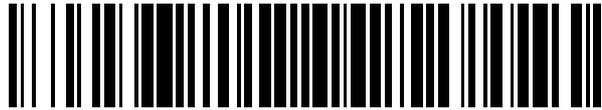


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 904**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 25/04</b>	(2006.01)	<b>A01N 57/14</b>	(2006.01)
<b>A01N 25/08</b>	(2006.01)	<b>A01N 57/16</b>	(2006.01)
<b>A01N 31/06</b>	(2006.01)	<b>A01N 65/00</b>	(2009.01)
<b>A01N 37/40</b>	(2006.01)		
<b>A01N 37/44</b>	(2006.01)		
<b>A01N 37/52</b>	(2006.01)		
<b>A01N 43/22</b>	(2006.01)		
<b>A01N 47/02</b>	(2006.01)		
<b>A01N 51/00</b>	(2006.01)		
<b>A01N 57/12</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2011 E 11728913 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2575447**

54 Título: **Composiciones líquidas que comprenden un sistema de liberación prolongada para insecticidas**

30 Prioridad:

**19.08.2010 GB 201013871**  
**27.05.2010 GB 201008873**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.10.2015**

73 Titular/es:

**EXOSECT LIMITED (100.0%)**  
**Leylands Business Park**  
**Colden Common, Winchester SO21 1TH, GB**

72 Inventor/es:

**STORM, CLARE GILLIAN y**  
**HUGGETT, NICOLA JANE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 548 904 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

Composiciones líquidas que comprenden un sistema de liberación prolongada para insecticidas.

- 5 La presente invención se refiere a formulaciones líquidas para controlar infestaciones de artrópodos. En particular, la presente invención se refiere a la provisión de formulaciones líquidas que comprenden partículas de electreto que portan productos químicos que presentan actividad contra artrópodos tales como especies de insectos y arácnidos, a métodos de producción de tales formulaciones líquidas y a las utilidades de las mismas.
- 10 La infestación de artrópodos de cultivos, de otros artrópodos y sus entornos tales como insectos sociales, por ejemplo, abejas y sus colmenas, de animales, incluyendo seres humanos, de entornos construidos por el hombre como instalaciones de almacenamiento de alimentos tales como silos de cereales y legumbres, granjas, alojamientos para animales, y otras estructuras, es la causa de importantes pérdidas económicas en todo el mundo.
- 15 Muchos medios de tratamiento de la infestación de artrópodos se ponen en práctica en todo el mundo. Es una lucha constante mantenerse un paso por delante de la evolución de los artrópodos y/o mantener o mejorar actividades de control de artrópodos en las que la utilización de productos químicos a lo largo del tiempo indica que la especie de artrópodos están desarrollando resistencia.
- 20 Un problema asociado con la utilización convencional de agentes químicos previstos en forma líquida contra artrópodos en el campo es que aunque los agentes químicos proporcionados pueden ser eficaces durante cortos periodos de tiempo tras la aplicación, a lo largo de periodos de tiempo más prolongados, tiende a disminuir el nivel de actividad. Como resultado, el usuario ha de aplicar productos químicos más frecuentemente para mantener el control sobre la infestación de artrópodos. Esto significa a su vez que los entornos en los que se aplican los
- 25 productos químicos recibirán altas cargas de producto químico a menudo y esto puede presentar un efecto adverso sobre el medio ambiente, y en particular sobre animales tales como mamíferos, incluyendo seres humanos, así como otras clases tales como aves, anfibios y artrópodos beneficiosos tales como abejas, mariquitas que comen pulgones, arañas y mariposas.
- 30 Un problema adicional asociado con la aplicación convencional de productos químicos contra artrópodos sobre cultivos o sobre animales es que cuando se aplican disoluciones en forma de pulverizaciones, nebulizaciones, lavados, baños y similares, las pérdidas al entorno tienden a ser elevadas debido a que los agentes activos pueden eliminarse por lavado a través de la acción de la lluvia o de equipos de irrigación, y se pierde una alta proporción del producto químico activo al entorno. Esto conduce en sí mismo a cargas de producto químico al entorno que pueden
- 35 ser además destructivas para animales domesticados y salvajes, anfibios, aves silvestres y similares.
- Las formulaciones de polvo seco de compuestos que presentan actividad contra artrópodos rara vez se aplican a cultivos debido a las dificultades para lograr una aplicación uniforme al cultivo, contaminación ambiental y seguridad de los trabajadores.
- 40 La capacidad para pulverizar partículas que comprenden productos químicos que son activos contra artrópodos en las que las partículas están comprendidas en un líquido sobre cultivos o sobre animales o a entornos que frecuentan los animales se considera deseable puesto que permitiría a los trabajadores utilizar equipos de pulverización de productos químicos convencionales, maximizaría la uniformidad de aplicación, reduciría la carga de producto químico al entorno y minimizaría los riesgos para la salud de los trabajadores.
- 45 Se ha encontrado ahora que pueden proporcionarse partículas de electreto que comprenden productos químicos que son activos contra artrópodos a entornos que contienen artrópodos en un portador líquido. Tales partículas de electreto pueden adherirse a las superficies de plantas, o cuando sea apropiado, a las superficies de animales, y en ambos casos, se adhieren preferentemente a la cutícula de artrópodos diana. Tales electretos liberan productos químicos lentamente y, por tanto, no se requieren aplicaciones repetidas tan a menudo como con aplicaciones líquidas convencionales de productos químicos dirigidos contra artrópodos. Como consecuencia, el nivel de producto químico que entra en el entorno es menor de manera correspondiente. Además, aplicando electretos que comprenden productos químicos que son activos contra artrópodos en forma de formulaciones líquidas a las
- 50 superficies de organismos eucariotas que están infestados por artrópodos, tales como plantas, animales y artrópodos beneficiosos para el hombre, se reduce la cantidad de compuesto activo que puede absorberse por tales superficies, tales como hojas, cutícula (en el caso de artrópodos beneficiosos para el hombre) y piel (en el caso de mamíferos o aves), y se potencia la eficacia de suministro de compuestos activos a artrópodos diana.
- 55 El documento WO2008/062221 se refiere a la provisión de un producto compacto y no enseña la provisión de formulaciones líquidas que contienen partículas de electreto compuesto por ceras. El documento WO2010/031508 se refiere a dispersiones de ceras insecticidas que no están diseñadas para su utilización como formulación líquida para pulverizar sobre superficies de eucariotas sino que se emplean únicamente en forma de una masa sólida, combustible en el campo. El documento DE 19906491 se refiere a la fusión de cera sólida y un emulsionante de cera sólida a alta temperatura formándose una masa fundida. El documento WO97/33472 se refiere a la provisión de partículas de una construcción compleja que comprende un sustrato inerte, poroso, altamente absorbente en
- 60
- 65

asociación con un pesticida que puede encapsularse en el interior de un recubrimiento de cera.

Existe la necesidad de superar o por lo menos reducir los inconvenientes de los métodos convencionales de tratamiento de infestaciones de artrópodos en el campo. Este y otros objetos resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y los ejemplos.

Como primer aspecto de la invención, se proporciona una formulación líquida para controlar la infestación de artrópodos que comprende las características expuestas en la reivindicación 1.

La formulación líquida de la invención puede formularse como formulación acuosa o como formulación oleaginoso, dependiendo del diseño. Las formulaciones acuosas pueden incluir tensioactivos seleccionados de tensioactivos disponibles comercialmente tales como Libsorb, Silwet L77, Tween 80, Torpedo II, Newmans T80, Fortune, Guard, Rhino, Biopower, y similares. De estos tensioactivos, Libsorb es el más preferido.

Las formulaciones oleaginosas, es decir formulaciones basadas en aceite, pueden contener cualquier aceite adecuado para su utilización en la invención que puede seleccionarse de aceites del petróleo, tales como aceite de parafina, aceites para pulverización en verano y aceites para pulverización en invierno conocidos en la técnica, y aceites vegetales tales como aceite de colza, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de palma y similares. Las formulaciones de aceite de la invención contienen partículas de electreto tal como se describe a continuación en la presente memoria y éstas pueden mezclarse a su vez con agentes de flujo tales como sílices precipitadas hidrófilas, por ejemplo Sipernat 383 DS, Sipernat 320, EXP 4350 y Sipernat D-17 y similares. Tales agentes de flujo libre pueden dispersarse en aceites, por ejemplo, para propósitos antiespumantes.

Para los propósitos de la presente invención, "electretos" son materiales que mantienen una polarización dieléctrica permanente, o carga en el volumen, en vez de una carga electrostática de superficie. Las partículas de electreto son partículas hidrófobas seleccionadas de entre cera de carnauba, cera de abejas, cera de China, cera de goma laca, cera de espermaceti, cera de candelilla, cera de ricino, cera de uricuri y cera de salvado de arroz. Éstas son ceras duras que presentan un punto de fusión  $\geq 50^{\circ}\text{C}$ , más preferentemente  $\geq 60^{\circ}\text{C}$  y lo más preferentemente  $\geq 70^{\circ}\text{C}$ . Tales ceras presentan normalmente una alta entalpía de energía de red cristalina durante la fusión. Las partículas de electreto presentan un diámetro volumétrico medio de 10 a  $40\ \mu\text{m}$ , preferentemente desde 10 hasta  $30\ \mu\text{m}$  o de 10 a  $15\ \mu\text{m}$ .

Las composiciones o formulaciones líquidas de la invención comprenden partículas de electreto que una vez suministradas a superficies diana pueden adherirse a las mismas, a medida que se evapora el elemento acuoso de la composición o, en el caso de un elemento oleaginoso, se dispersa el aceite. Las superficies que contienen células eucariotas diana incluyen superficies de plantas tales como hojas, tallos y flores, y cuando se aplican a animales, las superficies diana incluyen el pelo, el cabello, las plumas, la piel, la cutícula u otra superficie según sea apropiado, dependiendo del diseño. Como resultado de que las partículas de electreto se apliquen a y se adhieran a las superficies diana del animal (que se adhieran preferentemente a la cutícula del artrópodo plaga cuando se aplican a animales distintos de artrópodos), el agente químico presenta un tiempo de residencia más largo sobre la superficie diana que los tratamientos pesticidas aplicados de manera convencional porque se lixivia de la partícula de electreto a una lenta velocidad.

Las composiciones o formulaciones líquidas de la invención deben ser eficaces en el control de poblaciones de artrópodos que infestan plantas o que infestan animales tal como se alude en la presente memoria. Los productos químicos de utilización en la invención deben poder actuar sobre la especie de artrópodo que infesta y una vez puestos en contacto con la misma, poder destruirla o por lo menos hacer que sea disfuncional con respecto a su capacidad para comer y/o reproducirse. Por tanto, las composiciones líquidas de la invención pueden controlar poblaciones de artrópodos que infestan plantas o animales, normalmente reduciendo el tamaño de la población a lo largo del tiempo.

Adicionalmente, las partículas de composiciones o formulaciones líquidas de la invención pueden contener otros componentes tales como aditivos seleccionados de bloqueadores de UV tales como beta-caroteno o ácido p-aminobenzoico, agentes colorantes tales como blanqueantes ópticos y agentes colorantes disponibles comercialmente tales como agentes colorantes alimentarios, plastificantes tales como glicerina o aceite de soja, agentes antimicrobianos tales como sorbato de potasio, nitratos, nitritos, óxido de propileno y similares, antioxidantes tales como vitamina E, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), y otros antioxidantes que pueden estar presentes, o mezclas de los mismos. El experto en la materia apreciará que la selección de tales aditivos incluidos comúnmente se realizará dependiendo del propósito final y la necesidad percibida.

Productos químicos adecuados de utilización en la presente invención incluyen los productos químicos orgánicos aplicados de manera convencional que pueden encapsularse dentro de las partículas de electreto de la invención, y que no afectan de manera perjudicial a la capacidad de la partícula cargada con producto químico para adherirse a la cutícula del artrópodo diana o a la superficie que contiene células eucariotas diana, por ejemplo la superficie de planta o superficie de animal de una planta o un animal receptor. Los ejemplos de productos químicos adecuados de

- utilización en la invención pueden seleccionarse de los piretroides, tales como  $\alpha$ -cipermetrina,  $\lambda$ -cihalotrina, 3-(2,2-dibromoetenil)-2,2-dimetil-ciclopropano-1-carboxilato de [ciano-(3-fenoxifenil)-metilo] (deltametrina) y T-fluvalinato, los organofosfatos tales como clorpirifós (dietoxi-sulfaniliden-(3,5,6-tricloropiridin-2-il)oxi-1<sup>5</sup>-fosfano), malatión (2-dimetoxifosfotioil-sulfanilbutanodioato de dietilo), cumafós (3-cloro-7-dietoxifosfotioiloxi-4-metilumarina) y estirifós (fosfato de [(E)-2-cloro-1-(2,4,5-triclorofenil)etenil]dimetilo), los carbamatos tales como amitraz (N-(2,4-dimetilfenil)-N-[(2,4-dimetilfenil)iminometil]-N-metilmetanimidamida), los espinosanos tales como espinosad (Dow Agrichemical, Francia), los inhibidores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) tales como fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-(trifluorometilsulfinil)pirazol-3-carbonitrilo), los neonicotinoides tales como imidacloprid (N-[1-[(6-cloro-3-piridil)metil]-4,5-dihidroimidazol-2-il]nitramida), las antranilamidas, las formononetinas tales como 7-Hidroxi-3-(4-metoxifenil)cromona, los aceites esenciales tales como aceite del árbol del té, aceite de tomillo (también conocido como timol), aceite de citronela y mentol, y los reguladores del crecimiento de insectos tales como metoxifenoza (N-terc-butil-N-(3-metoxi-o-toluoil)-3,5-xilohidrazida) y similares. Los compuestos preferidos para su utilización en formulaciones líquidas de la invención incluyen timol, deltametrina y tau-fluvalinato (Mavrik).
- 15 Los productos químicos de utilización en la invención deben poder controlar la población de artrópodos infestantes, normalmente reduciendo significativamente los números de los mismos, tal como destruyéndolos. Los productos químicos adecuados que pueden mezclarse con electretos hidrófobos de utilización en la invención incluyen los productos químicos enumerados anteriormente en la presente memoria.
- 20 El experto en la materia apreciará que están incluidas dentro del alcance del término "artrópodo" todas las fases del desarrollo de los artrópodos que se aplican a cualquier especie de artrópodo dada y pueden incluir la fase de huevo, la fase de larva, la fase de ninfa, la fase de imago y la fase de adulto en una población de artrópodos, tal como las poblaciones que infestan plantas o animales, tales como poblaciones de artrópodos ectoparasitarios que infestan animales tal como se alude en la presente memoria. La población de artrópodos a la que pueden aplicarse composiciones o formulaciones líquidas de la invención es cualquier población de artrópodos que infeste plantas o animales y/o sus entornos y/o entornos de almacenamiento de los mismos. La especie de artrópodo infestante puede ser cualquier especie de plaga que afecte de manera perjudicial a plantas y/o animales y puede seleccionarse de las enumeradas a continuación en la presente memoria. Los ejemplos de plagas de artrópodos que infestan plantas y productos de plantas incluyen polillas de productos almacenados tales como *Plodia interpunctella* (polilla de la harina de la India), *Ephestia kuehniella* (polilla gris de la harina), *Cadra cautella* (polilla de la almendra), carcomas de los cereales tales como *Oryzaephilus surinamensis* (carcoma dentada de los cereales), gorgojos tales como *Cosmopolites sordidus* (gorgojo del plátano) y *Sitophilus granarius* (gorgojo de los cereales) y *Cryptolestes ferrugineus* (carcoma achatada de los cereales), psocópteros tales como el psocóptero negro doméstico: *Lepinotus patruelis* (GB), ácaros tales como el ácaro de la harina, *Acarus siro*, y la arañuela roja - *Tetranychus urticae*, polillas tales como *Cydia pomonella* (polilla de las manzanas) y *Helicoverpa armigera*, moscas tales como *Ceratitis capitata* (mosca mediterránea de las frutas) y *Bactrocera oleae* (mosca de las aceitunas), escarabajos tales como *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la patata), hormigas tales como *Solenopsis spp* (hormigas bravas), pulgones tales como *Aphis gossypii* (pulgón del algodón) y *Myzus persicae* (pulgón verde del melocotonero), chinches tales como *Nezara viridula* (chinches verdes de las hortalizas), *Bemisia spp.*, (moscas blancas) tal como *Trialeurodes vaporariorum*, trips tales como *Frankliniella occidentalis* (trips occidental de las flores), chinches algodonosas tales como *Phenacoccus aceris* (chinche algodonosa del manzano), cochinillas tales como *Quadraspidiotus perniciosus* (cochinilla de San José), psílidos tales como *Psylla piricola* (psila del peral), y similares.
- 45 Los ejemplos de plagas de artrópodos que infestan animales incluyen, pero no se limitan a, ectoparásitos tales como pulgas de los perros (*Ctenocephalides canis*), pulgas de los gatos (*Ctenocephalides felis*), piojos de los cerdos (puercos), tal como *Haematopinus suis*, ácaros de la sarna, tales como *Sarcoptes scabiei var. suis* (que provocan sarna sarcóptica en cerdos), ácaros foliculares, tales como *Demodex phylloides* (que provocan sarna demodécica en cerdos), garrapatas tales como de *Boophilus spp*, *Amblyomma spp*. e *Ixodes spp.*, tal como *Ixodes ricinus* (garrapata de las ovejas), *Ixodes hexagonus* (garrapata de los erizos) e *Ixodes canisuga* (garrapatas de los perros británicos), garrapatas duras, por ejemplo, garrapata de los perros, garrapata café del perro, garrapata de la costa del Golfo y garrapata de los bosques de las Montañas Rocosas, y garrapatas blandas, tales como la garrapata espinosa de la oreja (*O. turicata*), pulga de la gallina en cerdos y aves de corral, *Dermanyssus spp* tal como ácaro rojo de las aves (*Dermanyssus gallinae*) que afecta a las aves de corral, moscas domésticas de la especie *Musca* (que afectan a caballos, cerdos, seres humanos y ganado), tales como *Musca domestica*, y moscas de la cara tales como *Musca autumnalis*, *Drosophila spp.*, *Calliphora spp.*, tal como la mosca azul de la carne, y *Stomoxys spp.*, tal como la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*) (afecta a caballos, ganado, cerdos), mosquitos tales como *Anopheles spp*, *Culex spp* y *Aedes spp*, moscas de los cuernos tales como *Haematobia irritans* (afectan a ganado y caballos), tábanos, moscas de los ciervos, moscas negras (también conocidas como simúlidos), chinches chupadoras (*Culicoides spp.*) (también conocidas como "beatillas" o "cínifes enanos"), jejenes y mosquitos oculares tales como *Hippelates spp.*, la mosca común del caballo (*Gastrophilus intestinalis*), la mosca de la garganta (*Gastrophilus nasalis*), la mosca de la nariz (*Gastralis haemorrhoidalis*), ácaros traqueales de abejas tales como *Acarapis woodi*, ácaros varroa tales como *Varroa destructor* (ácaros que afectan a cepas de *Apis mellifera*) y similares.
- 65 Las plagas de artrópodos adicionales que infestan a seres humanos y sus entornos incluyen mosquitos tales como *Aedes sp.* (transmiten el dengue), *Anopheles sp.* (transmiten la malaria) y, *Culex sp.* (transmiten la encefalitis

japonesa), la mosca tsé-tsé (transmite la enfermedad del sueño), mosca Bot-Bot, hormigas, termitas, langostas, garrapatas, cucarachas, piojos tales como *H. Pediculus capitis*, *Pediculus humanus* y *Pthirus pubis*, pulgas tales como *Tunga penetrans*, *Xenopsylla cheopis* (transmite la peste bubónica), y ácaros tales como *Sarcoptes scabiei*, *Trombicula sp.*, *Demodex folliculorum*, *Ornithonyssus bacoti*, rezo del ganado, (*Hypoderma lineatum*), especies de gusanos barrenadores tales como *Cochliomyia hominivorax*, y tórsalo (*Dermatobia hominis*), y similares.

Las composiciones o formulaciones líquidas de la invención pueden incluir más de un producto químico orgánico que presenta la capacidad de controlar la población de por lo menos una especie de artrópodo infestante. Por tanto, pueden utilizarse composiciones de la invención para controlar 1, 2, 3 ó 4 o más poblaciones de artrópodos, dependiendo del grado de infestación en la planta o el animal o el ser humano y el número de poblaciones de especies que están implicados en la infestación. Por tanto, una única composición líquida de la invención puede comprender una "especie" de partícula de electreto cargada con dos o más agentes químicos de elección dependiendo del propósito final. O bien, como alternativa, las composiciones líquidas de la invención pueden incluir dos o más especies de partícula de electreto en las que cada especie de electreto está cargada con un producto químico de elección.

Para los propósitos de la presente invención "controlar poblaciones de especies de artrópodos que infestan animales" significa que las poblaciones de artrópodos a las que se aplican composiciones de la invención son aquéllas que presentan una disminución del número debido a muerte, enfermedad mortal que en última instancia puede conducir a la muerte y/o incapacidad para reproducirse o reducción de la capacidad para reproducirse. Preferentemente, el control de poblaciones de artrópodos que infestan animales significa que por lo menos el 90% de las poblaciones de artrópodos a las que se aplican composiciones de la invención mueren en el plazo de 28 días desde la aplicación de las composiciones líquidas de la invención. Preferentemente, las poblaciones de artrópodos que se ven afectadas adversamente por composiciones de la invención mueren o en el mejor de los casos padecen efectos subletales que contribuyen a la reducción de la población a largo plazo como resultado de la aplicación de composiciones líquidas de la invención a la zona afectada. El experto en la materia apreciará que la población de artrópodos a la que se aplican las composiciones de la invención puede estar compuesta por una o más de una especie de artrópodo. Los ejemplos de especies de artrópodos que pueden componer una población de artrópodos que infestan animales que pueden verse afectadas adversamente por composiciones de la invención incluyen los artrópodos enumerados anteriormente en la presente memoria.

Las clases adicionales de productos químicos que pueden añadirse a partículas de electreto de utilización en la invención incluyen feromonas de artrópodo tales como feromonas que alteran el comportamiento de los artrópodos, tal como el comportamiento de alimentación o el comportamiento de apareamiento en insectos y/o arácnidos, junto con insecticidas y aracnidas. Las feromonas adecuadas que pueden utilizarse en la presente invención incluyen feromonas sexuales tales como las emitidas por polillas hembra, tales como la polilla de las manzanas (*Cydia pomonella*), polilla oriental del melocotonero (*Grapholita molesta*), polilla de la harina de la India (*Plodia interpunctella*), polilla gris de la harina (*Ephestia kuehniella*), polilla de la almendra (*Cadra cautella*), polilla del racimo de la vid (*Lobesia botrana*), polilla café de la manzana (*Epiphyas postvittana*), barrenador del arroz (*Chilo suppressalis*), barrenador amarillo del tallo (*Scirpophaga incertulas*) y similares; feromonas de agregación tales como las emitidas por la carcoma dentada de los cereales (*Oryzaephilus surinamensis*), el gorgojo de los cereales (*Sitophilus granarius*), la carcoma achatada de los cereales (*Cryptolestes ferrugineus*) y similares. Pueden obtenerse feromonas de posible utilización en la invención de Plant Research International, en la colección *Pherobank*<sup>®</sup>, Wageningen, Países Bajos. Los ejemplos de feromonas adecuadas para su utilización en la invención incluyen E,E-8,10-dodecadienol, combinaciones de acetato de E-8-dodecen-1-ilo, acetato de Z-8-dodecen-1-ilo y Z-8-dodecenol, una combinación de acetato de E-11-tetradecenilo, acetato de E,E-9,11-tetradecadienilo, una combinación de Z-11-hexadecenal y Z-9-hexadecenal, la feromona acetato de E,Z-7,9-dodecadienilo, la feromona acetato de Z,E-9,12-tetradecadienilo, y una combinación de E,Z-2,13-octadecadienal y E-2-octadecenal.

Están incluidas en formulaciones líquidas de la invención formulaciones que contienen por lo menos un producto químico artropodocida eficaz contra artrópodos que infestan otros artrópodos de importancia económica para el hombre, tales como especies de utilización en la fabricación de miel, tales como cepas de abejas melíferas (tales como cepas de *Apis mellifera*), tales como ácaros varroa y ácaros traqueales, o en artrópodos que infestan especies de utilización en la fabricación de material para prendas de ropa, tales como el pavón de noche (*Bombyx mori*), o artrópodos que infestan plantas de cultivo y ornamentales, y artrópodos que infestan animales domésticos y de granja.

Las formulaciones líquidas según la invención incluyen electretos que pueden adherirse a tejido eucariota tal como tejido de plantas, incluyendo hojas, tallos, cuerpos fructíferos y flores, tejido animal tal como piel, cabello, pelo, cuernos, plumas, uñas, garras y picos, y tejido de artrópodo tal como la cutícula de artrópodo incluyendo partes de exoesqueleto tales como la cabeza, el tórax, el abdomen, las patas, las alas y los pies (tarsos).

Como aspecto adicional de la invención, se proporciona la utilización de partículas de electreto en la fabricación de una formulación líquida acuosa u oleaginoso para controlar la infestación de artrópodos en plantas, animales incluyendo seres humanos y especies de artrópodo beneficiosas para el hombre, y entornos de animales y seres humanos. Preferentemente, las partículas de electreto se seleccionan de cera de carnauba, cera de abejas, cera de

China, cera de goma laca, cera de espermaceti, cera de candelilla, cera de ricino, cera de uricuri y cera de salvado de arroz. Preferentemente, las partículas de electreto se componen de cera de carnauba. Normalmente, las partículas de electreto presentan un diámetro volumétrico medio comprendido entre 10 y 40  $\mu\text{m}$ , preferentemente desde 10 hasta 30  $\mu\text{m}$  o de 10 a 15  $\mu\text{m}$ .

5 Como aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para producir partículas de electreto para su utilización en una formulación líquida según la invención que comprende las etapas de:

- 10 i) añadir un agente químico seleccionado de entre por lo menos un producto químico artropodocida y una feromona de artrópodo a partículas de un electreto;
- ii) fusionar entre sí las partículas cargadas con agente químico de i), formando una matriz sólida;
- 15 iii) tratar la matriz sólida de ii) para formar partículas de tamaño milimétrico adecuadas para molienda; y
- iv) moler las partículas de iii) para formar partículas que presentan un diámetro volumétrico medio de desde 10 hasta 40  $\mu\text{m}$ , preferentemente desde 10 hasta 30  $\mu\text{m}$ ; y
- 20 v) opcionalmente añadir un agente de flujo a las partículas molidas.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para producir partículas de electreto de utilización en una formulación líquida según la invención que comprende las etapas de:

- 25 i) añadir independientemente material de electreto líquido y por lo menos un agente químico líquido en una cámara de mezclado a una temperatura a la que el electreto está en forma líquida;
- ii) pulverizar la mezcla de i) en una cámara de enfriamiento a una temperatura a la que el material de electreto solidifica o empieza a solidificar formando partículas de material de electreto cargado con agente químico que presentan un diámetro volumétrico medio en el intervalo de desde 10 hasta 15  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, el diámetro volumétrico medio es de 10  $\mu\text{m}$ .
- 30

En un procedimiento de este tipo, el material de electreto se selecciona de entre cera de carnauba, cera de abejas, cera de China, cera de goma laca, cera de espermaceti, cera de candelilla, cera de ricino, cera de uricuri y cera de salvado de arroz. Lo más preferentemente, el material de electreto es cera de carnauba.

35

En este aspecto de la invención, dicho por lo menos un agente químico se selecciona de entre piretroides, organofosfatos, carbamatos, espinosanos, inhibidores de GABA, neonicotinoides, antranilamidas, formonocetinas, aceites esenciales y reguladores del crecimiento de insectos.

40 Una formulación líquida según la invención puede utilizarse para controlar la infestación de artrópodos en plantas, animales, aves y seres humanos. La formulación líquida también puede utilizarse para controlar la infestación de artrópodos (por ejemplo infestación por ácaros varroa; e infestación por ácaros traqueales) en especies de artrópodo beneficiosas para el hombre, tales como abejas melíferas (por ejemplo en cepas de *Apis mellifera*). Además, la formulación líquida puede utilizarse para controlar la infestación de artrópodos en zonas de almacenamiento de cereales, en instalaciones de transporte de cereales tales como recipientes para envío, bodegas de buques, compartimentos de carga de aeronaves y camiones y en zonas donde habitan seres humanos.

45

A continuación siguen ejemplos y figuras que ilustran la invención. Ha de entenderse que no debe interpretarse que los ejemplos y las figuras limitan la invención en modo alguno.

50

Figura 1: El efecto del almacenamiento durante 21 días sobre el tamaño de partícula de cera de carnauba en una suspensión que contiene 2, 5 ó 10 g de cera, 100 ml de agua destilada y un tensioactivo: Libsorb o Silwet L77.

55 Figura 2: Patrón de deposición a modo de ejemplo y % de cobertura cuando se pulverizaron diferentes formulaciones a través de una boquilla TP11015 sobre papel sensible al agua: a) 100 ml de agua (control), b) 100 ml de agua, 5,0 g de cera de carnauba y Silwet L77 (al 1%), c) 100 ml de agua, 5,0 g de cera de carnauba Libsorb (al 1%).

60 Figura 3: residuo de Mavrik sobre discos foliares a lo largo del tiempo cuando se trataron con o bien partículas de cera de carnauba (CWP) o bien con pulverización de emulsión convencional, y luego o bien se mantuvieron secos o bien se expusieron a condicionales climatológicas artificiales (experimento 1).

Figura 4: Aumento medio del área del limbo de las hojas en plantas de control, experimento 1.

65

Figura 5: Mortalidad media de pulgones a lo largo del tiempo cuando se colocaron sobre muestras de disco foliar que se recogieron un día tras la pulverización con diferentes formulaciones.

5 Figura 6: Mortalidad media de pulgones a lo largo del tiempo cuando se colocaron sobre muestras de disco foliar que se recogieron ocho días tras la pulverización con diferentes formulaciones.

Figura 7: Mortalidad media de pulgones a lo largo del tiempo cuando se colocaron sobre muestras de disco foliar que se recogieron quince días tras la pulverización con diferentes formulaciones.

10 Figura 8: Gráfica que muestra datos de temperatura media semanales. Experimento 1 desde el 20/07/2008 hasta el 10/08/2008. Experimento 2 desde el 10/08/2008 hasta el 31/08/2008.

15 Figura 9: Gráfica que muestra datos de humedad media semanales. Experimento 1 desde el 20/07/2008 hasta el 10/08/2008. Experimento 2 desde el 10/08/2008 hasta el 31/08/2008.

## Sección experimental

### 1. Desarrollo de un portador de cera pulverizable de pesticidas

#### 20 Objetivo

Investigar la capacidad de una variedad de tensioactivos disponibles comercialmente para suspender partículas de cera de carnauba en líquido y el efecto de estos tensioactivos sobre propiedades de la cera tras almacenamiento y aplicación.

#### 25 Introducción

30 Las partículas de cera de carnauba son hidrófobas y cada partícula es un electreto (mantiene una carga electrostática interna tras someterse a carga triboeléctrica). Los insectos desarrollan una carga opuesta a la cera en la cutícula tras el movimiento. Por tanto, las partículas de cera se adhieren a la cutícula del insecto tanto mediante atracción electrostática como mediante enlaces hidrófobos entre la cera y el recubrimiento lipídico sobre la cutícula del insecto. Las partículas de cera de carnauba pueden formularse con componentes activos tales como insecticidas y luego utilizarse para suministrar el componente activo a la cutícula del insecto durante la unión.

35 Las partículas de cera son hidrófobas y no se humectan, así que en el desarrollo de una formulación pulverizable ha de superarse el carácter hidrófobo. Mezclas líquidas que contienen un tensioactivo adecuado pueden superar este problema.

40 El propósito de este estudio era investigar si era posible suspender el polvo de cera de carnauba altamente hidrófobo en agua utilizando tensioactivos de modo que fuera posible pulverizarlo a través de equipos de aplicación de insecticidas convencionales. Una variedad de tensioactivos disponibles comercialmente se sometieron a prueba y se evaluó su capacidad para suspender cera de carnauba examinando el tamaño de partícula resultante a diferentes concentraciones de tensioactivo. Dos tensioactivos utilizados comúnmente, Libsorb y Silwet L77 se seleccionaron para someter a prueba adicionalmente para a) examinar el efecto de la concentración de cera sobre el tamaño de partícula de la suspensión, b) examinar los efectos del almacenamiento sobre el mantenimiento de la suspensión de cera y c) examinar la capacidad para pulverizar las suspensiones a través de boquillas de equipos de pulverización convencionales.

#### 50 Métodos

##### Estudio 1: Capacidad de los tensioactivos para suspender partículas de cera de carnauba en agua

55 Se sometió a prueba la capacidad de diez agentes humectantes para suspender partículas de cera de carnauba en agua. Se investigó el efecto de la concentración de tensioactivo utilizando concentraciones del 0,01, el 0,1, el 1,0, el 2,0 y el 5,0% (v:v) y 2,0 g de cera de carnauba. Se investigaron dos métodos de mezclado de la cera en suspensión:

- i) se añadió la cera al tensioactivo en primer lugar para formar una pasta y luego se mezcló con 100 ml de agua destilada; y
- 60 ii) se añadió tensioactivo a 100 ml de agua destilada y se mezcló antes de añadir la cera.

Una vez añadida al agua, se mezcló la cera durante 5 min antes de que se midiera el tamaño de partícula de la cera utilizando un medidor del tamaño de gota y de partícula de la serie 2600c de Malvern con una lente de 63 mm. Se colocaron muestras de suspensión en un compartimento de dimensionamiento de partícula adaptado especialmente (20 ml de capacidad). Se calculó la DV50 (la mediana del tamaño de partícula basándose en una distribución volumétrica del tamaño de partícula) así como el intervalo de tamaños de partícula (considerado en este caso como

del 10-90%).

Estudio 2: El efecto de la concentración de cera sobre la capacidad de los tensioactivos para suspender partículas de cera de carnauba

5 Tras el trabajo sobre los tensioactivos, se seleccionaron dos productos (Libsorb y Silwet L77) para investigar el efecto de la concentración de cera sobre la capacidad de los tensioactivos para suspender cera. Se sometieron a prueba los tensioactivos a una concentración del 1,0% en 100 ml de agua destilada. Se añadió cera de carnauba a concentraciones de 2,0, 5,0 y 10,0 g por 100 ml de agua destilada. Se mezclaron las suspensiones durante 5 min y luego se calculó la DV50 así como el intervalo de tamaños de partícula (considerado en este caso como del 10-90%). Se llevó a cabo un análisis de regresión utilizando R versión 2.1.1.

Estudio 3: Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la suspensión de partículas de cera de carnauba

15 Se mezclaron concentrados de 100 ml de agua destilada que contenía el 1,0% de los tensioactivos Libsorb o Silwet L77 y o bien 2,0, o bien 5,0 o bien 10,0 g de partículas de cera durante 5 min y se dejaron en reposo durante 21 días. Para investigar si el polvo había permanecido en suspensión o se había separado y/o habían aparecido grumos, se midió el tamaño de partícula inicial de la cera en suspensión en el día 1. Luego se dejaron en reposo las muestras en una probeta graduada de 100 ml a temperatura ambiente (aproximadamente 15°C). Tras 21 días, se mezclaron las suspensiones durante 2 min y luego se midieron los tamaños de partícula.

Estudio 4: Evaluación de los equipos de pulverización convencionales para aplicar una suspensión de cera de carnauba

25 Se mezcló un concentrado de 5,0 g de cera en 100 ml de agua destilada que contenía el 1,0% de tensioactivo (o bien Silwet L77 o bien Libsorb) y se dejó en reposo durante 24 h. Luego se diluyeron éstos hasta una tasa de aplicación de campo (200 g de cera ha<sup>-1</sup>, en 100 l de agua = 2 g l<sup>-1</sup>). Se analizó la capacidad para pulverizar la suspensión a través de diferentes boquillas examinando el tamaño de gota y la cobertura de deposición por pulverización.

30 Para investigar la posibilidad de bloqueo de boquilla, se sometieron a prueba boquillas de chorro plano con los orificios más pequeños que es probable que se utilicen en un pulverizador montado en tractor en el campo: TP 11001 y TP 11015 con una velocidad de flujo de 0,6 l/min. Todas las boquillas estaban equipadas con filtros de malla 100 (297 µm) y se hicieron funcionar a una presión de 2,0 bar.

35 Se investigaron los tamaños de partícula de la cera en suspensiones antes y tras la pulverización a través de las dos boquillas. Se analizó la deposición por pulverización resultante de la utilización de cada tipo de boquilla pulverizando tiras de 5 cm de papel sensible al agua en una unidad Mardrive (1,38 m s<sup>-1</sup>, 2,0 bar). Se analizó luego la cobertura de deposición utilizando el programa informático de análisis de imagen ImageJ versión 1.36 (Rasband, 2006).

40 Resultados

Estudio 1: Capacidad de los tensioactivos para suspender partículas de cera de carnauba en agua

45 Todos los tensioactivos investigados pudieron suspender cera de carnauba en agua; sin embargo, algunos de los tensioactivos pudieron suspender más cantidad de la cera a menores concentraciones. Se obtuvieron los mejores resultados (facilidad de mezclado y menor intervalo de tamaño de partícula) premezclando el agente humectante con la cera, y luego añadiendo la pasta a agua. Cuando se añadió la cera y se mezcló en los 100 ml de disolución que ya contenía el tensioactivo, resultaron valores de DV50 ligeramente mayores con intervalos más amplios de tamaño de partícula.

50 Para la mayor parte de los tensioactivos investigados, a medida que se aumentó la concentración, se requirió menos mezclado para obtener la cera en suspensión. Por ejemplo, el 0,01% de Libsorb requirió 2 min de agitación, que disminuyó hasta 30 s cuando se aumentó la concentración de tensioactivo hasta el 5,0%. Para todos los productos, cuanto mayor era la concentración de tensioactivo, más fácil resultó suspender la cera y menor fue la DV50 de tamaño de partícula resultante (tabla 1).

Estudio 2: El efecto de la concentración de cera sobre la capacidad de los tensioactivos para suspender partículas de cera de carnauba

60 El análisis de regresión mostró que la concentración de cera añadida a la disolución de agua y tensioactivo no presenta un efecto significativo sobre la DV50 ni para Silwet L77 (d.f. = 1, r<sup>2</sup> = 0,84, p = 0,26) ni para Libsorb (d.f. = 1, r<sup>2</sup> = 0,17, p = 0,73). Con el 1% de tensioactivo, no hubo ninguna diferencia en la capacidad para suspender 2 ó 10 g de cera de carnauba.

65 Estudio 3: Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la suspensión de partículas de cera de carnauba

Tras 21 días almacenamiento, hubo diferencias visibles entre las suspensiones de cera que contenían o bien Libsorb o bien Silwet L77. Cuando se utilizó Silwet L77, a las tres concentraciones de cera, el periodo de almacenamiento dio como resultado que la cera saliera de la suspensión y formase grumos. La formación de grumos era visible en la parte superior y en particular en la parte inferior de la probeta graduada. Las muestras que contenían Libsorb mostraron cierta sedimentación de la cera, deposición en la parte inferior de las probetas (aproximadamente 5 mm) y una costra delgada encima (aproximadamente 3 mm). Generalmente para las tres concentraciones de cera, la cera permaneció en suspensión cuando se utilizó Libsorb, pero no cuando se utilizó Silwet L77.

- 5
- 10 Las mediciones del tamaño de partícula tomadas en el día 1 mostraron que las suspensiones presentaban valores de DV50 similares. Tras 21 días almacenamiento, hubo claras diferencias en el tamaño de las partículas de cera dentro de las muestras (figura 1). Tras volver a mezclar la suspensión con Libsorb tras 21 días almacenamiento, los valores de DV50 eran equivalentes al tamaño que presentaban tras 1 día de almacenamiento. En las suspensiones que contenían Silwet L77, los valores de DV50 tras 21 días almacenamiento eran por lo menos el doble del tamaño
- 15 de las partículas en muestras de 1 día.

#### Estudio 4: Evaluación de los equipos de pulverización convencionales para aplicar una suspensión de cera de carnauba

- 20 Para cada tensioactivo, se midió el tamaño de las partículas de cera en suspensión antes y tras la aplicación de pulverización con cada tipo de boquilla (tabla 2). No se observó obstrucción ni acumulación de cera sobre el filtro tras la pulverización. Los tamaños de partícula de la cera tras la pulverización presentaban valores de DV50 e intervalos de tamaño de partícula similares a los de las suspensiones originales.

- 25 El análisis de la deposición por pulverización desde las dos boquillas mostró que no había mucha diferencia entre los patrones de deposición de un control de agua y las dos suspensiones de cera ni con Silwet L77 ni con Libsorb (figura 2).

- 30 El análisis del caudal de pulverización desde un pulverizador Micron Ulva plus mostró que para el menor limitador de flujo (90 ml min<sup>-1</sup>) se produjeron bloqueos con ambas formulaciones dando como resultado que no se proporcionara ningún caudal. Con limitadores de mayor velocidad de flujo, no se produjeron bloqueos y el análisis de la pulverización mostró que la formulación no presenta ningún efecto sobre el espectro de gotas.

#### Discusión

- 35 Los estudios muestran que es posible suspender partículas de cera de carnauba en agua con una variedad de tensioactivos, concentraciones de tensioactivo y concentraciones de cera y que es posible pulverizar tales suspensiones a través de boquillas de pulverización convencionales estrechas.

- 40 La concentración de tensioactivo afectó a la capacidad para suspender la cera y el tamaño de partícula. Algunos tensioactivos no suspendieron la cera a las menores concentraciones, por tanto, no todos los tensioactivos serán adecuados para suspender cera de carnauba. En cuanto al tiempo de mezclado requerido para suspender la cera y el tamaño de partícula final, este estudio mostró que los mejores tensioactivos para suspender cera de carnauba eran Libsorb, Newmans T80 y Rhino.
- 45

- Fue más fácil el premezclado de la cera con un pequeño volumen de tensioactivo antes de añadirla al agua que añadir la cera a una mezcla de agua/tensioactivo, y resultaron intervalos más estrechos de tamaño de partícula. Sin embargo, debe tenerse en cuenta si se dañaría el insecticida en la cera al exponerse a una forma concentrada del tensioactivo. Este concentrado puede diluirse luego adicionalmente hasta la tasa de campo (como en el estudio 4) mediante el aplicador de insecticida en una mezcla de tanque antes de pulverizarlo sobre el cultivo.
- 50

Cuando se investigó la capacidad portadora de 100 ml de agua, se mostró que a la vez que se mantenía la concentración de tensioactivo al 1%, el aumento de la cantidad de cera en suspensión no afectó a la DV50 de las partículas dentro de la suspensión.

55

Se seleccionaron dos tensioactivos para investigar el efecto de almacenar las suspensiones: Libsorb y Silwet L77. Se mostró que Libsorb mantenía las partículas de cera en suspensión durante por lo menos 21 días y cuando se mezclaba tras el almacenamiento, las partículas volvían al tamaño (tanto DV50 como intervalo de tamaño) que habían presentando antes del almacenamiento.

60

- Para someter a prueba la aplicación de la suspensión a superficies, se seleccionaron boquillas de chorro plano de baja velocidad de flujo porque presentan los orificios más pequeños. Se midieron los tamaños de partícula y la cobertura de deposición de gotas de suspensiones con Libsorb y Silwet L77 diluidas hasta una tasa de campo tras hacerse pasar a través de las boquillas. Se mostró que ambas suspensiones presentaban valores de DV50 e intervalos de partículas y no se experimentó obstrucción cuando se utilizaron filtros. La descomposición de las partículas por el filtro o por la presión dio como resultado que la suspensión fluyese a través de las boquillas
- 65

mientras que no se provocó obstrucción sobre el propio filtro.

Libsorb era altamente eficaz en la suspensión de cera de carnauba en una variedad de concentraciones y con una variedad de cantidades de cera. Libsorb también mostró que mantenía la calidad de la suspensión de concentrado a lo largo de un periodo de almacenamiento de 21 días y la suspensión a la tasa de campo pudo pulverizarse eficazmente a través de boquillas pulverización de insecticidas convencionales estrechas. Otros tensioactivos que funcionaron bien en el estudio 1 parecen ser adecuados para una formulación pulverizable que contiene cera de carnauba.

5

10 Tablas

Tabla 1: El efecto de la concentración de tensioactivo sobre el tamaño de partícula DV<sub>50</sub> e intervalo de tamaño de cera en suspensión cuando se añadió una pasta de los dos a 100 ml de agua destilada y se mezcló.

Tensioactivo (nombre de producto comercial)	Conc. de tensioactivo (%)	DV50	Intervalo de DV (10-90)
Libsorb	0,01	7,28	3,57 - 13,25
	0,1	7,55	3,83 - 13,78
	1,0	7,54	3,85 - 13,05
	2,0	7,53	3,90 - 12,88
	5,0	7,39	3,59 - 12,47
Silwet L77	0,01	-	-
	0,1	7,23	3,54 - 12,59
	1,0	7,42	3,70 - 12,92
	2,0	7,36	3,61 - 12,36
	5,0	7,22	3,60 - 11,97
Tween 80	0,01	7,02	3,44 - 10,59
	0,1	6,85	3,22 - 10,82
	1,0	6,92	3,27 - 10,65
	2,0	6,87	3,20 - 11,14
	5,0	6,60	2,80 - 10,71
Torpedo II	0,01	Sin suspensión total	
	0,1	Sin suspensión total	
	1,0	-	-
	2,0	5,86	2,03 - 18,08
	5,0	6,25	2,25 - 10,57
Newmans T80	0,01	6,58	2,91 - 10,81
	0,1	6,81	3,21 - 11,55
	1,0	6,57	2,82 - 10,36
	2,0	6,68	2,98 - 10,52
	5,0	6,76	2,99 - 10,83
Fortune	0,01	Sin suspensión total	
	0,1	-	-
	1,0	9,83	4,32 - 39,80
	2,0	8,99	3,76 - 39,66
	5,0	8,05	2,89 - 26,41
Guard	0,01	Sin suspensión total	
	0,1	Sin suspensión total	
	1,0	6,69	2,87 - 11,24
	2,0	6,71	2,89 - 11,04
	5,0	6,85	3,27 - 11,27
Rhino	0,01	6,70	3,05 - 11,27
	0,1	6,92	3,29 - 11,67
	1,0	6,84	3,16 - 11,71
	2,0	6,94	3,23 - 11,68
	5,0	6,88	3,07 - 11,56
Biopower	0,01	7,24	2,55 - 12,70
	0,1	6,90	3,16 - 11,54
	1,0	7,09	3,34 - 14,11
	2,0	7,04	3,02 - 13,26
	5,0	7,30	3,24 - 68,70

15

Tabla 2: El efecto de la aplicación de pulverización sobre el tamaño de partícula de cera en la suspensión.

	Antes de la aplicación (suspensiones originales)		TP 11001 y presión de 2 bar		TP 11015 y presión de 2 bar	
	DV <sub>50</sub>	Intervalo	DV <sub>50</sub>	Intervalo	DV <sub>50</sub>	Intervalo
Silwet 77	7,09	3,26 - 12,84	6,74	2,75 - 12,10	6,73	3,01 - 11,64
Libsorb	6,72	2,95 - 11,38	7,22	2,92 - 38,18	6,59	2,83 - 11,11

## Sección experimental 2

5

### 1. Objetivos

10

1. Determinar la captación y longevidad en hojas de frijoles de una formulación pulverizable de partículas de cera de carnauba de Mavrik encapsulado en matriz en condiciones de clima seco y lluvia simulada.
2. Determinar la eficacia de una formulación pulverizable de partículas de cera de carnauba de Mavrik encapsulado en matriz pulverizado sobre hojas de frijoles contra el pulgón *Myzus persicae* tras condiciones de clima seco y lluvia simulada.

15

### Introducción

20

El propósito del ensayo era investigar la viabilidad de una nueva tecnología de pulverización basándose en la utilización de inclusiones de partículas de cera de carnauba cargadas (CWP), “electretos”, desarrolladas por Exosect Ltd. Los “electretos” son materiales que mantienen una polarización dieléctrica permanente, o carga en el volumen, en vez de una carga electrostática de superficie. El propósito de la partícula cargada es potenciar la adherencia tanto al follaje como a la plaga diana. En esta tecnología, la incorporación de componente activo es dentro de los cuerpos de inclusión de electreto (las partículas de cera de carnauba), por tanto aislado en gran medida del agua o aceite portador en la formulación.

25

El ensayo tenía como objetivo evaluar si podrían aplicarse o no electretos directamente al follaje mediante pulverización, en un bajo volumen de pulverización basado o bien en agua o bien en aceite. Se evaluó la capacidad para adherirse a superficies de plantas analizando la presencia de residuos de electreto del material aplicado utilizando formulaciones basadas en agua o aceite ubicado en las plantas a lo largo del tiempo, en comparación con una pulverización convencional que no contiene residuos o cuerpos de electreto.

30

Esta nueva tecnología puede mejorar la eficacia mientras que al mismo tiempo reduce la deriva de pulverización y las tasas de aplicación de pesticidas (como de pulverización de señuelo y destrucción se suministraría en fuentes puntuales en la totalidad del cultivo), alarga los intervalos de pulverización requeridos, minimiza la carga de pesticida al medio ambiente así como minimiza el riesgo de exposición a los operarios de equipos de pulverización.

35

40

En este estudio, se examinó la deposición de electretos, en este caso las partículas de cera de carnauba, pulverizando una pulverización a base de agua (que contenía tensioactivo para suspender las partículas de cera de carnauba) sobre una planta (frijoles). Se seleccionó un insecticida suministrado por Makhteshim, Mavrik (taufluvalinato) para determinar su eficacia contra la especie diana, *Myzus persicae* (pulgón), y esto se formuló en las partículas de cera de carnauba. Se comparó la retención de Mavrik en hojas de frijoles tras la pulverización con la formulación basada en cera de carnauba y una emulsión de aceite en agua convencional para determinar si las partículas de cera de carnauba habían aumentado los niveles de deposición y adhesión a lo largo del tiempo del insecticida. Se examinó el efecto de la lluvia sobre la adhesión de las formulaciones pulverizadas dentro del mismo estudio para determinar qué formulación era más inalterable frente a la lluvia. Luego se examinó el efecto de residuos de hojas de ambas formulaciones sobre la supervivencia de pulgones en un experimento adicional para determinar si la formulación de cera de carnauba mejoraba o reducía la eficacia del insecticida con respecto a una formulación de emulsión en agua convencional.

45

50

#### Experimento 1

Se extrajo insecticida (Mavrik) encapsulado en matriz en las partículas de cera de carnauba de muestras de hojas y se analizó utilizando CG-ECD. Se evaluó la adherencia inicial como lo fue la longevidad de adherencia del polvo a la superficie de planta tras condiciones de clima “seco” y “húmedo”. Se pulverizó una formulación de emulsión en agua convencional del mismo insecticida en otro grupo de tratamiento que se utilizó como referencia de prueba.

55

#### Experimento 2

60

En un segundo experimento, se comparó la eficacia de la formulación de partículas de cera de carnauba pulverizada frente a la formulación de referencia de prueba contra el pulgón *Myzus persicae* utilizando bioensayos de disco foliar en diversos puntos de tiempo tras la pulverización. Se expusieron de nuevo las plantas o no a las condiciones climáticas siguiendo procedimientos tal como se expone en el experimento 1.

2. Detalles de artículo de prueba

- 5 Tipo de artículo de prueba: Partículas de cera de carnauba fusionadas en caliente con el 1% (p/p) de concentrado de Mavrik (tau-fluvalinato), suspendido en agua con el 0,1% de tensioactivo Libsorb. El concentrado de Mavrik es el 80% de tau-fluvalinato puro y el 20% de Solvesso 100
- 10 Tasa de artículo de prueba: Tasa de campo = 200 litros agua por ha. Un litro de agua requiere 26,174 g de cera (0,209392 g = Mavrik puro)
- 15 Almacenamiento: Se almacenó el polvo en un congelador hasta que se requirió. Se añadió la cantidad requerida a Libsorb y luego se suspendió en agua la mañana de la pulverización. Se almacenó Mavrik en el armario de pesticidas hasta que se necesitó.

3. Detalles de artículo de referencia

- 20 Tipo de artículo de referencia: Mavrik (pureza del 80%) suspendido en agua.
- 25 Tasa de artículo de referencia: Basándose en la recomendación del fabricante de que a una pureza del 22%, 200 litros agua para tratar una hectárea deben contener 0,15 litros de Mavrik al 22%. Se vuelve a calcular que el concentrado de prueba y 100 litros deben contener 0,02061 litros de Mavrik de una pureza del 80%, que son 26,174 g de Mavrik al 80% cuando se convierte de volumen a peso, igual a la concentración de artículo de prueba. Se añadió Libsorb de nuevo al 0,1%.
- 30 Almacenamiento: Se almacenó Mavrik en un armario de pesticidas hasta que se necesitó.

4. Pruebas

- 35 La mayoría del ensayo se llevó a cabo en Mambo-tox, Chilworth Science Park, Southampton. Se hicieron crecer plantas en macetas de compost F2s de Levington en un invernadero y se pulverizaron en Mambo-tox y se almacenaron en la zona cubierta, junto al invernadero de Mambo-tox. Se recogieron muestras para el análisis de residuos y para los bioensayos de disco foliar por el personal del Exosect y se analizaron en las instalaciones de Exosect.

5. Procedimientos experimentales

5.1. Aplicación de tratamientos

- 45 Para detalles de formulaciones y concentraciones de pulverización véanse 2 y 3 anteriormente. Se aplicaron las pulverizaciones utilizando un pulverizador de pista Schachtner (Chr. Schachtner, Luisburgo, Alemania) operado según las instrucciones del fabricante y SOP-42 de Mambo-Tox. Se fijó la presión de pulverización a 3 bar y el brazo de pulverización estaba equipado con una única boquilla de chorro plano (Teejet 8003EVS). Se calibró el pulverizador por adelantado a las aplicaciones de prueba utilizando agua purificada, para confirmar una tasa de deposición equivalente a 200 L/ha (es decir, 2 mg de depósito/cm<sup>2</sup> con un intervalo real dentro de ± el 10% de la tasa objetivo y un intervalo medio dentro de ± el 5% de la tasa objetivo).
- 50 El procedimiento de calibración implicó pesada, pulverización y nueva pesada de cinco placas de vidrio cuadradas (cada una de 10 cm x 10 cm), para determinar la tasa de deposición lograda. Se colocaron las placas sobre soportes a lo largo de la pista de pulverización, de modo que estaban nominalmente a la misma altura que las hojas de las plantas de prueba cuando se trataron finalmente. Se pulverizaron las placas de calibración utilizando agua purificada y se realizó este proceso dos veces. Siempre que las tasas de deposición cumplieren los criterios anteriores, se aplicaron luego los tratamientos a las plantas de judías. Si no se cumplían los criterios, luego o bien se seleccionó una velocidad de programa diferente para el pulverizador y/o bien se ajustó la altura de la boquilla y se pulverizó otro grupo de placas y se pesaron, para confirmar que se había logrado la tasa de suministro correcta (véase el apéndice 9.1).
- 60 Se aplicaron tratamientos en el orden de control (agua sólo), artículo de prueba y finalmente el artículo de referencia. Se lavó meticulosamente el pulverizador de pista a su través y se limpió antes de aplicarse el tratamiento de referencia.

5.2. Plantas

- 65 Se aplicaron tratamientos a plantas de frijoles (*Phaseolus vulgaris* L. var. The Prince; Moles Seeds). Se hicieron

crecer las plantas en macetas de compost F2s de Levington en un invernadero, en condiciones de temperatura controlada. Se utilizaron cuando presentaban aproximadamente 2-3 semanas de edad y en la fase de crecimiento de 2 hojas verdaderas. Se pinzó la punta de crecimiento de cada planta para estimular el crecimiento de las primeras hojas verdaderas y para proporcionar una superficie de pulverización uniforme.

5 5.3. Grupos de tratamiento y régimen de toma de muestras

Hubo cuatro grupos de tratamiento para el experimento 1:

- 10
- Formulación de prueba de partículas de cera de carnauba (CWP) y expuesto a condiciones climáticas con lluvia.
  - Formulación de prueba de partículas de cera de carnauba (CWP) y sin lluvia.
- 15
- Formulación de referencia y expuesto a condiciones climáticas con lluvia
  - Formulación de referencia y sin lluvia

Hubo dos grupos de tratamiento adicionales para el experimento 2:

- 20
- Control (sin tratamiento) y expuesto a condiciones climáticas con lluvia
  - Control (sin tratamiento) y sin lluvia

25 Se recogieron muestras para el análisis de residuos (experimento 1) en los días 0, 1, 3, 8, 15 y 22. Se recogieron muestras para bioensayo de disco foliar (experimento 2) en los días 1, 3 y 15.

30 Para el experimento 1, cada grupo requirió 30 plantas, lo que permitió cinco plantas repetidas por tiempo de muestra, y se pulverizaron 3 plantas extra para cada grupo en caso de que se requieran muestras de más. También se hicieron crecer diez plantas y no se tomó muestras de ellas en todo el periodo de estudio, y se midieron regularmente estas plantas utilizando pies de rey digitales para cuantificar el crecimiento de las plantas durante el periodo de estudio. Por tanto, el experimento 1 requirió 165 plantas, 13 de las cuales no se pulverizaron.

35 Para el experimento 2, cada grupo tratado y grupo de control requirió 15 plantas, lo que permitió cuatro plantas repetidas por toma de muestras de bioensayo de disco foliar, más 3 muestras extra de más por grupo. Cada grupo de tratamiento de control requirió 12 plantas. Por tanto, el experimento 2 requirió 72 plantas, 18 de las cuales no se trataron con un pesticida. Se realizaron los dos experimentos uno tras otro en vez de en paralelo.

40 5.4. Régimen de exposición a condiciones climáticas

Tras la pulverización, se almacenaron las plantas sobre el suelo bajo una cubierta para la lluvia en exteriores. Los dos grupos para cada experimento que requirieron exposición a condiciones climáticas con lluvia recibieron 2000 litros por ha de volumen de agua por planta en el día 0 (tras la pulverización con las formulaciones), el día 2, el día 7, el día 14 y el día 21 (menos plantas en cada punto de tiempo consecutivo debido a la retirada de algunas en cada punto de tiempo de toma de muestras). Se simuló la lluvia utilizando el pulverizador de brazo. Los grupos que recibieron lluvia artificial se denominan en lo sucesivo “expuestos a condiciones climáticas”.

Agenda para los estudios:

50 Experimento 1

Fecha	Día	Tratamiento
Lunes	0	Pulverizar 132 plantas (66 plantas con o bien artículo de prueba o bien de referencia) Tomar muestras de 5 plantas de cada grupo Simular lluvia en 56 plantas (28 de prueba y 28 de referencia)
Martes	1	5 plantas de cada grupo
Miércoles	2	Simular lluvia en 46 plantas (23 de prueba y 23 de referencia)
Jueves	3	Tomar muestras de 5 plantas de cada grupo
Lunes	7	Simular lluvia en 36 plantas (18 de prueba y 18 de referencia)
Martes	8	Tomar muestras de 5 plantas de cada grupo
Lunes	14	Simular lluvia en 26 plantas (18 de prueba y 18 de referencia)
Martes	15	Tomar muestras de 5 plantas de cada grupo
Lunes	21	Simular lluvia en 16 plantas (13 de prueba y 13 de referencia)
Martes	22	Tomar muestras de 5 plantas de cada grupo

Agenda para los estudios:Experimento 2

5

Fecha	Día	Tratamiento
Lunes	0	Pulverizar 60 plantas con o bien artículo de prueba o bien de referencia 30 plantas sin tratamiento químico (control) Simular lluvia en 45 plantas (15 de prueba, 15 de referencia y 15 de control)
Martes	1	Recoger discos foliares de 4 plantas de cada grupo
Lunes	7	Simular lluvia en 33 plantas (11 de prueba, 11 de referencia y 11 de control)
Martes	8	Recoger discos foliares de 4 plantas de cada grupo
Lunes	14	Simular lluvia en 21 plantas (7 de prueba, 7 de referencia y 7 de control)
Martes	15	Recoger discos foliares de 4 plantas de cada grupo

5.5. Monitorización de temperatura interna y externa y humedad relativa

10 Se midieron la temperatura y la humedad relativa en la zona cubierta en la totalidad del ensayo utilizando un registrador de datos proporcionado por Mambo-tox. Para los datos, véanse las figuras 8 y 9.

5.6. Estimación del crecimiento de las plantas

15 Experimento 1: Se marcaron todas las macetas con plantas con un número y el grupo de tratamiento. Se situó la etiqueta en la maceta de tal manera que una hoja estuviera a la izquierda de la etiqueta (A) y una hoja estuviera a la derecha de la etiqueta (B). Se midieron los limbos de las hojas de todas las plantas utilizando calibres al inicio del experimento, antes de que se aplicara la primera pulverización a las hojas. Se tomaron dos mediciones de cada limbo, la primera de donde terminaba el peciolo en la punta del limbo, y la segunda, la anchura del punto más ancho del limbo en ángulos rectos con respecto al peciolo. Se registraron todas las mediciones con el número de planta, el tratamiento y si era hoja A o B. Se midieron diez plantas de control de esta manera en cada punto de toma de muestras. Se midió cada planta de la que se tomaron muestras para el análisis de residuos (longitud y anchura únicamente) antes de pulverizarla y luego de nuevo antes de cortar las hojas. Como no hubo un aumento significativo del tamaño de limbo de las hojas en la totalidad del experimento, no se midió el crecimiento de las plantas en el segundo experimento.

25 Al final del estudio, se midió de nuevo el área de las diez plantas de control. Debido a la forma natural del limbo, se calculó el área total del limbo multiplicando la longitud medida desde el extremo del peciolo hasta la punta del limbo por la anchura máxima de la hoja. Se calculó una relación entre el cambio en la anchura y la longitud de las hojas, y el crecimiento (en área) de las hojas. Se encontró que no era necesario un factor de ajuste para la dilución de componentes activos por el crecimiento de las hojas.

5.7. Análisis de muestra de residuo utilizando ECD5.7.1. Preparación de muestras

35 Tras haberse medido las hojas, se utilizó una base de placa de Petri de 35 mm para cortar dos discos de cada limbo de las hojas (dos limbos por planta: A y B). Se taparon inmediatamente los discos cortados y la base de placa de Petri en un recipiente de vidrio (suministros científicos de Fisher UK) y se marcaron con el número de planta, el tratamiento y A o B. Se colocaron los recipientes en una bolsa refrigerante durante la fase de campo del procedimiento de extracción. Una vez que los recipientes que contenían los discos foliares estaban de vuelta en el laboratorio, se añadieron 20 ml de n-hexano, de calidad para HPLC, al recipiente, los discos foliares y las bases de placa de Petri y se almacenaron en una nevera hasta que estuvieron listos para extraerse mediante ultrasonificación. Antes de la extracción, se añadieron 100 µl de patrón interno pentacloronitrobenceno (PCNB) 0,01 mg/ml al recipiente que contenía las muestras y hexano. Se colocaron las muestras en un baño con ultrasonidos (Ultrawave U1750D) a 40°C durante 10 min. Luego se extrajeron muestras de 2 ml del disolvente en los recipientes utilizando una pipeta Pasteur de plástico y se transfirieron a viales para CG convencionales para análisis; se mantuvieron los viales en el congelador hasta que se requirió. Se prepararon disoluciones de calibración en matraces volumétricos de 20 ml utilizando patrón interno PCNB para cubrir un intervalo de desde 5 hasta 940 ng/ml y se hizo correr la disolución junto con los extractos de muestra. Se construyó una gráfica de calibración.

5.7.2. Análisis utilizando ECD

55 Se analizó una disolución de prueba de Mavrik en hexano utilizando QCRF017-1 mediante cromatografía de gases (CG) capilar equipada con un detector de captura de electrones (ECD). Mavrik contiene tanto grupos flúor como cloro, que los detecta con más sensibilidad ECD que FID. Se utilizó una columna con fase de dimetilpolisiloxano (apolar) para lograr la separación de los componentes no activos. Cuantificación mediante patrón interno. Se

describen las condiciones de CG en el apéndice número 9.2

#### 5.8. Cultivo de pulgones

5 Se creó el cultivo de pulgones con un cultivo iniciador de *Myzus persicae* obtenido del Grupo de Ecología de Plantas e Invertebrados, Rothamsted Research, Harpenden, Herts. Originariamente se obtuvieron los pulgones de una población susceptible a pesticidas con fuente en R.U. de *Myzus persicae*, referencia n.º 4106A. Se hicieron crecer semillas de col china en bandejas para semillas en un invernadero ubicado en el emplazamiento externo de Exosect Limited (Boyes Lane, Colden Common, Winchester). Una vez que las plántulas tuvieron 3 semanas de edad, se transfirieron a macetas más grandes para que crecieran y se regaron regularmente. Se dispersaron plantas de cilantro entre las coles en crecimiento para repeler los pulgones nativos. Se construyó una jaula (1,5 m x 1 m) a partir de madera de 1 x 2 pulgadas, y se cubrió con red. Un lado presentaba una solapa de cierre de Velcro cosida en el mismo para permitir que se introdujesen y sacasen las plantas infestadas con pulgones. Se colocó una gran bandeja en el centro del suelo de la jaula y se llenó de agua para ahogar a los pulgones que caían. Se colocaron las plantas de col sobre pequeñas placas, ligeramente elevadas, de modo que las raíces estuvieran por encima de la línea de agua. Inicialmente se infestó una planta de col con pulgones. Una vez que los pulgones habían colonizado una planta completa, se retiraron las hojas infestadas y se utilizaron para inocular nuevas plantas. Se repitió este procedimiento regularmente siempre que se necesitase.

#### 5.9. Bioensayo de disco foliar

20 Se utilizó una placa de Petri de 35 mm para cortar discos de limbos de las hojas. Se cortaron las dos hojas principales de cuatro plantas. Se colocó cada hoja plana sobre la superficie de una bandeja de plástico revestida con una lámina de rolo absorbente azul, con el área tratada orientada hacia arriba. Luego se colocó la base de la placa de Petri encima del limbo y se cortó un disco. Luego se tapó el disco foliar sobre la tapa de la placa de Petri, que contenía un trozo de almohadilla de algodón en rama cortada previamente para caber dentro de la tapa y se empapó con agua destilada. Luego se colocó de vuelta la base de la placa de Petri sobre el disco foliar para proteger la superficie tratada. Una vez que todos los discos foliares estuvieron de vuelta en el laboratorio, se retiró la cubierta del disco foliar y se colocaron 6 pulgones de 3<sup>er</sup> estadio de tamaño medio sobre cada uno de los discos. Luego se volvió a colocar la cubierta y se registró la mortalidad en puntos de tiempo regulares durante por lo menos 72 h cada 24 h, se humedecieron las almohadillas de algodón con 3 gotas de agua destilada utilizando una pipeta Pasteur.

#### 6.0. Análisis de datos

35 Se llevaron a cabo todos los análisis utilizando el software XLStat de Microsoft, EE.UU.

#### 6.1. Análisis de datos de residuos de pesticidas a lo largo del tiempo

40 Se expresó la cantidad de residuo de Mavrik (tau-fluvalinato) sobre el disco foliar cuando se analizó mediante CG como ng de Mavrik por cm<sup>2</sup> de disco foliar.

Se realizaron pruebas ANOVA para comparar los cuatro grupos de tratamiento en cada día de toma de muestras (días 0, 1, 3, 8, 15 y 22). Se sometieron a prueba todos los errores residuales para determinar normalidad y sólo los datos de residuos del día 8 requirieron una transformación de raíz cuadrada para normalizar los datos.

45

#### 6.2. Análisis del crecimiento de plantas a lo largo del tiempo en el experimento 1

50 Se calcularon las áreas de las hojas de planta de control multiplicando la longitud de la hoja (la medición desde el extremo del peciolo hasta la punta del limbo de las hojas), y la anchura máxima de la hoja. Se realizaron comparaciones entre área de hoja en el día 0 con cada fecha de toma de muestras después de eso. Se utilizaron pruebas de la t de datos emparejados para someter a prueba si hubo diferencias significativas entre mediciones de área tomadas en el día 0 en comparación con las mismas plantas en los días 1, 3, 8, 15 y 22. Se analizó la variación del crecimiento de plantas de control utilizando una prueba de Kruskal-Wallace no paramétrica con ajuste de Bonferroni.

55

#### 6.3. Análisis de la mortalidad de pulgones en el experimento 2

60 Se realizó un ajuste de Abbott para la mortalidad de control en todos los datos. Se aplicaron modelos probit cualitativos a los datos a las 24, 48 y 72 h tras inocularse las hojas con pulgones. Se utilizaron límites de confianza del 95% no solapantes para determinar la significación de cualquier diferencia en el número de ejemplares muertos previstos entre grupos en cada tiempo de toma de muestras.

## 7.0. Resultados y discusión

### 7.1. Análisis de residuos, experimento 1

- 5 Hubo un efecto significativo del método de tratamiento y exposición a condiciones climáticas sobre la retención de residuos en cada día de toma de muestras: (día 0:  $F_{1,39} = 12,46$ ,  $P = 0,001$ ; día 1:  $F_{3,39} = 27,039$ ,  $P < 0,0001$ ; día 3:  $F_{3,39} = 16,578$ ,  $P < 0,0001$ ; día 8:  $F_{3,39} = 20,811$ ,  $P < 0,001$ ; día 15:  $F_{3,39} = 6,159$ ,  $P = 0,002$  y día 22:  $F_{3,39} = 48,456$ ,  $P < 0,0001$ ).
- 10 En el día 0, tras la pulverización inicial de todas las plantas de judías, antes de que se expusieran a condiciones climáticas, la cantidad de residuo en las hojas fue significativamente diferente entre las plantas pulverizadas con la formulación de emulsión convencional y las pulverizadas con las partículas de formulación de cera de carnauba: las pulverizadas con las partículas de cera de carnauba presentaban significativamente más residuo de Mavrik sobre ellas. Esto fue sorprendente debido a que las formulaciones se crearon con la misma concentración de Mavrik.
- 15 En el día 1, tras haberse expuesto a condiciones climáticas la mitad de las plantas tratadas, las muestras tomadas de las plantas pulverizadas con partículas de cera de carnauba presentaban significativamente más residuo sobre ellas que las pulverizadas con la disolución de emulsión convencional.
- 20 En el día 3 y 8, las plantas tratadas con partículas de cera de carnauba no expuestas a condiciones climáticas presentaban significativamente más residuo de Mavrik sobre ellas que los otros grupos de tratamiento ( $P < 0,0001$ ). No hubo ninguna diferencia significativa entre otros grupos de tratamiento.
- 25 En el día 15, las plantas con partículas de cera de carnauba no expuestas a condiciones climáticas presentaban significativamente más residuo sobre ellas que las plantas con partículas de cera de carnauba expuestas a condiciones climáticas ( $P < 0,005$ ) y las plantas con emulsión convencional no expuestas a condiciones climáticas ( $P < 0,003$ ); no hubo ninguna diferencia significativa entre cualquiera de los otros grupos de tratamiento.
- 30 En el día 22, las plantas tratadas con partículas de cera de carnauba no expuestas a condiciones climáticas presentaban significativamente más residuo sobre ellas que las plantas tratadas con partículas de cera de carnauba expuestas a condiciones climáticas ( $P < 0,0001$ ), con emulsión expuestas a condiciones climáticas ( $P < 0,0001$ ) y con emulsión no expuestas a condiciones climáticas ( $P < 0,0001$ ). No hubo ninguna diferencia significativa entre cualquiera de los otros grupos.
- 35 El análisis de residuos (figura 3) mostró que las plantas tratadas con partículas de cera de carnauba presentaban más residuo sobre ellas al inicio del ensayo que las tratadas con la emulsión de Mavrik.

Las plantas tratadas con partículas de cera de carnauba no expuestas a condiciones climáticas presentaban más residuos sobre ellas que cualquiera de los otros grupos tratados (figura 3).

#### 7.2.1. Área de hoja de planta de control en el experimento 1

- 40 No hubo ningún aumento significativo del área de hoja en las plantas de control tras 22 días del ensayo,  $P=0,970$ , con un ajuste de Bonferroni de 0,0033. (Véase la figura 4, y el apéndice 9.4)

#### 7.2.2. Área de hoja de planta de la que se tomaron muestras en el experimento 1

- 50 No hubo ningún cambio significativo en el área de hoja desde el primer día de medición en el día 0 en comparación con el día 1 ( $P = 0,071$ ), el día 8 ( $P = 0,201$ ) y el día 15 ( $P = 0,328$ ). Hubo un aumento significativo del área de hoja entre los días 0 y 3 ( $P < 0,0001$ ), y los días 0 y 22 ( $P = 0,326$ ). La diferencia media entre las mediciones en el día 0 y el resto de las mediciones tomadas en los otros días de toma de muestras no superó los  $0,6 \text{ cm}^2$  (véase el apéndice 9.5). Cuando se tiene en cuenta el tamaño global de las hojas pulverizadas, un aumento de área máximo de  $0,6 \text{ cm}^2$  no habría presentado un gran efecto de dilución sobre la concentración de los residuos sobre las hojas de las planta, y la reducción de residuos observada se debía a otros factores, lo más probablemente a las acciones de exposición a condiciones climáticas y la degradación por Mavrik. Todas las plantas en todos los grupos habían crecido en una cantidad tan ligera que se consideró innecesario un ajuste en el cálculo de la retención de residuos por  $\text{cm}^2$  debido al crecimiento de las plantas.

### 7.3. Bioensayos de pulgones en el experimento 2.

#### 7.3.1. Muestras recogidas un día tras la pulverización:

- 60 Cuando se colocaron pulgones sobre discos foliares recogidos un día tras la pulverización, hubo un efecto significativo del tratamiento sobre el número de pulgones muertos tras 24, 48 y 72 h de exposición a los tratamientos. Mavrik en una emulsión convencional no expuesto a condiciones climáticas fue más eficaz que todos los demás tratamientos cada día. Las plantas tratadas con partículas de cera de carnauba no expuestas a

condiciones climáticas y en emulsión expuesta a condiciones climáticas fueron ambas significativamente más eficaces que las plantas tratadas con partículas de cera de carnauba expuestas a condiciones climáticas cada día (véase el apéndice 9.7).

- 5 Cuando se colocaron los pulgones sobre los discos de los que se tomaron muestras un día tras la pulverización, los discos tratados con emulsión convencional provocaron la mortalidad mayor y más rápida (véase la figura 5).

7.3.2. Muestras recogidas ocho días tras la pulverización:

- 10 Cuando se colocaron pulgones sobre discos foliares recogidos ocho días tras la pulverización, hubo un efecto significativo del tratamiento sobre la muerte de pulgones tras 24, 48 y 72 h de exposición a los tratamientos. No hubo ninguna diferencia significativa en la muerte de pulgones entre la emulsión convencional no expuesta a condiciones climáticas y las partículas de cera de carnauba no expuestas a condiciones climáticas hasta 72 h tras la exposición a discos foliares. Ambos grupos no expuestos a condiciones climáticas fueron significativamente más eficaces que los grupos expuestos a condiciones climáticas. No hubo ninguna diferencia entre los grupos expuestos a condiciones climáticas (véase la figura 6).

7.3.3. Muestras recogidas quince días tras la pulverización:

- 20 Cuando se colocaron pulgones sobre discos foliares recogidos 15 días tras la pulverización, hubo un efecto significativo del tratamiento sobre la muerte de pulgones tras 24 y 72 h de exposición a los tratamientos. A las 24 h, las partículas de cera de carnauba no expuestas a condiciones climáticas provocaron significativamente más mortalidad que ambos grupos expuestos a condiciones climáticas; ninguno de los otros grupos de tratamiento fue significativamente diferente. A las 72 h, las partículas de cera de carnauba provocaron significativamente más mortalidad de pulgones que ambos grupos tratados con emulsión, y las partículas de cera de carnauba expuestas a condiciones climáticas fueron significativamente más eficaces que la emulsión expuesta a condiciones climáticas. Cuando se colocaron los pulgones sobre los discos quince días tras la pulverización, los tratados con las partículas de cera de carnauba no expuestas a condiciones climáticas presentaban por tanto la mayor mortalidad, seguidos por las partículas de cera de carnauba expuestas a condiciones climáticas y luego la emulsión (véase la figura 7).

- 30 Tras 15 días, la eficacia de la emulsión se había reducido significativamente y las plantas pulverizadas con las partículas de cera de carnauba destruyeron significativamente más pulgones que las tratadas con una emulsión normal.

35 8.0. Resumen de la discusión

- Se suspendió de manera satisfactoria una formulación de partículas de cera de carnauba con insecticida encapsulado en matriz en agua utilizando una cantidad mínima del tensioactivo Libsorb (0,1%) y se encontró que este era más sencillo de mezclar con agua que la emulsión de Mavrik a base de aceite convencional. Inmediatamente tras la pulverización, las plantas presentaban una mayor cantidad de residuo de Mavrik sobre ellas cuando se pulverizaron con las partículas de cera de carnauba en comparación con la emulsión de aceite. Las plantas tratadas con cera de carnauba no expuestas a condiciones climáticas presentaban el mayor residuo que quedaba al final del ensayo.

- 45 Las tasas de mortalidad de pulgones fueron mayores en las plantas tratadas con cera de carnauba en comparación con las plantas tratadas con emulsión sólo tras 15 días siguiendo el tratamiento.

- Los bioensayos de pulgones mostraron que 15 días tras la pulverización, el tratamiento con cera de carnauba, tanto con exposición a condiciones climáticas como sin exposición a condiciones climáticas, dio como resultado una mayor tasa de mortalidad que el tratamiento con emulsión. Esto fue sorprendente, ya que los tratamientos con emulsión dieron como resultado mayor mortalidad al comienzo del ensayo que el tratamiento con cera de carnauba; a pesar del hecho de que las plantas tratadas con cera de carnauba presentaban más cantidad de residuo de Mavrik sobre ellas en la totalidad del ensayo. Al inicio del ensayo, las plantas pulverizadas con las partículas de cera de carnauba presentaban doble cantidad de los componentes activos de Mavrik disponibles para actuar sobre los pulgones, en comparación con las plantas tratadas con emulsión, pero las plantas tratadas con emulsión provocaron mayor mortalidad de pulgones. Tras 15 días, había todavía aproximadamente el doble de cantidad de Mavrik sobre las plantas tratadas con cera de carnauba no expuestas a condiciones climáticas, pero la tasa de mortalidad de pulgones era significativamente mayor que en las tratadas con la emulsión.

- 60 Es posible que los pulgones captaran más cantidad de Mavrik mediante la formulación de cera de carnauba pero debido a que Mavrik estaba encapsulado en matriz en el interior de la cera, llevó más tiempo transferir Mavrik a través de la cutícula de los insectos. Las partículas de cera de carnauba parecieron ampliar la cantidad de tiempo que Mavrik permanecía activo contra los pulgones en más de una semana.

- 65 En los tratamientos sin lluvia simulada, el estudio mostró que el tratamiento con emulsión dio como resultado mayores niveles de mortalidad de pulgones (~90%), que remitieron hasta el 30% a lo largo de dos semanas,

mientras que el tratamiento con cera de carnauba dio como resultado un bajo nivel de mortalidad inicialmente (30%) que aumentó hasta el 65% en el día 15. Un tratamiento mediante pulverización de combinación con emulsión de Mavrik y Mavrik encapsulado en matriz en las partículas de cera de carnauba puede proporcionar un control de pulgones eficaz y de larga duración.

5 La formulación de cera de carnauba muestra ser prometedora, particularmente puesto que era más fácil de mezclar con agua que la emulsión basada en aceite. Si los cultivadores reciben una mezcla concentrada de matriz de insecticida encapsulado en partículas de cera de carnauba y tensioactivo, esta pasta se mezclaría con agua muy rápidamente y permanecería suspendida en el tanque, dando como resultado una mezcla muy homogénea. Se encontró que es difícil mezclar una formulación de aceite con el agua, incluso con agitación vigorosa, y se cree que es posible que los cultivadores también tengan mayor dificultad para crear una mezcla homogénea, totalmente suspendida con la formulación convencional.

15 9.0. Apéndice

9.1. Calibración del pulverizador de pista

Boquilla: Teejet 8003 EVS (azul); altura de 36,5 cm. Presión: 3 bar. Tasa de apertura: 200 l/ha. Prog.: 14 (3,75 km/h). Objetivo: placa de vidrio de 10x10 cm (x5). Depósito objetivo: 0,200 g por placa.

20 Disolución: agua purificada.

	Peso seco (g)	Peso húmedo (g)	Depósito (g)
A	73,544	73,76	0,216
B	72,489	72,702	0,213
C	72,866	73,085	0,219
D	71,727	71,937	0,21
E	71,391	71,587	0,1960
			<u>0,2108 X</u>

	Peso seco (g)	Peso húmedo (g)	Depósito (g)
A	73,544	73,759	0,215
B	72,489	72,696	0,207
C	72,866	73,076	0,21
D	71,727	71,932	0,205
E	71,391	71,588	0,1970
			<u>0,2068</u>

	Peso seco (g)	Peso húmedo (g)	Depósito (g)
A	73,544	73,76	0,216
B	72,489	72,682	0,193
C	72,866	73,065	0,199
D	71,727	71,924	0,197
E	71,391	71,598	0,2070
			<u>0,2024</u>

25 9.2. Condiciones de CG

Horno

Temp. inicial: 60°C (encendido)      Temp. máxima: 350°C  
 Tiempo inicial: 2,00 min              Tiempo de equilibración: 3,00 min  
 Rampas:

#	Tasa	Temp. final	Tiempo final
1	12,00	250	0,00
2	15,00	350	3,00
3	0,00	(apagado)	

30 Temp. post.: 60°C, tiempo post.: 0,00 min, tiempo de ejecución: 27,50 min

Entrada frontal (fraccionamiento/sin fraccionamiento)

35 Modo: fraccionamiento; Temp. inicial: 220°C (encendido); presión: 20,00 psi (encendido); razón de fraccionamiento: 20:1; flujo fraccionado: 101,1 ml/min; flujo total: 108,8 ml/min; ahorrador de gas: encendido; flujo de ahorrador: 20,0 ml/min; tiempo de ahorrador: 2,00 min; gas portador: helio

Columna 1

5 Columna capilar; número de modelo: SGE 054798 Solgel-1; temperatura máxima: 350°C; longitud nominal: 30,0 m; diámetro nominal: 320,00 µm; grosor de película nominal: 0,25 µm; modo: presión constante; presión: 20,00 psi; flujo inicial nominal: 5,1 ml/min; velocidad promedio: 66 cm/s; entrada: entrada frontal; salida: detector trasero; presión de salida: ambiental.

Detector trasero (µecd)

10 Temperatura: 350°C (encendido); modo: flujo de reposición constante; flujo de reposición: 15,0 ml/min (encendido); tipo de gas de reposición: nitrógeno; electrómetro: encendido.

Inyector Frontal

15 Lavados de muestra: 3; bombas de muestra: 3; volumen de inyección: 2,0 microlitros; tamaño de jeringa: 10,0 microlitros; lavados con disolvente A tras iny.: 3; lavados con disolvente B tras iny.: 3; retardo de viscosidad: 0 s

9.3. Resultados estadísticos de análisis de datos de residuos

20 9.3.1. Día 0

T = día 0					
Tratamiento / Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95%					
Contraste	Diferencia	Diferencia normalizada	Valor crítico	Pr > dif.	Significativo
CWP frente a Mavrik	1,165	3,570	2,024	0,001	Sí
Valor crítico d de Tukey:			2,863		

25 9.3.2. Día 1

T = día 1					
Análisis de la varianza:					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F
Modelo	3	31,950	10,650	27,039	< 0,0001
Error	36	14,180	0,394		
Total corregido	39	46,129			
<i>Calculado frente al modelo Y = media (Y)</i>					

T = 1					
Tratamiento / Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95%					
Contraste	Diferencia	Diferencia normalizada	Valor crítico	Pr > dif.	Significativo
CWP frente a Mav.	2,252	8,024	2,693	< 0,0001	Sí
CWP frente a lluvia con Mav.	2,070	7,375	2,693	< 0,0001	Sí
CWP frente a lluvia con CWP	1,146	4,083	2,693	0,001	Sí
Lluvia con CWP frente a Mav.	1,106	3,941	2,693	0,002	Sí
Lluvia con CWP frente a lluvia con Mav.	0,924	3,292	2,693	0,011	Sí
Lluvia con Mav. frente a Mav.	0,182	0,648	2,693	0,915	No
Valor crítico d de Tukey:			3,809		

## ES 2 548 904 T3

### 9.3.3. Día 3

T = día 3					
Análisis de la varianza:					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F
Modelo	3	13,481	4,494	16,578	< 0,0001
Error	36	9,758	0,271		
Total corregido	39	23,239			
<i>Calculado frente al modelo Y = media (Y)</i>					

T = 3					
Tratamiento / Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95%					
Contraste	Diferencia	Diferencia normalizada	Valor crítico	Pr > dif.	Significativo
CWP frente a lluvia con Mav.	1,462	6,279	2,693	< 0,0001	Sí
CWP frente a lluvia con CWP	1,329	5,708	2,693	< 0,0001	Sí
CWP frente a Mav.	1,164	4,999	2,693	< 0,0001	Sí
Mav. frente a lluvia con Mav.	0,298	1,280	2,693	0,581	No
Mav. frente a lluvia con CWP	0,165	0,709	2,693	0,893	No
Lluvia con CWP frente a lluvia con Mav.	0,133	0,571	2,693	0,940	No
Valor crítico d de Tukey:			3,809		

### 5 9.3.4. Día 8

T = día 8					
Análisis de la varianza:					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F
Modelo	3	1,847	0,616	20,811	< 0,0001
Error	36	1,065	0,030		
Total corregido	39	2,912			
<i>Calculado frente al modelo Y = media (Y)</i>					

T = 8					
Tratamiento / Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95%					
Contraste	Diferencia	Diferencia normalizada	Valor crítico	Pr > dif.	Significativo
CWP frente a lluvia con Mav.	0,586	7,619	2,693	< 0,0001	Sí
CWP frente a Mav.	0,417	5,428	2,693	< 0,0001	Sí
CWP frente a lluvia con CWP	0,394	5,118	2,693	< 0,0001	Sí
Lluvia con CWP frente a lluvia con Mav.	0,192	2,502	2,693	0,077	No
Lluvia con CWP frente a Mav.	0,024	0,310	2,693	0,990	No
Mav. frente a lluvia con Mav.	0,169	2,192	2,693	0,145	No
Valor crítico d de Tukey:			3,809		

### 9.3.5. Día 15

10

T = día 15					
Análisis de la varianza:					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F
Modelo	3	0,083	0,294	6,159	0,002
Error	36	1,720	0,048		
Total corregido	39	2,603			

Calculado frente al modelo  $Y = \text{media}(Y)$

T = 15					
Tratamiento / Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95%					
Contraste	Diferencia	Diferencia normalizada	Valor crítico	Pr > dif.	Significativo
CWP frente a lluvia con Mav.	0,369	3,779	2,693	0,003	Sí
CWP frente a lluvia con CWP	0,355	3,631	2,693	0,005	Sí
CWP frente a Mav.	0,211	2,153	2,693	0,156	No
Mav. frente a lluvia con Mav.	0,159	1,625	2,693	0,378	No
Mav. frente a lluvia con CWP	0,144	1,478	2,693	0,461	No
Lluvia con CWP frente a lluvia con Mav.	0,014	0,147	2,693	0,999	No
Valor crítico d de Tukey:			3,809		

9.3.6. Día 22

T = día 22					
Análisis de la varianza:					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F
Modelo	3	1,622	0,541	48,456	< 0,0001
Error	36	0,402	0,011		
Total corregido	39	2,024			
Calculado frente al modelo $Y = \text{media}(Y)$					

5

T = 22					
Tratamiento / Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95%					
Contraste	Diferencia	Diferencia normalizada	Valor crítico	Pr > dif.	Significativo
CWP frente a lluvia con CWP	0,486	10,288	2,693	< 0,0001	Sí
CWP frente a lluvia con Mav.	0,455	9,632	2,693	< 0,0001	Sí
CWP frente a Mav.	0,451	9,547	2,693	< 0,0001	Sí
Mav. frente a lluvia con CWP	0,035	0,741	2,693	0,880	No
Mav. frente a lluvia con Mav.	0,004	0,085	2,693	1,000	No
Lluvia con Mav. frente a lluvia con Ent.	0,031	0,656	2,693	0,913	No
Valor crítico d de Tukey:			3,809		

9.4. Análisis del área de hoja de planta de control

Prueba de Kruskal-Ellis:	
K (valor observado)	0,899
K (valor crítico)	11,070
DF	5
Valor de p (de dos colas)	0,970
alfa	0,05

10 9.5. Análisis del área de hoja de planta de la que se tomaron muestras

9.5.1. Diferencia media en el área

	Área de planta de muestra media, cm <sup>2</sup>	Área media en el día 0, cm <sup>2</sup>	Diferencia en el área, cm <sup>2</sup>
Día 1	14,57718161	14,4462625	0,130919108
Día 3	14,05116936	13,453545	0,59762436
Día 8	15,68704125	15,48519152	0,201849735
Día 15	13,25228781	12,9246675	0,327620308
Día 22	13,10252875	12,77612	0,32640875

9.5.2. Día 1

Diferencia	0,131
t (valor observado)	1,859
t (valor crítico)	2,023
DF	39
Valor de p (de dos colas)	0,071
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

5

H0: La diferencia entre las medias no es significativamente diferente de 0.  
 Ha: La diferencia entre las medias es significativamente diferente de 0.

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es cierta es del 7,06%

10

9.5.3. Día 3

Diferencia	0,598
t (valor observado)	4,920
t (valor crítico)	2,023
DF	39
Valor de p (de dos colas)	< 0,0001
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

15

H0: La diferencia entre las medias no es significativamente diferente de 0.  
 Ha: La diferencia entre las medias es significativamente diferente de 0.

Como el valor de p calculado es mayor que el nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , debe rechazarse la hipótesis nula H0, y aceptarse la hipótesis alternativa Ha.

20

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es cierta es menor del 0,01%

9.5.4. Día 8

25

Diferencia	0,202
t (valor observado)	0,596
t (valor crítico)	2,023
DF	39
Valor de p (de dos colas)	0,554
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

30

H0: La diferencia entre las medias no es significativamente diferente de 0.  
 Ha: La diferencia entre las medias es significativamente diferente de 0.

Como el valor de p calculado es mayor que el nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , debe aceptarse la hipótesis nula H0.

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es cierta es del 55,45%

35

9.5.5. Día 15

Diferencia	0,328
t (valor observado)	1,629
t (valor crítico)	2,023
DF	39
Valor de p (de dos colas)	0,111
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

40

H0: La diferencia entre las medias no es significativamente diferente de 0.

## ES 2 548 904 T3

Ha: La diferencia entre las medias es significativamente diferente de 0.

Como el valor de p calculado es mayor que el nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , debe aceptarse la hipótesis nula  $H_0$ .

5 El riesgo de rechazar la hipótesis nula  $H_0$  cuando es cierta es del 11,14%.

### 9.5.6. Día 22

Diferencia	0,326
t (valor observado)	2,122
t (valor crítico)	2,023
DF	39
Valor de p (de dos colas)	0,040
alfa	0,05

10 Interpretación de la prueba:

$H_0$ : La diferencia entre las medias no es significativamente diferente de 0.

Ha: La diferencia entre las medias es significativamente diferente de 0.

15 Como el valor de p calculado es mayor que el nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , debe rechazarse la hipótesis nula  $H_0$ , y aceptarse la hipótesis alternativa  $H_a$ .

El riesgo de rechazar la hipótesis nula  $H_0$  cuando es cierta es menor del 4,03%.

20 9.6. Bioensayos de pulgones en el experimento 2

#### 9.6.1. Muestras de disco foliar con pulgones, 1 día tras la pulverización

24 horas tras la inoculación de las hojas		
	Límite inferior, 95%	Límite superior, 95%
Mavrik	2,600	4,245
Lluvia con Mavrik	0,967	2,453
CWP	0,408	1,610
Lluvia con CWP	0,000	0,000
48 horas tras la inoculación de las hojas		
	Límite inferior, 95%	Límite superior, 95%
Mavrik	4,244	5,506
Lluvia con Mavrik	1,275	2,847
CWP	1,425	3,026
Lluvia con CWP	0,000	0,000
72 horas tras la inoculación de las hojas		
	Límite inferior, 95%	Límite superior, 95%
Mavrik	4,601	5,706
Lluvia con Mavrik	1,068	2,586
CWP	1,318	2,898
Lluvia con CWP	0,000	0,000

25 9.6.2. Muestras de disco foliar con pulgones, 8 día tras la pulverización

24 horas tras la inoculación		
	Límite inferior, 95%	Límite superior, 95%
Mavrik	1,644	3,277
Lluvia con Mavrik	0,248	1,306
CWP	0,809	2,236
Lluvia con CWP	0,248	1,306
48 horas tras la inoculación		
	Límite inferior, 95%	Límite superior, 95%
Mavrik	3,819	5,230
Lluvia con Mavrik	1,068	2,586
CWP	2,848	4,467
Lluvia con CWP	1,171	2,717
72 horas tras la inoculación		
	Límite inferior, 95%	Límite superior, 95%

Mavrik	3,819	5,230
Lluvia con Mavrik	1,068	2,586
CWP	2,848	4,467
Lluvia con CWP	1,171	2,717

9.6.3. Muestras de disco foliar con pulgones, 8 días tras la pulverización

4 horas tras la inoculación		
	Límite inferior, 95%	Límite superior, 95%
Mavrik	0,161	1,116
Lluvia con Mavrik	0,110	0,985
CWP	1,109	2,639
Lluvia con CWP	0,044	0,784
48 horas tras la inoculación		
	Límite inferior, 95%	Límite superior, 95%
Mavrik	0,197	1,227
Lluvia con Mavrik	0,418	1,640
CWP	1,025	2,527
Lluvia con CWP	0,558	1,866
72 horas tras la inoculación		
	Límite inferior, 95%	Límite superior, 95%
Mavrik	0,115	1,045
Lluvia con Mavrik	0,000	0,000
CWP	1,178	2,721
Lluvia con CWP	0,272	1,377

5 Sección experimental: adherencia y actividad residual

Resumen

10 El objetivo de este estudio era determinar efectos de adherencia y actividad residual de un insecticida (deltametrina) en una formulación de cera de carnauba pulverizable; observando los efectos sobre la supervivencia del chinche predador, *Orius laevigatus*. Los criterios de valoración del estudio fueron la mortalidad de *Orius* en cuatro bioensayos organizados a los 0, 3, 7 y 14 días tras el tratamiento (DAT) tras la exposición a residuos del artículo de prueba.

15 Se llevó a cabo una prueba límite utilizando la tasa de 0,76 g/ha de formulación de cera de carnauba (equivalente a 0,0038 g/l). Para propósitos comparativos, se incluyó un grupo de control de agua desionizada no tratado (Tween 20 al 0,1%).

20 Se aplicaron todos los tratamientos a plantas de algodón utilizando un pulverizador de pista a una tasa de aplicación de 200 l/ha. Una vez que se había secado el depósito de pulverización, se tomaron discos foliares para el bioensayo de *Orius* y para el análisis de residuos. Se confinaron cinco ninfas de *O. laevigatus* en la superficie tratada de los discos foliares y se alimentaron con huevos de *Ephestia* al inicio del bioensayo y tras la evaluación a las 48 h. En el bioensayo, se repitieron el tratamiento de control y el artículo de prueba ocho veces. Se evaluó la mortalidad de *Orius* para cada bioensayo a las 2, 24, 48 y 72 horas tras la adición de los insectos.

25 La cera de carnauba, a la tasa de 0,76 g/ha tuvo un efecto estadísticamente significativo ( $P > 0,01$ ) sobre la mortalidad de *Orius* en comparación con el control (prueba de la t de dos colas homocedástica, ToxCalc versión 5.0.23, 1999).

30 Los criterios de prueba observados eran que la mortalidad de control durante 72 horas para los bioensayos a los 0, 3 y 14 DAT no superase el 20% (mortalidad real del 20, el 10 y el 10% respectivamente) y que la mortalidad de control durante 72 horas para los bioensayos a los 7 DAT fuese del 32,5%

Materiales

35 1.1. Artículo de prueba y tasa de dilución

40 Se diluyó el artículo de prueba, cera de carnauba, en agua desionizada poco antes de su aplicación y se agitó la disolución de pulverización meticulosamente para garantizar su homogeneidad. El volumen de aplicación para todos los tratamientos era equivalente a 200 l/ha.

Identidad:	Cera de carnauba (fusionada en caliente formulada con concentrado de deltametrina al 1% p/p
Proveedor:	Exosect Ltd
Política de almacenamiento:	Los artículos de prueba se conservarán en condiciones ambientales por lo menos hasta la fecha de caducidad del lote.

Tasa de aplicación: 0,76 g/ha (equivalente a 0,0038 g de c.a./l)  
 Control negativo: Agua desionizada con Tween 20 al 0,1%

Sistema de prueba

5 Se obtuvieron especímenes de *O. laevigatus* como huevos de un proveedor comercial. Se proporcionaron huevos de *Ephestia* (polilla) como alimento para estos chinches predadores. Se había mantenido *Orius* en condiciones del entorno similares a las del estudio y se utilizaron cuando no presentaban más de 72 horas de edad tras la eclosión.

Métodos

10 3.1. Preparación de las concentraciones de prueba

Se prepararon disoluciones de tratamiento junto antes de su utilización pesando los artículos de prueba y de referencia y enrasándolos con Tween 20 al 0,1%. Se aplicaron los tratamientos a las plantas de algodón utilizando un pulverizador de pista a una presión de pulverización de 2 bar. Se calibró el pulverizador antes de la aplicación de los tratamientos. Se logró un volumen de aplicación equivalente a 194 y 204 l/ha (intervalo de 182 - 214 l/ha) para el bioensayo.

Se aplicaron los tratamientos en el orden de control (Tween 20 al 0,1% en agua desionizada), y luego la tasa de tratamiento de cera de carnauba. Se limpió el pulverizador con acetona y agua entre las aplicaciones.

20 3.2. Espacios de prueba

Se expuso *Orius* a residuos de producto frescos en espacios de prueba en puntos de tiempo tras la aplicación de la pulverización. Cada unidad de prueba consistía en un disco foliar de algodón cortado dentro de una placa de Petri de 9 cm. Se colocaron estas hojas encima de una capa delgada de agar. Cada placa de Petri presentaba las paredes internas tratadas con Fluon para impedir que escapase *Orius*, y cada disco foliar presentaba huevos de *Ephestia* disponibles como fuente de alimento y agua.

30 4.0. Procedimientos de bioensayo

4.1. Fase de mortalidad

Se pulverizaron las plantas de algodón tratadas y se dejaron secar en el laboratorio de pulverización antes de la retirada de las hojas para preparar cada espacio de prueba, y la transferencia de *Orius*. Se establecieron espacios de prueba de bioensayo en el día 0 (día de aplicación) y también a los 3, 7 y 14 DAT (días tras el tratamiento).

Utilizando un cepillo fino, se transfirieron cinco ninfas de *O. laevigatus* de 2-4 días de edad sobre cada espacio. Se añadió aproximadamente 1 mg de huevos de *Ephestia* a cada espacio y se repuso esto tras 48 horas. Se expuso *Orius* a los espacios tratados durante 72 horas antes de desecharse.

40 4.2. Observaciones

Para las evaluaciones de la mortalidad, se evaluaron las condiciones de *Orius* bajo un microscopio binocular a las 2, 24, 48 y 72 horas tras la adición de los insectos, para cada configuración de DAT de bioensayo. Se registró que estaban:

<i>Vivos</i>	Todavía se movían
<i>Moribundos</i>	Todavía se sacudían, pero generalmente no podían incorporarse por sí mismos
<i>Muertos</i>	Ya no se movían
<i>Ausentes</i>	No visibles

4.3. Condiciones del entorno

50 Se mantuvo el estudio a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , y una humedad relativa de 60-90%. La iluminación era de 1870 - 2220 lux con un fotoperiodo de 16 horas de luz:8 horas de oscuridad para las fases de mortalidad del bioensayo. Se monitorizaron las condiciones del entorno utilizando equipo electrónico para el entorno IceSpy (Comark). Véanse los apéndices 1 y 2.

55 4.4. Análisis de los resultados

Se sumó el número de cualquier *Orius* ausente y el número de *Orius* muertos en cada tratamiento para derivar la mortalidad global. Se calculó el porcentaje de mortalidad media en los tratamientos individuales, y luego se corrigió para cualquier pérdida en el tratamiento de control utilizando la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

60

5 Resultados

5.1. Fase de mortalidad del bioensayo

5 Los resultados de las evaluaciones de la mortalidad a los 0, 3, 7 y 14 DAT se facilitan en el apéndice 3 y se resumen en las tablas 1 y 2 a continuación.

Tabla 1 efectos de mortalidad de cera de carnauba y deltametrina sobre *orius laevigatus* (0 y 3 dat)

Tratamiento	Mortalidad a los 0 DAT (72 h) (%)	Mortalidad corregida según Abbott (%)	Mortalidad a los 3 DAT (72 h) (%)	Mortalidad corregida según Abbot (%)
Control de Tween 20 al 0,1% en agua desionizada	20,00	-	10,00	-
Cera de carnauba: 0,76 g ha	67,50	59,38	72,50	69,44

10 Tabla 2 efectos de mortalidad de cera de carnauba y deltametrina sobre *orius laevigatus* (7 y 14 dat)

Tratamiento	Mortalidad a los 7 DAT (72 h) (%)	Mortalidad corregida según Abbott (%)	Mortalidad a los 14 DAT (72 h) (%)	Mortalidad corregida según Abbott (%)
Control de Tween 20 al 0,1% en agua desionizada	32,50	-	10,00	-
Cera de carnauba: 0,76 g ha	47,50	22,22	35,00	27,78

15 Cera de carnauba, a la tasa de 0,76 g/ha presentó un efecto estadísticamente significativo ( $P>0,01$ ) sobre la mortalidad de *Orius* en comparación con el control. Los resultados del bioensayo a los 7 DAT mostraron que cera de carnauba, a la tasa de 0,76 g/ha no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo ( $P>0,01$ ) sobre la mortalidad de *Orius* en comparación con el control.

Conclusiones

20 Cera de carnauba, a la tasa de 0,76 g/ha presentó un efecto estadísticamente significativo ( $P>0,01$ ) sobre la mortalidad de *Orius* en comparación con el control.

Cera de carnauba, a la tasa de 0,76 g/ha no presentó ningún efecto estadísticamente significativo ( $P>0,01$ ) sobre la mortalidad de *Orius* en comparación con el control.

25 Apéndice 3: Evaluaciones de mortalidad - Bioensayo a 0 DAT

La tabla a continuación proporciona el número de *Orius* vivos a las 72 h para las evaluaciones a 0 DAT y el número de *Orius* muertos.

Tratamiento	Rep.	Vivos	Moribundos	Muertos	Ausentes	% de M	% de M media	% de mortalidad media corregida según Abbott
Control	1	5	0	0	0	0	20,00	-
	2	4	0	1	0	20		
	3	5	0	0	0	0		
	4	4	0	1	0	20		
	5	3	0	2	0	40		
	6	3	1	1	0	40		
	7	4	0	1	0	20		
	8	4	0	0	1	20		
Cera de carnauba: 0,76 g/ha	1	1	0	4	0	80	70,00	62,50
	2	2	0	3	0	60		
	3	2	0	2	1	60		
	4	3	0	2	0	40		
	5	0	0	5	0	100		
	6	3	0	2	0	40		
	7	0	0	4	1	100		
	8	1	0	2	2	80		

Leyenda: M = Mortalidad

ES 2 548 904 T3

Nota: Se supuso que los *Orius* "ausentes" habían muerto y se incluyeron en los cálculos de mortalidad

Apéndice 4: Evaluaciones de mortalidad - Bioensayo a los 3 DAT.

5 La tabla a continuación proporciona el número de *Orius* vivos a las 72 h para las evaluaciones a los 3 DAT y el número de *Orius* muertos.

Tratamiento	Rep.	Vivos	Moribundos	Muertos	Ausentes	% de M	% de M media	% de mortalidad media corregida según Abbott
Control	1	5	0	0	0	0	10,00	-
	2	5	0	0	0	0		
	3	4	0	0	1	20		
	4	4	0	1	0	20		
	5	4	0	1	0	20		
	6	4	0	1	0	20		
	7	5	0	0	0	0		
	8	5	0	0	0	0		
Cera de carnauba: 0,76 g/ha	1	1	1	3	0	80	72,50	69,44
	2	3	0	1	1	40		
	3	1	1	3	0	80		
	4	0	0	4	1	100		
	5	1	0	4	0	80		
	6	1	0	3	1	80		
	7	2	0	3	0	60		
	8	2	1	2	0	60		
Leyenda:		M = mortalidad						

10 Nota: Se supuso que los *Orius* "ausentes" habían muerto y se incluyeron en los cálculos de mortalidad

Apéndice 5: Evaluaciones de mortalidad - Bioensayo a los 7 DAT

15 La tabla a continuación proporciona el número de *Orius* vivos a las 72 h para las evaluaciones a los 7 DAT y el número de *Orius* muertos.

Tratamiento	Rep.	Vivos	Moribundos	Muertos	Ausentes	% de M	% de M media	% de mortalidad media corregida según Abbott
Control	1	2	0	3	0	60	32,50	-
	2	4	0	0	1	20		
	3	5	0	0	0	0		
	4	2	0	3	0	60		
	5	5	0	0	0	0		
	6	4	0	1	0	20		
	7	3	0	2	0	40		
	8	2	0	3	0	60		
Cera de carnauba: 0,76 g/ha	1	3	0	0	2	40	47,50	22,22
	2	3	0	2	0	40		
	3	2	0	3	0	60		
	4	3	0	2	0	40		
	5	2	0	1	2	60		
	6	3	0	0	2	40		
	7	2	0	0	3	60		
	8	3	0	1	1	40		
Leyenda:		M = Mortalidad						
		Mv = Valor ausente						

Nota: Se supuso que los *Orius* "ausentes" habían muerto y se incluyeron en los cálculos de mortalidad.

20 Apéndice 6: Evaluaciones de la mortalidad - Bioensayo a los 14 DAT

ES 2 548 904 T3

La tabla a continuación proporciona el número de *Orius* vivos a las 72 h para las evaluaciones a los 14 DAT y el número de *Orius* muertos.

Tratamiento	Rep.	Vivos	Moribundos	Muertos	Ausentes	% de M	% de M media	% de mortalidad media corregida según Abbott
Control	1	5	0	0	0	0	10,00	-
	2	5	0	0	0	0		
	3	4	0	1	0	20		
	4	4	0	1	0	20		
	5	4	0	0	1	20		
	6	5	0	0	0	0		
	7	5	0	0	0	0		
	8	4	0	1	0	20		
Cera de carnauba: 0,76 g/ha	1	3	0	1	1	40	35,00	27,78
	2	3	0	2	0	40		
	3	3	0	2	0	40		
	4	1	0	4	0	80		
	5	4	0	1	0	20		
	6	4	0	1	0	20		
	7	4	0	1	0	20		
	8	4	0	1	0	20		
Leyenda:		M = mortalidad						

5

Nota: Se supuso que los *Orius* "ausentes" habían muerto y se incluyeron en los cálculos de mortalidad.

## REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n l3quida para controlar la infestaci3n de artr3podos, que comprende:
  - 5 i) unas part3culas de electreto seleccionadas de entre cera de carnauba, cera de abejas, cera de China, cera de goma laca, cera de espermaceti, cera de candelilla, cera de ricino, cera de uricuri y cera de salvado de arroz y que presentan un di3metro volum3trico medio de 10 a 40  $\mu\text{m}$  y que pueden adherirse a tejido eucariota, suspendi3ndose las part3culas dentro de un l3quido de la formulaci3n l3quida;
  - 10 ii) por lo menos un agente qu3mico, encapsulado dentro de y disperso en la superficie de las part3culas de electreto, que presenta actividad sobre los artr3podos; y
  - iii) un tensioactivo.
- 15 2. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 1, siendo la formulaci3n seleccionada de entre una formulaci3n acuosa y una formulaci3n oleaginosa.
3. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 1 o la reivindicaci3n 2, en la que dicho por lo menos un agente qu3mico activo se selecciona de entre un producto qu3mico artropod3cida y una feromona de artr3podo.
- 20 4. Formulaci3n l3quida seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las part3culas de electreto presentan un di3metro volum3trico medio comprendido entre 10 y 30  $\mu\text{m}$ .
5. Formulaci3n l3quida seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho por lo menos un agente qu3mico es eficaz contra artr3podos que infestan insectos sociales de importancia econ3mica para el hombre, artr3podos que infestan especies destinados a ser utilizados en la fabricaci3n de material para prendas de ropa, artr3podos que infestan plantas de cultivo y ornamentales o artr3podos que infestan animales dom3sticos y de granja.
- 25 6. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 5, en la que dicho por lo menos un agente qu3mico se selecciona de entre piretroides, organofosfatos, carbamatos, espinosanos, inhibidores de GABA, neonicotinoides, antranilamidas, formononetinas, aceites esenciales y reguladores del crecimiento de insectos.
- 30 7. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 6, en la que dicho por lo menos un agente qu3mico es eficaz contra los artr3podos que infestan abejas.
- 35 8. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 6, en la que dicho por lo menos un agente qu3mico es eficaz contra artr3podos que infestan el pav3n de noche.
- 40 9. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 6, en la que dicho por lo menos un agente qu3mico se selecciona de entre  $\alpha$ -cipermetrina,  $\lambda$ -cihalotrina, 3-(2,2-dibromoetenil)-2,2-dimetil-ciclopropano-1-carboxilato de [ciano-(3-fenoxifenil)-metilo] (deltametrina) y T-fluvalinato, clorpirif3s (dietoxi-sulfaniliden-(3,5,6-tricloropiridin-2-il)oxi-1<sup>5</sup>-fosfano), malati3n (2-dimetoxifosfinoti3il-sulfanilbutanodioato de dietilo), cumaf3s (3-cloro-7-dietoxifosfinoti3iloxi-4-metilcumarina) y estirif3s (fosfato de [(E)-2-cloro-1-(2,4,5-triclorofenil)etenil]dimetilo), espinosad, fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-(trifluorometilsulfinil)pirazol-3-carbonitrilo), imidacloprid (N-[1-[(6-cloro-3-piridil)metil]-4,5-dihidroimidazol-2-il]nitramida), 7-hidroxi-3-(4-metoxifenil)cromona, aceite del 3rbol del t3, aceite de tomillo, mentol y metoxifeno3ida (N-terc-butil-N'-(3-metoxi-o-toluoil)-3,5-xilohidrazida).
- 45 10. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 9, en la que dicho por lo menos un agente qu3mico se selecciona de entre aceite de tomillo y deltametrina.
- 50 11. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 5, en la que el producto qu3mico artropod3cida es amitraz (N-(2,4-dimetilfenil)-N-[(2,4-dimetilfenil)iminometil]-N-metilmetanimidamida).
- 55 12. Formulaci3n l3quida seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tejido eucariota se selecciona de entre hojas, tallos, cuerpos fruct3feros y flores, de tejido animal seleccionado de piel, cabello, pelo, cuernos, plumas, uñas, garras y picos, y de tejido de artr3podo seleccionado de la cut3cula de artr3podo incluyendo partes de exoesqueleto seleccionadas de entre la cabeza, el t3rax, el abdomen, las patas, las alas y los pies (tarsos).
- 60 13. Utilizaci3n de part3culas de electreto en la fabricaci3n de una formulaci3n l3quida seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 65 14. Procedimiento para producir part3culas de electreto que pueden utilizarse en una formulaci3n l3quida seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende las etapas siguientes:

- 5
- i) añadir por lo menos un agente químico seleccionado de entre un producto químico artropodocida y una feromona de artrópodo a partículas de electreto;
  - ii) fusionar entre sí las partículas cargadas con un agente químico de i) para formar una matriz sólida;
  - iii) tratar la matriz sólida de ii) para formar partículas de tamaño milimétrico aptas para molienda; y
  - iv) moler las partículas de iii) para formar partículas que presentan un diámetro volumétrico medio comprendido entre 10 y 40  $\mu\text{m}$ .
- 10
15. Procedimiento según la reivindicación 14, que comprende las etapas adicionales de añadir un agente de flujo a las partículas molidas.
- 15
16. Procedimiento para producir partículas de electreto que pueden utilizarse en una formulación líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende las etapas siguientes:
- 20 i) pulverizar independientemente materiales formadores de electreto líquido y por lo menos un agente químico líquido en una cámara de recogida;
  - ii) enfriar la cámara hasta una temperatura a la cual se solidifica o empieza a solidificarse el material de electreto; y
  - iii) formar partículas de material de electreto cargado con agente químico que presentan un diámetro volumétrico medio en el intervalo comprendido entre 10 y 15  $\mu\text{m}$ .

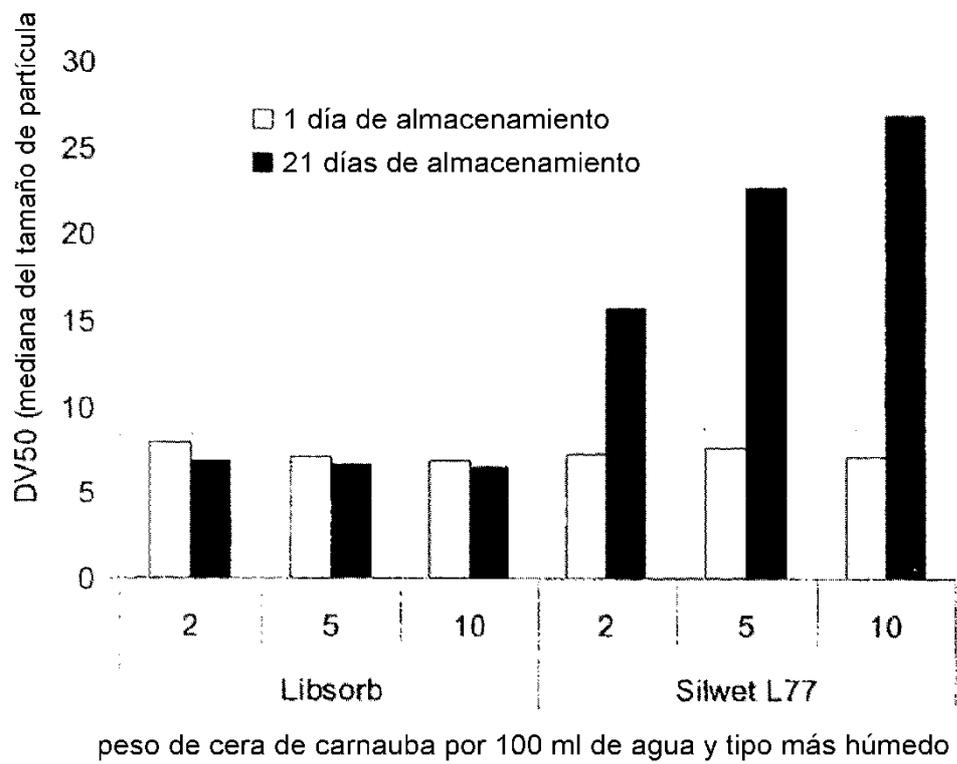


Figura 1

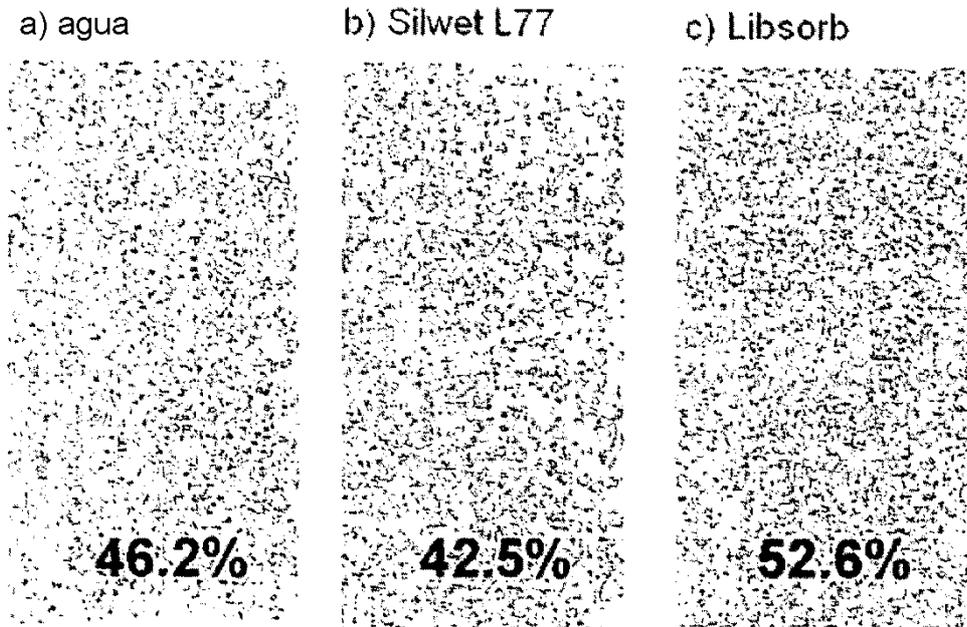


Figura 2

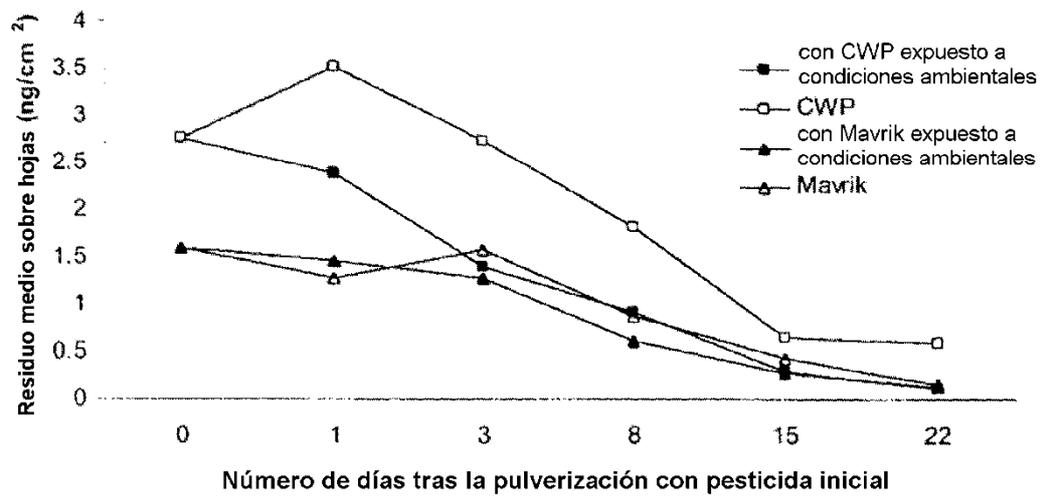


Figura 3

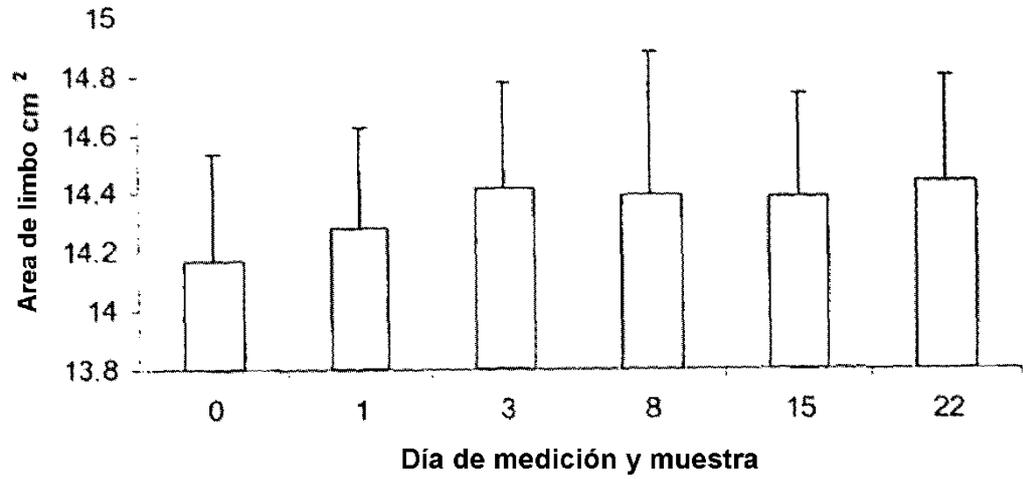


Figura 4

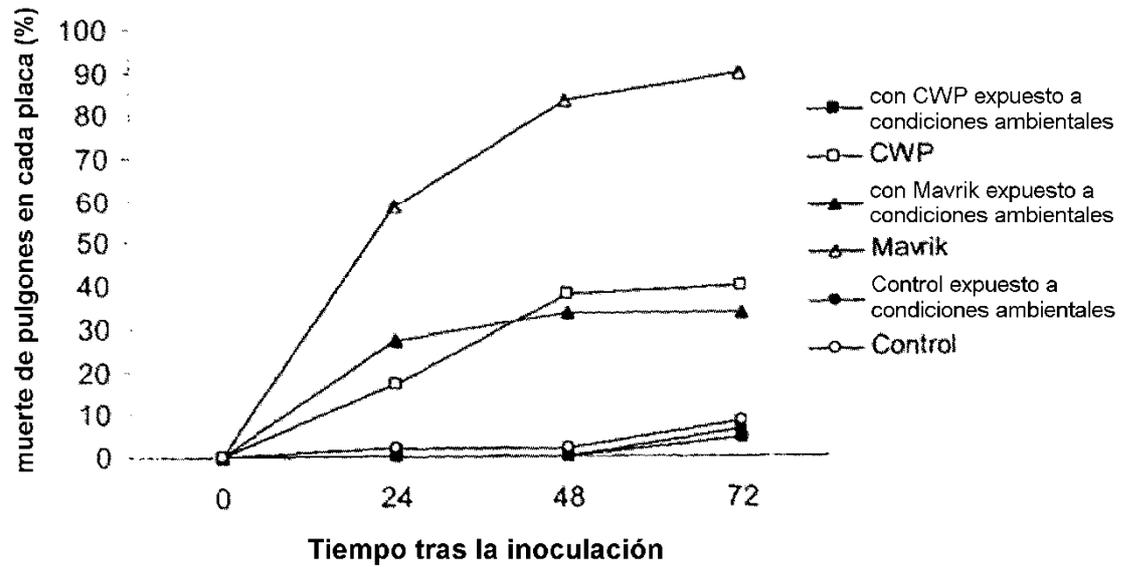


Figura 5

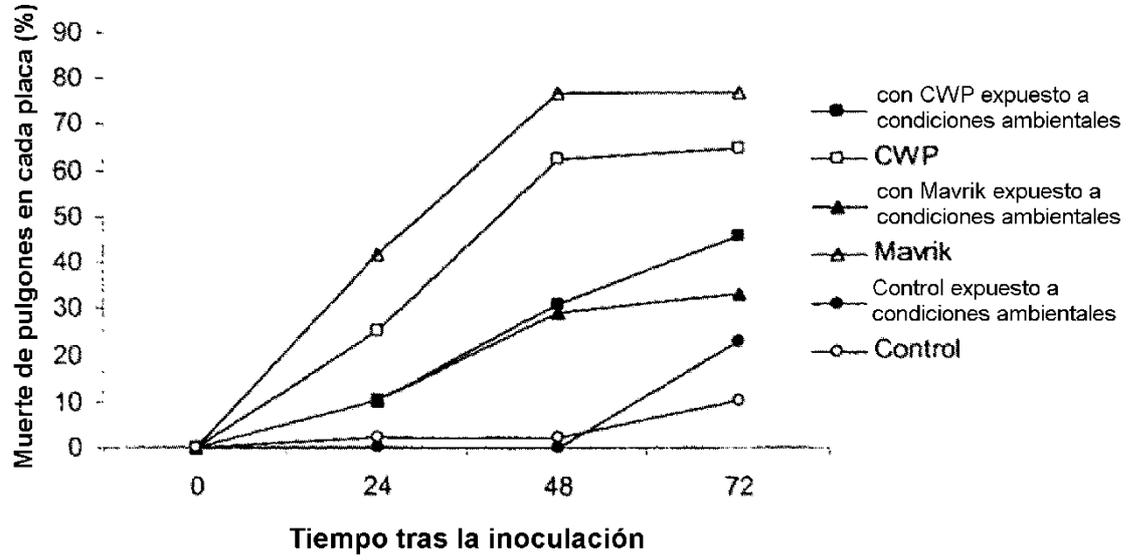


Figura 6

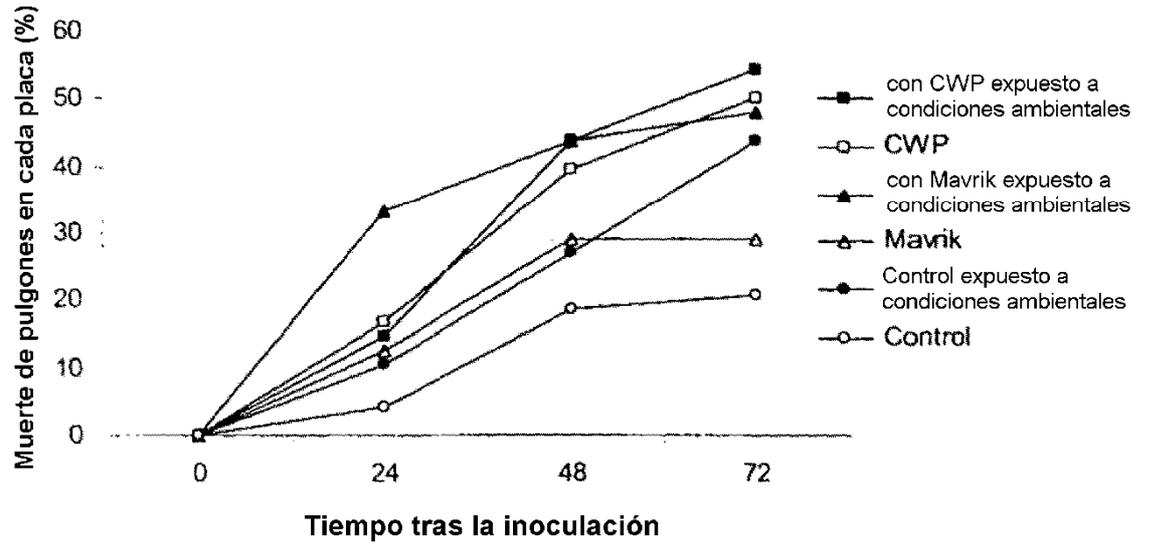


Figura 7

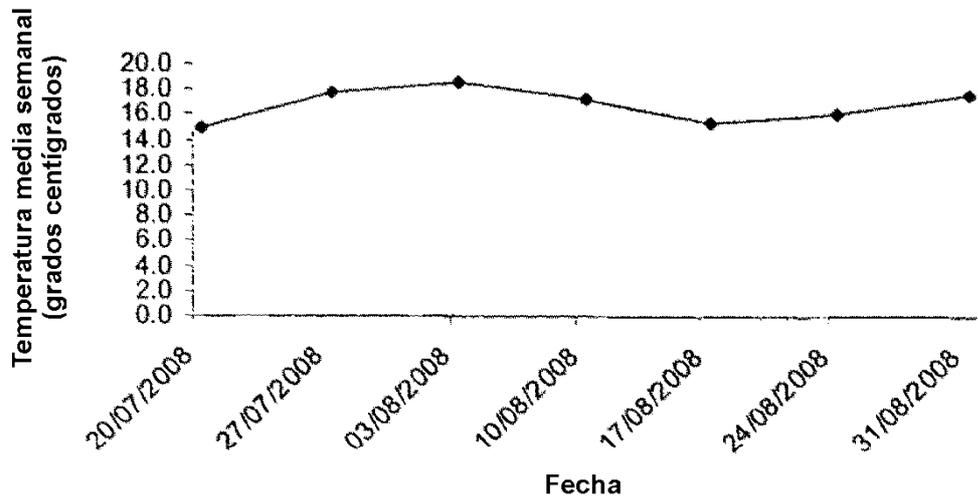


Figura 8

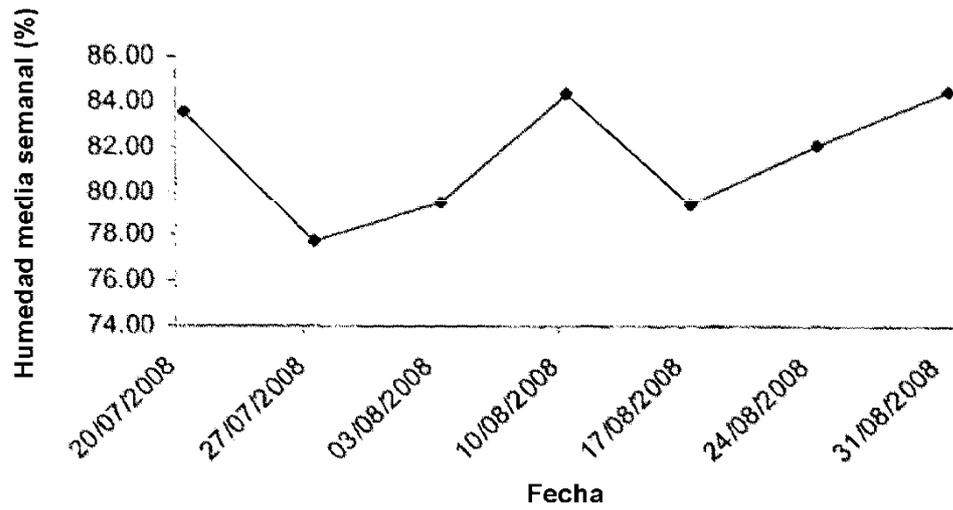


Figura 9