

Promicell: la autoencapsulación como nueva tecnología de formulación de fitosanitarios en base a extractos naturales

En los últimos años, la preocupación y conciencia social en torno a los problemas ambientales ocasionados por el uso indiscriminado de fitosanitarios sintéticos ha aumentado a nivel global. Muchos son ya los países que están legislando para disminuir y prohibir el uso de los más peligrosos (Villaverde y col., 2014), por lo que surge la necesidad de conseguir alternativas que ayuden a combatir de una forma más sostenible las plagas. Así, los extractos naturales de plantas y microorganismos se presentan como una interesante solución para ser utilizada en combinación con compuestos sintéticos en programas de control integrado de plagas.

Departamento de
I+D+i y Departamento
Técnico de Grupo
Agrotecnología

Introducción

Los extractos naturales, a diferencia de los sintéticos, son biodegradables y menos proclives a la generación de resistencias, pudiendo ser además tan efectivos como los fitosanitarios de síntesis (Koul y col., 2008). Sin embargo, los extractos naturales no suelen ser muy estables ni persistentes, ya que son muy vulnerables a distintos factores ambientales, lo que disminuye su efectividad en la práctica. Por ello, es necesario trabajar en formulaciones adaptadas que permitan mantener estos extractos estables durante más tiempo, potenciando con ello su efectividad. De esta necesidad surge Promicell, la nueva tecnología de formulación de extractos naturales que ha hecho posible el desarrollo del bioinsecticida Tec Fort.

Tec Fort: bioinsecticida en base a piretrinas naturales con tecnología de formulación Promicell

Tec Fort es un bioinsecticida de amplio espectro, especialmente eficaz contra insectos plaga de exoesqueleto blando. Tec Fort está formulado a base de una selección de piretrinas naturales. Estas piretrinas provienen del extracto de la flor de *Tanacetum cinerariifolium* sin. *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis., más conocido como pelitre de Dalmacia o piretro. Para la obtención de los compuestos activos, las flores son recolectadas en el momento de su apertura, pudiendo ser secadas y pulverizadas o sometidas a un proceso de extracción con distintos solventes. Los extractos o polvos obtenidos contienen los compuestos activos con capacidad insecticida, siendo los más abundantes las piretrinas I y II, aunque también contienen otras moléculas activas como las jasmolinas I y II o las cinerinas I y II.

Las piretrinas, al proceder de extractos naturales de crisantemo, son muy vulnerables a distintos factores ambientales, sobre todo a la radiación UV. De este modo, aunque estos compuestos activos tienen elevadas capacidades insecticidas, muchos de los productos comerciales en base a piretrinas presentan efectividades bajas en campo, ya que estos compuestos se degradan con facilidad antes de alcanzar sus dianas en los insectos.

En Grupo Agrotecnología, hemos conseguido un insecticida altamente efectivo a base de piretrinas naturales gracias a nuestra tecnología de formulación Promicell. Esta tecnología es capaz de proteger los compuestos activos alargando su tiempo de degradación.

Nuestra tecnología de formulación parte de una selección exhaustiva de piretrinas, optimizándose en el formulado la procedencia y proporciones de los distintos tipos de piretrinas. Las piretrinas son combinadas a su vez con distintos antioxidantes, coadyuvantes y otros co-formulantes totalmente biodegradables, en unas condiciones y proporciones que dan lugar a Tec Fort, un concentrado altamente estable, capaz de mantener la concentración efectiva de piretrinas (2% (p/v)) durante periodos mínimos de dos años.

Si bien, la verdadera novedad de la tecnología de formulación Promicell se hace patente cuando el producto concentrado se disuelve en agua, en la solución de dosificación. En este momento, se produce una reorganización micelar, que consiste en la autoencapsulación de las piretrinas en el interior de unas capsulas de naturaleza lipídica denominadas micelas. Las micelas están diseñadas para formarse cuando el producto concentrado se mezcla con la cantidad de agua necesaria para su correcta dosificación. Estas cápsulas lipídicas protegen a las piretrinas de su rápida degradación por la acción de los distintos factores ambientales.

Modo de acción de Tec Fort

Los distintos compuestos activos presentes en Tec Fort actúan como insecticidas de contacto, penetrando fácilmente por las distintas cavidades naturales del insecto o a través de las zonas no esclerotizadas del mismo. Una vez en el interior, estos compuestos alcanzan rápidamente el sistema nervioso central del insecto donde se unen y activan los canales de sodio de las membranas celulares de los nervios, generando una alteración del impulso nervioso y causando la muerte del insecto por extenuación y/o parálisis (Ray and Fry, 2006). Todo este proceso ocurre con rapidez una vez que las piretrinas son aplicadas sobre

el insecto, pues minutos después de entrar en contacto con los compuestos activos los insectos son incapaces de moverse o volar.

El objetivo principal de este trabajo se centra en el estudio del fenómeno de autoencapsulación de las piretrinas que tiene lugar en el proceso de dosificación de Tec Fort, gracias a la tecnología de formulación Promicell. El estudio de la evolución en el tiempo de las micelas protectoras formadas es otro de los objetivos del presente estudio. Adicionalmente, se comprobó cómo esta tecnología de formulación permite disminuir la cantidad de principio activo dosificada, obteniendo efectividades similares a las obtenidas con una concentración doble de principio activo. De este modo, se optimiza la cantidad de principio activo dosificada en campo, minimizando aún más el impacto ambiental del bioinsecticida.

Materiales y métodos

Autoencapsulación de las piretrinas presentes en Tec Fort en la disolución de dosificación

Con el objetivo de observar y corroborar el proceso de encapsulación que tiene lugar cuando Tec Fort se disuelve en la dilución de aplicación, en un vaso de precipitados de 1 L se añadieron 500 mL de agua y 0,6 mL de Tec Fort y se agitaron por agitación magnética a 25°C, obteniéndose una dispersión homogénea. Inmediatamente, tras la formación de la dispersión se paró la agitación y se extrajo la primera muestra para su observación.

La observación de la encapsulación se realizó de manera directa sin necesidad de marcar el compuesto con fluoróforos, pues las piretrinas tienen la capacidad natural de auto-fluorescer. Para la observación se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Axioplan, ZEISS). La muestra fue observada inmediatamente tras su recogida. Para ello se colocó una gota de muestra en un portaobjetos (20 x 80 x 1 mm) y se cubrió con un cubreobjetos de (20 x 40 x 0,25 mm). Para las observaciones se trabajó principalmente con los objetivos de x20 y x40 aumentos. Se tomaron fotografías y vídeos del fenómeno observado.

Para el estudio de la evolución en el tiempo de las micelas formadas, se tomaron muestras de la dispersión homogénea cada 30 minutos durante 2 horas, y también a las 3, 24 y 72 horas, y se observaron de la misma forma descrita anteriormente.

Comparación y evaluación de la eficacia insecticida de Tec Fort formulado al 2% con tecnología Promicell y un producto de otro fabricante en base a piretrinas al 4%

Con el objetivo de evaluar la eficacia del bioinsecticida Tec Fort formulado con la tecnología Promicell al 2% de piretrinas, y compararlo con un producto comercial de otro fabricante formulado al 4% de piretrinas, se desarrolló un ensayo en un cultivo de pimiento (*Capsicum annuum*) en invernadero. El ensayo se llevó a cabo durante el mes de mayo de 2019 en una parcela de 50 m² situada en la localidad de Pilar de la Horadada (Alicante).

Se realizó una sola aplicación de los productos tras la aparición de un foco de infección por pulgón (*Aphis* spp.) en

TESIS	PRODUCTO	MATERIA ACTIVA	DOSIS
Tesis 1	Tec-Fort	Piretrinas naturales 2%	1 cc/L
Tesis 2	Tec-Fort	Piretrinas naturales 2%	1.2 cc/L
Tesis 3	Piretro Competidor	Piretrinas naturales 4%	1 cc/L
Tesis 4	Piretro Competidor	Piretrinas naturales 4%	1.2 cc/L

Tabla 1. Tesis del ensayo.

el invernadero. Se testaron dos dosificaciones distintas por producto (Tabla 1).

En cada una de las tesis se marcaron hojas con un nivel similar de infestación visual. Se realizaron evaluaciones antes de la aplicación de los productos y 3 días después de la misma, contabilizándose el número de pulgones ápteros por hoja infestada.

Resultados

Autoencapsulación de las piretrinas presentes en Tec Fort en la disolución de dosificación y evolución de las micelas formadas

Las imágenes tomadas con el microscopio de epifluorescencia corroboraron la encapsulación de las piretrinas en la disolución de dosificación. Se comprobó que las cápsulas que contenían piretrinas se correspondían con micelas y no con liposomas, pues las cápsulas tenían una pared única (Figura 1).

Las micelas formadas tenían tamaños de entre 5 y 16 µm. Se comprobó que las micelas eran totalmente estables hasta pasadas dos horas de la obtención de la solución de piretrinas en agua. Si bien, a las tres horas se empezó a observar que las micelas aumentaban de tamaño y las piretrinas se concentraban en la periferia de éstas (Figura 2 A-B). Además, algunas de las micelas se rompían y vaciaban totalmente su contenido. La desestabilización y degradación de las micelas fue ocurriendo paulatinamente, hasta observarse micelas mayoritariamente vacías transcurridas 24 horas (Figura 2 C-D). También se observaron a este tiempo agregados que se correspondían con productos de degradación de piretrinas. Las fotografías tomadas 48 y 72 horas después de la obtención de la dispersión homogénea de piretrinas en agua no se muestran en este trabajo, puesto que a estos tiempos ya no había rastro de piretrinas o micelas.

Comparación y evaluación de la eficacia insecticida de Tec Fort formulado al 2% de piretrinas con tecnología Promicell y un producto de otro fabricante en base a piretrinas al 4%

Los resultados del ensayo de campo en el que se comparó la eficacia insecticida de Tec Fort con la de un producto de otro fabricante con un contenido en piretrinas doble que el de Tec Fort, puso de manifiesto que, a las dos dosificaciones testadas los resultados de control de pulgones ápteros resultaron similares con ambos productos, no encontrándose diferencias significativas (Figura 3). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las dos concentraciones testadas de cada producto.

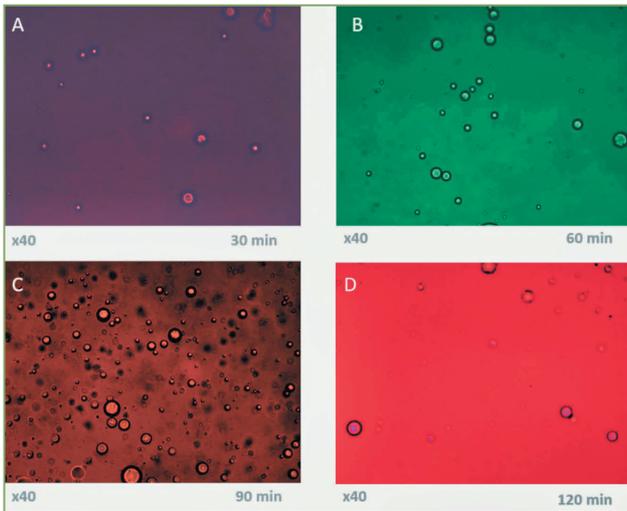


Figura 1. Fotografías tomadas con microscopio de epifluorescencia que muestran la autoencapsulación de las piretrinas presentes en Tec Fort cuando el producto se disuelve en la solución de dosificación. Las fotografías A, B, C y D fueron tomadas a los 30, 60, 90 y 120 minutos de la obtención de la dispersión homogénea de piretrinas en agua respectivamente.

Discusión y conclusiones

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto cómo, gracias a la tecnología de formulación Promicell, cuando Tec Fort se mezcla con la cantidad de agua necesaria para su correcta dosificación, se produce un fenómeno de autoencapsulación de las piretrinas en el interior de micelas lipídicas de tamaños que varían entre los 5 y 16 μm . También se demostró que las micelas formadas son totalmente estables durante un mínimo de dos horas, empezando a romperse sólo después de tres horas de su formación. Estas tres horas de protección máxima del compuesto activo proporcionan el tiempo suficiente a las piretrinas para ejercer su acción insecticida. No obstante, transcurrido este tiempo, las micelas se rompen y vacían paulatinamente, dejando parte de las piretrinas desprotegidas. Después de 24 horas prácticamente todas las micelas se observaron vacías y las piretrinas degradadas.

De este modo, la tecnología de formulación Promicell consigue mantener la acción de las piretrinas durante tiempos más prolongados, protegiéndolas de su degradación en los momentos cruciales de acción.

Las micelas protegen a las piretrinas de su degradación por la acción de los rayos UV, pues son capaces de refractarlos y evitar su impacto directo. Así, el producto puede usarse bajo cualquier condición de luminosidad y climática.

Adicionalmente, el ensayo de campo puso de manifiesto cómo, con una cantidad menor de principio activo, pueden conseguirse resultados en campo similares a los obtenidos con el doble de principio activo. Esto se alcanza gracias a la acción protectora de las micelas, puesto que mantienen efectivo el principio activo durante más tiempo.

Además, la tecnología Promicell también consigue que Tec Fort tenga una mayor capacidad mojante, alcanzando una mayor superficie cubierta por volumen de aplicación, lo cual también contribuye a los resultados obtenidos en el ensayo de campo, permitiendo optimizar dosificaciones.

Tec Fort no presenta problemas de fitotoxicidad, pues la tecnología Promicell ayuda a que se produzca homoge-

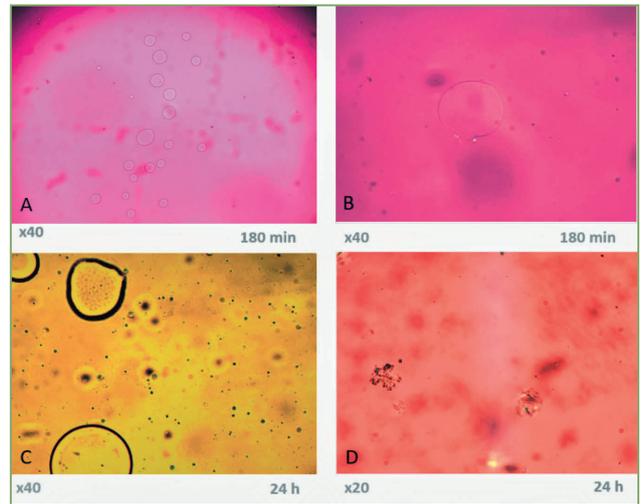


Figura 2. Fotografías tomadas con microscopio de epifluorescencia que muestran la evolución y degradación de las micelas formadas tras la disolución de Tec Fort en la solución de dosificación. Las fotografías A y B fueron tomadas a los 180 minutos de la obtención de la dispersión homogénea de piretrinas en agua, mientras que C y D fueron tomadas a las 24 horas.

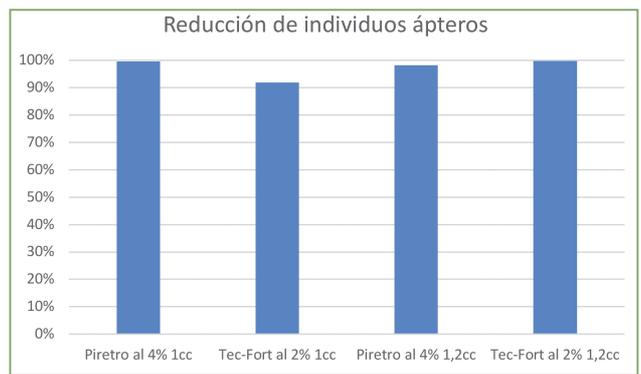


Figura 3. Porcentaje de control de pulgones ápteros tres días después de la aplicación de los productos Tec Fort y un producto de otro fabricante con un contenido en piretrinas del 4% a dos dosificaciones distintas.

neidad en la dosis. Tec Fort es también biocompatible con el insecto, de modo que no existen problemas de entrada de las piretrinas en el insecto cuando están encapsuladas, pues la naturaleza lipídica de las micelas les hace perfectamente compatibles con las membranas del insecto, favoreciendo su entrada.

Por último, la tecnología Promicell es totalmente compatible con la biodegradabilidad natural de las piretrinas, pues nuestros estudios demostraron que no había rastro de ellas tras 24 horas de la aplicación.

Bibliografía

- ! Koul O, Walia S, Dhaliwal GS (2008) Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopesticides International*, 4: 63-84.
- Villaverde JJ, Sevilla-Moran B, Sandín-España P, López-Goti C, Alonso-Prados JL (2014) Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Management Science*, 70:2-5.
- Ray DE, Fry JR (2006) A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology and Therapeutics*, 111: 174-193.