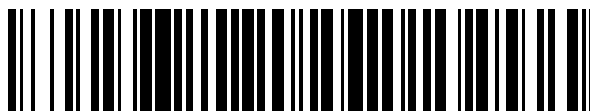


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 318 139**

51 Int. Cl.:

A01N 25/00 (2006.01)

A01N 25/28 (2006.01)

A01N 53/08 (2006.01)

A01N 43/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **03730310 .4**

96 Fecha de presentación: **29.04.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1499183**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

54 Título: **Composiciones y métodos para evitar o reducir la resistencia de insectos a insecticidas**

30 Prioridad:

29.04.2002 GB 0209749

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea:

01.05.2009

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI:

10.12.2012

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada:

10.12.2012

73 Titular/es:

**ROTHAMSTED RESEARCH LIMITED (50.0%)
Harpden
Hertfordshire AL5 2JQ , GB y
DEPARTMENT OF PRIMARY INDUSTRIES FOR
AND ON BEHALF OF THE STATE OF NEW
SOUTH WALES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MOORES, GRAHAM DAVID y
GUNNING, ROBIN VERA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 318 139 T5

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para evitar o reducir la resistencia de insectos a insecticidas

- 5 La presente invención se refiere a un método para prevenir o reducir la resistencia de una plaga a un pesticida y a formulaciones para uso en tal método. En particular, la invención se refiere a resistencia a insecticidas y a composiciones insecticidas.
- 10 Hay varias definiciones de resistencia a insecticidas, que a menudo reflejan el interés del científico que lleva a cabo la definición, en lugar del fenómeno mismo. La Organización Mundial de la Salud ha definido la resistencia como "el desarrollo de una capacidad en una cepa de insectos para tolerar dosis de producto tóxico que serían letales para la mayoría de individuos en una población normal de la misma especie". La resistencia a los plaguicidas va a ser por lo tanto similarmente interpretada, aunque las principales plagas tratadas aquí son insectos.
- 15 La resistencia a los insecticidas se ha generalizado más progresivamente desde que se registró primero científicamente en 1914. Alrededor de 500 insectos y especies de ácaros muestran ahora tolerancia a los pesticidas, y la resistencia a los pesticidas se ha vuelto una seria amenaza para el éxito futuro de la represión de plagas usando productos químicos.
- 20 Hay tres mecanismos principales por los que puede ocurrir la resistencia: penetración reducida de la plaga por el plaguicida; metabolismo del insecticida (dando como resultando la destoxicación); e insensibilidad del lugar objetivo. Estos mecanismos de resistencia pueden existir individualmente en un insecto, pero se encuentran a menudo en combinación en la que la resistencia total ofrecida es sustancialmente más alta; esta situación se denomina "resistencia multifactorial".
- 25 Muchos insectos poseen sistemas de destoxicación, que evolucionaron originalmente para proteger al insecto de toxinas naturales en el medio. El metabolismo del insecticida puede ocurrir antes de que llegue al lugar objetivo cuando se pone en contacto con las enzimas destoxicantes que lo convierten en menos tóxico o más fácilmente excretado, o ambas. Los sistemas enzimáticos más importantes implicados en la resistencia a los insecticidas incluyen los grupos a) oxidasas de función mixta, b) glutatión S-transferasas y c) esterasas. Se ha encontrado resistencia, que es el resultado de la actividad mejorada de uno o más de estos grupos de enzimas, en varias especies de insectos.
- 30 Los sistemas enzimáticos de destoxicantes de insectos se pueden estudiar in vivo por bioensayos convencionales, o in vitro por ensayos bioquímicos. En los bioensayos convencionales, hay un empleo ampliamente extendido de compuestos sinérgicos tales como DEF (fosforotioato de S,S,S-tributilo) y TPP (fosfato de O,O,O-trifenilo). Estos son compuestos que mejoran significativamente la toxicidad de un insecticida, aunque pueden ser virtualmente no tóxicos cuando se emplean solos. Los insecticidas sinérgicos actúan inhibiendo enzimas metabólicas. Las diferencias de mortalidad en un bioensayo, usando un plaguicida en presencia o ausencia de un compuesto sinérgico, deben indicar si una supuesta enzima metabólica está implicada en la resistencia. Sin embargo, se debe tener precaución cuando se usan compuestos sinérgicos; muy a menudo el producto químico no es completamente específico de la enzima que se está examinando, y puede ser difícil evaluar su posible efecto en otros sistemas biológicos.
- 35 Las esterasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de un enlace éster. Los insecticidas de organofosfato, carbamato y la mayoría de los piretroides contienen enlaces éster y en algunos casos son sensibles a la hidrólisis por esterasas.
- 40 Las esterasas pueden actuar secuestrando toxinas para el insecto o hidrolizando las toxinas. Por lo tanto la resistencia a insecticidas puede ser el resultado de cambios cuantitativos o cualitativos en carboxilesterasas o una combinación de los dos. Los cambios cualitativos podrían conferir a la enzima la capacidad de hidrolizar ésteres insecticidas en un porcentaje significativo, pero pueden o no pueden afectar a la actividad de la esterasa respecto a los substratos modelo. Sin un cambio cualitativo, puede ocurrir aún resistencia por cambios cuantitativos que son el resultado de un procedimiento de amplificación génica. Esto conduce a la producción de una mayor cantidad de la misma esterasa, que secuestra el insecticida, dando como resultado la resistencia. Ocasionalmente, la esterasa puede ser tanto alterada como amplificada.
- 45 El butóxido de piperonilo (PB o PBO) se ha usado extensamente como "mezcla de depósito", tanto como excipiente debido a sus propiedades detergentes/tensioactivas como debido a la riqueza de bibliografía que describe su capacidad para inhibir enzimas metabólicas oxidantes (oxidasas de función mixta). Hemos mostrado que ciertas esterasas no específicas implicadas en la resistencia a insecticidas son parcialmente inhibidas por concentraciones micromolares de butóxido de piperonilo (IUPAC, London 1998).
- 50 En Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner), hasta el 70% de la actividad de las esterasas relacionadas con la resistencia a piretroides fue inhibida por butóxido de piperonilo 10^{-5} M, tanto en homogenatos de insectos resistentes como en un extracto de esterasa parcialmente purificada (Gunning et al in Piperonyl Botoxide, pp. 215-225, Academic Press (1998)).
- 55

- 5 También se realizaron estudios en esterasas del áfido del algodón, *Aphis gossypii* (Glover) y el áfido del melocotón-patata, *Myzus persicae* (Sulzer). El butóxido de piperonilo era capaz de inhibir la actividad de la esterasa de *A. gossypii*, pero solo cuando estaba presente en concentraciones nominales de 10^{-4} o mayores. La actividad de la esterasa total se redujo típicamente al 50% en 30 minutos. Este efecto no es simplemente una consecuencia del efecto físico-químico que implica al substrato, dado que las esterasas presentes en *M. persicae* directamente implicadas en la resistencia a insecticidas no fueron inhibidas cuando se incubaron con concentraciones mM de butóxido de piperonilo durante 40 minutos.
- 10 Gunning et al. (1998) por lo tanto propusieron el uso de un compuesto sinérgico o inhibidor de la esterasa tal como PBO simultáneamente en una mezcla de depósito con un insecticida tal como un piretroide para mejorar la eficacia del insecticida en el campo. Además, los datos obtenidos por Gunning et al (Pest Biochem & Physiol 63, 50-62 (1999)) revelaron un significativo sinergismo con los piretroides por organofosfatos; en estudios previos, los trabajadores en el campo no observaron este efecto, sin duda porque el periodo de pretratamiento usado en tales estudios (profenofos y DEF) nunca excedía de 30 minutos, que es un periodo demasiado corto para que tal efecto sea evidente.
- 15 De este modo, en algunos casos en los que se confiere resistencia por enzimas estéricas, se podría añadir PBO o análogo de PBO que actúa similarmente, tal como una de sus variantes estable a UV, para inhibir las esterasas durante un periodo de tiempo previo a la adición de un insecticida convencional. Este necesitaría normalmente una segunda aplicación de insecticida, es decir un pretratamiento con un inhibidor de enzima metabólica previamente a la pulverización del insecticida, que no es una proposición económica comparada con una sola aplicación, por ejemplo, de la mezcla de depósito.
- 20 La presente invención resuelve el problema de la aplicación múltiple proponiendo que, si un insecticida se microencapsulara o si no se administrara en una formulación de desprendimiento no inmediato y el PBO u otro inhibidor de la esterasa no, entonces sería suficiente una sola aplicación. El PBO comenzaría a actuar inmediatamente sobre las esterasas y, después de un periodo dado, se rompería la microencapsulación y desprendería el insecticida convencional. Para entonces, las enzimas asociadas a la resistencia estarían inhibidas, y de este modo superado el mecanismo de resistencia.
- 25 Se conocen varias formulaciones que implican tanto un compuesto sinérgico, tal como PBO, como un insecticida tal como un piretroide.
- 30 La memoria descriptiva de patente europea no. 233 184 se refiere al uso de un plaguicida microencapsulado y un plaguicida no microencapsulado, en la que los dos plaguicidas son preferentemente el mismo, por ejemplo, permetrina. La memoria descriptiva de patente europea no. 427 991 describe una mezcla de un plaguicida de organofosforo microencapsulado y/o carbamato con una fase fluidizable que comprende un plaguicida piretroide. Ambas memorias descriptivas sugieren el uso de la formulación para la acción combinada de derribar-matar, como lo hace la memoria descriptiva de patente alemana no. 2411 373, que describe una formulación parcialmente microencapsulada de un piretroide, que contiene opcionalmente un compuesto sinérgico.
- 35 Sin embargo, ninguna de estas formulaciones se refiere a uno apropiado para los propósitos de esta invención, a saber, para reducir o prevenir la resistencia a plaguicidas permitiendo que un inhibidor de esterasa se ponga en contacto con la plaga primero, seguido del plaguicida, en una sola aplicación.
- 40 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para prevenir o reducir la resistencia a un plaguicida por una plaga, método que comprende la administración al cultivo, otro substrato o la plaga de una composición que comprende:
- (a) una formulación de desprendimiento rápido de un inhibidor de un factor que provoca o contribuye a la resistencia de la plaga al plaguicida; y, sustancial y simultáneamente,
- (b) un plaguicida encapsulado en una cápsula degradable.
- 45 Además, la presente invención proporciona una composición, apropiada para su uso en tal método, composición que comprende:
- (a) una formulación de desprendimiento rápido de un inhibidor de un factor que provoca o contribuye a la resistencia de la plaga al plaguicida en donde la formulación de desprendimiento rápido se selecciona del grupo que consiste en polvos humedecibles, gránulos, concentrados emulsionables y formulaciones de ultra bajo volumen a las que se puede añadir agua para formar una emulsión o una suspensión; y,
- 50 (b) un plaguicida encapsulado en una cápsula degradable.
- Preferentemente, la formulación de desprendimiento rápido y la formulación de desprendimiento sostenido están comprendidas en la composición en una mezcla física. Sin embargo, las formulaciones (a) y (b) se pueden administrar separadamente. Por "sustancial y simultáneamente" aquí se entiende que las formulaciones se ponen en

- contacto con el sustrato y/o la plaga aproximadamente al mismo tiempo, evitando la necesidad de volver a visitar el lugar del sustrato y/o plaga para aplicar la segunda de las dos formulaciones. Ambas formulaciones se pondrían por ello en contacto con el sustrato y/o la plaga con una diferencia del orden de segundos, preferentemente de 10 segundos y más preferentemente, de uno o dos segundos, en lugar de del orden de minutos o más.
- 5 Preferentemente, las formulaciones (a) y (b) se administran simultáneamente.
- Preferentemente, la formulación de desprendimiento rápido, que comprende PBO u otro inhibidor de enzima metabólica, está en la forma de un concentrado emulsionable. Se apreciará que el inhibidor de enzima preferido, o combinación de inhibidores de enzimas, se seleccionará en base a que compuesto o compuestos plaguicidas se está empleando contra una plaga específica.
- 10 El plaguicida encapsulado en una cápsula degradable previene que una dosis efectiva del plaguicida se desprenda o entre en contacto efectivo con la plaga o su objetivo en la plaga hasta que el inhibidor de esterasa, o inhibidor de otro factor que provoca o contribuye a la resistencia al plaguicida, ha comenzado por lo menos su efecto inhibidor en su objetivo en la plaga. Apropiadamente, la encapsulación previene el desprendimiento del plaguicida o su contacto con la plaga o el sustrato durante por lo menos 30 minutos después de la aplicación de la composición. El
- 15 plaguicida encapsulado en una cápsula degradable preferentemente comprende tecnología de microencapsulación. Uno de tales ejemplos de una pulverización superficial que encapsula un insecticida piretroide es Karate Zeon [marca registrada] (lambda-cihalotrina). El tiempo óptimo de retraso para el desprendimiento del plaguicida se determinará por varios factores y requerirá experimentación para determinar el perfil de tiempo/respuesta del (de los) inhibidor(es) seleccionado(s). Una formulación de no desprendimiento que corresponde a este perfil se
- 20 seleccionará/desarrollará a continuación.
- Las formulaciones de microencapsulación apropiadas incluyen aquellas análogas a las descritas en las anteriormente mencionadas memorias descriptivas de patente alemana pero adaptadas para microencapsular el insecticida (por ejemplo, piretroide) y no el inhibidor de enzima metabólica (por ejemplo, inhibidor de esterasa, por ejemplo, PBO).
- 25 El plaguicida mismo es apropiadamente cualquiera que sea capaz de actuar como tal y al cual ha sido identificada resistencia entre la plaga, o alguna de las plagas contra las que es de otro modo activo. Los ejemplos de plaguicidas apropiados que pueden comprender los ingredientes activos del componente (b) de la composición por lo tanto incluyen piretroides, organofosfatos y carbamatos. Preferentemente, el plaguicida es un piretroide, tal como fenvalerato, s-fenvalerato, cipermetrina (tanto la forma alfa como la zeta), bifentrina, deltametina y beta-ciflutrina. Se
- 30 apreciará que se descubren de vez en cuando nuevos plaguicidas y nuevas clases de plaguicida, y que con el tiempo se puede desarrollar resistencia a los plaguicidas. Se pretende que los principios de esta invención, y los presentes conceptos de invención, se pueden aplicar a una amplia variedad de plaguicidas, tanto conocidos como aún por descubrir, donde y cuando se identifique resistencia.
- 35 El componente (b) por lo tanto comprende preferentemente una cantidad equivalente a una dosis estándar del plaguicida. Por ejemplo, en el caso de beta-ciflutrina para actividad plaguicida contra *Helicoverpa*, una dosis típica comprende 8 g/l de un volumen ultra bajo o 25 g/l de una formulación emulsionable; y para alfa-cipermetrina una dosis típica comprende 16 g/l de un volumen ultra bajo o 100 g/l de una formulación emulsionable.
- El inhibidor es apropiadamente cualquiera que sea capaz de prevenir o reducir la resistencia de la(s) plaga(s) al plaguicida. Los inhibidores apropiados por lo tanto incluyen inhibidores de esterasa, inhibidores de oxidasa microsomal e inhibidores de glutatión S-transferasa. Preferentemente, el inhibidor es un inhibidor de esterasa, tal como PBO, etion, profenobos y dimetoato.
- 40 El componente (a) preferentemente comprende una cantidad del inhibidor suficiente para prevenir o reducir la resistencia de la(s) plaga(s) al plaguicida y dependerá del tamaño de la plaga (por ejemplo, una mosca blanca necesita mucho menos inhibidor que una larva de *H. armigera*), grado de resistencia mediada por el éster etc., pero es determinable por los expertos en la técnica.
- 45 La(s) plaga(s) contra la(s) que se dirige la composición de la invención puede(n) ser cualquiera que se sabe que ofrece(n) por lo menos alguna resistencia a un plaguicida y que se considera que es necesaria para inhabilitar y/o matar. Los ejemplos incluyen aquellos que atacan o dañan o si no reducen el valor comercial u otro valor del sustrato, tales como cultivos, particularmente cultivos arables, tales como cultivos de alimentos y materiales que
- 50 incluyen algodón. Otras plagas incluyen aquellas que son una molestia o un adversario de otros organismos vivos, incluyendo mamíferos tales como los seres humanos.
- Por consiguiente, la(s) plaga(s) puede(n) incluir una o más de *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa punctigera*, *Heliothis virescens*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *P. includens*, *W. cervinata*, *Bemisia tabaci* y especies de mosquitos.
- 55 A modo de ejemplo, el gusano de la cápsula del algodón *Helicoverpa armigera* y *B. tabaci* biotipo B (mosca blanca de la poinsetia o de la hoja plateada) son serias plagas de cultivos en todo el mundo. La resistencia extrema al

insecticida exacerba la condición de plaga de estos insectos. Las resistencias a los piretroides y otras resistencias en *H. armigera* australiana y *B. tabaci* biotipo B están causadas por una sobreproducción de isoenzimas esterasa que secuestran y metabolizan los insecticidas.

5 Para la administración al sustrato, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la aplicación de un plaguicida o similar a un sustrato y puede depender de factores tales como el sustrato particular (por ejemplo, cultivo), estado de la plaga objetivo del cultivo y similares. Los ejemplos de tales métodos incluyen pulverizar por aplicación aérea o al suelo. Para la administración a cultivos, particularmente en vastas áreas tales como los campos de algodón australianos, se prefiere pulverizar una composición que comprende una suspensión o emulsión de los componentes (a) y (b) en agua, que comprenden opcionalmente también un tensioactivo u otros excipientes (aunque el PBO mismo puede actuar como tensioactivo) o una composición de volumen ultra bajo (omitiendo el agua), suministrada en un recipiente, tal como uno adaptado para ser transportado por avión o, por ejemplo como en 10 el caso de las pulverizaciones para mosca blanca, por plataforma terrestre (tal como tractor, depósito o pulverizador de pluma).

15 La tasa de administración de las composiciones según la invención estarán de acuerdo con las tasas conocidas o aprobadas (registradas) de los ingredientes activos de cada una de las formulaciones (a) y (b). Por ejemplo, para *H. armigera*, la tasa registrada en Australia para PBO está en el intervalo de 250-360 g i.a./ha y para un piretroide las tasas están en el intervalo de alrededor de 12-80 g i.a./ha.

La presente invención proporciona por lo tanto adicionalmente:

- (a) el uso de una composición según la invención en el tratamiento o prevención de resistencia a los plaguicidas;
- 20 (b) el uso de una composición según la invención en el tratamiento o prevención del daño o la destrucción de un sustrato por una plaga;
- (c) el uso de una composición según la invención en la represión de plagas; y
- (d) un método para preparar una composición según la invención, método que comprende poner en una mezcla física los componentes (a) y (b).

25 La presente invención se ilustrará ahora por los siguientes Ejemplos.

Breve descripción de las Figuras

La invención se describirá ahora, solo a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes Figuras en las que:

- La Figura 1 muestra el porcentaje de actividad de la esterasa de *H. armigera* (expresado como % del control \pm desviación estándar) que queda en periodos fijados después de la aplicación tópica de 1 μ l de PBO al 1%;
- 30 La Figura 2 muestra el porcentaje de actividad de la esterasa de *B. tabaci* biotipo B (Australiana) (expresado como % del control \pm desviación estándar) que queda en periodos fijados después de la exposición a PBO al 0,1%;
- La Figura 3 y 4 muestra la comparación del porcentaje de inhibición de la esterasa de larvas de *H. armigera* usando pretratamiento de PBO, fenfalerato y zeta-cipermetrina;
- La Figura 5 muestra la tasa de aparición de síntomas de envenenamiento de piretroides (a la luz del día y por la noche) en larvas de *H. armigera* de 3ª fase susceptibles a piretroide. Las larvas se trataron, por aplicación tópica, con una dosis discriminante de lambdacihalotrina usando Karate o Karate Zeon;
- 35 La Figura 6 muestra la toxicidad, usando un bioensayo de aplicación tópica de Karate EC y Karate Zeon y mezclas de butóxido de piperonilo (1%) y Karate EC y Karate Zeon para *H. armigera* de 3º fase susceptibles a piretroides y resistentes (80 veces resistentes a lambdacihalotrina). Los insecticidas se aplicaron a *H. armigera* durante la noche (con luz roja) y los bioensayos se dejaron durante la noche en la oscuridad;
- 40 La Figura 7 muestra la toxicidad, usando un bioensayo de inmersión de la hoja, de Karate EC y Karate Zeon y mezclas de butóxido de piperonilo (1%) y Karate EC y Karate Zeon para *B. tabaci* nativos adultos susceptibles a piretroides y *B. tabaci* biotipo B resistentes (2000 veces resistentes a lambdacihalotrina). Los insecticidas se aplicaron a *B. tabaci* durante la noche (con luz roja) y los bioensayos se dejaron durante la noche en la oscuridad;
- 45 La Figura 8 muestra la represión en el campo en algodón de *H. armigera* de 2ª fase resistentes a piretroides (80 veces a lambdacihalotrina), usando tasas registradas de Karate Zeon de desprendimiento retrasado y Karate EC de desprendimiento inmediato, y mezclas de Karate Zeon y Karate EC con PBO. Las barras de error representan las desviaciones estándar (Las tasas de insecticida aplicado fueron: PBO 320 g i.a./ha, y lambdacihalotrina 15 g i.a./ha);
- 50 La Figura 9 muestra la represión en el campo en algodón de adultos de *B. tabaci* biotipo B resistentes a piretroides, usando pulverizaciones de tasas registradas de Karate Zeon de desprendimiento retrasado y Karate EC de

desprendimiento inmediato, y mezclas de Karate Zeon y Karate EC con butóxido de piperonilo. Las barras de error representan las desviaciones estándar (Las tasas de insecticida aplicado fueron: PBO 320 g i.a./ha, y lambdacihalotrina 15 g i.a./ha);

EJEMPLOS

5 Métodos generales y materiales

Se determinó la actividad de la esterasa midiendo el porcentaje de hidrólisis del sustrato modelo, acetato de 1-naftilo, por las carboxilesterasas presentes en insectos resistentes a organofosfato tales como *H. armigera*, o la hidrólisis de butirato de 1-naftilo por *B. tabacii*. Tales hidrólisis darán como resultado un color amarillo/marrón característico después de complejarse con FBRR (sal RR azul rápida) con absorbancia a 450 nm, que se mide para determinar el porcentaje de reacción. La FBRR (0,6% de disolución final), se disolvió en pH 6,0, tampón de fosfato 0,2 M, a continuación se añadió 1,86% de acetato de 1-naftilo o butirato de 1-naftilo.

Los ensayos cinéticos se realizaron usando un lector de microplaca Bio-Rad 3550 (Bio-Rad Laboratories, UK, usando software Kinetic Collector 2.0 en un microordenador Mackintosh SE), tomando lecturas de absorbancia a 450 nm automáticamente a intervalos de 14 segundos durante 10 minutos. El porcentaje se calculó por el ordenador en línea como la pendiente de la línea de regresión ajustada, usando un límite de absorbancia de 2,0; las lecturas se dan en mili-OD (unidad de densidad óptica).

Los insecticidas usados eran de grado técnico: fenvalerato (98%, Shell), éster ciano(3-fenoxifenil)metílico de ácido (R-(R*,S*))-4-cloro- α (1-metiletil)bencenoacetico; cipermetrina ((R;S)-alfa-ciano-3-fenoxibencil-(1RS)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-S,S-dimetilciclopropano-carboxilato); y zeta-cipermetrina ((S)-ciano(3-fenoxifenil)-metil(\pm)-cis-trans-3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato) (85%, FMC). El insecticida sinérgico, butóxido de piperonilo (96% puro, grado técnico), y 800 g/l de formulación de concentrado emulsionable de este producto químico (PBEC80) fueron suministrados por Endura Spa, Bolonia, Italia.

Ejemplo 1: el PBO inhibe esterasas de *H. armigera*

Los ensayos cinéticos confirmaron que la actividad de la esterasa fue inhibida por el insecticida sinérgico, PBO, durante un periodo de 24 horas (Figura 1), proporcionando evidencia de que el PBO inhibe las esterasas de *H. armigera*. Además, los ensayos cinéticos ilustran que la inhibición de la esterasa por PBO no ocurre inmediatamente después de la dosificación, sino que ocurre con máxima inhibición de la enzima de 3 a 4 horas después (de 70 a 72% de inhibición de la actividad de la esterasa). Generalmente, las esterasas comienzan a recuperarse gradualmente hasta que la actividad completa de la esterasa está presente a las 24 horas. Sin embargo, se debe advertir que el porcentaje de esterasa del control permanece en menos del 50% entre 2 y 11 horas.

Ejemplo 2: el PBO inhibe esterasas de *B. tabaci* biotipo B

Los ensayos cinéticos mostraron también que el PBO inhibe las esterasas de *B. tabaci* biotipo B durante un periodo de 26 horas. Después de una rápida inhibición inicial de las esterasas (durante 1 hora), hay una disminución gradual hasta una máxima inhibición de la esterasa (36% del control a 11 horas), previamente a una recuperación gradual de la actividad de la esterasa con la actividad completa de la esterasa observada, 30 horas después de la exposición inicial a PBO (Figura 2). El porcentaje de actividad del control permanece en menos del 50% entre 7,5 y 17 horas y, en general, las esterasas sufren algún grado de inhibición entre 1 y 26 horas.

Ejemplo 3: el PBO incrementa la mortalidad por piretroides

Los estudios de sinergia confirmaron que el PBO incrementa la mortalidad por piretroides (Figuras 3 y 4). Estos implicaron una comparación de la inhibición de esterasa (expresada como % del control \pm desviación estándar) en que incurrieron larvas de *H. armigera* con el tiempo después de la aplicación tópica de 1 μ l de PBO (1%), y el efecto sobre la mortalidad de larvas resistentes a piretroides cuando se exponen a intervalos de pretratamiento crecientes de PBO (1 μ l, 1% de PBO/larva) antes de la exposición a fenvalerato (1 μ l, 0,125% fenvalerato/larva, Figura 3) y zeta-cipermetrina (1 μ l, 0,01% zeta-cipermetrina/larva, Figura 4). Los efectos eran más pronunciados con zeta-cipermetrina. Hay un incremento de mortalidad altamente significativo ($p < 0,01$), hasta que se llega a una meseta (100% de mortalidad) (4-5 horas para fenvalerato, y 4-10 horas para zeta-cipermetrina); a continuación, los efectos sinérgicos decaen. Esta tendencia corresponde a hallazgos previos, en los que las esterasas son inhibidas en un alto grado (más del 50% de reducción de la actividad de la esterasa) entre 4 y 18 horas.

Ejemplo 4: Composición

Los siguientes ingredientes se pueden mezclar conjuntamente en agua para formar una composición apropiada para aplicación desde tierra o aire en tasas estándar para el piretroide:

Formulación (a): 800 g/l de PBO (formulación de PBO EC)

Formulación (b):250 g/l de Lambdacihalotrina (en la forma de Karate-Zeon (marca comercial)); (Karate-Zeon es 250 g/l i.a.)

Ejemplo 5: Estudios de laboratorio con H. armigera

Introducción

5 Los bioensayos de laboratorio sobre H. armigera susceptible y resistente a piretroides se realizaron en la oscuridad para retrasar el desprendimiento de piretroide de microencapsulación usando Karate Zeon®.

10 El Karate Zeon® es una formulación microencapsulada del piretroide lambdacihalotrina y es el único insecticida encapsulado en el mercado de cultivos de campo australianos. Desarrollada para incrementar la seguridad del operario, esta formulación proporciona una lambdacihalotrina de desprendimiento retrasado (a la luz del sol después de mezclar con agua), de aproximadamente 30 minutos. El desprendimiento de los contenidos de la microcápsula es parcialmente desencadenado por la luz del sol. Un retraso de 30 minutos en el desprendimiento del piretroide es, sin embargo, insuficiente para permitir la máxima acción sinérgica, necesaria para la represión de insectos resistentes. Sin embargo, el desprendimiento del piretroide en Karate Zeon®, se puede retrasar más allá de 30 min reduciendo las condiciones de luz.

15 Para demostrar la prueba del concepto de control de la resistencia al insecticida, usando una aplicación simultánea de un compuesto sinérgico y un insecticida de desprendimiento retrasado, se usaron Karate Zeon® y el piretroide de desprendimiento artificialmente retrasado de encapsulación usando el insecticida en la oscuridad. Sin embargo, la tecnología requerida para preparar formulaciones insecticidas de desprendimiento retrasado con un mayor retraso de tiempo para el desprendimiento es conocida por los expertos en la técnica. De este modo, las técnicas de microencapsulación se pueden aplicar y adaptar para dar el deseado retraso de tiempo con un insecticida específico.

Métodos generales

25 Las poblaciones de H. armigera usadas fueron: una cepa susceptible a piretroide y una cepa resistente a piretroide seleccionada (aproximadamente 80 veces resistente a lambdacihalotrina). Larvas de H. armigera de 3ª fase susceptibles y resistentes a piretroide se trataron con el insecticida sinérgico butóxido de piperonilo (PBO) y dos formulaciones de lambdacihalotrina. Los insecticidas usados fueron: butóxido de piperonilo (800 g/l i.a.), Karate EC® (50 g/l i.a.) no encapsulado, Karate Zeon® microencapsulado (250 g/l i.a.). Los insecticidas se diluyeron en serie en agua. Los insecticidas se aplicaron tópicamente a larvas, usando un procedimiento estándar de bioensayo de Helicoverpa (Gunning et al, 1984). Los experimentos se realizaron a 25°C. La mortalidad se evaluó después de 24 h. Los grupos de control se trataron con agua o PBO y no hubo mortalidad del control. Se representaron las curvas de mortalidad de dosificación completa. Los datos se analizaron por análisis probit.

Prueba de retraso del desprendimiento de piretroide en la oscuridad

35 Los piretroides son neurotoxinas que afectan al sistema nervioso periférico del insecto y los síntomas de envenenamiento en H. armigera son bien conocidos, Gunning R.V. (Biossay for detecting pyrethroid nerve insensitivity in Australian Helicoverpa armigera, Journal of Economic Entomology, 89:816-819, 1996). El tiempo de retraso de desprendimiento de piretroide se estimó (usando tratamientos de Karate EC y Karate Zeon), registrando el tiempo hasta la primera aparición de los síntomas de envenenamiento por piretroides en H. armigera susceptible a piretroides. Las larvas se trataron con una dosis que se sabe que mata al 100% de larvas de H. armigera susceptibles, tanto con luz diurna fuerte como en la oscuridad. Se dosificaron tres duplicados de 30 insectos para cada tratamiento. Las observaciones nocturnas de las larvas se realizaron con luz roja (los insectos no pueden ver la luz roja).

40 Los resultados (Figura 5) muestran que los síntomas de envenenamiento se desarrollaron en H. armigera tratada con Karate EC no encapsulado en aproximadamente 30 minutos, tanto a la luz del día como en la oscuridad. Usando Karate Zeon encapsulado, los síntomas de envenenamiento se desarrollaron en aproximadamente una hora a la luz del día, mientras que en condiciones de oscuridad se retrasó la aparición de los síntomas de envenenamiento hasta 4,5 h. De este modo, el uso de Karate Zeon en la oscuridad retrasó el desprendimiento del piretroide de su microencapsulación aproximadamente 3,5 horas.

Bioensayos nocturnos con H. armigera resistente a piretroides

50 El Karate EC y el Karate Zeon se diluyeron en serie en agua para formar varias concentraciones para bioensayo (0,005- 10 µg de lambdacihalotrina/µl). Grupos de larvas susceptibles o resistentes a piretroides (n = 30) recibieron los siguientes tratamientos de insecticida bajo luz roja y se mantuvieron en la oscuridad:

Cepa susceptible

Karate EC, Karate Zeon

Cepa resistente

Karate, Karate EC + PBO, Karate Zeon, Karate Zeon + PBO. Cada insecto recibió una dosis de 10 µg de PBO.

Tratamiento	Pendiente	LD ₅₀ (µg/larva)	Límites fiduciales	Factor de resistencia
Sus. Karate EC	2,1	0,013	0,008-0,020	-
Sus. Karate Zeon	2,2	0,014	0,008-0,023	-
R. Karate EC	1,3	0,60	0,45-0,87	46
R. Karate Zeon	1,3	0,60	0,45-0,82	46
R. Karate EC+PBO	1,3	0,33	0,25-0,45	25
R. Karate Zeon+PBO	2,1	0,013	0,008-0,02	1

- 5 Tabla 1. Análisis probit de la respuesta de *H. armigera* susceptible y resistente a piretroide para bioensayos nocturnos de formulaciones de lambdacihalotrina y butóxido de piperonilo.

Los resultados del bioensayo se muestran en la Tabla 1 y la Figura 6. Las toxicidades del Karate EC y Karate Zeon para larvas susceptibles no eran significativamente diferentes. Las toxicidades del Karate EC y Karate Zeon para *H. armigera* resistentes eran también indistinguibles (factor de resistencia 46 veces). El PBO y Karate Zeon de resistencia retrasada superaron completamente la resistencia (RF = 1), mientras que el PBO y el Karate EC redujeron el nivel de resistencia a 25 veces.

Conclusiones

15 *H. armigera* tratadas con PBO y Karate Zeon de desprendimiento retrasado se volvieron efectivamente susceptibles a lambdacihalotrina con la supresión completa de la resistencia. El uso nocturno del Karate EC + PBO suprimió completamente la resistencia, enfatizando adicionalmente que, para reprimir los insectos resistentes, es necesario un retraso entre la aplicación de PBO y el piretroide para la óptima inhibición de la esterasa por PBO.

Ejemplo 6: Estudios de laboratorio con *Bemisia tabaci* biotipo B**Introducción**

20 Los bioensayos de laboratorio en *B. tabaci* biotipo B susceptible y resistente a piretroides se realizaron en la oscuridad para retrasar el desprendimiento de piretroide de la microencapsulación usando Karate Zeon®.

Métodos generales

25 Adultos susceptibles a piretroide (*B. tabaci* nativa del norte de Australia) y de *B. tabaci* biotipo B resistente (resistente ~2000 veces a lambdacihalotrina) se trataron con butóxido de piperonilo sinérgico de insecticida formulado y dos formulaciones de lambdacihalotrina (Karate EC® no encapsulado y Karate Zeon® microencapsulado). Los insecticidas usados fueron de butóxido de piperonilo 800 g/l de EC (Concentrado Emulsionable), Karate EC (50 g/l de EC) y Karate Zeon (250 g/l).

30 La lambdacihalotrina formulada se diluyó en serie en agua para formar varias concentraciones de ensayo (0,1-10000 ppm de lambdacihalotrina). Se usó una técnica de bioensayo para inmersión de hojas estándar para moscas blancas adultas (Cahill 1995). Se sumergieron discos de hoja de algodón en concentraciones de lambdacihalotrina en una mezcla que contiene PBO al 1%. Las hojas se secaron y colocaron en un lecho de agar en placas petri. Se añadieron moscas blancas adultas y se cerraron las placas petri. Se realizaron bioensayos durante la noche a 25°C. Se realizaron controles sumergidos en agua y en PBO. Se evaluó la mortalidad y se corrigió con la mortalidad del control (que no excedió del 5%). Se representaron las curvas de respuesta de la dosis total y los datos se analizaron por el análisis probit.

Resultados

Los datos de mortalidad del ensayo se muestran en la Tabla 2 y la Figura 7. Los datos de *B. tabaci* susceptibles no muestran diferencias entre la toxicidad de Karate EC y Karate Zeon. Tampoco hubo diferencias entre la toxicidad de Karate EC y Karate Zeon para *B. tabaci* resistentes (RF ~ 140). *B. tabaci* resistentes a piretroide tratadas con PBO y

Karate Zeon de desprendimiento retrasado fueron indistinguibles de las cepas susceptibles en la respuesta a lambdacihalotrina (RF = 1), mientras que el tratamiento con PBO y Karate EC redujo algo la resistencia a lambdacihalotrina (RF = 52).

Tratamiento	Pendiente	LD ₅₀ (µg/larva)	Límites fiduciales	Factor de resistencia
Sus. Karate EC	3,0	0,60	0,50-0,73	-
Sus. Karate Zeon	3,0	0,61	0,48-0,73	-
R. Karate EC	0,90	87,3	59-129	146
R. Karate Zeon	0,86	81	54-122	135
R. Karate EC+PBO	0,89	31,1	21-46	52
R. Karate Zeon+PBO	2,96	0,58	0,48-0,70	1

- 5 Tabla 2. Análisis probit de la respuesta de *H. armigera* susceptible y resistente a piretroides en ensayos nocturnos de formulaciones de lambdacihalotrina y butóxido de piperonilo.

Conclusiones

- 10 B. tabaci tratadas con PBO y Karate Zeon de desprendimiento retrasado se volvieron efectivamente susceptibles a lambdacihalotrina con supresión completa de la resistencia. El uso nocturno de Karate EC + PBO suprimió incompletamente la resistencia, enfatizando adicionalmente que, para reprimir los insectos resistentes, es necesario un retraso entre la aplicación de PBO y el desprendimiento del piretroide para la óptima inhibición de la esterasa por PBO.

Ejemplo 7: Estudios de campo con un compuesto sinérgico y piretroide de desprendimiento retrasado en algodón contra *H. armigera* - pulverizaciones nocturnas.

Introducción

Los estudios de laboratorio de *H. armigera* descritos anteriormente fueron seguidos de un ensayo de campo repetido a pequeña escala en algodón convencional en el Australian Cotton Research Institute en Narrabri, NSW, Febrero 2003.

Método de ensayo

- 20 En ausencia de presión de *H. armigera* sobre el algodón, larvas de *H. armigera* de segunda fase resistentes a piretroides, que fueron la progenie de una cepa de campo originaria de Queensland, se colocaron sobre la planta de algodón. La cepa era 20 veces resistente a lambdacihalotrina.

- 25 Los insecticidas usados fueron butóxido de piperonilo 800 g/l i.a. de EC. Karate EC (50 g/l de EC i.a.) y Karate Zeon (250 g/l i.a.). Los insecticidas se mezclaron con agua. Los insecticidas se pulverizaron a tasas registradas sobre algodón de PBO 320 g i.a./ha, y lambdacihalotrina 15 g i.a./ha, usando una barra pulverizadora calibrada sostenida a mano. Los tratamientos fueron: un control sin tratar, control de PBO, Karate EC, Karate Zeon y Karate EC y Karate Zeon mezclados con PBO.

- 30 El ensayo se realizó en parcelas repetidas de 1 fila x 2 m. Cada parcela contenía de 13-17 plantas maduras de algodón. Había una zona de separación sin pulverizar de dos filas entre cada parcela. Justo antes del ocaso, se colocaron diez larvas de *H. armigera* de segunda fase sobre los terminales de cada planta en las parcelas de ensayo y se pulverizaron las parcelas. Se evaluaron los números de *H. armigera* por planta un día después del tratamiento. La temperatura varió de 24-26°C. Se calcularon para cada tratamiento el porcentaje medio de mortalidad y la desviación estándar. No hubo mortalidad en el control.

Resultados

- 35 Los resultados (Figura 8) muestran que la lambdacihalotrina reprimió ~40% de *H. armigera* sin tener en cuenta la formulación, el tratamiento con una mezcla de PBO + Karate EC no dio un incremento significativo de mortalidad. Sin embargo, el PBO mezclado con Karate Zeon dio más del 90% de mortalidad de insectos resistentes, indicando la casi completa supresión de la resistencia. Estos son consistentes con los resultados de los bioensayos de laboratorio.

Conclusiones

5 Estos datos de campo demuestran que el butóxido de piperonilo sinérgico, cuando se aplica simultáneamente con un piretroide de desprendimiento retrasado, proporcionó una represión de campo efectiva de *H. armigera* resistente a piretroides. El desprendimiento retrasado de piretroides dejó tiempo para que el compuesto sinérgico inhibiera las esterasas asociadas a la resistencia, proporcionando el 100% de mayor represión de *H. armigera* resistente a piretroides que el PBO mezclado con un Karate EC no encapsulado.

Ejemplo 8: Estudios de campo con un compuesto sinérgico y piretroide de desprendimiento retrasado sobre algodón contra *B. tabaci* biotipo B - condiciones de luz reducida.**Introducción**

10 Los estudios de laboratorio de *B. tabaci* descritos anteriormente, fueron seguidos de un ensayo de campo repetido a pequeña escala en algodón comercial convencional en Emerald, Qld, Febrero de 2003. Dado que la lluvia y el fuerte viento evitaron cualquier pulverización nocturna, los insecticidas se aplicaron por la mañana y el ensayo se realizó bajo luz enormemente reducida (muy cubierto, nubes bajas y chubascos), comparado con las condiciones de luz del día normales.

Método de ensayo

15 El ensayo se realizó en algodón maduro con baja presión de *B. tabaci* (~ 2 moscas blancas/terminal). Las moscas blancas era aproximadamente 100 veces resistentes a lambdacihalotrina.

20 Los insecticidas usados fueron butóxido de piperonilo 800 g/l i.a. de EC, Karate EC (50 g/l de EC i.a.) y Karate Zeon (250 g/l i.a.). Los insecticidas se mezclaron con agua y se pulverizaron con tasas registradas sobre algodón (PBO 320 g i.a./ha, y lambdacihalotrina 15 g/ i.a./ha) usando una barra pulverizadora calibrada sostenida a mano. Los tratamientos fueron: un control sin pulverizar, control de PBO, y tanto Karate EC como Karate Zeon mezclados con PBO.

25 El ensayo se realizó en parcelas repetidas de 1 fila x 10 m . Había una zona de separación sin pulverizar de dos filas entre cada parcela. Se evaluó el número de moscas blancas, contando los adultos en cada terminal, previamente a la pulverización. Las parcelas se pulverizaron en condiciones de luz ambiental reducida y se evaluaron los números de moscas blancas adultas un día después del tratamiento. La temperatura varió de 28-34°C y la humedad relativa era 80-100%. Se calcularon para cada tratamiento los números medios de moscas blancas/terminal y las desviaciones estándar.

Resultados

30 Los datos del ensayo se muestran en la Figura 9. Un día después del tratamiento, no había mortalidad detectable en los controles de PBO o sin tratar. Las diferencias entre el control de mosca blanca y la formulación de lambdacihalotrina eran altamente significativas. El Karate EC mezclado con PBO proporcionó alguna represión del 25% de moscas blancas, mientras que el Karate Zeon + PBO dio una represión virtualmente completa indicando la supresión completa de la resistencia. Los resultados son consistentes con los datos de bioensayo de laboratorio.

Conclusiones

40 Los resultados del ensayo indican que la luz del día muy tenue retrasó el desprendimiento de la lambdacihalotrina de la encapsulación. Había un retraso suficiente entre la aplicación de PBO y el desprendimiento de piretroides de la microencapsulación, para permitir la inhibición adecuada de las esterasas por PBO previamente al desprendimiento de piretroide. Por lo tanto, la aplicación de un compuesto sinérgico y un insecticida de desprendimiento retrasado reprimió los *B. tabaci* biotipo B altamente resistentes a piretroides en el campo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para prevenir o reducir la resistencia a un plaguicida de una plaga de un sustrato, método que comprende la administración al sustrato o a la plaga de una composición que comprende:
 - 5 (a) una formulación de desprendimiento rápido de un inhibidor de un factor que causa o contribuye a la resistencia de la plaga al plaguicida, siendo el inhibidor un inhibidor enzimático metabólico; y sustancial y simultáneamente,
 - (b) un plaguicida encapsulado en una cápsula degradable.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que el componente (a) y el componente (b) están comprendidos en la composición en forma de mezcla.
- 10 3. Un método según la reivindicación 1, en el que el componente (a) y el componente (b) se administran separadamente.
4. Un método según la reivindicación 3, en el que ambos componentes de la composición se administran al sustrato o a la plaga con 10 segundos de diferencia.
- 15 5. Un método según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que ambos componentes se administran al sustrato o a la plaga con uno o dos segundos de diferencia.
6. Un método según cualquier reivindicación previa, en el que la formulación de desprendimiento rápido del componente (a) es una formulación plaguicida estándar que incluye por lo menos una formulación seleccionada del grupo que consiste en: polvos humedecibles, gránulos; concentrados emulsionables; y formulaciones de volumen ultra bajo a las que se puede añadir agua para formar una emulsión o una suspensión.
- 20 7. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el inhibidor del componente (a) incluye por lo menos un inhibidor seleccionado del grupo que comprende:

inhibidores de esterasa; inhibidores de oxidasa de función mixta; e inhibidores de glutatión S-transferasa.
8. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el inhibidor del componente (a) comprende un inhibidor de esterasa.
- 25 9. Un método según la reivindicación 8, en el que el inhibidor de esterasa incluye por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

fosforotionato de S,S,S-tributilo; fosfato de O,O,O-trifenilo; butóxido de piperonilo (PBO); profenofos; etion; y dimetoato.
10. Un método según la reivindicación 9, en el que el inhibidor del componente (a) es butóxido de piperonilo (PBO).
- 30 11. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que la composición comprende más de un plaguicida encapsulado en una cápsula degradable.
12. Un método según la reivindicación 11, en el que uno o más plaguicidas se microencapsulan dentro de una cápsula degradable.
- 35 13. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el plaguicida del componente (b) incluye por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

piretroides; organofosfatos; y carbamatos.
14. Un método según la reivindicación 13, en el que el plaguicida del componente (b) incluye por lo menos un piretroide seleccionado del grupo que comprende:

fenvalerato; S-fenvalerato; cipermetrina (tanto la forma alfa como la zeta); bifentrina; deltametrina; y beta-ciflutrina.
- 40 15. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el inhibidor del componente (b) es butóxido de piperonilo y el plaguicida del componente (b) es un piretroide.
16. Una composición plaguicida apropiada para uso en el método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 inclusive, comprendiendo dicha composición:
 - 45 (a) una formulación de desprendimiento rápido de un inhibidor de un factor que causa o contribuye a la resistencia de una plaga a un plaguicida, siendo el inhibidor un inhibidor enzimático metabólico y siendo la

formulación de desprendimiento rápido una formulación plaguicida estándar seleccionada del grupo que consiste en:

polvos humedecibles; gránulos; concentrados emulsionables; y formulaciones de volumen ultra bajo a las que se puede añadir agua para formar una emulsión o una suspensión.; y

5 (b)un plaguicida encapsulado en una cápsula degradable.

17. Una composición plaguicida según la reivindicación 16, en la que el componente (a) y el componente (b) se formulan en forma de una mezcla.

18. Una composición plaguicida según la reivindicación 16 o la reivindicación 17 inclusive, en la que el inhibidor del componente (a) incluye por lo menos un inhibidor seleccionado del grupo que comprende:

10 inhibidores de esterasa; inhibidores de oxidasa de función mixta; e inhibidores de glutathion S-transferasa.

19. Una composición plaguicida según la reivindicación 18, en la que el inhibidor del componente (a) es un inhibidor de esterasa.

20. Una composición plaguicida según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 inclusive, en la que el plaguicida del componente (b) incluye por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

15 piretroides; organofosfatos; y carbamatos.

21. Una composición plaguicida según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 inclusive, en la que el inhibidor del componente (a) es butóxido de piperonilo y el plaguicida del componente (b) es un piretroide.

22. El uso de una composición o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 inclusive, en el tratamiento o prevención de la resistencia a plaguicidas.

20 23. El uso de una composición o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 inclusive, en el tratamiento o prevención del daño o destrucción de un sustrato por una plaga.

24. Un método para preparar una composición plaguicida según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 inclusive, comprendiendo dicho método poner en una mezcla física el componente (a) y el componente (b).

25 25. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el plaguicida del componente (b) es un piretroide.

26. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que la formulación encapsulada del plaguicida es lambda-cihalotrina microencapsulada, por lo que desprende el plaguicida de una manera retrasada después de ser mezclado con agua y en el que el desprendimiento del plaguicida está en parte desencadenado por la luz del sol.

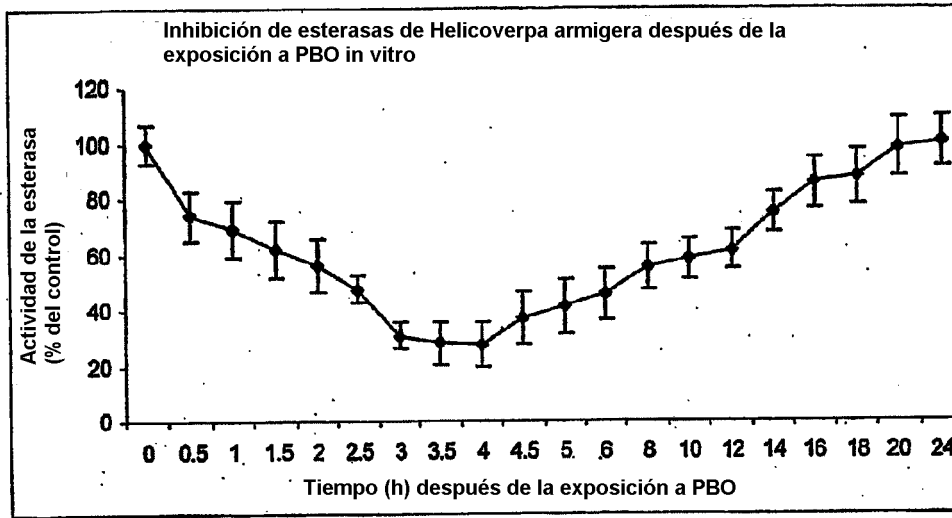


FIGURA 1

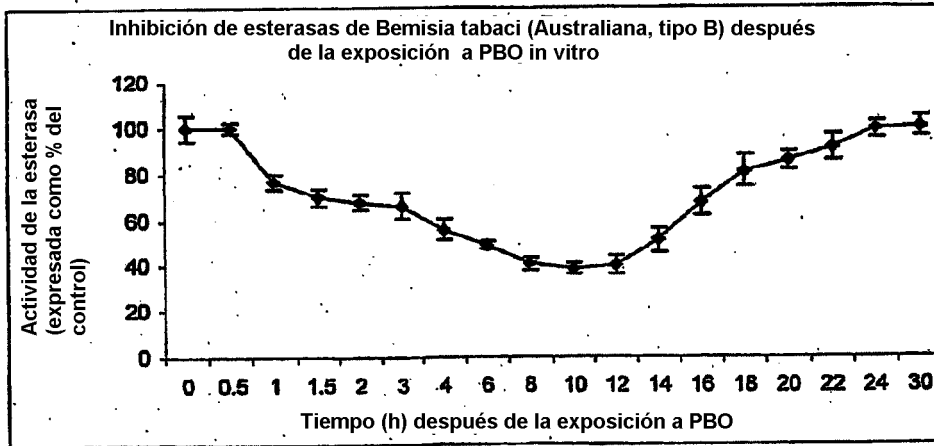


FIGURA 2

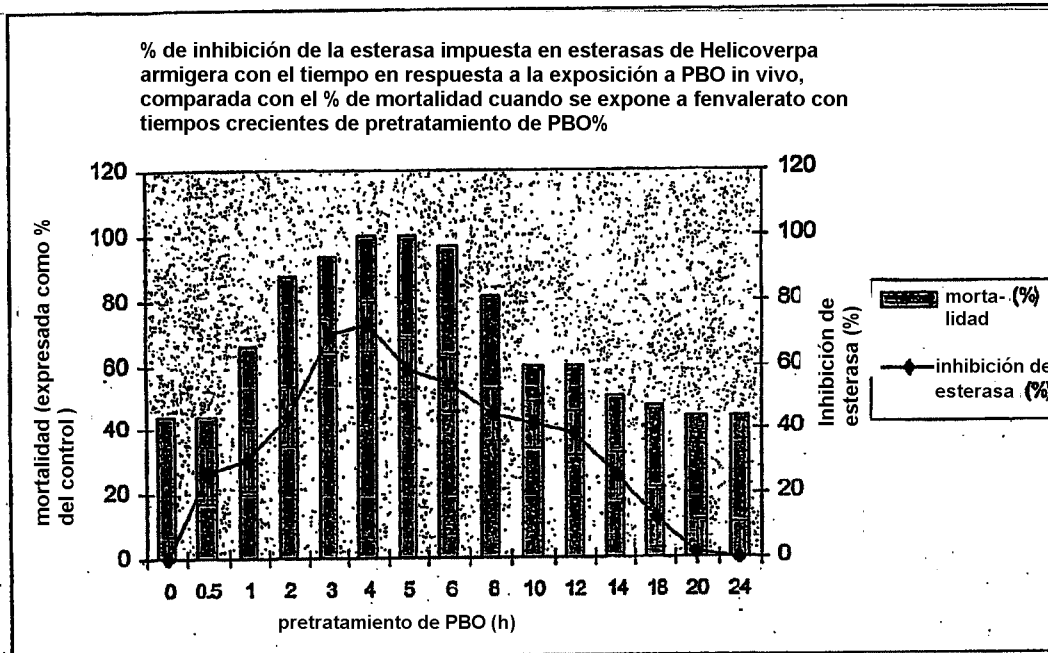


FIGURA 3

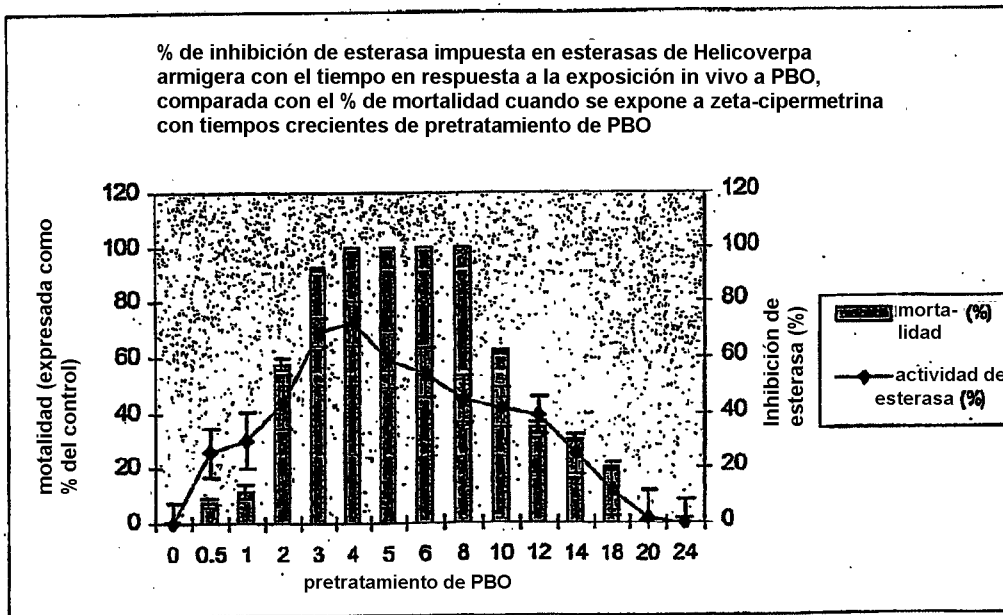


FIGURA 4

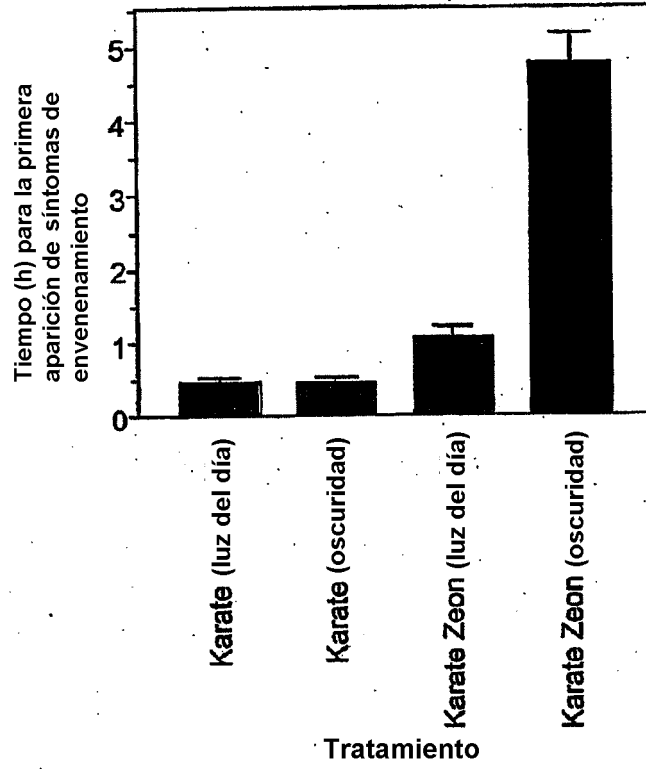


FIGURA 5

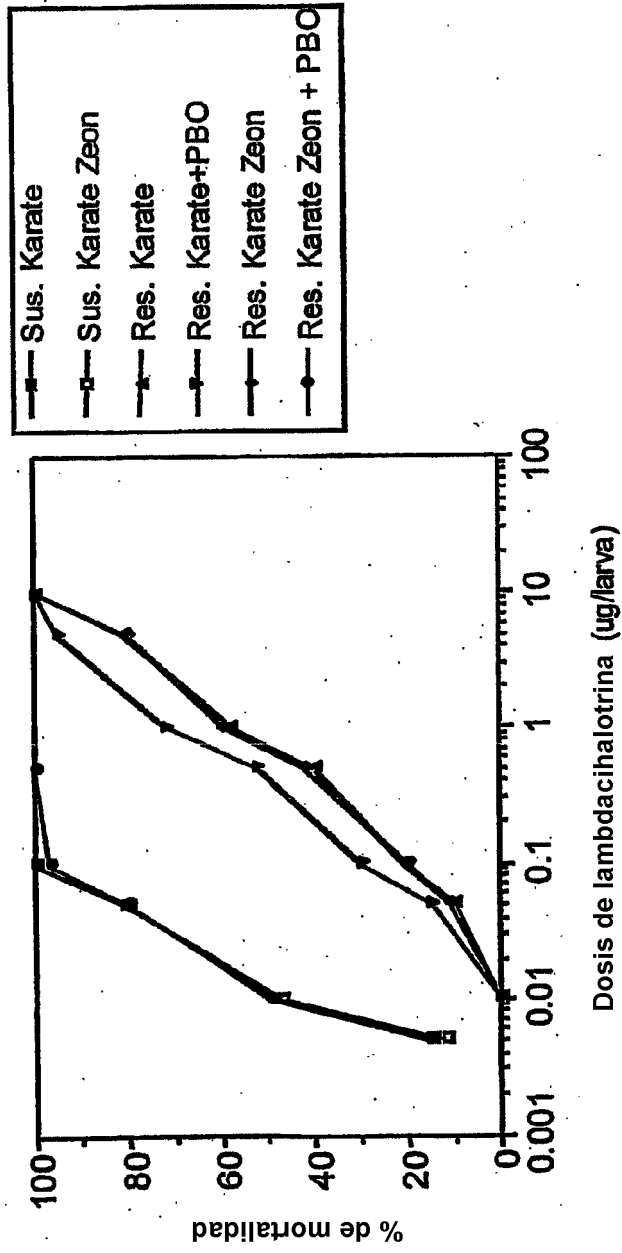


FIGURA 6

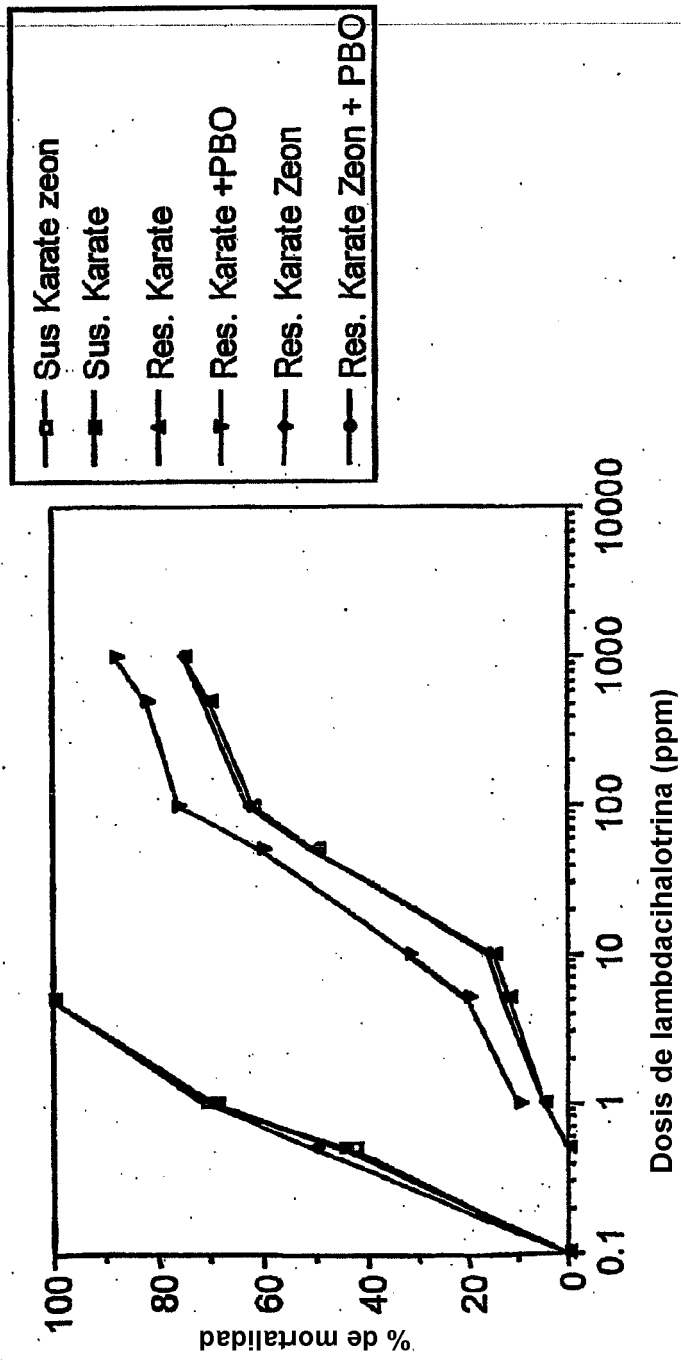


FIGURA 7

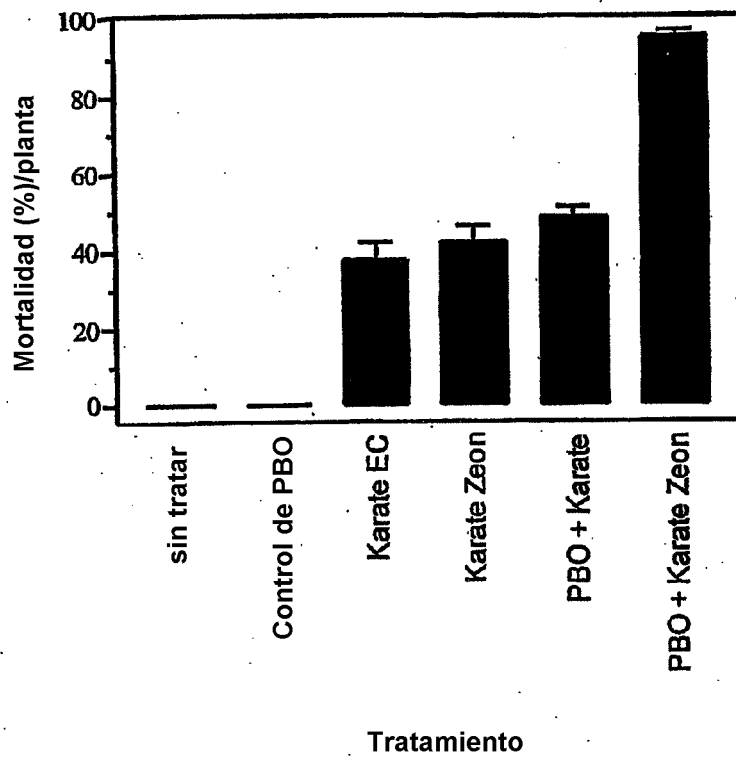


FIGURA 8

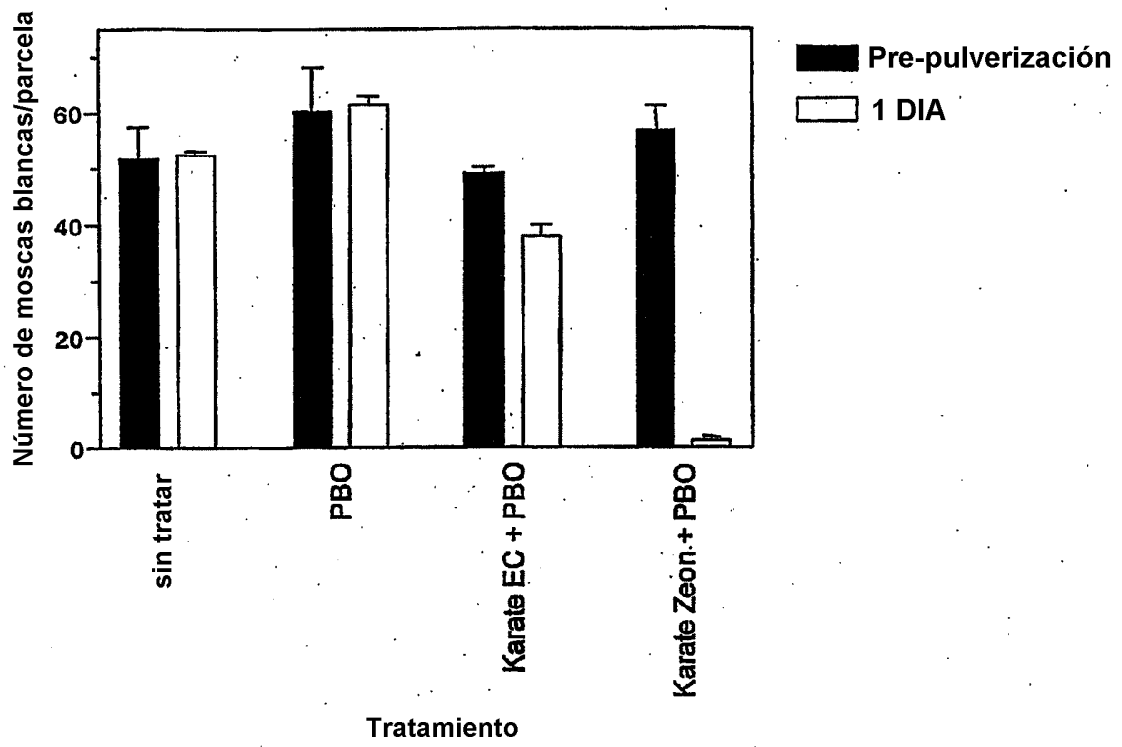


FIGURA 9