

COMPOSICIÓN PESTICIDA A PARTIR DE EXTRACTOS DE TABACO Y AJÍ CHILE

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra en el campo de la agroquímica, específicamente en
5 composiciones pesticidas biodegradables para el control de plagas en cultivos cítricos y de
café.

DESCRIPCION DEL ESTADO DE LA TECNICA

Los productos sintéticos destinados a controlar plagas y enfermedades en los vegetales han
tenido un rol muy marcado en el incremento de la producción agrícola, sin embargo, el uso
10 continuo e indiscriminado de estas sustancias han afectado de manera negativa al medio
ambiente, acumulándose por bioconcentración en los distintos eslabones de la cadena
alimenticia, en el suelo y en el agua.

Los pesticidas pueden convertirse en contaminantes del suelo como consecuencia de su
persistencia después de haber sido aplicados a cultivos, de su lixiviación con agua de
15 esorrentía en tierras tratadas, de fugas accidentales o de la contaminación generada
durante su fabricación. Normalmente, menos de 10% de los pesticidas aplicados alcanzan
su objetivo y el resto se dispersa en el medio ambiente. El hombre puede verse afectado a
través de la cadena trófica o por el agua contaminada con el pesticida o sus productos de
descomposición.

20 A partir de la necesidad de encontrar una nueva alternativa para el control de insectos y
reemplazar los pesticidas sintéticos, aparecen los pesticidas botánicos ofreciendo seguridad
para el medio ambiente y una eficiente opción agronómica. En el estado de la técnica se
describen diferentes insecticidas botánicos que no persisten mucho tiempo en el medio
ambiente. El documento US 20150359229A1 describe una formulación natural de un
25 pesticida a partir de productos botánicos (mezclas de aceites de ajo y ají chile) y una cepa
de hongos entomopatógenos (v.g. *Beauveria bassiana*). La formulación es útil en el
control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) y de otros insectos importantes en
cultivos de maíz y en cultivos de invernadero (flores y verduras).

El documento WO 2008128355A1 divulga una composición pesticida que contiene
30 nicotina derivada del proceso de pirolisis de tabaco en una concentración entre el 3% y
10% p/p útil para el control de plagas del escarabajo de la patata, el cual es resistente a
muchos otros insecticidas. El documento WO 2014126411A1 describe una composición
pesticida que comprende como principios activos una mezcla de aceites cítricos, extracto de
sedimento de café y el extracto de semillas de pimiento que exhibe eficacia insecticida
35 contra grillos topes, pulgones, ácaros, norinjas, detenido Sammy quaker, larvas

gumbaengyi, larvas del gorgojo, orugas gulpari amarillo, polillas, pulgón de la col, cheongbeolre col, hojas de pino y moscas negras.

Si bien en el estado de la técnica se encuentran divulgadas composiciones pesticidas obtenidas a partir de extractos de plantas y aceites naturales, es necesario el desarrollo de nuevas composiciones pesticidas con propiedades biodegradables como una alternativa para sustituir los pesticidas sintéticos en el control de plagas de insectos como *Dysmicoccus Brevipes*, *Dysmicoccus neobrevipes*, *Solenopsis sp*, *Pheidole sp* y *Iridomyrmex sp*. que afectan los cultivos cítricos y de café.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición pesticida que comprende extractos naturales de ají chile y tabaco disueltos en un solvente acuoso o hidroalcohólico. La composición contiene extractos de ají chile y tabaco entre 4,0 y 30,0% (p/p) y se caracteriza por exhibir propiedades biocidas contra las plagas del *Dysmicoccus Brevipes*, *Dysmicoccus neobrevipes*, *Solenopsis sp*, *Pheidole sp* y *Iridomyrmex sp*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Cromatograma del extracto de ají-chile disuelto en agua 15,0% (p/p).

FIG. 2. Cromatograma del extracto de tabaco disuelto en agua 10,0% (p/p).

FIG. 3. Mortalidad de *D.brevipes* con una composición acuosa de la invención.

FIG. 4. Mortalidad de Hormiga con una composición acuosa de la invención.

FIG. 5. Mortalidad de *D.brevipes* con una composición alcohólica de la invención.

FIG. 6. Mortalidad de Hormiga con una composición alcohólica de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las composiciones pesticidas de la invención comprenden, como ingredientes activos, extractos de tabaco y extractos de ají-chile, en iguales o diferentes proporciones y/o concentraciones, incorporados en un vehículo aceptable. La proporción de los extractos en las composiciones puede estar entre 1:0,1 y 1:10, en tanto que concentración de cada uno puede estar entre 1 y 30% (p/p), preferiblemente entre 10 y 20% (p/p). Adicionalmente, las composiciones pesticidas de la invención pueden incluir uno o más aditivos con funciones específicas para mejorar la estabilidad y aumentar su vida útil durante el almacenamiento.

El término “vehículo aceptable”, para efectos de la presente invención, se puede definir como una mezcla de sustancias (v.g. disolventes) capaces de contener los ingredientes activos y los aditivos, sin que se afecte su capacidad para realizar la función deseada. En

una modalidad de la invención, el vehículo aceptable se compone de agua, alcoholes (v.g. metanol, etanol, isopropanol) y mezclas de los mismos.

Como aditivos se incluyen todos aquellos conocidos en el campo técnico, entre los que se pueden mencionar, reguladores de pH, agentes humectantes, modificadores reológicas, emulsionantes, antiespumantes, estabilizantes y agentes de dispersión. La concentración de los aditivos en las composiciones de la invención, bien sea de manera individual o en su conjunto, esta preferiblemente entre 0,01 y 20,0% (p/p), más preferiblemente entre 0,1 y 15,0% (p/p).

Obtención de los extractos de tabaco y ají-chile

El extracto de tabaco de las composiciones de la invención se puede obtener a partir de las hojas de tabaco. Inicialmente se adicionan de hojas de tabaco, preferiblemente picado para mejorar la superficie de contacto, a un recipiente con agua caliente y un modificador de pH (v.g. jabón de tierra) para alcalinizar la solución y favorecer las condiciones de la extracción. Luego, la solución obtenida se deja enfriar y se almacena protegiendo de la luz. Para determinar la concentración de los componentes activos de la solución obtenida se puede acudir a cualquier técnica conocida en la técnica (v.g. cromatografía de gases).

El extracto de ají-chile de las composiciones de la invención se puede obtener a partir de los frutos de ají-chile. Inicialmente se adicionan frutos de ají-chile, preferiblemente machacados para mejorar la superficie de contacto, a un recipiente con agua a temperatura ambiente y un modificador de pH (v.g. jabón de tierra) para alcalinizar la solución y favorecer las condiciones de la extracción. Luego, la solución obtenida se almacena protegiendo de la luz. Para determinar la concentración de los componentes activos de la solución obtenida se puede acudir a cualquier técnica conocida en la técnica (v.g. cromatografía de gases).

Para preparar las composiciones de la invención, primero se define la proporción o concentraciones de cada uno de los extractos y luego se mezcla el extracto de tabaco con el extracto de ají-chile en el vehículo. Posteriormente se adicionan a la mezcla uno a uno los aditivos previamente disueltos en el vehículo con agitación permanente hasta obtener la composición (Tabla 1).

Tabla 1.

Componente	Concentración % (p/p)
Extracto de tabaco	4,0 - 30,0
Extracto de ají-chile	4,0 - 30,0
Vehiculo aceptable	70,0 – 96,0
Aditivos	0,01 - 20,0

Las composiciones de la invención exhiben propiedades biocidas y son útiles para el control de plagas de insectos, entre ellos, *Dysmicoccus Brevipes*, *Dysmicoccus neobrevipes*, *Solenopsis sp*, *Pheidole sp* y *Iridomyrmex sp.*, los cuales afectan los cultivos cítricos y de café.

- 5 Para verificar la acción toxica de las composiciones de la presente invención, se selecciona un cultivo donde se identifique la presencia de *Dysmicoccus Brevipes*, *Dysmicoccus neobrevipes*, *Solenopsis sp*, *Pheidole sp* y *Iridomyrmex sp*, y posteriormente se pueden realizar estudios microbiológicos y fisicoquímicos preliminares para determinar las condiciones y características del suelo y en cual se aplicarán las composiciones pesticidas de la invención.

Trascurrido un tiempo después de la aplicación, se realizan nuevamente estudios en el suelo para compararlos con los iniciales y determinar cambios significativos. Las composiciones pesticidas del presente desarrollo generan un incremento de aproximadamente 4 veces en mohos y levaduras en el suelo. Teniendo en cuenta que los hongos y levaduras participan en la ruptura de las cadenas de los compuestos orgánicos, las composiciones de la invención estabilizan el suelo, por lo que su presencia es benéfica. Es importante resaltar que los hongos y levaduras permiten el control de algunas enfermedades que se presentan en los cultivos, aportando un equilibrio en el ecosistema, el enriquecimiento de biomasa suelo y otorga un fortalecimiento microbiológico en el suelo.

- 20 Los siguientes Ejemplos ilustran la invención, sin estar el concepto inventivo restringido a los mismos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de extractos de tabaco y ají-chile en agua

Para obtener el extracto de tabaco en base agua se sometió a calentamiento 2 litros de agua hasta una temperatura de 95°C y se adicionaron 50gr de jabón de tierra junto con 300gr de hojas de tabaco en trozos. La solución se mantuvo bajo calentamiento constante a una temperatura de 95°C hasta observar un desprendimiento de color negro, se dejó reposar la solución durante 5 horas hasta temperatura ambiente y se refrigeró protegido de la luz.

Para obtener el extracto de ají-chile en base agua, se maceraron 200gr de frutos de ají-chile y 50gr de jabón de tierra y se adicionaron a 2 litros de agua a temperatura ambiente. Posteriormente se refrigeró y almacenó protegido de la luz.

Ejemplo 2: Caracterización de los extractos de tabaco y ají-chile

Extractos obtenidos de acuerdo al Ejemplo 1 se caracterizaron por cromatografía de gases (GC) acoplada a un detector selectivo de masas (MSD), para lo cual se realizó una extracción liquido-liquido por lotes, utilizando diclorometano como solvente de extracción.

Para el proceso de cromatografía se utilizó el cromatógrafo (GC) HP 5890A Series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU), acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) HP-5972, operado en el modo de iones seleccionados (SIM).

La columna empleada en el análisis fue HP-5MS [5%-fenil-poli (metilsiloxano) 30m x 0,25 mm x 0,25µm]. La inyección se realizó en modo splitless con el volumen inyectado de 1µL. Como material de referencia para el extracto de tabaco se utilizó una solución de nicotina (Cat No.8.20877.0100, Merck, Shuchardt OHG, Germany) y para el extracto de ají-chile una solución de capsaicina (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GMBH M2028). Del análisis del cromatograma del extracto de tabaco (FIG.1) y el cromatograma del extracto de ají-chile (FIG.2) se determinó la cantidad de nicotina y capsaicina respectivamente (Tabla 2).

Tabla2.

Componente	Cantidad de ingrediente activo
Solución al 10,0% (p/p) de extracto de tabaco en agua	1356 mg nicotina/kg
Solución al 15,0% (p/p) de extracto tabaco en alcohol	1937 mg nicotina/kg
Solución al 10,0% (p/p) de extracto de ají-chile en agua	1895 mg capsaicina/kg
Solución al 15,0% (p/p) de extracto ají-chile en alcohol	3546 mg capsaicina/kg

Ejemplo 3: Optimización de las proporciones de los componentes activos de la composición pesticida (Nicotina y Capsaicina)

Se aplicó un diseño experimental factorial 2² en el cual se tienen en cuenta dos variables (concentración de Nicotina y Capsaicina) en dos niveles. Los niveles de concentración analizados son máximo (+) y mínimo (-), se determinaron con los pre-ensayos, y se aplicó a cinco extractos de tabaco y ají-chile (5, 10, 15, 20 y 25 % p/p)). Para esto se prepararon diluciones al 0,1%, 0,5%, 1,0%, 10%, 30%, 60% de los extractos y se evaluaron en los bioensayos de toxicología. Se tuvo en cuenta el contenido de nicotina y capsaicina en los extractos (Tabla 4). Los bioensayos realizaron por los métodos propuestos por Barrios Salazar, Cesar 2004¹, para determinar el DI₅₀.

Los pre-ensayos de toxicidad se realizaron evaluando las disoluciones de los cinco extractos de tabaco en adultos de *Dysmicoccus brevipes*, y las disoluciones de los cinco

¹ Barrios Salazar, C. Evaluación del parasitismo de *Heterorhabditis spp* y *Diplogasteritus spp* sobre *Phyllophaga spp*, *Scaptocoris Talpa*, y *Ampedus sppa* nivel de laboratorio e invernadero. Guatemala, 2004, 16p.

extractos de ají-chile en hormigas, para determinar las concentraciones máxima y mínima de cada uno de los compuestos. En los pre-ensayos se empleó agua y etanol como controles, y adicionalmente, un pesticida sintético (v.g. Furadan®²), para un total de 690 pruebas del pre-ensayo.

- 5 Posteriormente se realizaron 60 bioensayos de optimización donde se utilizaron hormigas y cochinillas (*Dysmicoccus brevipes*), colectados del tallo, hojas lanceoladas y raíces de la planta de la piña (*Ananás comosus*) recientemente capturadas de diferentes plantas de piña, pero del mismo cultivo y de forma manual. Se utilizó el método de aspersión, aplicando tres cortas y seguidas salpicaduras de las disoluciones sobre los insectos expuestos, se
10 evaluó la mortalidad entre las 8 y 12 horas posteriores a la aplicación.

Con los resultados de los bioensayos se determinó que a mayor concentración de Nicotina y Capsaicina en los extractos mayor tasa de mortalidad de *Dysmicoccus brevipes* y hormiga respectivamente, de tal manera que los extractos de 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 % (p/p) presentan mejores resultados que las diluciones realizadas a partir de éstos. Los dos
15 solventes aplicados como control no causaron muerte de *Dysmicoccus brevipes* y el pesticida químico evaluado (Furadan®) es efectivo en cualquier concentración evaluada.

Los datos obtenidos en los bioensayos se analizaron por el método de Análisis Probit, el cual tiene una confiabilidad de 95%, ingresando al software las variables: número de individuos expuestos, concentraciones y resultados de la mortalidad en cada fracción de
20 concentraciones estudiadas. De esta manera se determina los valores DL_{50} (Tabla 3) y CL_{50} (Tabla 4), que indican la concentración letal que mata 50% de la población y la dosis que elimina 50% de los individuos estudiados.

Con los resultados obtenidos en el método Probit, se evidencia un alto nivel de toxicidad de la Capsaicina para la hormiga y de la Nicotina para el *D.brevipes*. Teniendo en cuenta la
25 simbiosis identificada entre la hormiga con la *D.brevipes* se evidencia la utilidad de la composición que contenga la mezcla de extractos de tabaco y ají-chile, permitiendo la ruptura de la asociación de estos insectos y posterior muerte del *D. brevipes* bajo la acción del pesticida reivindicado.

² <http://www.pro-agro.com.mx/prods/fmc/fmc18.htm>

Tabla 3. Determinación del Porcentaje del DL₅₀.

Compuesto Activo	Valor % DL ₅₀ (Método Probit)									
	Solvente	Organismo aplicado	1ra		2da		3ra		Promedio	
			10,0 %(p/p)	15,0 %(p/p)	10,0 %(p/p)	15,0 %(p/p)	10,0 %(p/p)	15,0 %(p/p)	10,0%(p/p)	15,0%(p/p)
Ají-chile	Agua	Hormiga	2,10	0,72	1,28	0,18	2,40	0,64	1,92	0,51
	Alcohol	Hormiga	1,36	0,31	0,36	0,14	0,61	0,67	0,77	0,37
Tabaco	Agua	<i>D.brevipes</i>	0,11	0,97	1,87	0,08	0,70	0,94	0,89	0,66
	Alcohol	<i>D.brevipes</i>	2,73	28,93	0,68	12,05	3,50	1,16	2,30	14,04
Pesticida Químico (Furadam®)	Agua	Hormiga	0,59	0,76	0,10	0,52	0,07	1,28	0,25	0,85
	Alcohol	<i>D.brevipes</i>	0,23	0,72	1,30	0,22	0,44	0,38	0,65	0,44

Tabla 4. Determinación del Porcentaje del CL₅₀.

Compuesto Activo	Valor CL ₅₀ (Método Probit) (g/ml)									
	Solvente	Organismo aplicado	1ra		2da		3ra		Promedio	
			10,0 %(p/p)	15,0 %(p/p)	10,0 %(p/p)	15,0 %(p/p)	10,0 %(p/p)	15,0 %(p/p)	10,0% (p/p)	15,0% (p/p)
Ají-chile	Agua	Hormiga	2,10	10,73	1,3	0,18	2,48	0,65	1,96	3,85
	Alcohol	Hormiga	1,35	0,31	0,35	0,14	0,62	0,66	0,77	0,37
Tabaco	Agua	<i>D.brevipes</i>	0,11	0,97	1,75	0,09	0,71	0,95	0,85	0,67
	Alcohol	<i>D.brevipes</i>	2,74	29,01	0,68	12,19	3,27	1,17	2.23	14.12
Pesticida Químico (Furadam)	Agua	Hormiga	0,58	0,75	0,11	0,51	0,08	1,31	0,25	0,85
	Alcohol	<i>D.brevipes</i>	0,23	0,72	1,35	0,22	0,44	0,37	0,67	0,43

Ejemplo 4: Preparación de una composición pesticida

Para preparar las composiciones de la invención, se mezcla el extracto de tabaco con el extracto de ají-chile en el vehículo. Posteriormente se adicionan a la mezcla uno a uno los aditivos previamente disueltos en el vehículo con agitación permanente hasta obtener la composición. Composiciones ejemplares A y B se prepararon de acuerdo con las especificaciones descritas en la (Tablas 5 y 6) y sus propiedades (Tabla 7):

Tabla 5. Composición pesticida A

Componente	(% p/p)
Extracto tabaco	10,0
Extracto ají-chile	13,0
Aditivo modificador pH	2,5
Solvente Agua	74,5

Tabla 6. Composición pesticida B

Componente	(% p/p)
Extracto tabaco	15,0
Extracto ají-chile	20,0
Aditivo modificador pH	1,5
Solvente Alcohol	63,5

Tabla 7. Propiedades de las composiciones

Propiedades	Rango
pH	4,0 y 7,2
Densidad	0,91 y 1,20
Toxicidad D _{L50} (g/L)	0,40 y 5,10

Ejemplo 5: Bioensayos de toxicidad y mortalidad

Para determinar la toxicidad y mortalidad de composiciones pesticidas obtenidas según el Ejemplo 4, se realizó un bioensayo por triplicado, aplicándolo a hormigas y cochinillas

(*Dysmicoccus brevipes*). Para esto se colectaron de forma manual individuos adultos (machos y hembras) del tallo, hojas lanceoladas y raíces de la planta de la piña (*Ananás comosus*) de un cultivo que no había sido tratado con ningún control químico previo.

En cajas petri se agregaron 20 adultos de *Dysmicoccus brevipes* y 20 hormigas y posteriormente se adicionaron 0,5mL de diluciones individuales al 0,1%, 0,5%, 10,0%, 30,0%, 60,0%, 100,0% (p/p) de la composición pesticida. Para determinar la mortalidad se realizó seguimiento cada hora por un periodo de 14 horas para *D.brevipes* (FIG.3) y hormiga (FIG.4) del pesticida en solvente agua y *D.brevipes* (FIG.5) y hormiga (FIG.6) del pesticida en solvente etanol. Con el pesticida de la presente invención se rango de mortalidad para el 100% de los individuos analizados se encuentra entre 4,5 y 8,5 horas.

En este bioensayo se realizó un control negativo con agua destilada y guarapo en ausencia de los ingredientes activos y un control insecticida químico Furadan®. Los solventes aplicados como el control negativo en los bioensayos no causan la muerte de *D.brevipes* mientras se encuentran en agua. Los insectos expuestos al alcohol en prolongado tiempo pueden resultar alterados por el efecto de este solvente, el cual causa el efecto inhibitor de quitina ocasionando daños permanentes en el cascarón hasta la muerte de los individuos. Con estos ensayos se determinó la dosis letal para la eliminación del 50% de los organismos estudiados (DL₅₀) empleando método estadístico Probit (Tabla 8).

Tabla 8. Determinación del DL₅₀

Compuesto	Valor % DL ₅₀ (Método Probit)					
	Solvente	Organismo aplicado	1ra	2da	3ra	Promedio
Pesticida	Agua	<i>D. Brevipes</i>	2,594	0,941	1,705	1,747
		Hormiga	0,145	0,407	0,690	0,414
Pesticida	Alcohol	<i>D. Brevipes</i>	0,855	0,260	0,855	0,66
		Hormiga	4,918	1,782	4,918	3,87

Ejemplo 6: Evaluación del pesticida en cultivo de la piña

Para evaluar el efecto del pesticida en campo, se realizó un estudio microbiológico y fisicoquímico preliminar, con el cual se determinó las condiciones y características del suelo antes de aplicar el tratamiento con composiciones pesticidas obtenidas según el ejemplo 3, el pesticida sintético Furadan® y un control con agua.

En un área de 5m x 5m se trataron con 3 litros de la composición pesticida de la invención y 3 litros de Furadan® por separado, empleando las condiciones de aplicación del tratamiento que realizan por costumbre por los cultivadores de piña. Adicionalmente se tomó un control donde no se aplicó ningún tipo de pesticida. A ocho días de aplicados los tratamientos, se verificó el número de *Dysmicoccus brevipes* y hormigas muertas. Para el realizar el conteo de insectos muertos, se desprendían las plantas y se sacudían vigorosamente sobre el paño negro, considerando que los insectos muertos no podrían

sostenerse y caerían, además se verificó si los insectos que quedaban en la planta tenían signos vitales.

Al finalizar, se valoró el desarrollo de la planta y se analizó nuevamente el suelo un mes después de la aplicación del tratamiento. Se observó la disminución de la coloración roja
5 indicador de la presencia de la Cochinilla en las hojas de las plantas tratadas con la composición pesticida y un aumento significativo de 830 UFC/g a 3280 UFC/g en moho y levaduras. Los resultados se ilustran en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis microbiológico del suelo

Parámetro	Suelo inicial	1 mes después del tratamiento		
		Control	Composición pesticida (Ejemplo 4)	Pesticida sintético (Furadan®)
Recuento de termófilos	<10 UFC /g	<10 UFC /g	<10 UFC /g	<10 UFC/g
Esporas clostridium sulfitos reductoras	40 UFC /g	10 UFC /g	20 UFC /g	10 UFC/g
Mohos y levaduras	830 UFC /g	3480 UFC /g	3280 UFC /g	2150 UFC/g