

PRESENTACIÓN PRODUCTO

# ARAW: Uva sin botritis y sin residuos

M. Ruiz García, D. Mulas García, J. Prades i Latorre y J. Ochoa de Eribe (Sipcam Iberia, S.L).  
 P. Querzola (Sipcam Italia S.p.A).  
 John Edmonds (R&D- Eden Research PLC).

Se describen las características del fungicida ARAW, está compuesto de tres terpenos: eugenol, geraniol y timol, formulado mediante una innovadora tecnología de patentada. Eugenol, timol y geraniol pertenecen a la familia de los terpenos con actividad fitosanitaria. Muchos de ellos producidos por las plantas, son los principales constituyentes de los aceites esenciales y poseen extraordinarias propiedades. Las propiedades antimicrobianas de los diferentes terpenos están bien establecidas y su perfil toxicológico está ampliamente documentado lo que hace que ARAW proporcione al agricultor/viticultor una herramienta alternativa, viable y efectiva, contra la botritis, respecto a fungicidas antibotrícticos existentes en el mercado. ARAW está formulado con una innovadora tecnología que promueve la actividad de eugenol, timol y geraniol sobre las enfermedades salvando las limitaciones naturales de éstos. El grupo químico al que pertenece presenta bajo riesgo de resistencias. Esta tecnología es un “sistema de administración” de las sustancias activas que ha sido científicamente desarrollado para capturar los terpenos impidiendo su rápida liberación y volatilización. A través de esta tecnología los terpenos se liberan de manera gradual obteniendo una persistencia mucho más elevada. Durante los años de experimentación y desarrollo de ARAW, llevada a cabo en el sur de Europa, ha demostrado buena eficacia para el control de botritis tanto en uva de mesa como en vid de vinificación. En los ensayos llevados a cabo se demuestra también una alta selectividad al cultivo (ensayos en 18 variedades diferentes sin problemas de fitotoxicidad). La aplicación del formulado en las condiciones de autorización solicitadas no afecta a la maduración, la calidad de la cosecha y no produce sabores ni olores indeseados sobre el vino ni la uva de mesa. Además hay que destacar la versatilidad del momento de aplicación de ARAW: se puede aplicar muy cerca de cosecha (Plazo de seguridad de 3 días). Eugenol, timol y geraniol son sustancias incluidas el anexo IV del REG 396/2005. “No requieren fijación de LMR”.

PALABRAS CLAVE: Eugenol, Geraniol, Timol, Terpenos, ARAW, botritis, sustancias exentas de LMR, innovadora tecnología de formulación.

## INTRODUCCIÓN

Eugenol, timol y geraniol se incluyen en diciembre de 2013 a nivel europeo (Reg. UE 1107/2009). ARAW se registró a nivel zonal en el sur de Europa para el control de botritis en viña el 18 de mayo de 2015. Eugenol se incluyó en el Anexo IV del REG. 396/2005 el 31 de agosto de 2008 mientras Timol y Geraniol lo hicieron el 11 de junio de 2015 (el anexo IV de este REG. Incluye las sustancias activas para las cuales no se requiere fijación de LMR). Sipcam Iberia lanzará en el mercado este nuevo antibotríctico en 2016.

## Características físico-químicas

Composición:	Eugenol 3.3% p/v + Geraniol 6.6% p/v+ Timol 6.6% p/v
Tipo de Formulación:	Suspensión de cápsulas (SC)
Olor:	Olor a aceite de clavo
Aspecto Físico	Color marrón muy claro, líquido viscoso
Densidad	1033 kg/cm3 (20° C)
pH	5.7 (producto concentrado)
	No explosivo, No inflamable

Tabla 1. Características físico-químicas ARAW.

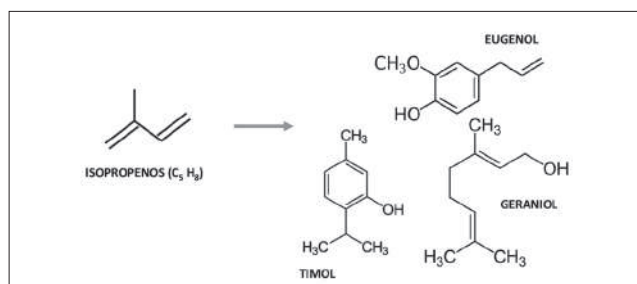


Figura 1. Estructura química Eugenol, Geranol y Timol.

# La vid y el vino

## La calidad del vino a través de la Gestión Integrada del viñedo

Los datos disponibles son los de las tres sustancias activas de las que está compuesto ARAW (Tabla 2).

Características toxicológicas de Eugenol	
Toxicidad oral aguda en Rata	DL50: 1930 mg/Kg
Inhalación aguda en Rata	DL50: >2.58 mg/l/4 h
Características toxicológicas de Geraniol	
Toxicidad oral aguda en Rata	DL50: 980 mg/Kg
Toxicidad dermal aguda en Rata	DL50: >2000 mg/Kg
Características toxicológicas de Timol	
Toxicidad oral aguda en Rata	DL50: 980 mg/Kg
Toxicidad dermal aguda en Rata	DL50: >2000 mg/Kg
ARAW: Peligrosidad para el hombre Irritante	

Tabla 2. Características Toxicológicas.

Características ecotoxicológicas de Timol	
<i>Pimephales promelas</i>	CL50 (96 h): 3,2 mg/l
<i>Dafnia magna</i>	CE50 (48 h): 1,7 mg/l
Algas verdes	CI50 (72 h): 2,33 mg/l
Tóxico para el medio acuático	
Características ecotoxicológicas de Geraniol	
<i>Brachydaniorerio</i>	CL50 (96 h): 9,8-19,9 mg/l

Tabla 3. Características Ecotoxicológicas.

Todas las sustancias activas que componen el formulado son biodegradables, y NO cumplen con los criterios de clasificación como muy persistentes (PBT) o muy bioacumulables (vPvB), pero a largo plazo puede causar efectos sobre el medio acuático, por ello y por razones de seguridad se clasifica como nocivo para los organismos acuáticos.

### Características biológicas. Modo de acción

ARAW es un fungicida de contacto, con actividad preventiva y curativa, formulado a base de eugenol, geraniol y timol, para el control de botritis (*Botryotinia fuckeliana* (De Bary) WHETZEL) en vid de vinificación y uva de mesa. Eugenol, geraniol y timol poseen actividad fungicida y un modo de acción similar al de los benzyl alcoholes, fenol y polifenoles. Poseen efectos sobre la germinación de las esporas, la penetración del hongo a través de los haustorios, crecimiento del micelio y el crecimiento de las hifas. Los compuestos terpénicos poseen diferentes efectos sobre las paredes y membranas celulares así como sobre paredes de los orgánulos celulares. El primer modo de acción es la destrucción de las células de las membranas que asociado a la capacidad de estos compuestos para disolver los lípidos produce la salida de las sustancias celulares provocando la muerte celular debido a la pérdida de la integridad celular. Los terpenos también causan cambios en las paredes de las hifas, algunos efectos sobre la actividad enzimática (interferencias sobre enzimas que intervienen en los procesos de la respiración) y responsables de la síntesis de las células de las paredes celulares.

Así pues la acción preventiva de ARAW se basa en el bloqueo del desarrollo

del micelio a partir de las esporas, mientras que su acción curativa se basa en la destrucción del micelio ya desarrollado.

En el momento de la publicación de este artículo se ha solicitado la inclusión por el Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) en su clasificación de eugenol, timol y geraniol, que sería la que se muestra en la Tabla 4.

Sustancia activa	MOA Propuesto	Nombre Grupo	Grupo Químico	Código FRAC*
Eugenol, Timol, Geraniol	F7: Disrupción de las membranas celulares	Extractos de Plantas	Terpenos hidrocarburos y Alcoholes terpénicos	FRAC 46

Tabla 4. Clasificación del Modo de Acción propuesto de Eugenol, Timol y Geraniol.

Este comité clasifica este grupo, en el que se incluirían, como de bajo riesgo en relación a la generación de resistencias, con lo cual el uso de ARAW es indispensable para evitar o minimizar la aparición de resistencias a otros grupos químicos que tienen medio-alto riesgo respetando para ello las condiciones y modo de empleo que se recogen en las etiquetas de los formulados. Los resultados de los estudios llevados a cabo en laboratorio para determinar la sensibilidad de *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) WHETZEL al formulado con muestras de poblaciones procedentes de diferentes países (Italia, España, Francia y Alemania) no mostraron diferencias significativas entre las muestras de los distintos países en términos de sensibilidad ni con las poblaciones de referencia aisladas en laboratorio. La mayoría de las poblaciones tuvieron una CE50 en la horquilla de 35-70 ug/ml independientemente del país de origen de la muestra.

### Innovadora tecnología de formulación

Los terpenos poseen un potencial muy interesante como productos para la protección de las plantas frente a enfermedades y algunas plagas, pero sus características químicas limitan su viabilidad para este uso.

Estas son las principales características que limitan su aplicación directa a los cultivos para protegerlos frente a plagas y enfermedades (Cuadro 1).

<b>1. Volatilidad</b> Terpenos tienden a dispersarse rápidamente en el aire.	<b>2. Baja solubilidad</b> Terpenos no poseen una alta hidrofiliía.	<b>3. Fitotoxicidad</b> Las aplicaciones con terpenos a altas concentraciones pueden causar fitotoxicidades.
Persistencia limitada a la hora de proteger al cultivo.	Dificultades a la hora de elegir el modo de aplicación del producto.	Falta de selectividad si se aplica directamente.

Cuadro 1.

ARAW está formulado con una innovadora tecnología de encapsulación patentada que promueve la actividad fitosanitaria de los terpenos salvando sus limitaciones naturales.

Esta tecnología de encapsulación es un "sistema de administración" de las sustancias activas que ha sido científicamente desarrollado para capturar los terpenos impidiendo su rápida liberación y volatilización. A través de esta tecnología los terpenos se liberan de manera gradual obteniendo una persistencia mucho más elevada.

## Proceso de extracción del contenido de las células-microesferas

La primera fase para la obtención de ARAW, previa a encapsulación de los terpenos de los que está compuesto, es un proceso enzimático mediante el cual se vacían células de su contenido obteniendo microesferas vacías, que contienen únicamente estructuras naturales (que constituyen la pared celular como vemos en la Figura 2. Estas microesferas son capaces de cargar hasta un máximo del doble de su peso, además son capaces de absorber más cantidad de carga cuánto más lipófilas son las sustancias de las que se cargan.

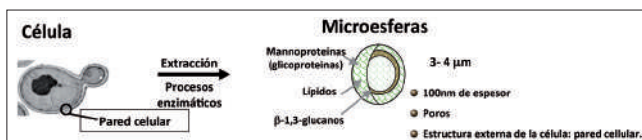


Figura 2. Proceso de extracción del contenido de las células para obtener Microesferas vacías capaces de absorber en un proceso posterior sustancias lipófilas.

## Proceso de encapsulación-Formulación ARAW

El siguiente paso constituye la formulación en sí del ARAW, a través de un proceso que consiste en cargar los terpenos en la microesfera, encapsulación. Primero, las microesferas se someten a una dispersión en una solución acuosa de forma que tenemos una solución homogénea. Luego los terpenos se añaden a esta solución que se somete a un proceso de difusión pasiva (que solo es favorecida por las condiciones de proceso; temperatura, agitación y tiempo). De este modo obtenemos las microesferas cargadas con eugenol, timol y geraniol en una emulsión acuosa, lo que constituye ARAW. En el formulado las "microesferas cargadas con los terpenos" en la solución acuosa se encuentran en un equilibrio energéticamente estable que mantiene el terpeno dentro de la microesfera. Solo el 5% de los terpenos libres en la solución acuosa no son absorbidos, encapsulados, por las microesferas tras el proceso de difusión pasiva (Figura 3).



Figura 3. Formulación-Encapsulación de ARAW y Liberación tras la hidratación de Timol, eugenol y geraniol.

Si observamos tomamos microfotografías tomadas con microscopio de contraste de fases de la emulsión acuosa homogenizada con las microesferas vacías antes y después de la encapsulación podemos ver lo siguiente:

- **Microesferas vacías en una emulsión acuosa:** se observan estructuras intracelulares con la microscopía de contraste de fases sin tinción y si aplicamos una tinción con rojo nilo, como éste tiñe las sustancias lipófilas de fluorescente, observamos algunos lípidos residuales.

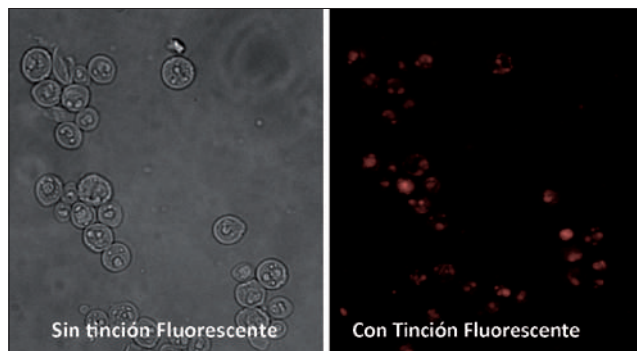
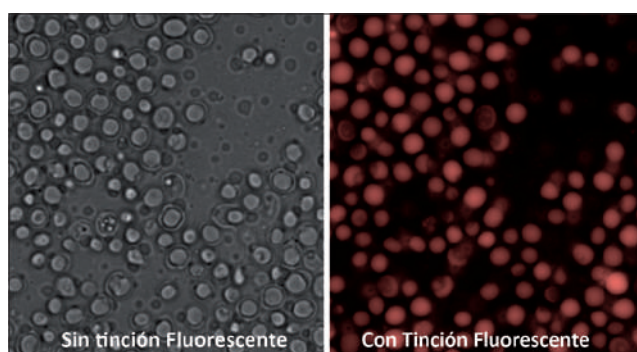


Foto 1 y 2. Microesferas vacías observadas con Microscopía de Contraste de fases.



Fotos 3 y 4. Microesferas cargadas con terpenos dentro del formulado ARAW, observadas con Microscopía de Contraste de fases.

- **ARAW, Microesferas cargadas con eugenol, timol y geraniol en solución acuosa:** observamos grandes gotitas de terpenos dentro de las microesferas vistas con microscopía de contraste que cuando aplicamos la tinción con rojo nilo se observan perfectamente teñidas de fluorescente.

El tamaño de las microesferas cargadas con los 3 terpenos es de 3-4  $\mu\text{m}$  lo que corresponde a 1/3 -1/4 del tamaño de los conidios y conidióforos de *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) WHETZEL, cuyo tamaño oscila entre 8-12  $\mu\text{m}$ .

## Ciclos de hidratación y Liberación de las sustancias activas

El formulado al disolverse en el agua del tanque y en el momento que se realiza la aplicación sufre un cambio drástico de equilibrio debido al cual se activa la liberación a través de la pared de la microesfera, a una velocidad controlada, de los terpenos de los que está compuesto ARAW, eugenol, timol y geraniol. Tras esta hidratación, a medida que las microesferas se secan, forman un cristal y cierran sus poros de manera que dejan de liberar el resto de los terpenos de los que están cargadas. Del mismo modo cuando se produce otro ciclo de hidratación la microesfera se comporta como una esponja, abriendo sus poros perdiendo rigidez y liberando de nuevo de manera adecuada las sustancias lipófilas que tiene en su interior. Este ciclo se repite con las re-hidrataciones hasta que la microesfera libera toda su carga de eugenol, timol y geraniol. La pared de las microesferas posee un espesor lipídico que debe ser específico y concreto para que la liberación de los terpenos sea adecuada y controlada (ni demasiado rápida ni demasiado lenta).



# La vid y el vino

## La calidad del vino a través de la Gestión Integrada del viñedo

Con humedad en el ambiente se libera mayor o menor contenido de la cápsula lo que también está directamente relacionado con las condiciones que favorecen la aparición de algunas enfermedades sobre las que actúa ARAW.

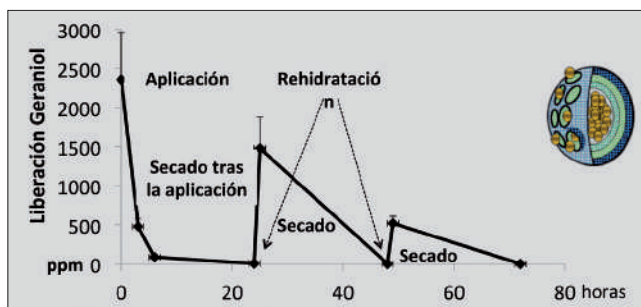


Gráfico 1. Ensayo de liberación continua de Geraniol a través de ciclos de hidratación en laboratorio. ARAW, Ciclos de hidratación y liberación.

### Futuro registro ARAW. Condiciones de solicitud de autorización

A continuación se detallan las condiciones de solicitud del registro de ARAW en España, indicando el cultivo, la enfermedad objetivo, las dosis de uso, el número de aplicaciones solicitadas, el intervalo entre las mismas y el plazo de seguridad. Aplicaciones desde inicio de floración (BBCH 60) hasta cosecha (BBCH 89). ARAW se puede aplicar en mezcla con otros formulados que se utilicen en el momento recomendado para la aplicación de ARAW observando el plazo de seguridad de los mismos, si la aplicación se hace cerca de cosecha, ya que el plazo de seguridad de ARAW es sólo de 3 días. No obstante, se recomienda siempre consultar con el Servicio Técnico de Sipcam Iberia las mezclas a realizar (Tabla 5).

Cultivo	Enfermedad	Dosis	Nº aplic.	Interv. (Días)	Plazo de Seguridad (Días)
Vid Parrales de Vid	Botritis ( <i>Botryotinia fuckeliana</i> )	0,2%-1% (4 l /ha)	4	7	3

Tabla 5. Condiciones de Solicitud de autorización de ARAW.

### Experimentación y desarrollo en campo

Un total de 26 ensayos de eficacia se han llevado a cabo entre 2004 y 2006 (3 campañas) en Grecia, Italia, España, Portugal y el Sur de Francia en hasta 18 variedades de uva diferentes en total (tanto de uva de mesa como en vid de vinificación). Durante estos años de experimentación y desarrollo ARAW ha demostrado una óptima actividad preventiva y curativa para el control del botritis en uva de mesa y vid de vinificación (Gráficos 2 y 3).

### Estudios sobre la influencia en la vinificación

Los numerosos los análisis químicos y sensoriales ("catas") realizados sobre los vinos elaborados con uvas tratadas con ARAW no habían diferencias con vinos procedentes de uvas tratadas con un estándar o sin ninguna aplicación para el control de esta enfermedad.

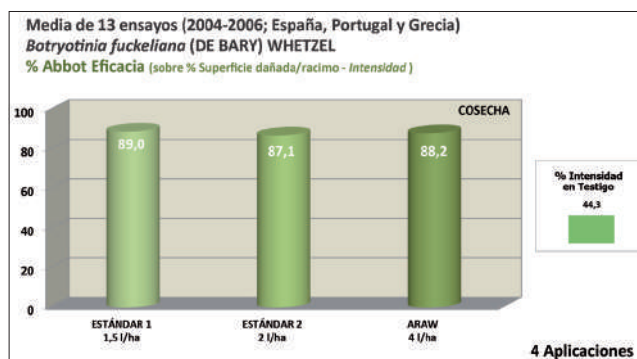


Gráfico 2.

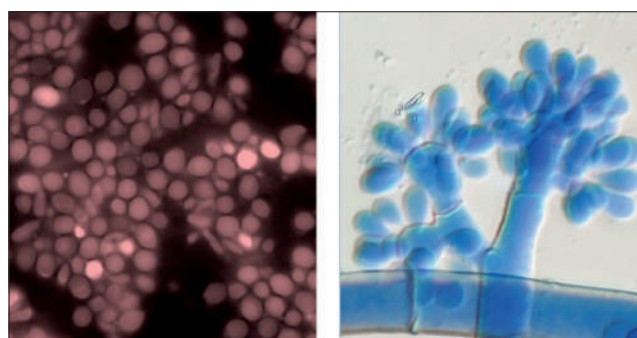


Foto 5. ARAW- Microesferas cargadas (3-4 µm).

Foto 6. *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) WHETZEL conidióforos y conidios (8-12µm).



Fotos 7 y 8. Uva sana sin botritis en var. Albariño en parcelas tratadas en una estrategia: FRUPICA (Mepanipirim 50% p/p WP) // ARAW // ARAW // ARAW.



Foto 9. Uva sana sin botritis en Var. merlot en parcelas tratadas ARAW.

Foto 10. Daños de botritis en Var. Merlot en testigo.

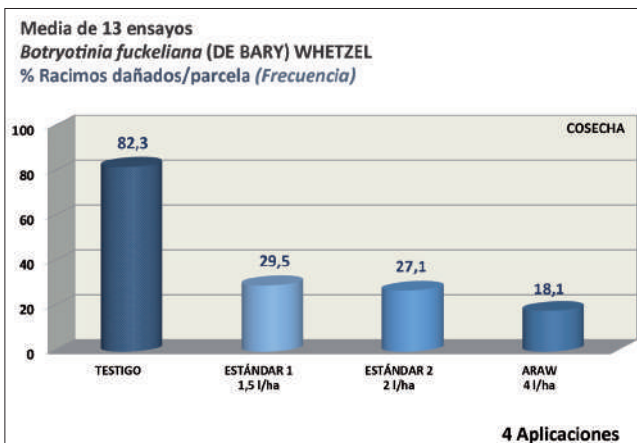


Gráfico 3.

En este artículo presentamos los resultados del estudio realizado este otoño 2015 por la **Universidad de la Rioja**: "Influencia sobre la Vinificación de uvas blancas procedentes de muestras de parcelas tratadas con ARAW y sin tratar para determinar posibles diferencias cualitativas". En este estudio los parámetros, a la entrada de la uva en la bodega experimental de la Universidad, fueron los normales en las vendimias de viura en la DO Rioja, las uvas tenían un buen aspecto y que el test de la lacasa para detectar posibles podredumbres fue negativo en ambos casos. Los datos muestran que el proceso fermentativo se realizó sin ningún tipo de problema ni irregularidad para ambas tesis. El arranque de la fermentación y cinética no se vio alterado en ninguno de los casos y se consideran totalmente normales como podemos ver en la Gráfico 4.

Los resultados del estudio también indicaron que la fermentación se completó en ambos casos y todos los azúcares se transformaron en alcohol. En la sesión de cata triangular llevada a cabo por un panel dos meses después del embotellado del vino, tanto la muestra del vino elaborado con uvas tratadas con ARAW como el control mostraron buenas cualidades organolépticas (aromas, gusto y color) sin diferencias significativas entre ellas.

Además estudios sensoriales ("catas") en vinos elaborados con uvas tratadas con ARAW se han realizado ensayos en diferentes variedades de uva de mesa en el sur de Europa (variedades con y sin semillas) con el objetivo de comparar sensorialmente las características organolépticas de uvas tratadas con ARAW (3 y 7 días antes de la cosecha), frente a un testigo o muestra de fruta sin tratar y fruta tratada con estándares antibotritis disponibles en el mercado respetando sus plazos de seguridad. Los resultados obtenidos en todos los "taint test" (análisis sensoriales, visuales y gustativos) en todas las variedades de uva de mesa concluyeron que no afecta a la calidad organoléptica de los frutos incluso realizando las aplicaciones 3 días antes de cosecha.

## Resumen

- Nuevo formulado a base de nuevas sustancias activas existentes también en la naturaleza y que tienen uso doméstico.
- Grupo químico con bajo riesgo de resistencias frente a un patógeno de alto riesgo.
- Su uso evita la aparición de resistencias.
- Innovadora formulación patentada que permite liberar las sustancias activas de manera controlada.

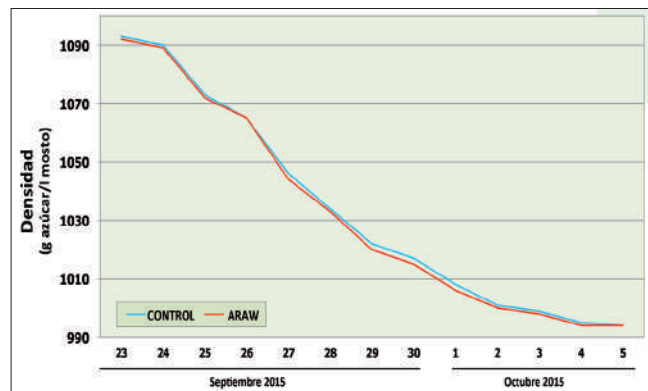


Gráfico 4. Cinética de fermentación del mosto de uvas var. viura tratadas con ARAW (3 aplicaciones a 4 l/ha, la última 3 días antes de cosecha) vs. uvas sin tratar.

- Alta protección de cultivo, persistencia y versatilidad en cuanto a los métodos de aplicación.
- Alta selectividad al cultivo (ensayos en 18 variedades diferentes sin problemas de fitotoxicidad)
- Buena miscibilidad con los productos usados en los momentos de las aplicaciones antibotritis.
- Control de la botritis preventivo y curativo inicial.
- Buen perfil toxi-ecotoxicológico.
- La aplicación del formulado en las condiciones de autorización solicitadas no afecta a la maduración, la calidad de la cosecha y no produce sabores ni olores indeseados sobre el vino ni la uva de mesa.
- Versatilidad del momento de aplicación: se puede aplicar muy cerca de cosecha (Plazo de seguridad de 3 días)
- Todas las sustancias activas de las que está compuesto ARAW están incluidas en el anexo IV del REG 396/2005. "NO REQUIEREN fijación de LMR".