

Desarrollo de una matriz monolítica de liberación lenta conteniendo clorpirifos o 1,8-cineol. Evaluación de su efecto insecticida sobre *Haematobia irritans*



Ing. Zootecnista Laura Wilma Juan

**Directores: Dr. Eduardo Zerba
Dr. Héctor Masuh**

**Lugar de Trabajo: CIPEIN (CITEDEF-CONICET-UNSAM)
Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas**

**Tesis para obtener el título de
Doctor en Ciencia y Tecnología Mención Química
Universidad Nacional de General San Martín
Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental**

Agosto 2010

RESUMEN

Haematobia irritans (Linnaeus 1758) es un parasito externo del ganado bovino y en menor grado, de otros rumiantes y de los equinos. La denominación común "mosca de los cuernos" está dada por las observaciones realizadas por Linnaeus en 1758 acerca del cobijamiento del insecto en la base de los cuernos al descender la temperatura.

Este insecto plaga es originario de Europa Central y se lo determinó inicialmente en Argentina en el año 1991 donde fue observado en la provincia de Misiones. Actualmente se distribuye en la mayoría de las regiones donde se crían bovinos, incluyendo áreas tan al sur como San Carlos de Bariloche, Esquel y Perito Moreno (Chubut). Desde su introducción al país en 1991 ha sido motivo de constante preocupación debido a las consecuencias económicas y sanitarias que implica la infestación, tanto en el ganado de carne como de leche.

Para el control de esta plaga, los productos químicos más utilizados son los piretroides, principalmente la cipermetrina en formulaciones de tipo *pour on* (líquidos para derrame dorsal). El uso masivo de los piretroides ha generado el desarrollo creciente de resistencia a esta familia de insecticidas. Las formas conocidas y más utilizadas de control químico en *Haematobia irritans* corresponden a los métodos de aspersión, caravanas insecticidas, inyecciones intramusculares o subcutáneas y los *pour on*.

La tecnología de liberación controlada de plaguicidas se ha desarrollado como un medio de superar los inconvenientes de las formulaciones de plaguicidas convencionales. Uno de estos sistemas es el de tipo monolítico, el cual consiste en una matriz sólida en la que el agente activo es homogéneamente disperso. La velocidad de liberación de activos de una formulación monolítica no es constante, sino que disminuye con el tiempo, pero puede ser adecuadamente regulada por la selección de los materiales constitutivos de la matriz. Este trabajo de tesis tiene como eje el estudio de sistemas monolíticos con un principio activo insecticida

para obtener un formulado de este tipo particularmente apto para el control de una de las más importantes plagas veterinarias como es la mosca de los cuernos.

En una primera etapa de evaluación de diferentes componentes líquidos y sólidos se definió por criterios fisicoquímicos y biológicos una formulación monolítica de alta viscosidad constituida por acetato de etileno vinilo, trementina y esteres metílicos de aceite de soja, a la que se denominó RET. Debido a la generalizada resistencia a los piretroides desarrollada por la mosca de los cuernos, las evaluaciones iniciales de efectividad de esta formulación se realizaron utilizando clorpirifos como principio activo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indicaron que este formulado RET da lugar en general a una sostenida liberación del activo clorpirifos durante el tiempo post tratamiento cuya cinética se midió por volteo de moscas domésticas o de los cuernos, tanto en vapores como en difusión lateral, sobre diferentes superficies lipofílicas. Como superficies lipofílicas se utilizaron placas de sílica gel fase invertida C18, filmes de cloruro de polivinilo, paños de lana impregnados con estearina y en condiciones de pre campo cueros de conejo mantenidos en intemperie. La liberación de activo vaporizado y/o difundido del formulado RET conteniendo 20 % de clorpirifos sobre esas superficies en función de los tiempos post tratamientos, fue medida por tiempos de volteo 50 % (TV₅₀) en *Musca domestica* o *Haematobia irritans* en comparación con una caravana auricular tomada como referencia que contiene como activos los fosforados diazinón (30%) y clorpirifos (10%). Los resultados de efectos de volteo por activos liberados de ambos formulados en función del tiempo post tratamiento mostraron en general para el formulado RET en las distintas superficies lipofílicas, un perfil de eficiencia volteante residual similar o mejor que la caravana auricular, formulación comercial tomada como referencia.

Teniendo en cuenta los promisorios resultados sobre moscas en los ensayos de liberación de activos y el efecto de volteo sobre superficies lipofílicas, fue de interés explorar la sustitución del fosforado en el formulado RET por algún

compuesto natural más selectivo y de menor impacto ambiental. Para tal fin se evaluaron la composición química y el efecto de volteo sobre mosca de los cuernos de aceites esenciales de 16 especies de *Eucalyptus*. El análisis de los resultados de la composición de los aceites esenciales de *Eucalyptus*, permitió establecer la importancia del 1,8-cineol, *p*-cimeno y el α -pineno como componentes principales. El terpenoide de mayor distribución y más alto contenido en general sobre los aceites de las especies de *Eucalyptus* en estudio en esta tesis fue el 1,8-cineol. Un análisis de la composición de los aceites que mostraron mayor efecto de volteo sobre mosca de los cuernos correspondientes a las especies *E. polybractea*, *E. darlympleana*, *E. smithii*, *E. robertsonii*, *E. badjensis* x *E. nitens*, *E. radiata*, *E. badjensis*, *E. dorrigoensis*, *E. rubida*, *E. resinifera* indicó que los mismos presentaban los mayores contenidos en 1,8-cineol. Este resultado fue corroborado por la medición del TV₅₀ de este monoterpeno, cuyo valor indicó su buen efecto de volteo sobre *H. irritans*. Sobre la base de este resultado se estableció una significativa correlación lineal entre el contenido de 1,8-cineol de los aceites de *Eucalyptus* estudiados y sus efectos de volteo en mosca de los cuernos. Esta correlación indica que el efecto de volteo aumenta a medida que los aceites se enriquecen en 1,8-cineol.

Debido a que la matriz de la formulación RET mostró ser un sistema monolítico interesante para liberar activos, fue de interés evaluar la matriz de la formulación con 1,8-Cineol como insecticida alternativo al clorpirifos, para lo cual se comparó el perfil de toxicidad de ambos activos sobre mosca doméstica. Los resultados indicaron que el clorpirifos presenta una gran eficacia por contacto, mientras que el 1,8-cineol posee su mayor actividad por emisión de vapores dando lugar a un buen efecto de volteo.

A los fines de evaluar el comportamiento del 1,8-cineol en la formulación RET, se midió por efecto de volteo en *H. irritans* la vaporización y difusión lateral del monoterpeno sobre la superficie lipofílica de sílica gel fase invertida C18. La cinética de liberación del 1,8-Cineol como principio activo formulado en matriz RET, mostró una muy rápida emisión inicial de vapores dando lugar a un buen

efecto de volteo a tiempo cero de envejecimiento, pero no se observó ni residualidad de efectividad por vaporización desde el formulado aplicado ni actividad volteante originada en la migración superficial.

Considerando que los ensayos sobre superficies lipofílicas y sobre cuero de conejo de la actividad insecticida inicial y residual de la formulación RET contra mosca doméstica y mosca de los cuernos mostraron un buen funcionamiento del clorpirifos en su perfil de liberación y efectividad, se encaró la realización de ensayos a campo con este activo para evaluar su eficacia real en el control de la mosca de los cuernos en bovinos. El primer ensayo realizado en la temporada 2006/2007 mostró una prolongada efectividad de la formulación RET conteniendo clorpirifos, con una significativa reducción de la población de moscas de los cuernos en las vaquillonas tratadas respecto al grupo control sin tratar, hasta la semana 20 posterior al comienzo del ensayo. Esta residualidad fue mayor a la de la caravana conteniendo clorpirifos y diazinón que se usó como referencia y cuyo efecto significativo de control de mosca de los cuernos se registró hasta la semana 15. El segundo ensayo de campo realizado en la temporada 2008/2009, a pesar que el lugar, los animales y el diseño experimental fueron similares a los del ensayo anterior, la residualidad del control de las poblaciones de mosca de los cuernos en los bovinos tratados con las caravanas insecticidas auriculares impregnadas con 30% de diazinón y 10% clorpirifos y de los tratados con la formulación RET con clorpirifos al 20% fue menor que en el ensayo anterior. La caravana y el formulado RET mostraron un control estadísticamente significativo de las infestaciones de bovinos con mosca de los cuernos hasta la semana 10 y 9 respectivamente.

El análisis estadístico de los resultados de ambos ensayos a campo demostró una gran semejanza en el rendimiento de control de *H. irritans* entre las caravanas auriculares insecticidas comerciales y el formulado RET. En términos generales los resultados sugieren que la residualidad de ambos formulados en el control de mosca de los cuernos en bovinos podría encuadrar en un intervalo entre 9 y 20 semanas.

En síntesis los resultados aquí informados sugieren que el formulado RET puede ser considerado una nueva herramienta útil para el control de ectoparásitos en general y mosca de los cuernos en particular en el ganado vacuno.

Abstract

ÍNDICE

RESUMEN.....	1.	
ABSTRACT.....	6.	
1.-INTRODUCCIÓN		
➤ Mosca de los cuernos (<i>Haematobia irritans</i>):		
▪ Generalidades.....	10.	
▪ Reseña histórica.....	10.	
▪ Biología.....	12.	
▪ Impacto Económico.....	22.	
➤ Insecticidas:		
▪ Clasificación.....	25.	
▪ Principales familias y modos de acción de los insecticidas utilizados en el control de <i>Haematobia irritans</i>	25.	
➤ Clorpirifos.....		33.
➤ Resistencia a insecticidas		
▪ Definición.....	35.	
▪ Manejo de la resistencia a insecticidas.....	35.	
➤ Aceites esenciales como insecticidas.....		36.
▪ Aceites esenciales de <i>Eucalyptus</i>	38.	
▪ El componente 1,8-Cineol.....	39.	
➤ Formulaciones de insecticidas:		
▪ ¿Que es una formulación insecticida?.....	39.	

▪ Diferentes tipos de formulaciones.....	40.
▪ Polímeros como componentes de formulados.....	41.
▪ Componentes principales de formulaciones de liberación controlada.....	41.
▪ Ventajas y limitaciones de la liberación controlada.....	42.
▪ Componentes básicos de dispositivos de liberación controlada.....	43.
▪ Breve descripción de las tecnologías de liberación controlada.....	44.
▪ Factores que influyen en la cinética de liberación del soluto en formulaciones monolíticas de liberación controlada.....	45.
➤ Control químico de mosca de los cuernos (<i>H. irritans</i>):	
▪ Principios activos, formulaciones utilizadas y formas de aplicación.....	46.
▪ Resistencia a insecticidas en <i>H. irritans</i>	48.
▪ Monitoreo de la susceptibilidad-resistencia.....	49.
▪ Aceites esenciales y componentes en control de moscas de los cuernos....	50.
2.- PROPÓSITOS DE ESTE TRABAJO.....	51.
3.-HIPOTESIS.....	53.
4.-MATERIALES Y MÉTODOS	
➤ Desarrollo de un formulado de clorpirifos en matriz de alta viscosidad:	
▪ Componentes sólidos.....	54.
▪ Componentes líquidos.....	54.
▪ Principios activos.....	55.
▪ Standard cromatográficos.....	55.

☞ Aceites esenciales de *Eucalyptus* como insecticidas naturales alternativos para el control de *H. irritans*:

- Material vegetal.....55.
- Extracción de los aceites esenciales.....57.
- Análisis cromatográfico de los aceites esenciales.....58.

☞ Soportes:

- Placas.....58.
- Modelo lipofílico: paño impregnado con estearina.....59.
- Cuero de conejo.....59.

☞ Formulados:

- Criterios de selección de formulados experimentales.....59.
- Preparación de formulaciones experimentales de clorpirifos.....60.
- Preparación de una formulación de 1,8-cineol.....61.
- Estabilidad del formulado por pérdida de peso.....61.

☞ Material Biológico:

- *Musca domestica*.....62.
- *Haematobia irritans*.....63.
- Animales Utilizados en los ensayos de campo.....64.

☞ Análisis estadísticos:

- Tiempo de Volteo 50%.....64.
- Determinación de Dosis Letal 50% (Tópico).....64.
- Correlación entre el contenido de 1,8-cineol de los aceites de *Eucalyptus* y sus respectivos efectos de volteo.....65.
- Diferencias entre tratamientos de campo.....65.

➤ **Bioensayos de laboratorio:**

- Actividad fumigante de los aceites de *Eucalyptus* y sus componentes sobre *H. irritans*.....65.
- Determinación de la dosis letal 50% del clorpirifos y del 1,8-cineol sobre *M. domestica*.....67.
- Efecto del formulado sobre soportes lipofílicos modelo.....68.
 - 1. Efecto insecticida del formulado sobre superficies simples.....69.
 - 2. Modelo lipofílico: paño impregnado con estearina.....70.
 - 3. Bioensayo en cuero de conejo.....71.

➤ **Bioensayos de campo:**

- Estimación de la densidad poblacional de *H. irritans*.....72.
 - 1. Ensayo preliminar sobre bovinos.....72.
 - 2. Ensayo de campo de formulado RET conteniendo clorpirifos en bovinos infestados con *H. irritans*.....73.
- Zona de los ensayos de campo.....76.
- Datos meteorológicos.....76.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

➤ **Desarrollo de un formulado de clorpirifos en matriz de alta viscosidad:**

- Criterio general.....77.
- Evaluación de propiedades fisicoquímicas de formulados experimentales.....77.
- Evaluación de efecto de volteo de insecticida vaporizado y difundido luego de la aplicación de formulados experimentales sobre cuero de conejos....79.
 - Bioensayo en *Musca domestica*.....79.
 - Bioensayo en *Haematobia irritans*.....80.

➤ Caracterización del formulado de alta viscosidad RET:

- Difusión lateral de insecticida luego de aplicación de formulado RET sobre superficies lipofílicas.....84.
 - Aplicación en placa delgada fase reversa y film de PVC – Efecto en *M. domestica*.....84.
 - Aplicación sobre paños de lana impregnados con estearina - Efecto en *M. domestica*.....86.
 - Aplicación sobre cuero de conejo en intemperie - Efecto en *H. irritans*.....89.

➤ Aceites esenciales de *Eucalyptus* como insecticidas naturales alternativos para el control de *Haematobia irritans* en formulado de liberación lenta:

- Rendimiento de la obtención de aceites esenciales de *Eucalyptus*.....92.
- Composición química de los aceites de *Eucalyptus*.....93.
 - *Eucalyptus badjensis*.....93.
 - *Eucalyptus badjensis x nitens*.....95.
 - *Eucalyptus botryoides*.....96.
 - *Eucalyptus darlympleana*.....98.
 - *Eucalyptus dorrigoensis*.....99.
 - *Eucalyptus elata*.....100.
 - *Eucalyptus fastigata*.....101.
 - *Eucalyptus fraxinoides*.....103.
 - *Eucalyptus nobilis*.....104.
 - *Eucalyptus obliqua*.....106.
 - *Eucalyptus polybractea*.....108.
 - *Eucalyptus radiata*.....109.
 - *Eucalyptus resinifera*.....110.
 - *Eucalyptus robertsoni*.....112.
 - *Eucalyptus rubida*.....113.
 - *Eucalyptus smithii*.....115.

▪ Efecto de volteo de aceites esenciales de <i>Eucalyptus</i> sobre <i>H. irritans</i>	117.
➤ 1,8-Cineol como potencial principio activo natural para un formulado en matriz de alta viscosidad :	
▪ Medición de Tiempo de Volteo 50 % y Dosis Letal 50 % del clorpirifos y del 1,8-cineol sobre <i>Musca doméstica</i>	122.
➤ Formulado de 1,8-Cineol en matriz de alta viscosidad:	
▪ Preparación del formulado RET conteniendo 1,8-cineol.....	124.
- Aplicación en placa delgada fase reversa– Efecto en <i>H. irritans</i>	124.
- Aplicación en placa delgada fase reversa– Efecto en <i>M. domestica</i>	125.
▪ Pérdida de peso por vaporización de 1,8-cineol de formulado RET.....	126.
➤ Ensayos a campo del formulado RET conteniendo clorpirifos al 20% como herramienta de control de <i>Haematobia irritans</i> en bovinos:	
▪ Ensayo de campo 2006/2007.....	128.
▪ Ensayo de campo 2008/2009.....	131.
6.- CONCLUSIONES.....	136.
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	140.