0	0	0	0
	200 ppm	1	0	1	0	1
	100 ppm	8	5	4	11	7
	50 ppm	29	31	27	42	32
	25 ppm	56	70	66	44	59
	12,5 ppm	58	71	88	92	77
Lorsban 4E 4 DAT	400 ppm	15	12	17	45	22
	200 ppm	24	31	26	45	32
	100 ppm	56	59	52	65	58
	50 ppm	61	63	64	63	63
	25 ppm	72	68	77	63	70
	12,5 ppm	87	90	89	70	84

ES 2 521 521 T3

Lorsban 4E 7 DAT	400 ppm	56	67	64	59	62
	200 ppm	58	66	64	71	65
	100 ppm	78	54	70	75	69
	50 ppm	75	87	64	73	75
	25 ppm	75	81	85	80	80
	12,5 ppm	89	90	95	96	93
Pyrinex 0 DAT	400 ppm	18	12	14	8	13
	200 ppm	41	45	44	39	42
	100 ppm	61	76	55	59	63
	50 ppm	71	74	65	88	75
	25 ppm	91	87	81	94	88
	12,5 ppm	90	85	88	92	89
Pyrinex 4 DAT	400 ppm	42	53	44	41	45
	200 ppm	55	55	61	50	54
	100 ppm	71	71	65	52	62
	50 ppm	84	84	72	70	79
	25 ppm	88	88	81	71	81
	12,5 ppm	82	82	85	87	86
Pyrinex 7 DAT	400 ppm	35	29	31	24	30
	200 ppm	47	55	51	46	50
	100 ppm	63	58	57	71	62
	50 ppm	83	51	80	77	80
	25 ppm	81	90	92	86	87
	12,5 ppm	95	80	85	83	86
CCS-0 0 DAT	400 ppm	0	0	0	0	0
	200 ppm	0	0	0	0	0
	100 ppm	3	6	1	5	4
	50 ppm	29	36	20	19	26
	25 ppm	49	41	45	39	44
	12,5 ppm	51	43	56	65	54
CCS-0 4 DAT	400 ppm	6	1	3	7	4
	200 ppm	20	26	31	16	23
	100 ppm	32	39	49	42	41
	50 ppm	45	48	41	51	46
	25 ppm	42	54	58	61	54
	12,5 ppm	54	50	62	68	59
CCS-0 7 DAT	400 ppm	21	35	26	24	27
	200 ppm	33	41	35	29	35
	100 ppm	41	38	47	50	44
	50 ppm	52	55	58	61	57
	25 ppm	61	62	59	65	62
	12,5 ppm	68	71	65	72	69
CCS-1 0 DAT	400 ppm	0	0	0	0	0
	200 ppm	0	0	0	0	0
	100 ppm	7	1	4	1	3

ES 2 521 521 T3

	50 ppm	17	30	34	19	25
	25 ppm	51	58	49	63	55
	12,5 ppm	71	81	76	65	73
CCS-1 4 DAT	400 ppm	1	0	1	0	1
	200 ppm	14	24	26	19	21
	100 ppm	36	49	51	45	45
	50 ppm	47	56	63	66	58
	25 ppm	68	74	65	72	70
	12,5 ppm	87	77	61	74	75
CCS-1 7 DAT	400 ppm	25	30	21	28	26
	200 ppm	35	32	29	38	34
	100 ppm	55	49	51	53	52
	50 ppm	66	57	60	55	60
	25 ppm	78	83	81	88	83
	12,5 ppm	86	79	72	85	81
CCS-2 0 DAT	400 ppm	0	0	0	0	0
	200 ppm	0	0	0	0	0
	100 ppm	2	4	8	14	7
	50 ppm	56	33	31	44	41
	25 ppm	71	75	64	60	68
	12,5 ppm	80	84	77	86	82
CCS-2 4 DAT	400 ppm	5	3	4	12	6
	200 ppm	39	44	36	40	40
	100 ppm	51	48	57	52	52
	50 ppm	70	64	61	76	68
	25 ppm	73	85	66	79	76
	12,5 ppm	84	78	81	75	80
CCS-2 7 DAT	400 ppm	22	25	31	27	26
	200 ppm	46	51	55	58	53
	100 ppm	71	63	58	62	64
	50 ppm	75	71	67	70	71
	25 ppm	84	72	81	75	78
	12,5 ppm	91	87	83	89	88
CCS-3 0 DAT	400 ppm	0	0	0	0	0
	200 ppm	0	0	0	0	0
	100 ppm	0	1	5	2	2
	50 ppm	15	22	31	25	23
	25 ppm	76	71	59	33	60
	12,5 ppm	85	93	90	87	89
CCS-3 4 DAT	400 ppm	6	3	5	2	4
	200 ppm	31	36	27	12	27
	100 ppm	43	49	51	56	50
	50 ppm	54	61	55	64	59
	25 ppm	72	66	69	63	68
	12,5 ppm	84	86	75	89	84

CCS-3 7 DAT	400 ppm	31	20	24	27	26
	200 ppm	51	49	43	38	45
	100 ppm	61	58	74	69	66
	50 ppm	63	76	59	67	66
	25 ppm	77	75	69	71	73
	12,5 ppm	81	84	77	87	82

Un sumario de los valores de LC<sub>50</sub> medidos para LAPHEG se muestra a continuación en la tabla 5. Estos datos se recogieron inicialmente y 4 y 7 días después de la exposición a las formulaciones.

5 Tabla 5. Sumario de los valores de LC<sub>50</sub> (ppm) determinados midiendo la capacidad de varias formulaciones de clorpirifós testigo y nuevas en microcápsulas para mitigar gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG).

Valores de LC <sub>50</sub> para la mitigación de gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG)			
Formulaciones	0	4	7
Pyrinex ME	681,66	668,39	730,82
Lorsban 4E	529,43	716,02	874,6
CCS-0	441,46	572,1	1469,26
CCS-1	353,55	367,53	376,11
CCS-2	379,99	541,41	656,33
CCS-3	299,58	542,41	728,15

10 Estos datos se presentan gráficamente en la Fig. 1. Lorsban 4E no es tan activo a 0 DAT que las cápsulas experimentales y continúa declinando en el tiempo. Pyrinex permanece virtualmente sin cambiar en el tiempo e incluso muestra menos actividad inicial que Lorsban 4E. El valor para la formulación CCS-0 en microcápsulas (3 μm (3 micrómetros), 5 nm) se abre rápidamente después del 4 DAT incluso aunque muestre mejor actividad que Lorsban 4E a 0 y 4 DAT.

15 Estos datos sugieren que las formulaciones CCS-1 y CCS-2 de clorpirifós encapsulado en microcápsulas son más activas que el testigo concentrado emulsionado. La formulación CCS-1 (tamaño parcial 3 μm (3 micrómetros), espesor de pared 10 nm), exhibe una excelente actividad inicial contra insectos tales como LAPHEG y que esta actividad se mantiene a lo largo de los 7 días completos del ensayo. Las formulaciones CCS-2 (tamaño parcial 6 μm (6 micrómetros), 5 nm), y CCS-3 (tamaño parcial 6 μm (6 micrómetros), 10 nm), exhiben cambios de actividad similares en el tiempo que con las cápsulas de 3 μm (3 micrómetros). La mejor actividad inicial se encuentra con las cápsulas de pared más gruesa. Estas observaciones parecen razonables en tanto y cuanto este ensayo está evaluando la toxicidad de clorpirifós para una plaga masticadora.

20 Tabla 6. Medida de la actividad insecticida de varias formulaciones de clorpirifós ensayadas en plantas de pimiento infestadas con gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG).

Tratamiento n°	Formulación	Tasa/ppm de clorpirifós	Tiempo 0 % del testigo	2 DAT % del testigo	5 DAT % del testigo	8 DAT % del testigo
13	Lorsban 4E	1000	100	100	100	13
14	Lorsban 4E	500	100	100	29	0
15	Lorsban 4E	250	100	92	13	0
16	Lorsban 4E	125	100	75	0	0
17	CCS-4	1000	100	100	100	100
18	CCS-4	500	100	100	100	21
19	CCS-4	250	100	100	75	0
20	CCS-4	125	100	63	17	0
21	Sin tratar		0	0	0	0

5 Cualquier encapsulación de clorpirifós que retrase su volatilidad debe proporcionar una mitigación más larga en tanto y cuanto la cápsula libere el componente activo tras la ingestión por las larvas. La mayor actividad inicial de las cápsulas experimentales sugiere que hay una pérdida significativa de clorpirifós en una pulverización de Lorsban 4E durante el período en el cual se deja que las plantas se sequen antes del muestreo. Al mismo tiempo, la menor actividad de la formulación de Pynrex sugiere que el clorpirifós de estas cápsulas no está biodisponible como el clorpirifós encontrado en las formulaciones experimentales en cápsulas.

En la tabla 7 se muestran los datos biológicos medidos contra los pulgones del algodón (APHIGO) no masticadores. Los valores de LD<sub>50</sub> calculados a partir de estos datos se muestran en la tabla 8.

10 Tabla 8. Sumario de valores de LC<sub>50</sub> (ppm) determinados midiendo la capacidad de varias formulaciones de clorpirifós testigo y nuevas en microcápsulas para mitigar pulgones del algodón (APHIGO). Estos datos se recogieron inicialmente y a los 4 y 7 días después de la exposición a las formulaciones.

Formulaciones	Valores de LC <sub>50</sub> (ppm) calculados		
	0 DAT	4 DAT	7 DAT
CCS-0	20,54	40,30	95,71
CCS-1	28,65	65,06	138,16
CCS-2	39,98	101,12	209,7
CCS-3	34,51	76,61	185,64
Pynrex	172,50	120,33	231,65
L 4E	34,93	103,77	255,27

15 Y la Fig. 2 es un gráfico de estos valores de LC<sub>50</sub> frente a DAT. Los pulgones plantean un reto significativo para la mayor parte de las formulaciones en cápsulas porque el contacto, y no la ingestión de clorpirifós, es la ruta principal de exposición de esta plaga al insecticida. Inicialmente en este estudio, los pulgones fueron directamente rociados con la formulación y se esperaba que las formulaciones encapsuladas no fueran tan activas como los concentrados emulsionados.

20 Inesperadamente, inicialmente las cápsulas experimentales se comportaron igual o mejor que la formulación de Lorsban 4E y con mejor mitigación residual. La clasificación de las formulaciones ensayadas de mejor a peor fue como sigue: CCS-0 > CCS-1 > CCS-3 > CCS-2 = L4E. Estas microcápsulas de tres micrómetros (CCS-0 y CCS-1) fueron superiores a las microcápsulas de 6 μm (6 micrómetros) y las microcápsulas con paredes más finas fueron superiores a las cápsulas con paredes más gruesas. Pynrex se comportó mal en el ensayo como sería de esperar para una formulación convencional en cápsulas. Los sorprendentes resultados son que las formulaciones en microcápsulas CCS0, CCS1, CCS2 y CCS3 exhiben una excelente actividad contra una plaga no masticadora tal como los pulgones del algodón.

25 Como se ilustra en la tabla 9, se ensayó la actividad insecticida de varias formulaciones de clorpirifós en plantas de calabacín infestadas con pulgones del algodón (APHIGO). Los valores de la tabla aparecen como un porcentaje del testigo. Como se muestra en la tabla, la mitigación de pulgones del algodón con CCS-4 tanto con 400 como con 100 ppm de clorpirifós fue mejor a los 7 días que la medida con las formulaciones de Lorsban 4E.

30 Tabla 9

Formulación	Tasa/ppm de clorpirifós	Tiempo 0 % del testigo	4 DAT % del testigo	7 DAT % del testigo
Lorsban 4E	400	99	81	41
Lorsban 4E	100	96	56	31
Lorsban 4E	25	83	30	39
CCS-4	400	100	97	98
CCS-4	100	98	72	77
CCS-4	25	92	29	32
Sin tratar		0	0	0

Se estudió la toxicología de las formulaciones CCS-0 y CCS-1 en microcápsulas. La formulación CCS-0 en microcápsulas tuvo una tasa de toxicología oral hacia ratas hembra del orden de aproximadamente LD<sub>50</sub> > 2000

mg.Kg<sup>-1</sup>; mientras que la formulación CCS-1 en microcápsulas tuvo un LD<sub>50</sub> > 5000 mg.Kg<sup>-1</sup> hacia ratas hembra. Esta misma microcápsula también exhibe una buena actividad destructora y residual contra pulgones del algodón (tabla 12), así como una excelente actividad destructora y residual contra gusanos soldado de la remolacha (tabla 3). Y un valor de residuos tan bueno como Lorsban 4E (tabla 14).

- 5 Tabla 12. Sumario de valores de LC<sub>50</sub> (ppm de clorpirifós) recogidos comparando varias formulaciones de clorpirifós ensayadas contra pulgones del algodón (APHIGO).

Formulación de clorpirifós	0 DAT	4 DAT	7 DAT
Lorsban 4E	34,93	103,77	255,27
CCS-1	28,65	65,06	138,16
Pyrinex ME	172,5	120,33	231,65

Tabla 13. Sumario de valores de LC<sub>50</sub> (ppm de clorpirifós) medidos comparando varias formulaciones de clorpirifós ensayadas contra gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG).

Formulación de clorpirifós	0 DAT	4 DAT	7 DAT
Lorsban 4E	529,43	716,02	874,6
CCS-1	353,55	367,53	376,11
Pyrinex ME	681,66	668,39	730,82

10

Tabla 14. Tabla que resume la vida media de residuos medida para varias formulaciones de clorpirifós

Formulación de clorpirifós	Vida media ( días)
Lorsban 4E	2,2
CCS-1	2,2
Pyrinex ME	6,9

## Experimento 2

### Resultados de los estudios toxicológicos

#### 15 Mortalidad

Todos los animales sobrevivieron al período de 14 días de observación. Los resultados de mortalidad obtenidos ensayando la toxicidad de CCS-1 en ratas hembra se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Estudio de la toxicidad oral aguda de la nueva microcápsula CCS-1 en ratas F344/DUCRL (procedimiento arriba-abajo). Mortalidad.

Dosis (mg/kg)	Nº/dosis	Nº de muertes	Tiempo de muerte (días) aproximado observado
2000	5	0	---
5000	6	0	---

20

No se observó ninguna muerte.

### Observaciones clínicas

25 Se realizaron observaciones clínicas y observaciones clínicas detalladas en animales individuales para ratas a las que se administraron estas formulaciones. Una de las cinco ratas a las que se administró 2000 mg.kg<sup>-1</sup> tuvo suciedad perineal en la orina el día 9 del ensayo. Los restantes tres animales no tuvieron ninguna observación clínica a lo largo de todo el estudio. Dos de los 3 animales a los que se administró 5000 mg.kg<sup>-1</sup> tuvieron suciedad periorcular y suciedad perineal en la orina, las cuales se resolvieron antes del día 4 del ensayo. El tercer animal no tuvo signos clínicos a lo largo de todo el estudio.

Pesos corporales

Se recogieron los pesos corporales medios e individuales. Con relación a los pesos corporales iniciales, dos ratas a las que se administró 5000 mg.kg<sup>-1</sup> perdieron peso antes del día 2 del ensayo, pero ganaron peso el tiempo restante del estudio. Todos los otros animales a los que se dio 2000 ó 5000 mg.kg<sup>-1</sup> ganaron peso corporal a lo largo de todo el estudio. No hubo ninguna observación patológica grave.

5

Conclusiones del estudio de toxicidad

En las condiciones de este estudio, el valor de LD<sub>50</sub> oral agudo para CCS-1 en ratas Fischer 344 hembra es del orden de mayor que 5000 mg.kg<sup>-1</sup>. Véase la tabla 11. Las formulaciones en microcápsulas de clorpirifós descritas en la presente memoria tienen un valor de toxicidad LD<sub>50</sub> mayor que aproximadamente 2.500 hacia ratas hembra y una actividad destructora alta contra dos plagas comunes de las plantas. Sin ligarse a ninguna teoría o explicación específica, estos resultados son consistentes con microcápsulas que tienen un tamaño y un espesor de pared ventajosos. Dado el amplio intervalo de tamaños y espesores de pared de microcápsulas posibles que pueden fabricarse es fortuito que estos compuestos fueran fabricados y que exhibieran estas ventajosas características biológicas.

10

15

Tabla 11. Sumario de resultados de toxicidad oral recogidos comparando varias formulaciones de clorpirifós en ratas

Formulación de clorpirifós	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
Lorsban 4E	300
CCS-1	> 5000

## REIVINDICACIONES

1. Una formulación plaguicida, que comprende:

un plaguicida tipo organofosfato; y

5 un polímero que forma una pared de una cápsula la cual encapsula al menos parcialmente al plaguicida tipo organofosfato para formar una microcápsula, pared que tiene un espesor medio de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 25 nm, teniendo dicha microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 6 micrómetros,

10 donde el plaguicida tipo organofosfato es clorpirifós y la microcápsula incluye entre aproximadamente 15 por ciento en peso y aproximadamente 35 por ciento en peso de clorpirifós, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

2. La formulación plaguicida según la reivindicación 1, donde la pared de la cápsula tiene un espesor medio de entre aproximadamente 8 nm y aproximadamente 12 nm, teniendo dicha microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 6 micrómetros, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

15 3. La formulación de plaguicida según la reivindicación 1, donde la pared se forma mediante una policondensación interfacial entre:

al menos un monómero soluble en aceites seleccionado del grupo que consiste en: diisocianatos, poliisocianatos, di(cloruros de ácidos), poli(cloruros de ácido), cloruros de sulfonilo y cloroformiatos; y

20 al menos un monómero soluble en agua seleccionado del grupo que consiste en: diaminas, poliaminas, dioles solubles en agua y polioles solubles en agua.

4. Un método para sintetizar una microcápsula, que comprende las etapas de:

proporcionar un insecticida tipo organofosfato, y al menos un monómero;

mezclar el insecticida tipo organofosfato, y al menos un monómero; y

25 formar una microcápsula, formando los monómeros un polímero, formando el polímero una pared, donde la pared engloba al menos parcialmente una porción del insecticida, formando dicha microcápsula, teniendo la pared un espesor medio de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 25 nm, teniendo dicha microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 6 micrómetros,

30 donde el plaguicida tipo organofosfato es clorpirifós y la microcápsula incluye entre aproximadamente 15 por ciento en peso y aproximadamente 35 por ciento en peso de clorpirifós, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

35 5. El método para sintetizar una formulación insecticida en partículas según la reivindicación 4, donde el polímero se forma mediante una policondensación interfacial entre al menos un monómero soluble en aceites seleccionado del grupo que consiste en: diisocianatos, poliisocianatos, di(cloruros de ácidos), poli(cloruros de ácido), cloruros de sulfonilo y cloroformiatos; y al menos un monómero soluble en agua seleccionado del grupo que consiste en: diaminas, poliaminas, dioles solubles en agua y polioles solubles en agua.

6. El método para sintetizar una formulación insecticida en partículas según la reivindicación 4, donde la pared de la cápsula tiene un espesor medio de entre aproximadamente 8 nm y aproximadamente 12 nm, teniendo la microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 6 micrómetros, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

40 7. Un método para mitigar una población de insectos, que comprende las etapas de:

proporcionar una formulación insecticida en microcápsulas, microcápsulas que incluyen:

un insecticida tipo organofosfato, y

un polímero; formando el polímero una pared la cual encapsula al menos parcialmente al plaguicida tipo organofosfato para formar una microcápsula, teniendo la pared un espesor medio de entre aproximadamente 5 nm y

aproximadamente 25 nm, teniendo dicha microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 6 micrómetros; y

aplicar dicho insecticida encapsulado a una población de insectos o a un área adyacente a dicha población de insectos,

5 donde el plaguicida tipo organofosfato es clorpirifós y la microcápsula incluye entre aproximadamente 15 por ciento en peso y aproximadamente 35 por ciento en peso de clorpirifós, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

8. El método para mitigar una población de insectos según la reivindicación 7, donde el polímero que forma dicha pared se forma mediante una policondensación interfacial entre:

10 al menos un monómero soluble en aceites seleccionado del grupo que consiste en: diisocianatos, poliisocianatos, di(cloruros de ácidos), poli(cloruros de ácido), cloruros de sulfonilo y cloroformiatos; y

al menos un monómero soluble en agua seleccionado del grupo que consiste en: diaminas, poliaminas, dioles solubles en agua y polioles solubles en agua.

15 9. El método para mitigar una población de insectos según la reivindicación 7, donde la pared tiene un espesor medio de entre aproximadamente 8 nm y aproximadamente 12 nm, teniendo dicha microcápsula un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 6 micrómetros, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

20 10. El método para mitigar una población de insectos según la reivindicación 7, donde dicha microcápsula exhibe una toxicidad en ratas hembra mayor que aproximadamente  $5.000 \text{ mg.kg}^{-1}$  y un  $\text{LC}_{50}$  para la mitigación inicial de pulgones del algodón de menos que aproximadamente 30 ppm de clorpirifós, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

25 11. El método para mitigar una población de insectos según la reivindicación 7, donde dicha microcápsula exhibe una toxicidad en ratas hembra mayor que aproximadamente  $2.500 \text{ mg.kg}^{-1}$  y un  $\text{LC}_{50}$  para la mitigación inicial de gusanos soldado de la remolacha de menos que aproximadamente 400 ppm de clorpirifós, y donde el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor especificado.

FIG. 1

Representación de los valores de  $LC_{50}$  (ppm de clorpirifós) frente a DAT, determinados para varias formulaciones nuevas en microcápsulas y testigo de clorpirifós. Ensayadas respecto a la eficacia contra gusanos soldado de la remolacha (LAPHEG)

**Biología cápsula (LAPHEG)**

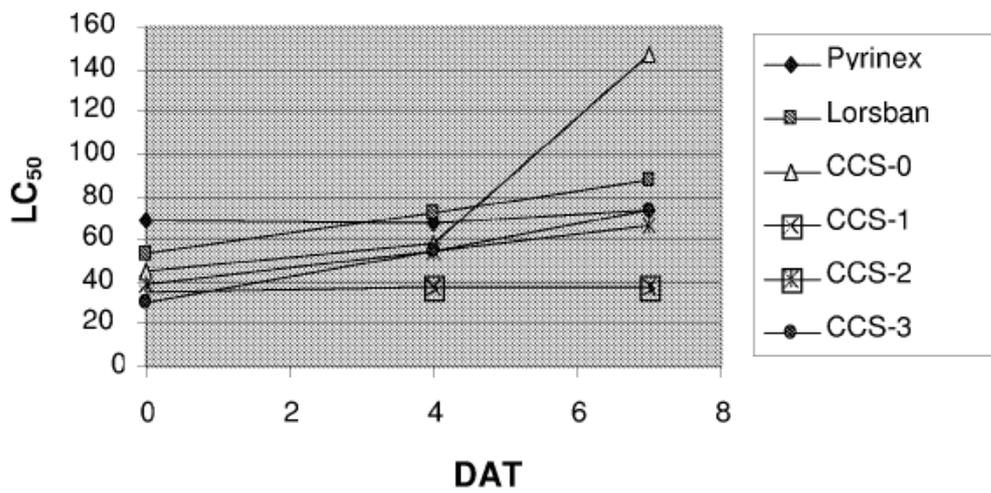


FIG. 2

**Biología cápsula APHIGO**

