

## **Composición líquida de proliposomas de agentes fitosanitarios y método para prepararlos.**

### **Campo de la invención**

La invención se refiere a una composición líquida de proliposomas de agentes fitosanitarios y a un proceso para la preparación de la composición.

### **Estado de arte**

Las crecientes preocupaciones sobre la salud y el medio ambiente entre los consumidores y la necesidad de productos libres de químicos han llevado a un aumento en la demanda de productos orgánicos. Actualmente, tanto el mercado como las tendencias sociales obligan a los productores de productos fitosanitarios a buscar productos fitosanitarios ecológicos y sostenibles que no produzcan residuos tóxicos en el medio ambiente y que provengan de fuentes renovables. En el marco del trabajo legislativo en la Unión Europea, se habla cada vez más de la necesidad de reducir la concentración de agentes fitosanitarios de origen sintético empleados o de sustituirlos por sustancias de origen natural. Desgraciadamente, tal estrategia provoca que las dosis de sustancias activas se utilicen al límite de su eficacia y, al mismo tiempo, en grandes cantidades, lo que tiene como consecuencia la promoción del fenómeno de resistencia de los patógenos a una determinada sustancia, así como la reducción de la eficacia de la acción de la sustancia.

Una solución eficaz a este problema parece ser la encapsulación de pesticidas en un vehículo liposómico. El portador de liposomas está hecho de una bicapa lipídica que permite la encapsulación eficiente de sustancias hidrofóbicas. Esta bicapa rodea un núcleo de agua, que puede contener sustancias hidrófilas. Los liposomas nanoportadores son actualmente uno de los principales sistemas de administración de sustancias activas debido a sus ventajas sobre las formulaciones convencionales. Actualmente se utilizan ampliamente como nanoportadores de sustancias activas en productos farmacéuticos, cosméticos y complementos dietéticos.

Las composiciones que contienen liposomas con sustancias activas encerradas en ellos con un tamaño que oscila entre 100 nm y 1000 nm permiten, entre otras cosas, la administración dirigida de la sustancia activa con liberación sostenida, mejorando su estabilidad, reduciendo su toxicidad, aumentando su actividad (lo que se traduce en una reducción de la cantidad de pesticidas utilizados) y mejora de la penetración a través de barreras biológicas tales como, por ejemplo, la capa lipídica de una hoja.

Además, los liposomas están hechos de fosfolípidos, que son 100% biodegradables y compatibles con la superficie de la hoja y, por tanto, seguros para el medio ambiente. Debido a su estructura única de vesículas lipídicas y su pequeño

tamaño - tamaños de hasta unos pocos pm que permiten serpentear entre las células de la hoja, los liposomas pueden penetrar en la hoja, de modo que la sustancia activa no se elimina de la superficie de la hoja, p. ej. por la lluvia. Esto permite utilizar una dosis significativamente reducida del principio activo, que al ser liberado gradualmente de los liposomas actúa sobre las células del hongo que atacan a la planta durante un período de tiempo más largo. Tales propiedades del vehículo liposómico permiten un aumento significativo de la eficacia de la sustancia activa y también pueden permitir una reducción del fenómeno de resistencia a patógenos.

A pesar de todas las ventajas de los liposomas y de los numerosos estudios de investigación sobre su aplicación, no se utilizan mucho como soportes para productos fitosanitarios. Las mayores limitaciones para el uso de liposomas en composiciones pesticidas incluyen: el problema de su estabilidad resultante de la presencia de grandes cantidades de agua en las composiciones de liposomas, la falta de resistencia a temperaturas negativas (transporte y almacenamiento del producto durante el invierno) y limitaciones relacionadas con la concentración máxima de la sustancia activa.

Las composiciones de proliposomas parecen ser la solución a estos problemas. Los proliposomas, es decir, los precursores de liposomas, debido a su bajo contenido de agua o ausencia total de agua, permiten la encapsulación de sustancias activas tanto hidrófobas como hidrófilas manteniendo la estabilidad en almacenamiento y minimizando los inconvenientes resultantes del uso de liposomas. El uso de proliposomas permite la preparación de liposomas sin pérdida del principio activo y sin cambiar las propiedades fisicoquímicas de los liposomas formados a partir de ellos. Una ventaja adicional e igualmente importante de los proliposomas es la facilidad de su preparación y uso, así como la posibilidad de obtener un producto en forma de concentrado que, después de la dilución, da un producto terminado.

En la técnica se conocen formulaciones de proliposomas que contienen agentes fitosanitarios como ingredientes activos.

GB2303791A describe un proceso para producir una solución madre (proliposomal) que es una solución pesticida y que puede usarse eficazmente para la microencapsulación liposomal de un pesticida agrícola mezclando esta solución madre con agua. El método comprende las etapas de: a) mezclar un solvente orgánico (capaz de disolver un pesticida) con lecitina vegetal para formar una solución saturada de lecitina en el solvente en una proporción en volumen de 1:1 o 1:2; b) dejar reposar la solución para separar la porción no disuelta de la solución; c) separar la solución saturada de lecitina de la porción no disuelta para usar adicionalmente la solución saturada en una etapa posterior de mezcla con el pesticida; y d) mezclar el pesticida con una solución saturada de lecitina para formar una solución de pesticida para uso agrícola. Como ya se

mencionó, antes del uso de la solución en la agricultura, además se mezcla con agua para formar liposomas. GB2303791A también describe una formulación pesticida producida según el método definido anteriormente.

AU 1998053619A1, que pertenece al mismo propietario que GB2303791A, se refiere a un desarrollo de la tecnología descrita en GB2303791A, y más específicamente a formulaciones de proliposomas que incluyen pesticidas que contienen boro, preferiblemente borato, y a un proceso para la producción de tales formulaciones. El proceso para la producción de dicha formulación es idéntico al del documento GB2303791A.

El documento WO2013171196A1 se refiere a composiciones liposomales que proporcionan el control de enfermedades fúngicas e infecciones microbianas en alimentos, piensos y productos agrícolas. La divulgación se refiere generalmente a formulaciones de liposomas convencionales, pero en un aspecto de la invención se divulgan composiciones concentradas acuosas y no acuosas (soluciones madre, formulaciones de proliposomas). Luego, estos concentrados se pueden mezclar con agua para formar liposomas. Las composiciones descritas en este documento contienen el ingrediente activo natamicina, pero ventajosamente pueden contener además herbicidas, fungicidas, agentes antibacterianos, insecticidas o nematocidas. Estas composiciones pueden contener lípidos naturales, semisintéticos y sintéticos como lípido responsable de la formación de liposomas. Por ejemplo, contienen fosfolípidos, incluidos, entre otros, lecitina, y específicamente lecitina vegetal o animal, con una pureza inferior al 95%. La lecitina está presente en la composición en una cantidad de 0,02 a 2,0 mg/ml.

US5004611A describe una composición de proliposomas que forma una mezcla homogénea de: (a) al menos un lípido formador de película (por ejemplo, lecitina) preferiblemente en una cantidad del 35-55 % en peso, (b) al menos un líquido no acuoso que consiste en un líquido orgánico miscible en agua, que es un disolvente para el lípido (por ejemplo, glicerol, etanol, propilenglicol, etanol, isopropanol, etilenglicol), preferiblemente en una cantidad de 35-55% en peso, (c) un agente biológicamente activo, variando la relación en peso de lípido a disolvente desde 40:1 a 1:20, y estando presente suficiente agente activo para producir una dosis biológicamente activa del mismo. La composición también puede contener de 5 a 40% de agua. Después de agregar más agua, esta mezcla forma espontáneamente liposomas con un diámetro de 0,1 a 2,5  $\mu$ m, que contienen al menos 2 ml de fase acuosa encapsulada por gramo de lípido. También pueden estar presentes en la composición ingredientes adicionales tales como, por ejemplo, éster de ácido graso y otros. La composición se puede aplicar mediante pulverización. La principal aplicación de las composiciones descritas es farmacéutica, pero el documento US5004611A también menciona la posibilidad de su

uso en el control de insectos y en horticultura.

El objetivo de la presente invención fue desarrollar una composición proliposomal de acción sistémica, que permitiría reducir la dosis de pesticida utilizada aumentando al mismo tiempo su absorción foliar y manteniendo una actividad herbicida y fungicida efectiva, y que se caracterizaría por una buena estabilidad en almacenamiento y durabilidad.

Sorprendentemente se ha descubierto que la composición de la presente invención cumple todos estos requisitos, y muchos otros.

### **Esencia de la invención.**

La presente invención se refiere a una composición líquida de proliposomas de agentes fitosanitarios que contiene:

del 1% al 50% en peso de al menos una sustancia activa,

del 20% al 75% en peso de al menos un lípido,

del 0,1% al 35% en peso de al menos una sustancia auxiliar, incluido al menos un tensioactivo en una cantidad inferior al 15% en peso,

del 20% al 75% en peso de al menos un disolvente orgánico biodegradable, no inflamable y no volátil,

de 0 a 12% en peso de agua o de una solución acuosa de una sal o de una sustancia tampón.

Preferiblemente, la sustancia activa es un herbicida o un fungicida.

Preferiblemente, la al menos una sustancia activa constituye del 5% al 20% en peso de la composición.

Preferiblemente, la relación entre el lípido y la sustancia activa es de 25:1 a 2:1.

Preferiblemente, el lípido comprende del 5% al 99,99% de fosfatidilcolina.

En una realización particularmente preferida de la invención, el lípido es lecitina.

Preferiblemente, el lípido constituye del 20% al 45% en peso de la composición.

Preferiblemente, el al menos un tensioactivo constituye el 3% en peso basado en el peso de la composición.

Preferiblemente, el al menos un tensioactivo se selecciona del grupo que comprende lisofosfolípidos, mono y diglicéridos, polisorbato, spans, alcoholes grasos etoxilados, alcoholes alcoxilados, aminas de ácidos grasos etoxilados, alcanaminas, sulfatos de alquilo, saponinas, ésteres de fosfato alcoxilados, copolímeros de bloque de butilo, y copolímeros de bloques de PEO y PPO.

Más preferiblemente, al menos un tensioactivo se selecciona del grupo que comprende polisorbato 20, una mezcla de alcoholes grasos de cadena larga (C12-15) etoxilados con 3-5 moléculas de óxido de etileno y octilamina.

Preferiblemente, además de al menos un tensioactivo, la composición comprende al menos otra sustancia auxiliar seleccionada del grupo que comprende agentes antiespumantes, antioxidantes y agentes biodegradables, no volátiles y no inflamables que afectan la fluidez de la película lipídica.

Preferiblemente, el disolvente constituye del 20% al 30% en peso de la composición.

Preferiblemente, el disolvente se selecciona del grupo que comprende n-butilpirrolidona, éter monobutílico de etilenglicol, carbonato de propileno, N,N-dimetillactamida, éster metílico del ácido 5-dimetilamino-2-metil-5-oxovalérico.

Preferiblemente, la composición comprende 8% en peso de agua o una solución acuosa de una sal o una sustancia tampón.

La invención también se refiere a un proceso para la preparación de la composición según la invención, en el que, en secuencia:

- a) el lípido se disuelve en un disolvente orgánico biodegradable y se mezcla para obtener una mezcla,
- b) se añade al menos un tensioactivo a la mezcla resultante de la etapa a) mientras se continúa mezclando,
- c) se añade al menos una sustancia activa a la mezcla resultante de la etapa b) mientras se continúa mezclando,
- d) opcionalmente se añade agua o una solución acuosa de una sal o sustancia tampón a la mezcla resultante de la etapa c),
- e) la mezcla obtenida en la etapa d) se mezcla para formar una composición de proliposomas.

### **Ventajas de la invención**

La investigación realizada por los inventores demostró que

- las composiciones de proliposomas según la invención (composiciones según la invención) muestran estabilidad incluso después del almacenamiento en condiciones de estrés,
- la estabilidad de la composición según la invención después de la preparación de una dispersión acuosa de la misma es independiente del tipo de agua

utilizada. Las dispersiones son estables cuando se utilizan tanto agua blanda como dura.

- las composiciones según la invención permiten obtener eficacias de encapsulación de sustancias activas muy elevadas.
- las composiciones según la invención permiten obtener un alto rendimiento de penetración de la sustancia activa en las hojas.
- las composiciones de proliposomas que contienen fungicidas según la invención no causa síntomas fitotóxicos.
- las composiciones de proliposomas que contienen fungicidas según la invención exhibe un efecto fungistático comparable o superior en comparación con las formulaciones de referencia.
- las composiciones de proliposomas que contienen fungicidas según la invención son eficaces contra una amplia gama de patógenos, independientemente de la especie de planta.
- las composiciones de proliposomas que contienen fungicidas según la invención no afectan ni aumentan el tamaño y la calidad del rendimiento del cultivo (masa de mil granos, contenido porcentual de proteína o aceite).

Los estudios *in vitro* han demostrado que la composición de proliposomas obtenida según la invención tiene todas las ventajas de las composiciones de liposomas, es decir, toxicidad reducida, permeabilidad aumentada, tiempo de residencia prolongado de la sustancia activa en la hoja y su liberación prolongada, lo que se traduce en una duración prolongada duración de acción de esta sustancia, y al mismo tiempo no presenta las desventajas características de los liposomas, como problemas de estabilidad y almacenamiento. Los estudios muestran que el uso de dicha composición permite reducir la dosis de pesticida utilizada por hectárea manteniendo el efecto esperado, en comparación con las composiciones clásicas de productos fitosanitarios. Sobre la base de estudios de campo se ha demostrado que en el control de ciertos patógenos, las composiciones proliposomales que contienen fungicidas permiten reducir la dosis del principio activo hasta un 60%, en comparación con el producto de referencia, manteniendo la eficacia. Después de mezclar la composición de proliposomas con agua para obtener una composición de liposomas, se observó que la sustancia activa se encapsula en los liposomas con una eficacia de hasta el 98%, lo que se debe al aumento de la solubilidad, e influye directamente en el aumento de la biodisponibilidad como en comparación con las sustancias libres. Al mismo tiempo, la composición de la presente invención no es más tóxica que la sustancia activa libre.

Otros estudios *in vivo* han demostrado que la composición de la presente invención presenta una mayor penetración foliar en comparación con productos convencionales, por ejemplo, productos disponibles comercialmente de diferente composición (véanse las Tablas 8 y 9). Una mayor penetración de agentes fitosanitarios en la hoja debido al uso de la composición de proliposomas según la invención, y adicionalmente debido al uso de al menos un tensioactivo en su composición, se traduce directamente en una mayor actividad de este agente fitosanitario. Además de que la penetración de la sustancia en la hoja afecta directamente a la biodisponibilidad, una mayor penetración afecta su protección contra factores externos, como la lluvia, cuando está en la superficie de la hoja.

La composición según la presente invención también contribuye a un tiempo de liberación prolongado de la sustancia activa gracias al uso de la composición de proliposomas según la invención. Esto, a su vez, influye directamente en la actividad fungicida y herbicida de las formulaciones desarrolladas. Es importante debido a la posibilidad de infecciones fúngicas secundarias después de la aplicación de fungicida. Además, este tiempo de liberación extendido permite utilizar una menor concentración de producto gracias al mayor tiempo de contacto del fungicida con el hongo.

Gracias a las ventajas antes descritas, la presente solución permitirá reducir la cantidad de pesticidas utilizados en la agricultura de acuerdo con la nueva normativa en conjunto con la estrategia Farm2Fork presentada por la Comisión Europea. La composición elaborada de agentes fitosanitarios permite reducir la dosis de sustancia activa utilizada y aumentar la eficacia biológica de la composición de PPA. Además, gracias al uso de disolventes biodegradables y lecitina como componente principal de las membranas de los liposomas, los proliposomas según la invención serán un vehículo ideal para productos basados en materias primas naturales.

#### **Breve descripción de las figuras del dibujo.**

Sin restringir el alcance de la invención, se ilustran realizaciones en los dibujos adjuntos, en los que:

Figure 1 muestra las composiciones de proliposomas hidratados de la invención en una imagen de microscopía crioelectrónica,

Figure 2 muestra el contenido de difenoconazol en extractos obtenidos con el uso de diferentes solventes.

Figure 3 muestra la cantidad porcentual de difenoconazol en el exterior y en el interior de una hoja tratada con la dispersión de proliposomas que contienen difenoconazol según la invención.

La Figura 4A muestra el efecto de varios herbicidas 23 días después de la

aplicación en las hojas.

- A) el herbicida según la composición del ejemplo 5 a una dosis de 25 g de sustancia activa/ha;
- B) el herbicida Imazamox 40 SL a dosis de 25 g de sustancia activa/ha;
- C) los herbicidas Imazamox 40 SL y según la composición del Ejemplo 5 a una dosis de 25 g de sustancia activa/ha;
- D) los herbicidas Imazamox 40 SL y según la composición del Ejemplo 5 a una dosis de 36 g de sustancia activa/ha.

### **Descripción detallada del invento**

El objeto de la presente invención es una composición líquida de proliposomas dedicada a agentes fitosanitarios del grupo de fungicidas y herbicidas de acción sistémica, y un proceso para la preparación de dicha composición.

#### Composición de proliposomas

La composición líquida de proliposomas según la presente invención incluye en su composición:

- al menos una sustancia activa,
- al menos un lípido que forma liposomas,
- al menos un disolvente orgánico biodegradable,
- al menos una sustancia auxiliar, incluido al menos un tensioactivo,
- opcionalmente agua o una solución acuosa de una sal o sustancia tampón.

Tal composición forma una solución miscible en agua estable y duradera que puede almacenarse y entregarse en el lugar de uso. Antes de su uso, preferiblemente inmediatamente antes de su uso, la composición se mezcla con agua, y después de la hidratación (dilución con agua) se forman espontáneamente vesículas de liposomas con un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$  con una sustancia activa hidrófoba encapsulada en las mismas.

La sustancia activa según la invención está presente en la composición en una cantidad que varía de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% en peso, preferiblemente de aproximadamente 5% a aproximadamente 45%, 40% o 35% en peso, preferiblemente de aproximadamente 5% a aproximadamente 30% o 25% en peso, preferiblemente de aproximadamente 5% a aproximadamente 20% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 % en peso, basado en el peso de la composición. El principio activo puede ser cualquier fungicida o herbicida de

acción sistémica. Fungicidas de ejemplo que pueden constituir sustancias activas según la presente invención: difenoconazol, protioconazol, metconazol, pentiopirad, fenpropidina, piraclostrobina, trifloxistrobina, penconazol y bupirimato. Por otro lado, herbicidas de ejemplo son: fenoxaprop-P-etilo, florasulam, nicosulfurón, amidosulfurón, yodosulfurón, pirloram, clopiralid, pinoxaden, propaquizafop, benfluralin, prosulfocarb, petoxamida, cletodim, picolinafen. Preferiblemente, el principio activo es difenoconazol, protioconazol, clopiralid o imazamox. La composición puede contener al menos una de las sustancias activas mencionadas anteriormente, preferiblemente dos o más sustancias activas.

El lípido formador de liposomas está presente en la composición en una cantidad que varía de aproximadamente 20% a aproximadamente 75% en peso, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 45% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 40% en peso, basado en sobre el peso de la composición. El contenido de lípidos de la composición preferiblemente no excede el 70 % en peso, preferiblemente el 65 % en peso, más preferiblemente el 60% en peso o el 55 o el 50% en peso, y preferiblemente es más del 25% en peso, preferiblemente el 30, 35 o 40% en peso. Dichos lípidos pueden ser lípidos naturales, semisintéticos y sintéticos que contienen de 5% a 99,99% de fosfatidilcolina, preferiblemente de 20% a 99,9% de fosfatidilcolina, más preferiblemente 20% de fosfatidilcolina. Preferiblemente los lípidos formadores de liposomas son fosfolípidos, más preferiblemente lecitina, incluyendo lecitina vegetal o animal. Aún más preferentemente, la lecitina utilizada en la invención es lecitina vegetal, más preferentemente es lecitina de soja.

En una realización preferida, la composición según la invención se caracteriza por una proporción de lecitina a sustancia activa de 25:1 a 2:1, por ejemplo tal como 20:1, 15:1 o 10:1, y más preferiblemente está en el rango de 6:1 a 2:1.

El al menos un disolvente según la invención se usa en la composición en una cantidad de 20% a 75% en peso, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% en peso, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 25 % en peso basado en el peso de la composición. El contenido de lípidos de la composición preferiblemente no excede el 70% en peso, preferiblemente el 65% en peso, más preferiblemente el 60% en peso o el 55 o el 50 % en peso, y preferiblemente es más del 25% en peso, preferiblemente el 30, 35 o 40% en peso. Los disolventes que pueden usarse de acuerdo con la invención son cualquier disolvente orgánico biodegradable, miscible en agua, no inflamable y no volátil en condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente). Su cantidad en la composición es proporcional a la cantidad de lecitina y sustancia activa utilizada, y debe ser lo suficientemente elevada como para disolver ambas sustancias. Los disolventes preferidos incluyen:

éteres, éteres de glicol, lactamas, y son particularmente preferidos: n-butilpirrolidona, éter monobutílico de etilenglicol, carbonato de propileno, N,N-dimetillactamida, éster metílico del ácido 5-dimetilamino-2-metil-5-oxovalérico. Más preferiblemente, el disolvente es éter monobutílico de etilenglicol. Según la invención es posible utilizar un sistema disolvente que contenga dos o más disolventes.

Las sustancias auxiliares según la invención están presentes en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 35% en peso, preferiblemente de 5 a 30% en peso, más preferiblemente de 10 a 25% en peso, o lo más preferiblemente 15% en peso, estando presente preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% en peso.

Preferiblemente, las sustancias auxiliares que pueden incluirse en las composiciones de la invención se seleccionan del grupo que comprende tensioactivos, agentes antiespumantes, antioxidantes o agentes que afectan la fluidez de la película lipídica. Las sustancias auxiliares sirven para aumentar la estabilidad del sistema y mejorar la solubilidad tanto del lípido como de la sustancia activa. Preferiblemente, la composición comprende más de una sustancia auxiliar. Por ejemplo, el glicerol se incluye en la composición como agente que afecta la fluidez de la película lipídica.

Una de las sustancias auxiliares es al menos un tensioactivo comprendido en la composición en una cantidad que no excede el 15%, preferiblemente no excede el 14%, incluso más preferiblemente no excede el 13%, por ejemplo no excede el 12%, de manera particularmente preferida no excede el 11% especialmente no excediendo el 10%, incluso más preferiblemente no excediendo el 9%, especialmente no excediendo el 8%, aún más preferiblemente no excediendo el 7%, especialmente no excediendo el 6%, particularmente preferiblemente de 0,1% a 5% en peso, incluso más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 3% en peso, basado en el peso de la composición. Los tensioactivos son compuestos cuyas moléculas constan de una porción lipófila y otra hidrófila. La porción lipófila del tensioactivo puede contener uno o más residuos de ácidos grasos, residuos de alcoholes grasos de longitud y grado de saturación variables de las cadenas de hidrocarburos, u otros residuos hidrófobos con alta afinidad por las membranas lipídicas, por ejemplo, aromáticos y otros residuos ramificados y grupos cíclicos alquilo. La porción hidrófila del tensioactivo contiene grupos hidroxilo, grupos carboxilo, grupos oxietileno, azúcares, carbohidratos, un residuo de fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina y derivados de los mismos. La presencia de tensioactivos en la composición permite aumentar la fluidez de la membrana lipídica, lo que se traduce en una mayor penetración de los liposomas hidratados a través de las hojas. Además, la presencia de tensioactivos en la composición permite una encapsulación más eficaz del principio activo en liposomas hidratados. A los tensioactivos utilizables según la

invención pertenecen en particular: lisofosfolípidos, mono y diglicéridos, polisorbatos, spans, alcoholes grasos etoxilados, alcoholes alcoxilados, aminas de ácidos grasos etoxilados, alcanaminas, sulfatos de alquilo, saponinas, ésteres de fosfato alcoxilados, bloques de butilo, copolímeros, copolímeros en bloque de PEO y PPO. Preferiblemente el tensioactivo usado según la invención es polisorbato 20, una mezcla de alcoholes grasos de cadena larga (C12-15) etoxilados con 3-5 moléculas de óxido de etileno (disponible comercialmente con el nombre ROKAnol DB5) y octilamina. La composición según la invención puede contener un tensioactivo, preferiblemente comprende dos o más tensioactivos.

Preferiblemente, la composición de la invención también comprende de 0 a aproximadamente 12% en peso, más preferiblemente de 5 a 10% en peso, y lo más preferiblemente aproximadamente 8% en peso de agua o una solución acuosa de una sal, preferiblemente cloruro de sodio o un sistema de amortiguación. La adición de una pequeña cantidad de agua o una solución salina acuosa o un sistema tampón mejora la solubilidad de sustancias hidrófilas y anfifílicas, tales como, por ejemplo, impurezas de lecitina natural, y reduce la viscosidad de los sistemas.

#### Proceso para la preparación de una composición de proliposomas.

La composición de la presente invención se puede preparar sustancialmente mediante cualquier método conocido en la técnica que implique mezclar los ingredientes para lograr la composición objetivo; sin embargo, preferiblemente la composición de la invención se prepara de la siguiente manera:

- a) el lípido se disuelve en un disolvente orgánico biodegradable y se mezcla para obtener una mezcla,
- b) se añade al menos un tensioactivo a la mezcla resultante de la etapa a) mientras se continúa mezclando,
- c) se añade al menos una sustancia activa a la mezcla resultante de la etapa b) mientras se continúa mezclando,
- d) opcionalmente se añade agua o una solución acuosa de una sal o sustancia tampón a la mezcla resultante de la etapa c),
- e) la mezcla obtenida en la etapa d) se mezcla para formar una composición de proliposomas.

Todos los pasos del proceso se llevan a cabo preferiblemente en un único dispositivo o recipiente que permita la mezcla. El proceso de preparación descrito anteriormente no requiere pasos adicionales, lo que reduce el tiempo y los costos de producción, y además no requiere el uso de equipos especializados (por ejemplo,

molinos, homogeneizadores, calibradores, etc.)

Preferiblemente, el proceso según la invención se lleva a cabo a una temperatura elevada, preferiblemente en el intervalo de 20 °C a 70 °C.

Según la invención, el término "aproximadamente" como se usa arriba y abajo debe entenderse como una desviación de +/- 5% del valor indicado, lo que refleja imprecisiones que pueden surgir durante la realización del proceso para la preparación de la composición según la invención, por ejemplo, durante la medición de los ingredientes.

## **Ejemplos**

### **Ejemplo 1. Composición según la invención**

Se mezclaron 40 g de éter monobutílico de etilenglicol y 40 g de glicerol a 60°C. Luego se añadieron 80 g de lecitina de soja (que contiene un 20% de fosfatidilcolina) y, tras su disolución, 4 g de polisorbato 20 y 2 g de una mezcla de alcoholes grasos de cadena larga (C12-15) etoxilados con 3-5 moléculas de Se añadió óxido de etileno (ROKANol DB5). Se añadieron sucesivamente 18 g de difenoconazol mientras se continuaba la agitación a 60°C. Finalmente se añadieron 16 g de una solución acuosa de NaCl al 5%. Después de combinar, se obtuvo una solución viscosa de las sustancias que constituyen la composición.

### **Ejemplo 2. Composición según la invención**

Se mezclaron 28 g de éter monobutílico de etilenglicol y 26 g de glicerol a 60°C. Luego se añadieron 26 g de lecitina de soja (que contiene un 20% de fosfatidilcolina) y, tras su disolución, 2 g de polisorbato 20 y 1 g de una mezcla de alcoholes grasos de cadena larga (C12-15) etoxilados con 3-5 moléculas de Se añadió óxido de etileno (ROKANol DB5). Se añadieron sucesivamente 18 g de difenoconazol mientras se continuaba la agitación a 60°C. Finalmente se añadieron 8 g de una solución acuosa de NaCl al 5%. Después de combinar, se obtuvo una solución viscosa de las sustancias que constituyen la composición.

### **Ejemplo 3. Composición según la invención**

Se mezclaron 40 g de éter monobutílico de etilenglicol y 40 g de glicerol a 60°C. Luego se añadieron 80 g de lecitina de soja (que contiene un 20% de fosfatidilcolina) y, tras su disolución, 4 g de polisorbato 20 y 2 g de una mezcla de alcoholes grasos de cadena larga (C12-15) etoxilados con 3-5 moléculas de Se añadió óxido de etileno (ROKANol DB5). Se añadieron sucesivamente 20 g de protioconazol mientras se continuaba la agitación a 60°C. Finalmente se añadieron 16 g de una solución acuosa de NaCl al 5%. Después de combinar, se obtuvo una solución viscosa de las sustancias

que constituyen la composición.

Ejemplo 4. Composición según la invención

Se mezclaron 42 g de éter monobutílico de etilenglicol y 42 g de glicerol a 60°C. Luego se añadieron 84 g de lecitina de soja (que contiene un 20% de fosfatidilcolina) y, tras su disolución, 4 g de polisorbato 20 y 2 g de una mezcla de alcoholes grasos de cadena larga (C12-15) etoxilados con 3-5 moléculas de Se añadió óxido de etileno (ROKANol DB5). Se añadieron sucesivamente 10 g de clopiralida mientras se continuaba la agitación a 60°C. Finalmente se añadieron 16 g de una solución acuosa de NaCl al 5%. Después de combinar, se obtuvo una solución viscosa de las sustancias que constituyen la composición. Ejemplo 5

Ejemplo 5. Composición según la invención

Se mezclaron 50 g de éter monobutílico de etilenglicol y 50 g de glicerol a 60°C. Luego se añadieron 100 g de lecitina de soja (que contiene un 20% de fosfatidilcolina) y, tras su disolución, 5 g de polisorbato 20 y 1.25 g de una mezcla de alcoholes grasos de cadena larga (C12-15) etoxilados con 3-5 moléculas de Se añadió óxido de etileno (ROKANol DB5). Se añadieron sucesivamente 7 g de octilamina y 16 g de imazamox mientras se continuaba la agitación a 60°C. Después de combinar, se obtuvo una solución viscosa de las sustancias que constituyen la composición.

Ejemplo 6. Composición según la invención

Se mezclaron 43 g de éter monobutílico de etilenglicol y 43 g de glicerol a 60°C. Luego se añadieron 86 g de lecitina de soja (que contiene un 20% de fosfatidilcolina) y, tras su disolución, 4,4 g de polisorbato 20 y 2,2 g de una mezcla de alcoholes grasos de cadena larga (C12-15) etoxilados con 3-5 moléculas de Se añadió óxido de etileno (ROKANol DB5). Se añadieron sucesivamente 22 g de metconazol mientras se continuaba la agitación a 60°C. Finalmente se añadieron 16 g de una solución acuosa de NaCl al 5%. Después de combinar, se obtuvo una solución viscosa de las sustancias que constituyen la composición.

Ejemplo 7. Composición según la invención

Se mezclaron 40 g de éter monobutílico de etilenglicol y 40 g de glicerol a 60°C. Luego se añadieron 79 g de lecitina de soja (que contiene un 20% de fosfatidilcolina) y, tras su disolución, 4 g de polisorbato 20 y 2 g de una mezcla de alcoholes grasos de cadena larga (C12-15) etoxilados con 3-5 moléculas de Se añadió óxido de etileno (ROKANol DB5). Se añadieron sucesivamente 20 g de clopiralida mientras se continuaba la agitación a 60°C. Finalmente se añadieron 16 g de una solución acuosa de NaCl al 5%. Después de combinar, se obtuvo una solución viscosa de las sustancias que constituyen la composición.

En el presente documento, como proliposomas nos referimos a precursores de liposomas que son anhidros o contienen una pequeña cantidad de agua. Como liposomas nos referimos a dispersiones diluidas en agua formadas a partir de proliposomas, que se autoensamblan espontáneamente en vesículas constituidas por una bicapa de fosfolípidos, cerrando un espacio de agua en su interior. En los ejemplos siguientes, cuando sólo se mencionan parámetros o propiedades de las dispersiones acuosas, se hace referencia a liposomas. Por otro lado, cuando se resumen las características, parámetros, propiedades y eficacia tanto de los proliposomas como de sus dispersiones acuosas (liposomas), generalmente escribimos proliposomas.

**Ejemplo 8. Estudio de estabilidad de las composiciones de los Ejemplos 1-5.**

Se estudió la estabilidad de la composición según la invención después de la dilución con agua para obtener liposomas.

*Tabla 1 Resultados del análisis de proliposomas y sus dispersiones acuosas.*

| <b>PARÁMETRO INVESTIGADO</b>                                                         | <b>Unidad</b>        | <b>Proliposomas del Ejemplo 1</b> | <b>Proliposomas del Ejemplo 2;</b> | <b>Proliposomas del Ejemplo 3</b> | <b>Proliposomas del Ejemplo 4</b> | <b>Proliposomas del Ejemplo 5</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Densidad a 20 °C (PA 73 - método del densitómetro de tubo oscilante)</b>          | [g/cm <sup>3</sup> ] | 1,1095                            | 1,1082                             | 1,1187                            | 1,111                             | 1,091                             |
| <b>Contenido de activo (HPLC)</b>                                                    | [g/L]                | 94,1                              | 91,4                               | 111,4                             | 62,8                              | 70,5                              |
| <b>pH del 1% dispersión (MT 75,3)</b>                                                | [unidad de pH]       | 6,4                               | 6,2                                | 6,3                               | 3,3                               | 6,3                               |
| <b>Estabilidad de la dispersión al 1,0 % después de 2 h (agua CIPAC A) (MT 36,2)</b> | [mL]                 | 0                                 | 0                                  | 0                                 | 0                                 | 0                                 |
| <b>Estabilidad de la dispersión al 1,0 % después de 2 h (agua CIPAC D) (MT 36,2)</b> | [mL]                 | 0                                 | 0                                  | Sedimento traza                   | Sedimento traza                   | 0                                 |

Las composiciones son estables después de la dilución con agua, tanto blanda (agua CIPAC A) como dura (agua CIPAC D).

También se observó la formación de liposomas en las composiciones de los Ejemplos 1-5. La imagen de microscopía crioelectrónica (Figura 1) muestra la presencia de liposomas que se forman espontáneamente tras la hidratación de la composición de proliposomas. Son visibles los liposomas hasta la 1  $\mu$ m. La composición permite obtener liposomas unilaminares o multilaminares sin necesidad de una etapa de encolado adicional. La ausencia de cristales/sedimentos en el campo de visión demuestra la alta eficacia de encapsulación de la sustancia activa (ausencia de sustancia activa no atrapada).

#### Ejemplo 9. Estudio de estabilidad de las composiciones de los Ejemplos 6-7.

Se estudió la estabilidad de la composición según la invención después de la dilución con agua para obtener liposomas.

*Tabla 2 Resultados del análisis de proliposomas y sus dispersiones acuosas.*

| PARÁMETRO INVESTIGADO                                                               | Unidad        | Proliposomas del Ejemplo 6   | Proliposomas del Ejemplo 7  |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------|-----------------------------|
|                                                                                     |               |                              |                             |
| <b>GSTOSC (MT 3,3)</b>                                                              | [g/mL]        | 1,0995                       | 1,1289                      |
| <b>Contenido de activo (HPLC)</b>                                                   | [%]           | 10,47                        | 9,75                        |
|                                                                                     | [g/L]         | 115,1                        | 110,1                       |
| <b>pH de la dispersión al 1% (m/v) en agua destilada (MT 75,3)</b>                  | [pH uniforme] | 6,8                          | 2.7                         |
| <b>Estabilidad de la dispersión al 0,5% (v/v);<br/>agua CICAP A; 0,5 h (MT 180)</b> | [mL]          | oi – 0<br>Cr - 0<br>sed - 0  | oi – 0<br>cr – 0<br>sed - 0 |
| <b>Estabilidad de la dispersión al 0,5% (v/v);<br/>agua CICAP A; 2 h (MT 180)</b>   | [mL]          | oi – 0<br>cr – 0<br>sed - 0  | oi – 0<br>cr – 0<br>sed - 0 |
| <b>Estabilidad de la dispersión al 0,5% (v/v);<br/>agua CICAP D; 0,5 h (MT 180)</b> | [mL]          | oi – 0<br>cr - 0<br>sed - tr | oi – 0<br>cr - 0<br>sed - 0 |
| <b>Estabilidad de la dispersión al 0,5% (v/v);<br/>agua CICAP D; 2 h (MT 180)</b>   | [mL]          | oi – 0<br>cr - 0<br>sed - tr | oi – 0<br>cr - 0<br>sed - 0 |
| <b>Estabilidad de la dispersión al 1,0% (v/v);<br/>agua CICAP A; 0,5 h (MT 180)</b> | [mL]          | oi - 0<br>cr - 0<br>sed - 0  | oi - 0<br>cr - 0<br>sed - 0 |
| <b>Estabilidad de la dispersión al 1,0% (v/v);<br/>agua CICAP A; 2 h (MT 180)</b>   | [mL]          | oi – 0<br>cr - 0<br>sed - 0  | oi – 0<br>cr - 0<br>sed - 0 |
| <b>Estabilidad de la dispersión al 1,0% (v/v);<br/>agua CICAP D; 0,5 h (MT 180)</b> | [mL]          | oi – 0<br>cr - 0<br>sed - 0  | oi – 0<br>cr – 0<br>sed - 0 |
| <b>Estabilidad de la dispersión al 1,0%</b>                                         | [mL]          | oi – 0                       | oi – 0                      |

|                                                                         |  |                   |                   |
|-------------------------------------------------------------------------|--|-------------------|-------------------|
| (v/v);<br>agua CICAP D; 2 h (MT 180)                                    |  | cr - 0<br>sed - 0 | cr - 0<br>sed - 0 |
| <b>Clave: oi - aceite, cr - crema, sed - sedimento;<br/>tr - rastro</b> |  |                   |                   |

Las composiciones son estables después de la dilución con agua, tanto blanda (agua CIPAC A) como dura (agua CIPAC D), y a diferentes concentraciones de dispersión.

Ejemplo 10. Ensayos de envejecimiento acelerado para las composiciones del Ejemplo 2 y del Ejemplo 4:

Las composiciones de proliposomas se sometieron a pruebas de envejecimiento acelerado para:

- 7 días a 0 °C
- 14 días a 54 °C
- 56 días a 40 °C

*Tabla 3 Resultados del análisis de proliposomas con difenoconazol (Ejemplo 2) tras ensayos de envejecimiento.*

| PARÁMETRO INVESTIGADO                                    | UNIDAD               | T=0; RT | T=2 semanas;<br>54 °C | T=8 semanas;<br>40 °C |
|----------------------------------------------------------|----------------------|---------|-----------------------|-----------------------|
| DENSIDAD A 20 °C (MÉTODO DENSITÓMETRO DE TUBO OSCILANTE) | [g/cm <sup>3</sup> ] | 1,1082  | 1,1080                | 1,1080                |
| CONTENIDO DE DIFENOCONAZOL (HPLC)                        | [%]                  | 8,25    | 8,14                  | 8,06                  |
|                                                          | [g/L]                | 91,4    | 90,2                  | 89,3                  |
| pH, 1% DISPERSIÓN                                        | [pH uniforme]        | 6,5     | 6,2                   | 6,2                   |

|                                                                                   |      |   |   |                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------|---|---|----------------------|
| <b>(MT 75,3)</b>                                                                  |      |   |   |                      |
| <b>ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN AL 1,0% DESPUÉS DE 2 h (CIPAC AGUAA) (MT 36,2)</b>  | [mL] | 0 | 0 | 0                    |
| <b>ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN AL 1,0% DESPUÉS DE 2 h (CIPAC AGUA D) (MT 36,2)</b> | [mL] | 0 | 0 | Rastros de sedimento |

*Tabla 4 Resultados del análisis de proliposomas con clopiralida (Ejemplo 4) tras ensayos de envejecimiento.*

| <b>PARÁMETRO INVESTIGADO</b>                                                      | <b>UNIDAD</b>        | <b>T=0; RT</b>       | <b>T=2 semanas;<br/>54 °C</b> | <b>T=8 semanas;<br/>40 °C</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>DENSIDAD A 20 °C (MÉTODO DENSITÓMETRO DE TUBO OSCILANTE)</b>                   | [g/cm <sup>3</sup> ] | 1,1110               | 1,1110                        | 1,1094                        |
| <b>CONTENIDO DE CLOPIRALIDA (HPLC)</b>                                            | [%]                  | 5,65                 | 5,63                          | 5,63                          |
|                                                                                   | [g/L]                | 62,8                 | 62,5                          | 61,6                          |
| <b>pH, DISPERSIÓN 1% (TM 75,3)</b>                                                | [unidad de pH]       | 3,3                  | 3,3                           | 3,3                           |
| <b>ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN AL 1,0% DESPUÉS DE 2 h (CIPAC AGUAA) (MT 36,2)</b>  | [mL]                 | 0                    | 0                             | 0                             |
| <b>ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN AL 1,0% DESPUÉS DE 2 h (CIPAC AGUA D) (MT 36,2)</b> | [mL]                 | Rastros de sedimento | Rastros de sedimento          | Rastros de sedimento          |

*Las composiciones son estables cuando se almacenan en condiciones de estrés.*

Ejemplo 11. Eficiencia de encapsulación de difenoconazol para la composición del Ejemplo

Para determinar la eficacia de encapsulación del principio activo en liposomas hidratados, el principio activo no encapsulado se separó de los liposomas mediante tamices moleculares. La eficacia de encapsulación del difenoconazol se midió mediante HPLC y la de los fosfolípidos, mediante espectrofotometría. La eficacia de encapsulación del principio activo se calculó según la fórmula:

$$W = \frac{A_p / F_p}{A_t / F_t}$$

dónde:

$A_p$  - concentración de sustancia activa a partir de la medición [mg/ml];  $F_p$  - concentración de fosfolípidos a partir de la medición [mg/mL];  $A_t$  - concentración teórica de sustancia activa [mg/ml];  $F_t$  - concentración teórica de fosfolípidos [mg/mL],

*Tabla 5 Resultados - valor de absorbancia, concentración de fosfolípidos y difenoconazol y eficiencia de encapsulación para la composición - Ejemplo 1.*

| Absorbancia | Concentración de fosfolípidos a partir de la medición [mg/mL] |      | Concentración teórica de fosfolípidos [mg/mL] | Concentración de difenoconazol a partir de la medición |      | Concentración teórica de difenoconazol [mg/mL] | Eficiencia de encapsulación [%] |
|-------------|---------------------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------|------------------------------------------------|---------------------------------|
| 0,133       | 5,13                                                          | 5,13 | 5,02                                          | 1,05                                                   | 1,05 | 1,05                                           | 98                              |
| 0,12        | 4,9                                                           |      |                                               | 1,05                                                   |      |                                                |                                 |
| 0,134       | 5,17                                                          |      |                                               | 1,04                                                   |      |                                                |                                 |
| 0,138       | 5,32                                                          |      |                                               |                                                        |      |                                                |                                 |

Los resultados de la prueba mostraron eficiencias de encapsulación muy altas de difenoconazol (98%) en liposomas después de la hidratación de la composición de proliposomas del Ejemplo 1. Las altas eficiencias de encapsulación de la sustancia activa se traducirán en una mejor penetración del agente fitosanitario (PPA) en la hoja y, por tanto, en una acción más eficaz del mismo.

#### Ejemplo 12. Estudio de la penetración en la hoja de liposomas que contienen difenoconazol para la composición del Ejemplo 1

Se introdujeron aproximadamente 5 ml de solución tampón A en 6 cámaras Franz termostatzadas cada una (25 °C). Luego se colocó en cada uno de ellos una hoja de manzano. Se aplicaron 500 µl de liposomas que contenían difenoconazol del Ejemplo 1 sobre las hojas en las tres primeras cámaras, y en las tres siguientes fue la solución de

una formulación comercial Tores 250 EC. Se tomaron muestras (200 µl) de cada cámara cada 0, 1, 2, 4, 5 y 24 h, reponiendo la diferencia con tampón A.

*Tabla 6 Composición de muestras sometidas al análisis de penetración.*

| Nombre de la muestra             | Contenido de difenoconazol [g/L] | Dosis                | Soluciones para el análisis |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| <b>Tores 250 EC</b>              | 250                              | 0,2L/ha/600L de agua | 36 mg/100 g de agua         |
| <b>Proliposomas de Ejemplo 1</b> | 90                               | 1,4L/ha/600L de agua | 103 mg/100 g de agua        |

*Tabla 7 Composición de la solución tampón A*

| Composición:          | [g]   |
|-----------------------|-------|
| <b>Agua</b>           | 469,5 |
| <b>Polisorbato 20</b> | 5,0   |
| <b>Ácido cítrico</b>  | 0,5   |
| <b>Metanol</b>        | 25,0  |

Luego, se extrajo el principio activo de las hojas en 4 etapas con:

- agua (lavando la superficie de la hoja)
- etanol (extracción del principio activo adsorbido en la superficie de la hoja)
- hexano (extracción del principio activo que ha penetrado en la capa de la cutícula)
- metanol (extracción del principio activo de las capas más profundas de una hoja cortada)

A las hojas colocadas en tubos de ensayo en cada etapa se les agregaron 5 mL de un solvente determinado. Todo el contenido se agitó durante 60 segundos.

#### Resultados:

*Tabla 8 Cantidad de difenoconazol en fases individuales después de la extracción.*

|  |               |               |               |                  |                  |                  |
|--|---------------|---------------|---------------|------------------|------------------|------------------|
|  | <b>Liposo</b> | <b>Liposo</b> | <b>Liposo</b> | <b>Tores 250</b> | <b>Tores 250</b> | <b>Tores 250</b> |
|--|---------------|---------------|---------------|------------------|------------------|------------------|

|                             | momento<br>s del<br>ejemplo 1<br>- 1 | momentos<br>del<br>Ejemplo 1<br>-2 | momentos<br>del<br>Ejemplo 1<br>-3 | EC-4          | EC-5          | EC-6          |
|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Agua [mg/mL]                | 0                                    | 0,0069<br>9                        | 0,0088<br>4                        | 0,01094       | 0,0065        | 0,00878       |
| Metanol [mg/mL]             | 0,0024<br>7                          | 0,0027<br>5                        | 0,0098<br>9                        | 0,00513       | 0,00789       | 0,0067        |
| Hexano [mg/mL]              | 0,0260<br>7                          | 0,0079<br>5                        | 0,0007<br>7                        | 0             | 0             | 0             |
| Etanol [mg/mL]              | 0,0089<br>9                          | 0,0117<br>2                        | 0,0072<br>3                        | 0,01624       | 0,02575       | 0,01961       |
| Agua + etanol<br>[mg/mL]    | 0,0089<br>9                          | 0,0187<br>1                        | 0,0160<br>7                        | 0,02718       | 0,03225       | 0,02839       |
| hexano + metanol<br>[mg/mL] | 0,0285<br>4                          | 0,0107                             | 0,0106<br>6                        | 0,00513       | 0,00789       | 0,0067        |
| Suma [mg/mL]                | <b>0,0375</b>                        | <b>0,0294</b>                      | <b>0,0267</b>                      | <b>0,0323</b> | <b>0,0401</b> | <b>0,0351</b> |
| Agua + etanol [%]           | 24,0                                 | 63,6                               | 60,1                               | 84,1          | 80,3          | 80,9          |
| Hexano + metanol<br>[%]     | 76,0                                 | 36,4                               | 39,9                               | 15,9          | 19,7          | 19,1          |

Dónde:

- Agua + etanol: la cantidad de sustancia activa que queda en la superficie de la hoja.
- Hexano + metanol: la cantidad de sustancia activa que cruzó la superficie de la hoja.

Los resultados anteriores se muestran además en la Figura 2.

*Tabla 9 Cantidad de difenoconazol permeada al otro lado de la hoja.*

| Tiempo<br>[horas] | Muestra No. | Contenido de difenoconazol<br>[mg/mL] |
|-------------------|-------------|---------------------------------------|
|-------------------|-------------|---------------------------------------|

|          |                                  |              |
|----------|----------------------------------|--------------|
| <b>0</b> | <b>Liposomas del Ejemplo 1-1</b> | No detectado |
|          | <b>Liposomas del Ejemplo 1-2</b> | No detectado |
|          | <b>Liposomas del Ejemplo 1-3</b> | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 4</b>         | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 5</b>         | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 6</b>         | No detectado |
| <b>1</b> | <b>Liposomas del Ejemplo 1-1</b> | No detectado |
|          | <b>Liposomas del Ejemplo 1-2</b> | No detectado |
|          | <b>Liposomas del Ejemplo 1-3</b> | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 4</b>         | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 5</b>         | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 6</b>         | No detectado |
| <b>2</b> | <b>Liposomas del Ejemplo 1-1</b> | No detectado |
|          | <b>Liposomas del Ejemplo 1-2</b> | No detectado |
|          | <b>Liposomas del Ejemplo 1-3</b> | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 4</b>         | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 5</b>         | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 6</b>         | No detectado |
| <b>4</b> | <b>Liposomas del Ejemplo 1-1</b> | No detectado |
|          | <b>Liposomas del Ejemplo 1-2</b> | No detectado |
|          | <b>Liposomas del Ejemplo 1-3</b> | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 4</b>         | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 5</b>         | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 6</b>         | No detectado |
| <b>5</b> | <b>Liposomas del Ejemplo 1-1</b> | No detectado |
|          | <b>Liposomas del Ejemplo 1-2</b> | No detectado |
|          | <b>Liposomas del Ejemplo 1-3</b> | No detectado |
|          | <b>Torres 250 EC - 4</b>         | No detectado |

|           |                                  |              |
|-----------|----------------------------------|--------------|
|           | <b>Torres 250 EC - 5</b>         | No detectado |
|           | <b>Torres 250 EC - 6</b>         | No detectado |
| <b>24</b> | <b>Liposomas del Ejemplo 1-1</b> | No detectado |
|           | <b>Liposomas del Ejemplo 1-2</b> | No detectado |
|           | <b>Liposomas del Ejemplo 1-3</b> | No detectado |
|           | <b>Torres 250 EC - 4</b>         | No detectado |
|           | <b>Torres 250 EC - 5</b>         | No detectado |
|           | <b>Torres 250 EC - 6</b>         | No detectado |

La Figura 3 muestra los resultados de la medición del contenido porcentual de difenoconazol en el exterior y en el interior de la hoja, con:

- Agua + etanol: cantidad de sustancia activa que permaneció en la superficie de la hoja.
- Hexano + metanol - cantidad de sustancia activa que atravesó la superficie de la hoja.

Los resultados obtenidos de la penetración del difenoconazol en la hoja indican claramente una penetración mucho más eficaz de la sustancia activa encerrada en liposomas en comparación con la forma convencional de esta sustancia disponible en el mercado. Tales resultados pueden indicar una penetración mucho mejor de las composiciones según la invención, lo que puede traducirse así en una reducción de las concentraciones/dosis de los agentes fitosanitarios utilizados en condiciones de campo.

#### Ejemplo 13. Estudio de actividad fungistática in vitro para la composición del Ejemplo 1

Estudio de la actividad fungistática contra diversas cepas de hongos patógenos para plantas en medio PDA en condiciones controladas (25 °C) mediante el método de envenenamiento de los sustratos.

Concentración de la sustancia activa en el medio: 200, 20, 5, 2, 1 mg/l.

*Tabla 10 Eficacia de la acción fungistática.*

| Formulación | Concentración de activo (mg/L) | <i>Botritis cinerea</i> | <i>Fusarium oxysporu</i> | <i>Sclerotinia sclerotioru</i> | <i>Alternaria alternata</i> | <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Phoma betae</i> | <i>Venturia inaequalis</i> |
|-------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|----------------------------|
|-------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|----------------------------|

|                                                             |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Proliposomas de<br>Ejemplo 1 95,4 g/L                       | 200. | 100  | 88,0 | 80,6 | 87,4 | -    | 100  | 100 |
| Proliposomas de<br>Ejemplo 1<br>(difenoconazol)<br>95,4 g/L | 20   | 100  | 88,0 | 77,4 | 82,0 | -    | 100  | 100 |
| Proliposomas del<br>ejemplo 1 95,4 g/l                      | 5    | 79,0 | 88,0 | 76,0 | 81,4 | 24,0 | 100  | 100 |
| Proliposomas del<br>ejemplo 1 95,4 g/l                      | 2    | 64,6 | -    | 61,4 | 76,0 | 20,0 | 94,8 | -   |
| Proliposomas del<br>ejemplo 1 95,4 g/l                      | 1    | 63,0 | -    | 51,4 | 62,0 | 16,0 | 85,5 | -   |
| Difenoconazol<br>250 EC<br>(Tores 250 EC -<br>estándar)     | 200  | 100  | 84,0 | 81,0 | 100  | -    | 100  | 100 |
| Difenoconazol<br>250 EC<br>(Tores 250 EC -<br>estándar)     | 20   | 100  | 84,0 | 80,0 | 96,4 | -    | 100  | 100 |
| Difenoconazol<br>250 EC<br>(Tores 250 EC -<br>estándar)     | 5    | 79,8 | 86,0 | 78,6 | 88,0 | 23,0 | 100  | 100 |
| Difenoconazol<br>250 EC<br>(Tores 250 EC -<br>estándar)     | 2    | 68,0 | -    | 72,0 | 78,0 | 15,0 | 94,8 | -   |
| Difenoconazol<br>250 EC<br>(Tores 250 EC -<br>estándar)     | 1    | 63,0 | -    | 57,4 | 62,0 | 12,0 | 85,5 | -   |

Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento lineal del micelio de una especie patógena determinada bajo la acción de las formulaciones en comparación con la combinación de control - colonia de hongos que crece en medio PDA que contiene un disolvente (agua).

Resultados: La composición de proliposomas del Ejemplo 1 mostró un efecto fungistático similar al del estándar Tores 250 EC contra las 7 cepas de hongos patógenos probadas en medio PDA.

Ejemplo 15. Estudio de la fitotoxicidad de composiciones fungicidas contra la colza de invierno en condiciones de invernadero en experimentos en macetas para la composición del Ejemplo 1.

*Tabla 12 Fitotoxicidad de composiciones fungicidas contra la colza de invierno, variedad Gemini.*

| Formulación                | Contenido de difenoconazol en formulación ng/L | Dosis - formulación L/ha - g de activo/ha | Ciudad fitotoxi (evaluación visual) Escala 0-4 | Peso promedio de 1 planta (5 repeticiones) mg/planta | % de masa fresca de control | Reducción del % de masa fresca |
|----------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Proliposomas del Ejemplo 1 | 95,4                                           | 3,14<br>300                               | 0,5 inhibición del crecimiento                 | 873,5                                                | 95,6                        | 4,4                            |
| Proliposomas del Ejemplo 1 | 95,4                                           | 2,36<br>225                               | 0                                              | 892,6                                                | 97,6                        | 3,4                            |
| Proliposomas del Ejemplo 1 | 95,4                                           | 1,57<br>150                               | 0                                              | 894,3                                                | 97,8                        | 2,2                            |
| Tores 250 EC               | 250                                            | 1,2<br>300                                | 0,5 inhibición del crecimiento                 | 886,8                                                | 97,0                        | 3,0                            |
| Tores 250 EC               | 250                                            | 0,9<br>225                                | 0                                              | 897,8                                                | 98,2                        | 1,8                            |
| Tores 250 EC               | 250                                            | 0,6<br>150                                | 0                                              | 920,2                                                | 100,6                       | + 0,6                          |
| Control                    | -                                              | -                                         | 0                                              | 914,1                                                |                             |                                |

\* Escala 0-4; 0 - sin síntomas

Resultados: Para evaluar la fitotoxicidad se utilizaron 3 dosis para cada formulación: la más baja y la más alta recomendada, y se duplicaron teniendo en cuenta las dosis del etiquetado de otro agente comercial que contiene difenoconazol recomendado para su uso con colza contra el oídio. Las dosis para los proliposomas según el ejemplo 1 se calcularon basándose en el contenido de sustancia activa. Después de 7 días del tratamiento, para las combinaciones núms. 1 y 4 (las dosis más altas de ambas formulaciones 300 g de sustancia activa/ha, correspondientes a 1,2 L/ha de Tores 250EC, que es 2,4 veces superior a lo recomendado para la colza de invierno - 0,5 L/ha) se produjo una ligera

inhibición de la Se encontró crecimiento de plantas de colza (puntuación de 0,5 en una escala (0-4)). Esto se tradujo en una ligera disminución del 3-4% en la masa fresca 4 semanas después del tratamiento. No hubo otros síntomas visibles del efecto fitotóxico de las formulaciones contra la colza en el período de 4 semanas después de la aplicación en todos los objetos en dosis más bajas.

Ejemplo 16. Evaluación biológica de la eficacia del fungicida en forma de proliposoma del Ejemplo 1 en el control de Sclerotinia sclerotiorum en colza de invierno

*Tabla 13 Evaluación de fitotoxicidad.*

| No.      | Combinaciones experimentales        | Dosis por ha | Fitotoxicidad |            |           |
|----------|-------------------------------------|--------------|---------------|------------|-----------|
|          |                                     |              | **DAA 7       | **DAA21    | **DAA 38. |
|          |                                     |              | BBCH 72       | BBCH 79-81 | BBCH 85   |
|          |                                     |              | %             | %          | %         |
| 1        | Control                             | -            | 0 a           | 0 a        | 0 a       |
| 2        | Tores 250 EC cone.                  | 1 N          | 0 a           | 0 a        | 0 a       |
| 3        | Proliposomas según la composición 1 | 1 N          | 0 a           | 0 a        | 0 a       |
| 4        | Proliposomas según la composición 1 | 0,5 N        | 0 a           | 0 a        | 0 a       |
| 5        | Proliposomas según composición 1    | 0,2 N        | 0 a           | 0 a        | 0 a       |
| NIR 0,05 |                                     |              | 0,00          | 0,00       | 0,00      |

Control = 0

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 14 El porcentaje de plantas en el área infestada y la efectividad de los fungicidas en la protección de los brotes de colza de invierno contra Sclerotinia sole roti orum (SCLESC).*

| No. | Combinaciones experimentales | Dosis por ha | SCSCL      |
|-----|------------------------------|--------------|------------|
|     |                              |              | **DAA 38   |
|     |                              |              | BBCH 83-85 |

|               |                                     |       | (% área infestada)<br>brotes | % efectividad* |
|---------------|-------------------------------------|-------|------------------------------|----------------|
| 1             | <b>Control</b>                      | -     | 62,80 a                      | ---            |
| 2             | <b>Tores 250 EC cone.</b>           | 1 N   | 49,80 b                      | <b>21</b>      |
| 3             | Proliposomas según la composición 1 | 1 N   | 29,80 c                      | <b>53</b>      |
| 4             | Proliposomas según la composición 1 | 0,5 N | 34,20 c                      | <b>46</b>      |
| 5             | Proliposomas según la composición 1 | 0,2 N | 54,70 ab                     | <b>13</b>      |
| NIR 0,05 6,97 |                                     |       |                              |                |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott \*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 15 Rendimiento de semillas de colza de invierno*

| No.           | Combinaciones experimentales        | Dosis por ha | Producción* |               |
|---------------|-------------------------------------|--------------|-------------|---------------|
|               |                                     |              | t/ha        | % vs. control |
| 1             | <b>Control</b>                      | -            | 3,63 b      | 100           |
| 2             | <b>Tores 250 EC</b>                 | 1 N          | 4,35 a      | 120           |
| 3             | Proliposomas según composición 1    | 1 N          | 4,43 a      | 122           |
| 4             | Proliposomas según la composición 1 | 0,5 N        | 4,31 a      | 119           |
| 5             | Proliposomas según la composición 1 | 0,2 N        | 3,92 b      | 108           |
| NIR 0,05 0,35 |                                     |              |             |               |

\* el rendimiento de grano se recalculó a 9% de humedad

*Tabla 16 Masa de mil semillas*

| No. | Combinaciones experimentales        | Dosis por ha | Masa de mil semillas |               |
|-----|-------------------------------------|--------------|----------------------|---------------|
|     |                                     |              | g                    | % vs. control |
| 1   | <b>Control</b>                      | -            | 5,35 c               | 100           |
| 2   | <b>Tores 250 EC</b>                 | 1 N          | 4,73 ab              | 109           |
| 3   | Proliposomas según la composición 1 | 1 N          | 4,92 a               | 113           |
| 4   | Proliposomas según la composición 1 | 0,5 N        | 4,75 ab              | 109           |

|                |                                     |       |         |     |
|----------------|-------------------------------------|-------|---------|-----|
| 5              | Proliposomas según la composición 1 | 0,2 N | 4,55 bc | 105 |
| NIR 0,05 10,25 |                                     |       |         |     |

#### Conclusiones:

1. No se observó ningún efecto fitotóxico del fungicida ensayado según la composición del Ejemplo 1 en las dosis de 0,2 N, 0,5 N y 1 N, y del agente comparativo Tores 250 EC en la dosis de 1 N sobre plantas de colza de invierno, variedad Architect se encontró.
2. El fungicida ensayado según la composición del ejemplo 1 en dos dosis más altas y el agente comparativo Tores 250 EC inhibieron significativamente el desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas de colza de invierno.
3. Dos dosis más altas del fungicida probado según la composición del Ejemplo 1 inhibieron el desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum* al mismo nivel. La eficacia de su acción fue significativamente mayor que la del agente comparativo Tores 250 EC, con una reducción simultánea de la dosis del principio activo incluso a la mitad.
4. La superficie de plantas de colza de invierno infestadas por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* en la combinación experimental con la dosis más baja del fungicida ensayado fue sólo ligeramente menor que en el control. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.
5. Los rendimientos obtenidos y las masas de mil granos de colza de invierno reflejaron el nivel de control de *Sclerotinia sclerotiorum*. Se encontró un aumento significativo en el rendimiento usando dos dosis más altas del fungicida ensayado según la composición del Ejemplo 1 y el agente comparativo Tores 250 EC. La mayor masa de mil semillas se registró después de la aplicación de la dosis más alta del fungicida ensayado según la composición del Ejemplo 1.

Ejemplo 17. Efecto herbicida de los herbicidas Imazamox 40 SL y la composición según el Ejemplo 5 23 días después de la aplicación sobre las hojas (especies de malas hierbas: avena sorda, hierba de ganso, cuartos de cordero, bleo áspero, charlock, bolsa de pastor, cereales de siembra espontánea: cebada, trigo)

Un experimento en maceta sobre un sustrato de suelo en condiciones de invernadero (temperatura del aire durante la vegetación: 18-28 °C).

Aplicación sobre hojas de plantas indicadoras de 18 días de edad en la fase 1-3 de la hoja propia.

Evaluación realizada entre 7 y 21 días después de la aplicación.

*Tabla 17 Efecto herbicida del herbicida en forma de proliposoma respecto a Imazamox 40 SL. Evaluación 7 días después de la aplicación.*

| Formulación                         | Dosis g de act./ha | Trigo                       | Cebada | Avena sorda | Hierba de ganso | Cuartos de cordero | Cenizo áspero | Planta de campos | Shepherd' s<br>purse | Promedio para sp. |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------------------|--------|-------------|-----------------|--------------------|---------------|------------------|----------------------|-------------------|
|                                     |                    | Control de hierbas malas, % |        |             |                 |                    |               |                  |                      |                   |
| Proliposomas según la composición 5 | 48                 | 50                          | 55     | 55          | 55              | 55                 | 55            | 55               | 70                   | 56,25             |
| Proliposomas según la composición 5 | 36                 | 40                          | 40     | 40.         | 40              | 40                 | 40            | 40               | 55                   | 41,88             |
| Proliposomas según la composición 5 | 25                 | 30                          | 30     | 30          | 30              | 30                 | 30            | 30               | 40                   | 31,25             |
| Imazamox 40 SL                      | 48                 | 55                          | 60     | 55          | 55              | 55                 | 55.           | 55               | 70                   | 57,5              |
| Imazamox 40 SL                      | 36                 | 40                          | 40     | 40          | 40              | 40                 | 40            | 40               | 55                   | 41,88             |
| Imazamox 40 SL                      | 25                 | 30                          | 30     | 30          | 30              | 30                 | 30            | 30               | 40                   | 31,25             |
| CONTROL                             | 0                  | 0                           | 0      | 0           | 0               | 0                  | 0             | 0                | 0                    | 0                 |

*Tabla 17a. Evaluación 15 días después de la aplicación.*

| Formulación                         | Dosis g de activo/ha | Trigo                       | Cebada | Avena sorda | Hierba de ganso | cuartos de cordero | Cenizo áspero | Planta de campos | Shepherd' s<br>purse |
|-------------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------|-------------|-----------------|--------------------|---------------|------------------|----------------------|
|                                     |                      | Control de hierbas malas, % |        |             |                 |                    |               |                  |                      |
| Proliposomas según la composición 5 | 48                   | 95                          | 92     | 90          | 90              | 100                | 100           | 100              | 100                  |
| Proliposomas según la composición 5 | 36                   | 75                          | 66     | 98          | 68              | 100                | 100           | 85               | 100                  |

|                                     |    |    |     |    |    |     |     |    |     |
|-------------------------------------|----|----|-----|----|----|-----|-----|----|-----|
| Proliposomas según la composición 5 | 25 | 58 | 66  | 84 | 67 | 100 | 100 | 52 | 100 |
| Imazamox 40 SL                      | 48 | 90 | 100 | 96 | 88 | 100 | 100 | 98 | 100 |
| Imazamox 40 SL                      | 36 | 92 | 100 | 92 | 70 | 100 | 100 | 82 | 100 |
| Imazamox 40 SL                      | 25 | 88 | 90  | 88 | 80 | 100 | 10  | 70 | 100 |
| CONTROL                             | 0  | 0  | 0   | 0  | 0  | 0   | 0.  | 0  | 0   |

*Tabla 17b. Evaluación 23 días después de la aplicación.*

| Formulación                         | Dosis g de act./ha | Trigo                       | Cebada | Avena sorda | Hierba de ganso | Cuartos de Cordero | Cenizo áspero | Planta de campos | Shepherd' s purse | Promedio para sp. |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------------------|--------|-------------|-----------------|--------------------|---------------|------------------|-------------------|-------------------|
|                                     |                    | Control de hierbas malas, % |        |             |                 |                    |               |                  |                   |                   |
| Proliposomas según la composición 5 | 48                 | 95                          | 95     | 95          | 88              | 100                | 100           | 100              | 100               | 96,63             |
| Proliposomas según la composición 5 | 36                 | 70                          | 70     | 80          | 68              | 100                | 100           | 88               | 100               | 84,5              |
| Proliposomas según la composición 5 | 25                 | 65                          | 80     | 70          | 65              | 100                | 100           | 61               | 100               | 80,13             |
| Imazamox 40 SL                      | 48                 | 98                          | 100    | 98          | 90              | 100                | 100           | 100              | 100               | 98,25             |
| Imazamox 40 SL                      | 36                 | 95                          | 100    | 94          | 70              | 100                | 100           | 98               | 100               | 94,63             |
| Imazamox 40 SL                      | 25                 | 92                          | 90     | 95          | 70              | 100                | 100           | 70               | 100               | 89,63             |
| CONTROL                             | -                  | 0                           | 0      | 0           | 0               | 0                  | 0             | 0                | 0                 | 0                 |

El efecto anterior también se ilustra en las Figuras 4A-E, donde:

- La Figura 4A muestra el efecto del herbicida en forma de proliposomas (Ejemplo 5) 23 días después de la aplicación sobre las hojas a una dosis de 25 g de sustancia activa/ha (control a la izquierda, muestra de prueba a la derecha),
- La Figura 4B muestra el efecto del herbicida Imazamox 40 SL 23 días después de su aplicación sobre las hojas a una dosis de 25 g de sustancia activa/ha (control a la izquierda, muestra de prueba a la derecha).
- La Figura 4C muestra el efecto de los herbicidas Imazamox 40 SL y la composición del Ejemplo 5 23 días después de la aplicación sobre las hojas a una dosis de 25 g de sustancia activa/ha (Imazamox 40 SL a la izquierda,

composición del Ejemplo 5 a la derecha).

- La Figura 4D muestra el efecto de los herbicidas Imazamox 40 SL y la composición del Ejemplo 5 23 días después de la aplicación sobre las hojas a una dosis de 36 g de sustancia activa/ha (Imazamox 40 SL a la izquierda, composición del Ejemplo 5 a la derecha),
- La Figura 4E muestra el efecto de los herbicidas Imazamox 40 SL y la composición del Ejemplo 5 23 días después de la aplicación sobre las hojas a una dosis de 48 g de sustancia activa/ha (Imazamox 40 SL a la izquierda, composición del Ejemplo 5 a la derecha).

**Resultados:** Los resultados preliminares del estudio de la composición herbicida del Ejemplo 5 indican un efecto herbicida más débil en los cereales de auto-siembra en comparación con el estándar Imazamox 40 SL en las dos dosis más bajas de 36 y 25 g de sustancia activa/ha. Después de 7 días de aplicación, la actividad de ambas composiciones fue similar para todas las especies de prueba, las diferencias aparecieron después de 15 días. Con la dosis más alta de 48 g de sustancia activa/ha no se encontraron diferencias significativas en la acción de ambos herbicidas.

*Tabla 20 Fitotoxicidad de la composición herbicida del Ejemplo 5 para la planta cultivable: soja (variedades: Aldana, Érica). La dosis de la formulación en g de sustancia activa/ha: 36 g (mínimo), 48 g (máximo), 96 (duplicado). Experimento en macetas, condiciones de invernadero.*

| No. | Formulación                         | Contenido de activo en la formulación. | Dosis<br>gramos de activo/ha | Fitotoxicidad<br>Evaluación visual (Escala 0-4) |     |    |    |
|-----|-------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------|-----|----|----|
|     |                                     |                                        |                              | 9 días después de la aplicación.                | 14  | 21 | 28 |
| 1   | Proliposomas según la composición 5 | 70.5 g/L                               | 96                           | 0,5-1 clorosis                                  | 0,5 | 0  | 0  |
| 2   | Proliposomas según la composición 5 | 70.5 g/L                               | 48                           | 0                                               | 0   | 0  |    |
| 3   | Proliposomas según la composición 5 | 70.5 g/L                               | 36                           | 0                                               | 0   | 0  | 0  |
| 4   | Imazamox 40SL                       | 40 g/L                                 | 96                           | 0,5-1 clorosis                                  | 0,5 | 0  | 0  |

|   |               |        |    |   |   |   |   |
|---|---------------|--------|----|---|---|---|---|
| 5 | Imazamox 40SL | 40 g/L | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | Imazamox 40SL | 40 g/L | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | Control       |        |    | 0 | 0 | 0 | 0 |

Resultados: Una semana después de la aplicación de ambas formulaciones en las dosis más altas (el doble de la dosis recomendada), apareció una ligera decoloración clorótica amarillenta en las hojas de las plantas de soja de ambas variedades, que persistió hasta aproximadamente 15-16 días después de la aplicación. No se encontraron otros daños durante la temporada de crecimiento.

*Tabla 22 Eficacia herbicida de la formulación de proliposomas del Ejemplo 5 contra la bolsa de pastor (Capsella bursa-pastoris)*

| Formulación               | Contenido de activo en la formulación | Dosis<br>g de activo/ha | % erradicación                                      |    |     |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|----|-----|
|                           |                                       |                         | Tiempo de evaluación, días después del tratamiento. |    |     |
|                           |                                       |                         | 7                                                   | 14 | 21  |
| Proliposomas de Ejemplo 5 | 70,5g/L                               | 48                      | 68                                                  | 82 | 94  |
| Proliposomas de Ejemplo 5 | 70,5g/L                               | 36                      | 57                                                  | 61 | 70  |
| Proliposomas de Ejemplo 5 | 70,5g/L                               | 25                      | 43                                                  | 52 | 55  |
| Imazamox 40 SL            | 40g/L                                 | 48                      | 84                                                  | 97 | 100 |
| Imazamox 40 SL            | 40g/L                                 | 36                      | 66                                                  | 94 | 98  |
| Imazamox 40 SL            | 40g/L                                 | 25                      | 60                                                  | 80 | 82  |
| Control                   | -                                     | -                       | 0                                                   | 0  | 0   |

Resultados: El efecto herbicida de los proliposomas con imazamox en la dosis más alta después de 21 días fue comparable al de Imazamox 40 SL (94 y 100%, respectivamente), pero para el producto de referencia ese resultado se obtuvo antes, después de 14 días. En dosis más bajas de 36 y 25 g de sustancia activa/ha, el efecto de los proliposomas fue aproximadamente un 27% más débil que el del estándar. El efecto herbicida máximo de Imazamox 40 SL en cada concentración se obtuvo después de 14 días, mientras que el efecto de los proliposomas aumentó gradualmente durante un período de tiempo más largo

hasta los 21 días después de la aplicación.

*Tabla 26 Eficacia herbicida del preparado según la composición 5 contra la cebada de primavera (autosiembra)*

| Formulación                         | Contenido de act. en formulación | Dosis g de act./ha | % erradicación                                      |    |    |     |
|-------------------------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------|----|----|-----|
|                                     |                                  |                    | Tiempo de evaluación, días después del tratamiento. |    |    |     |
|                                     |                                  |                    | 11                                                  | 23 | 30 | 42  |
| Proliposomas según la composición 5 | 70,5g/L                          | 48                 | 20                                                  | 66 | 84 | 96  |
| Proliposomas según la composición 5 | 70,5g/L                          | 36                 | 15                                                  | 30 | 40 | 55  |
| Proliposomas según la composición 5 | 70,5g/L                          | 25                 | 10                                                  | 20 | 25 | 30  |
| Imazamox 40 SL                      | 40g/L                            | 48                 | 30                                                  | 85 | 99 | 100 |
| Imazamox 40 SL                      | 40g/L                            | 36                 | 20                                                  | 65 | 85 | 95  |
| Imazamox 40 SL                      | 40g/L                            | 25                 | 10                                                  | 55 | 65 | 86  |
| Control                             | -                                | -                  | 0                                                   | 0  | 0  | 0   |

Resultados: El efecto herbicida de los proliposomas en la dosis más alta contra la cebada después de 42 días fue bueno, comparable al de Imazamox 40 SL (96 y 100%, respectivamente). El herbicida probado en dosis más bajas mostró una eficacia mucho menor. A una dosis de 36 g/ha, la efectividad de los proliposomas e Imazamox fue del 55 y 95%, respectivamente, y a una dosis de 25 g/ha, la efectividad fue del 30 y 86%.

Ejemplo 19. Fitotoxicidad del herbicida SNS H 01 19 (Ejemplo 5) para plantas cultivables - soja

*Tabla 31 Fitotoxicidad del herbicida en forma de proliposoma para la planta cultivable soja variedad Viola. Experimentos en macetas en condiciones de invernadero. Fase de desarrollo durante la aplicación: inicio -2 verticilos. 5 repeticiones x 9 plantas = 45 plantas para 1 combinación*

| Formulación                         | Contenido de act. en formulación | Dosis               | Fitotoxicidad (evaluación visual, escala 0-9)* |                                                                             |         |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------|
|                                     |                                  | g de act./ha        | días después del tratamiento                   |                                                                             |         |
|                                     |                                  |                     | 7 días                                         | 12 días                                                                     | 23 días |
| Proliposomas según la composición 5 | 70,5g/L                          | 96<br>duplicado     | 1<br>clorosis de las hojas superiores)<br>10%  | 0                                                                           | 0       |
| Proliposomas según la composición 5 | 70,5g/L                          | 48<br>recomendado   | 0,5<br>clorosis de las hojas superiores<br>5%  | 0                                                                           | 0       |
| Proliposomas según la composición 5 | 70,5g/L                          | 36<br>recomendado   | 0                                              | 0                                                                           | 0       |
| Imazamox 40 SL                      | 40g/L                            | 96<br>(duplicado)   | 1<br>clorosis de hojas superiores) 10 %        | 0,5<br>Clorosis en hojas apicales jóvenes.<br>2. inhibición del crecimiento |         |
| Imazamox 40 SL                      | 40g/L                            | 48<br>(recomendado) | 0,5<br>clorosis de las hojas superiores<br>5%  | 0,15<br>clorosis muy leve en hojas apicales jóvenes                         | 0       |
| Imazamox 40 SL                      | 40g/L                            | 36<br>(recomendado) | 0                                              | 0                                                                           | 0       |
| Control                             | -                                | -                   | 0                                              | 0                                                                           | 0       |

\* escala 0-9 (0 - sin síntomas de fitotoxicidad, 9 - destrucción de la planta)

Resultados: Al cabo de 5-7 días desde la aplicación de ambas formulaciones a las dosis más altas (doblas, 96 g de principio activo/ha y 48 g de principio activo/ha), color ligeramente amarillento apareció una decoloración clorótica en las hojas de las plantas de soja Viola. En las plantas rociadas con la composición según el ejemplo 5, la decoloración

desapareció alrededor del día 10-11, mientras que en las rociadas con Imazamox 40 permaneció hasta aproximadamente 15-16 días después de la aplicación, luego desapareció. No se encontraron otros daños durante la temporada de crecimiento en los objetos restantes. Bajo la influencia de Imazamox 40 SL, se inhibió el crecimiento de las plantas de soja a partir del 12º día (en un 14%) hasta el final de la observación - hasta el 23º día después de la aplicación, lo que también se reflejó en una menor masa: una reducción de aproximadamente el 20%.

*Tabla 32 El efecto del herbicida en forma de proliposomas sobre el crecimiento y desarrollo de la planta cultivable - soja, variedad Viola. Experimentos en macetas bajo condiciones de invernadero. Fase de desarrollo durante la aplicación: inicio -2 verticilos. 5 repeticiones x 9 plantas = 45 plantas para 1 combinación*

| Formulación                         | Contenido del act. en formulación | Dosis g de act./ha | Altura de las plantas (promedio) 12 días después del tratamiento. |                |             | Altura de las plantas (promedio) 23 días después del tratamiento. |              |             | Masa fresca de plantas 23 días después del tratamiento. |              |             |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|-------------|-------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|---------------------------------------------------------|--------------|-------------|
|                                     |                                   |                    | cm                                                                | % de control I | Reducción % | cm                                                                | % de control | Reducción % | g/planta                                                | % de control | Reducción % |
| Proliposomas según la composición 5 | 70,5 g/L                          | 96                 | 51,1                                                              | 99,4           | 0,6         | 65,5                                                              | 0            | 0           | 2,583                                                   | 96,2         | 3,8         |
| Proliposomas según la composición 5 | 70,5 g/L                          | 48                 | 52,6                                                              | 102,3          | +2,3        | 66,1                                                              | 100,9        | +0,9        | 2,615                                                   | 97,4         | 2,6         |
| Proliposomas según la composición 5 | 70,5 g/L                          | 36                 | 54,4                                                              | 105,8          | +5,8        | 68,6                                                              | 104,7        | +4,7        | 2,596                                                   | 96,6         | 3,4         |
| Imazamox 40 SL                      | 40g/L                             | 96                 | 44,6                                                              | 86,8           | 13,2        | 56,5                                                              | 86,3         | 13,7        | 2,153                                                   | 80,2         | 19,8        |
| Imazamox 40 SL                      | 40g/L                             | 48                 | 47,2                                                              | 91,8           | 8,2         | 64,8                                                              | 98,9         | 1,1         | 2,566                                                   | 95,5         | 4,5         |

|                |       |    |      |       |      |      |      |     |       |      |     |
|----------------|-------|----|------|-------|------|------|------|-----|-------|------|-----|
| Imazamox 40 SL | 40g/L | 36 | 52,2 | 101,6 | +1,6 | 64,3 | 98,2 | 1,8 | 2,612 | 97,2 | 2,8 |
| Control        | -     | -  | 51,4 | -     | -    | 65,5 | -    | -   | 2,686 | -    | -   |

Ejemplo 20. Evaluación biológica de la eficacia de los proliposomas que contienen difenoconazol (Ejemplo 1) en el control del oídio (*Blumeria graminis* (*Erysiphe graminis*)), roya parda (*Puccinia recondita*), septoriosis rayada de las hojas de trigo (*Mycosphaerella graminicola* (anam. *Zymoseptoria tritici*)) en trigo de invierno, variedad Zyta.

*Tabla 33 Fitotoxicidad*

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | Fitotoxicidad                                               | Fitotoxicidad                                                | Fitotoxicidad                                                   | Fitotoxicidad                                                 |
|---------------------|------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
|                     |                              |       | **DAA 7<br>(después del primer tratamiento)<br>BBCH 37<br>% | **DAA 21<br>(después del primer tratamiento)<br>BBCH 45<br>% | **DAA 8<br>(después del segundo tratamiento)<br>BBCH 58-59<br>% | **DAA 18<br>(después del segundo tratamiento)<br>BBCH 69<br>% |
| 1                   | Control                      | -     | 0 ac                                                        | 0 a                                                          | 0 a                                                             | 0 a                                                           |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 0 a                                                         | 0 a                                                          | 0 a                                                             | 0 a                                                           |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,8 N | 0 a                                                         | 0 a                                                          | 0 a                                                             | 0 a                                                           |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,6 N | 0 a                                                         | 0 a                                                          | 0 a                                                             | 0 a                                                           |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,4 N | 0 a                                                         | 0 a                                                          | 0 a                                                             | 0 a                                                           |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 0 a                                                         | 0 a                                                          | 0 a                                                             | 0 a                                                           |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       | .                                                           | .                                                            | .                                                               | .                                                             |

control = 0

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 34 El porcentaje promedio de infestación de la superficie foliar y la efectividad de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra el mildiú polvoriento - *Blumeria graminis* ERYSGR.*

| No. | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 21<br>BBCH 45 |                |
|-----|------------------------------|-------|---------------------|----------------|
|     |                              |       | % L-4               | % efectividad* |
| 1   | Control                      | -     | 5,50 a              | —              |

|                     |                            |       |        |     |
|---------------------|----------------------------|-------|--------|-----|
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol | 1 N   | 0,00 d | 100 |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol | 0,8 N | 0,00 d | 100 |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol | 0,6 N | 0,50 c | 91  |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol | 0,4 N | 1,25 b | 77  |
| 6                   | Dafne 250 CE               | 1 N   | 0,00 d | 100 |
| NIR 0,05 (LSD 0,05) |                            |       | 0,43   |     |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 35 El porcentaje medio de infestación de la superficie foliar y la eficacia de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra la septoriosis rayada de las hojas de trigo - Zymoseptoria tritici SEPTTR*

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 21<br>(después del primer tratamiento) |                | **DAA 39<br>(después del primer tratamiento)<br>**DAA 18<br>(después del segundo tratamiento) |                | **DAA 39<br>(después del primer tratamiento)<br>**DAA 18<br>(después del segundo tratamiento) |                | **DAA 49<br>(después del primer tratamiento)<br>**DAA 28<br>(después del segundo tratamiento) |                | **DAA 49<br>(después del primer tratamiento)<br>**DAA 28<br>(después del segundo tratamiento) |                |
|---------------------|------------------------------|-------|----------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
|                     |                              |       | BBCH 45                                      |                | BBCH 69                                                                                       |                | BBCH 69                                                                                       |                | BBCH 75-77                                                                                    |                | BBCH 75-77                                                                                    |                |
|                     |                              |       | % infestación superficial de L-4             | % efectividad* | % infestación superficial de L-3                                                              | % efectividad* | % infestación superficial de L-2                                                              | % efectividad* | % infestación superficial de L-2                                                              | % efectividad* | % infestación superficial de L-1                                                              | % efectividad* |
| 1                   | Control                      | -     | 7,38 a                                       | —              | 14,94 a                                                                                       | —              | 5,06 a                                                                                        | —              | 35,31 a                                                                                       | —              | 13,00 a                                                                                       | —              |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 1 N   | 3,56 b                                       | 52             | 5,94 d                                                                                        | 60             | 0,00 d                                                                                        | 100            | 18,44 d                                                                                       | 48             | 5,31 d                                                                                        | 59             |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 0.8 N | 4,81 b                                       | 35             | 6,81 cd                                                                                       | 54             | 0,75 cd                                                                                       | 85             | 19,06 d                                                                                       | 46             | 7,38 bcd                                                                                      | 43             |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 0.6 N | 4,94 b                                       | 33             | 7,31 bc                                                                                       | 51             | 1,25 bc                                                                                       | 75             | 23,13 bc                                                                                      | 35             | 8,19 bc                                                                                       | 37             |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 0.4 N | 6,81 a                                       | 8              | 8,19 b                                                                                        | 45             | 1,94 b                                                                                        | 62             | 25,38 b                                                                                       | 28             | 9,75 b                                                                                        | 25             |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 4,75 b                                       | 36             | 6,63 cd                                                                                       | 56             | 1,38 bc                                                                                       | 73             | 21,13 cd                                                                                      | 40             | 6,31 cd                                                                                       | 51             |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       | 1,40                                         |                | 1,27                                                                                          |                | 1,03                                                                                          |                | 2,78                                                                                          |                | 2,39                                                                                          |                |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 36 El porcentaje promedio de infestación de la superficie foliar y la efectividad de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra la roya parda - Puccinia recondita*

PUCCRE.

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) |                | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) |                |
|---------------------|------------------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
|                     |                              |       | BBCH 75-77                                                                              |                | BBCH 75-77                                                                              |                |
|                     |                              |       | % superficie infestación de L-2                                                         | % efectividad* | % superficie infestación de L-1                                                         | % efectividad* |
| 1                   | Control                      | -     | 5,00 a                                                                                  | —              | 8,63 a                                                                                  | —              |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 0,00 c                                                                                  | 100            | 0,00 c                                                                                  | 100            |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,8 N | 0,00 c                                                                                  | 100            | 0,63 c                                                                                  | 93             |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,6 N | 0,00 c                                                                                  | 100            | 0,88 bc                                                                                 | 90             |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,4 N | 1,81 b                                                                                  | 64             | 1,88 b                                                                                  | 78             |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 0,00 c                                                                                  | 100            | 0,00 c                                                                                  | 100            |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       | 0,49                                                                                    |                | 1,01                                                                                    |                |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

Tabla 37 Zona verde preservada de trigo de invierno

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 49 (después del primer tratamiento) **DAA 28 (después del segundo tratamiento) BBCH 75-77 |
|---------------------|------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                              |       | %<br>L-2 L-1                                                                                    |
| 1                   | Control                      | -     | 31,25 b                                                                                         |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 50,00 a                                                                                         |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,8 N | 47,50 a                                                                                         |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,6 N | 37,50 b                                                                                         |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,4 N | 35,00 b                                                                                         |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 50,00 a                                                                                         |
| NIR 0,05 (LSD 0,05) |                              |       | 8,91                                                                                            |

Tabla 38 Contenido de masa fresca, rendimiento de grano, masa de mil granos, contenido de proteína - de trigo de invierno

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | Contenido de masa fresca |                    | Producción* |                    | Masa de mil granos |                    | % de proteína de masa seca |                    |
|---------------------|------------------------------|-------|--------------------------|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
|                     |                              |       | kg                       | % frente a control | t/ha        | % frente a control | g                  | % frente a control | % de Masa seca             | % frente a control |
| 1                   | Control                      | -     | 10,21 a                  | 100                | 6,8 a       | 100                | 42,20 a            | 100                | 10,09 a                    | 100                |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 10,34 a                  | 101                | 6,95 a      | 101                | 42,15 a            | 100                | 10,09 a                    | 100                |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,8 N | 10,68 a                  | 105                | 7,18 a      | 105                | 42,40 a            | 100                | 10,36 a                    | 103                |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,6 N | 10,56 a                  | 103                | 7,15 a      | 104                | 42,31 a            | 100                | 9,85 a                     | 98                 |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0,4 N | 10,69 a                  | 105                | 7,22 a      | 105                | 42,50 a            | 101                | 10,05 a                    | 100                |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 10,50 a                  | 103                | 7,10 a      | 103                | 42,50 a            | 101                | 10,38 a                    | 103                |
| NIR 0,05 (LSD 0,05) |                              |       | 0,89                     |                    | 0,60        |                    | 0,73               |                    | 0,74                       |                    |

\* el rendimiento de grano se recalculó a 15% de humedad

#### Resultados:

Durante la primera aplicación realizada en la fase de desarrollo de la planta cultivable BBCH 32-33, se observaron síntomas de infestación por el hongo *Zymoseptoria tritici*, causante de la septoriosis rayada de las hojas de trigo, en las hojas inferiores de trigo de invierno variedad Zyta, a un nivel del 10% del área foliar infestada. Por otra parte, la infestación por *Blumeria graminis*, causante del oídio, se situó en un nivel del 3%. Tres semanas después de la primera aplicación se realizó un segundo tratamiento en la fase de desarrollo BBCH 45 de la planta cultivable; en ese momento se observó que las plantas estaban infestadas en la hoja L-4 por *Zymoseptoria tritici* y *Blumeria graminis*. La infestación en los pequeños campos de control (en lo sucesivo también denominados el control) fue en promedio del 7,38% y el 5,5%, respectivamente. La eficacia de los fungicidas probados tres semanas después de la primera aplicación fue del 77-100% en el caso del oídio, mientras que en el caso de la septoriosis rayada de las hojas de trigo fue del 8-52% (Tabla 34, Tabla 35).

Aproximadamente tres semanas después de la segunda aplicación, se observó septoriosis rayada en las hojas superiores con una intensidad de aproximadamente el 15 % en la hoja L-3 y aproximadamente el 5 % en la hoja L-2 en los pequeños campos de control. La efectividad de los fungicidas probados fue: 45-60% en la hoja L-3 y 62-100% en la hoja L-2. El agente comparativo inhibió el desarrollo de la enfermedad en un 56% en la hoja L-3 y en un 73% en la hoja L-2 (Tabla 35).

Durante la evaluación realizada en la fase de desarrollo BBCH 75-77 del trigo de invierno variedad Zyta, se observó la aparición de enfermedades como septoriosis rayada de las

hojas y roya parda en la hoja subbandera L-2 y en la hoja bandera L-1 a un nivel de 35,31% y 13% en el caso de *Zymoseptoria tritici*, y 5% y 8,63% en el caso de *Puccinia recondita*, respectivamente. La eficacia de la composición probada del Ejemplo 1 osciló entre 25 y 59 % para la septoriosis rayada de las hojas de trigo y entre 64 y 100 % para la roya parda. Por otro lado, el agente comparativo Daphne 250 EC inhibió el desarrollo de septoriosis rayada de hojas en la hoja L-2 en un 40% y en la hoja L-1 en un 51%, mientras que el desarrollo de roya parda fue inhibido en un 100% en tanto las hojas L-2 como L-1 (Tabla 35, Tabla 36).

En la fase de desarrollo BBCH 75 de las plantas, el área verde de las hojas de la subbandera L-2 y de la bandera L-1 fue mayor para todas las combinaciones probadas en comparación con el control (Tabla 37).

El rendimiento de grano, la masa de mil granos y el contenido porcentual de proteína estuvieron en el mismo nivel para todas las combinaciones experimentales probadas (Tabla 38).

Conclusiones:

1. En el experimento realizado no se encontraron síntomas de acción fitotóxica del fungicida en forma de proliposomas en diferentes dosis ni del agente estándar Dafne 250 EC en plantas de trigo de invierno de la variedad Zyta.
2. Los proliposomas probados aplicados en dosis de 0,8 N y 1 N mostraron una efectividad del 100% en la reducción de la aparición de *Blumeria graminis* en la hoja L-4, estando en el nivel del agente comparativo Dafne 250 EC (1 N).
3. El fungicida investigado en forma de proliposomas en dosis de 0,8 N y 1 N aplicado contra *Zymoseptoria tritici* tuvo un mejor rendimiento que el agente comparativo Dafne 250 EC.
4. Los proliposomas probados utilizados en las dosis de 0,6 N, 0,8 N y 1 N mostraron una eficacia del 100 % para reducir la aparición de *Puccinia recondita* en la hoja L-2, estando en el nivel del agente comparativo Dafne 250 EC (1 N).
5. Se observó un aumento en el área de la hoja verde (GLA) después de la aplicación del agente proliposomal estudiado en todas las dosis probadas y del agente comparativo Dafne 250 EC, en comparación con el control.
6. El uso de proliposomas y Dafne 250 EC, independientemente de la dosis empleada, no afectó el tamaño y la calidad (masa de mil granos, porcentaje de contenido de proteína) del rendimiento del trigo de invierno, variedad Zyta.

Ejemplo 21. Evaluación biológica de la eficacia de los proliposomas que contienen difenoconazol (Ejemplo 1) en el control del oídio (*Blumeria graminis* (*Erysiphe graminis*), *septoriosis* rayada de las hojas de trigo (*Mycosphaerella graminicola* (anam. *Zymoseptoria tritici*)) en trigo de invierno, variedad Arkadia.

*Tabla 39 Fitotoxicidad.*

| No.                 | Combinaciones experimentales  | Dosis | Fitotoxicidad                               | Fitotoxicidad                               | Fitotoxicidad                                | Fitotoxicidad                                  |
|---------------------|-------------------------------|-------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                     |                               |       | **DAA 7<br>(después del primer tratamiento) | **DAA21<br>(después del primer tratamiento) | **DAA 29<br>(después del primer tratamiento) | **DAA A 36<br>(después del primer tratamiento) |
|                     |                               |       |                                             |                                             | **DAA 8<br>(después del segundo tratamiento) | **DAA 15<br>(después del segundo tratamiento)  |
|                     |                               |       | BBCH 37-39                                  | BBCH 49-53                                  | BBCH 59-61                                   | BBCH 69                                        |
|                     |                               |       | %                                           | %                                           | %                                            | %                                              |
| 1                   | Control                       | -     | 0 a                                         | 0 a                                         | 0 a                                          | 0 a                                            |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 0 a                                         | 0 a                                         | 0 a                                          | 0 a                                            |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0,8 N | 0 a                                         | 0 a                                         | 0 a                                          | 0 a                                            |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0,6 N | 0 a                                         | 0 a                                         | 0 a                                          | 0 a                                            |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0,4 N | 0 a                                         | 0 a                                         | 0 a                                          | 0 a                                            |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 0 a                                         | 0 a                                         | 0 a                                          | 0 a                                            |
| NIR 0,05 (LSD 0,05) |                               |       |                                             |                                             |                                              |                                                |

control = 0

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 40 El porcentaje promedio de infestación de la superficie foliar y la efectividad de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra el mildiú polvoriento - Blumeria graminis ERYSGR.*

| No. | Combinaciones experimentales  | Dosis | **DAA21 (después de la primera aplicación) |                | **DAA 36 (después de la primera aplicación)<br>**DAA 15 (después de la segunda aplicación) |                |
|-----|-------------------------------|-------|--------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
|     |                               |       | BBCH 49-53                                 |                | BBCH 69                                                                                    |                |
|     |                               |       | % superficie infestación de L-4            | % efectividad* | % superficie infestación de L-2                                                            | % efectividad* |
| 1   | Control                       | -     | 7.81 a                                     | —              | 5.31 a                                                                                     | —              |
| 2   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 0,50 c                                     | 94             | 0.00 d                                                                                     | 100            |
| 3   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0,8 N | 2,44 b                                     | 69             | 0.56 cd                                                                                    | 89             |
| 4   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0,6 N | 2,63 b                                     | 66             | 1.44 c                                                                                     | 73             |
| 5   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0,4 N | 3,44 b                                     | 56             | 2.44 b                                                                                     | 54             |

|                     |              |     |         |    |        |     |
|---------------------|--------------|-----|---------|----|--------|-----|
| 6                   | Dafne 250 CE | 1 N | 1.63 be | 79 | 0.00 d | 100 |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |              |     | 1.79    |    | 0.96   |     |

\*\*eficacia calculada mediante la fórmula de Abbott"

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 41 El porcentaje promedio de infestación de la superficie foliar y la efectividad de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra la septoriosis rayada de las hojas de trigo - Zymoseptoria tritici SEPTTR.*

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA21 (después del primer tratamiento) |                | **DAA 36 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 15 (después del segundo tratamiento) |                | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) |                | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) |                |
|---------------------|------------------------------|-------|------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
|                     |                              |       | BBCH 49-53                               |                | BBCH 69                                                                                 |                | BBCH 69                                                                                 |                | BBCH 75-77                                                                              |                |
|                     |                              |       | % infestación superficial de L-4         | % efectividad* | % infestación superficial de L-2                                                        | % efectividad* | % infestación superficial de L-1                                                        | % efectividad* | % infestación superficial de L-1                                                        | % efectividad* |
| 1                   | Control                      | -     | 6.38 a                                   | —              | 20.94 a                                                                                 | —              | 5.38 a                                                                                  | —              | 21.38 a                                                                                 | —              |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 2.75 b                                   | 57             | 9.00 c                                                                                  | 57             | 2.06 b                                                                                  | 62             | 6.88 c                                                                                  | 68             |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 3.81 b                                   | 40             | 11.19 bc                                                                                | 47             | 2.50 b                                                                                  | 53             | 8,56 bc                                                                                 | 60             |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.6 N | 4.25 b                                   | 33             | 12.69 b                                                                                 | 39             | 2.81 b                                                                                  | 48             | 10,19 b                                                                                 | 52             |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 5.75 a                                   | 10             | 13.38 b                                                                                 | 36             | 3.25 b                                                                                  | 40             | 10,94 b                                                                                 | 49             |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 3.25 b                                   | 49             | 14.19 b                                                                                 | 32             | b                                                                                       | 50             | 8,06 bc                                                                                 | 62             |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       | 1.40                                     |                | 2.99                                                                                    |                | 1.33                                                                                    |                | 2.90                                                                                    |                |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 42 Zona verde preservada de trigo de invierno.*

| No. | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) BBCH 75-77 % |
|-----|------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | Control                      | -     | 10.00 d                                                                                              |
| 2   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 25.00 ab                                                                                             |
| 3   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 23.75 abc                                                                                            |
| 4   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.6 N | 22.50 bc                                                                                             |

|                     |                           |       |         |
|---------------------|---------------------------|-------|---------|
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol | 0.4 N | 21.25 c |
| 6                   | Dafne 250 CE              | 1 N   | 26.25 a |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                           |       | 3.25    |

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 43 Contenido de masa fresca, rendimiento de grano, masa de mil granos, contenido de proteína - de trigo de invierno.*

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | Contenido de masa fresca |                    | Producción* |                    | Masa de mil granos |                    | % de proteína de masa seca |                    |
|---------------------|------------------------------|-------|--------------------------|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
|                     |                              |       | kg                       | % frente a control | t/ha        | % frente a control | g                  | % frente a control | % de masa seca             | % frente a control |
| 1                   | Control                      | -     | 7.13 a                   | 100                | 4.81 a      | 100                | 37.81 a            | 100                | 10.98                      | 100                |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 7.14 a                   | 100                | 4.84 a      | 101                | 37.86 a            | 100                | 10.62                      | 97                 |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 7.91 a                   | 111                | 5.34 a      | 111                | 38.40 a            | 102                | 10.84                      | 99                 |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.6 N | 7.65 a                   | 107                | 5.17 a      | 108                | 39.74 a            | 105                | 10.49                      | 96                 |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 7.75 a                   | 109                | 5.23 a      | 109                | 39.01 a            | 103                | 10.53                      | 96                 |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 7.13 a                   | 96                 | 4.62 a      | 96                 | 37.88 a            | 100                | 10.85                      | 99                 |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       | 1.94                     |                    | 1.31        |                    | 2.40               |                    | 1.10                       |                    |

\* el rendimiento de grano se recalculó a 15% de humedad

## Resultados:

Durante la primera aplicación realizada en la fase de desarrollo BBCH 32-33 de la planta cultivable, se observaron síntomas de infestación por el hongo *Zymoseptoria tritici*, causante de la septoriosis rayada de las hojas de trigo, en las hojas inferiores de trigo de invierno variedad Arkadia, a un nivel del 15% del área foliar infestada. Por otra parte, la infestación por *Blumeria graminis*, causante del oídio, se situó en un nivel del 4%. Tres semanas después de la primera aplicación se realizó un segundo tratamiento en la fase de desarrollo BBCH 49-53 de la planta cultivable; en ese momento la infestación de las plantas en los pequeños campos de control en la hoja L-4 por *Zymoseptoria tritici* era del orden del 6,38%, y la infestación de las plantas en los pequeños campos de control en la hoja L-4 por *Blumeria graminis* fue del orden del 7,81%. La efectividad de los fungicidas probados tres semanas después de la primera aplicación fue de 56-94% en L-4 en el caso del oídio, mientras que en el caso de la septoriosis rayada de las hojas de trigo fue de 10- 57% (Tabla 40, Tabla 41).

Aproximadamente dos semanas después de la segunda aplicación, se observó mildiú polvoriento en las hojas superiores con una intensidad de aproximadamente el 5% en L-2 en los pequeños campos de control. La efectividad del fungicida probado, dependiendo de la dosis empleada, fue del 54-100% en la hoja L-2. El agente comparativo inhibió la enfermedad al 100% en la hoja L-2. Por otro lado, la septoriosis rayada de las hojas ocurrió con una intensidad de aproximadamente el 21% en la hoja L-2 y aproximadamente el 5% en la hoja L-1 en los pequeños campos de control. La efectividad del fungicida probado, dependiendo de la dosis empleada, fue del 36-57% en la hoja L-2, mientras que fue del 40-62% en la hoja L-1. El agente comparativo inhibió el desarrollo de la enfermedad en un 32% en la hoja L-2 y en un 50% en la hoja L-1 (Tabla 40, Tabla 41).

Durante la evaluación realizada en la fase de desarrollo BBCH 75-77 del trigo de invierno variedad Arkadia, la ocurrencia de septoriosis rayada de hojas en la hoja bandera L-1 fue de 21,38%. La eficacia de la composición de prueba del Ejemplo 1 osciló entre 49 y 68% en L-1 (Tabla 41).

En la fase de desarrollo BBCH 75-77 de las plantas, el área verde de la hoja bandera L-1 fue mayor para todas las combinaciones probadas en comparación con el control (Tabla 42).

#### Conclusiones:

1. En el experimento realizado no se encontraron efectos fitotóxicos del fungicida en forma de proliposomas en diferentes dosis ni del agente estándar Dafne 250 EC en plantas de trigo de invierno de la variedad Arkadia.
2. La eficacia de la formulación de proliposomas contra *Blumeria graminis* comparable a la del agente estándar se demostró para la dosis 1 N.
3. Los proliposomas probados aplicados dos veces en dosis de 0,8 N y 1 N redujeron la aparición de *Zymoseptoria tritici* al nivel del agente estándar Dafne 250 EC.
4. Se observó un aumento significativo en el área de la hoja verde (GLA) después de la aplicación del agente proliposomal estudiado en todas las dosis probadas y del agente comparativo Dafne 250 EC, en comparación con el control.
4. En los pequeños campos tratados con proliposomas, independientemente de la dosis empleada, se observó un aumento medio significativo del rendimiento y de la masa de mil semillas, en comparación con los pequeños campos de control.

Ejemplo 22. Evaluación biológica de la eficacia de proliposomas que contienen difenoconazol (Ejemplo 1) en el control del oídio (*Blumeria graminis* (*Erysiphe graminis*)), roya parda (*Puccinia recondita*), mancha amarilla de la hoja (*Pyrenophora tritici-repentis*), septoriosis rayada del trigo hojas (*Mycosphaerella graminicola* (anam. *Zymoseptoria tritici*)) en trigo de invierno de la variedad Tobak.

Tabla 44 Fitotoxicidad.

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | Fitotoxicidad                            | Fitotoxicidad                             | Fitotoxicidad                             | Fitotoxicidad                               |
|---------------------|------------------------------|-------|------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                     |                              |       | **DAA 7 (después del primer tratamiento) | **DAA 14 (después del primer tratamiento) | **DAA 29 (después del primer tratamiento) | **DAA A 36 (después del primer tratamiento) |
|                     |                              |       |                                          |                                           | **DAA 8 (después del segundo tratamiento) | **DAA 15 (después del segundo tratamiento)  |
|                     |                              |       | BBCH 37                                  | BBCH 45-47                                | BBCH 59                                   | BBCH 61                                     |
|                     |                              |       | %                                        | %                                         | %                                         | %                                           |
| 1                   | Control                      | -     | 0 a                                      | 0 a                                       | 0 a                                       | 0 a                                         |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 0 a                                      | 0 a                                       | 0 a                                       | 0 a                                         |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 0 a                                      | 0 a                                       | 0 a                                       | 0 a                                         |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.6 N | 0 a                                      | 0 a                                       | 0 a                                       | 0 a                                         |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 0 a                                      | 0 a                                       | 0 a                                       | 0 a                                         |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 0 a                                      | 0 a                                       | 0 a                                       | 0 a                                         |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       |                                          |                                           |                                           |                                             |

control = 0

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

Tabla 45 El porcentaje promedio de infestación de la superficie foliar y la efectividad de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra el mildiú polvoriento - *Blumeria graminis* ERYSGR.

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 21 (después del primer tratamiento) |                 | **DAA 21 (después del primer tratamiento) |                 | **DAA A 36 (después del primer tratamiento) **DAA 15 (después del segundo tratamiento) |                 | **DAA A 36 (después del primer tratamiento) **DAA 15 (después del segundo tratamiento) |                 |
|---------------------|------------------------------|-------|-------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
|                     |                              |       | BBCH 45-47                                |                 | BBCH 45-47                                |                 | BBCH 61                                                                                |                 | BBCH 61                                                                                |                 |
|                     |                              |       | % infestación de superficie de L-4        | % efectividad * | % infestación de superficie de L-3        | % efectividad * | % infestación de superficie de L-3                                                     | % efectividad * | % infestación de superficie de L-2                                                     | % efectividad * |
| 1                   | Control                      | -     | 14.00 a                                   | —               | 5.13 a                                    | —               | 21.56 a                                                                                | —               | 6.75 a                                                                                 | —               |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 1.56 d                                    | 89              | 0.38 b                                    | 93              | 4.50 d                                                                                 | 79              | 0.81 b                                                                                 | 88              |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 2.69 d                                    | 81              | 0.44 b                                    | 91              | 7.19 cd                                                                                | 67              | 1.44 b                                                                                 | 79              |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.6 N | 5.44 be                                   | 61              | 0.56 b                                    | 88              | 10.75 b                                                                                | 50              | 2.00 b                                                                                 | 70              |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 6.06 b                                    | 57              | 0.75 b                                    | 85              | 11.38 b                                                                                | 47              | 2.56 b                                                                                 | 62              |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 3.38 cd                                   | 76              | 1.44 b                                    | 72              | 7.56 c                                                                                 | 65              | 1.50 b                                                                                 | 78              |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       | 2.07                                      |                 | 1.51                                      |                 | 2.79                                                                                   |                 | 1.79                                                                                   |                 |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 46a. El porcentaje promedio de infestación de la superficie foliar y la efectividad de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra la septoriosis rayada de las hojas de trigo - Zymoseptoria tritici SEPTTR.*

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA21 (después del primer tratamiento) |             | **DAA A 36 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 15 (después del segundo tratamiento) |                 | **DAA A 36 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 15 (después del segundo) |             |
|---------------------|------------------------------|-------|------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|                     |                              |       | BBCH 45-47                               |             | BBCH 61                                                                                   |                 | BBCH 61                                                                       |             |
|                     |                              |       | % de infestación superficial de          | % eficacia* | % de infestación superficial de                                                           | % efectividad * | % de infestación superficial de                                               | % eficacia* |
| 1                   | Control                      | -     | 8.44 a                                   | —           | 13.44 a                                                                                   | —               | 7.44 a                                                                        | —           |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 6.06 c                                   | 28          | 7.25 d                                                                                    | 46              | 2.88 b                                                                        | 61          |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 7.06 bc                                  | 16          | 8.94 bc                                                                                   | 33              | 5.06 ab                                                                       | 32          |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.6 N | 7.38 ab                                  | 13          | 9.44 bc                                                                                   | 30              | 5.44 ab                                                                       | 27          |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 7.88 ab                                  | 7           | 10.00 b                                                                                   | 26              | 6.31 a                                                                        | 15          |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 7.31 ab                                  | 13          | 8.25 cd                                                                                   | 39              | 3.69 b                                                                        | 50          |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       | 1.17                                     |             | 1.56                                                                                      |                 | 2.43                                                                          |             |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott a

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 46b. El porcentaje medio de infestación de la superficie foliar y la eficacia de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra la septoriosis rayada de las hojas de trigo - Zymoseptoria tritici SEPTTR*

| No. | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) |                | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) |                |
|-----|------------------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
|     |                              |       | BBCH 75                                                                                 |                | BBCH 75                                                                                 |                |
|     |                              |       | % infestación de superficie L-4                                                         | % efectividad* | % infestación de superficie L-2                                                         | % efectividad* |
| 1   | Control                      | -     | 29.69 a                                                                                 | —              | 9.19 a                                                                                  | —              |
| 2   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 14.75 c                                                                                 | 50             | 2.75 c                                                                                  | 70             |

|                     |                               |       |         |    |         |    |
|---------------------|-------------------------------|-------|---------|----|---------|----|
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 16.13 c | 46 | 3.81 bc | 59 |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.6 N | 21.00 b | 29 | 4.19 bc | 54 |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 22.75 b | 23 | 4.50 b  | 51 |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 16.75 c | 44 | 3.13 be | 66 |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       | 3.84    |    | 3.84    |    |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 47 El porcentaje promedio de infestación de la superficie foliar y la efectividad de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra la roya parda - Puccinia recondita PUCCRE*

| No. | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) |                |
|-----|------------------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
|     |                              |       | % superficie infestación de L-1                                                         | % efectividad* |
| 1   | Control                      | -     | 10.25 a                                                                                 | —              |
| 2   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 1 N   | 1.88 c                                                                                  | 82             |
| 3   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 0.8 N | 2.69 c                                                                                  | 74             |
| 4   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 0.6 N | 2.81 c                                                                                  | 73             |
| 5   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 0.4 N | 4.81 b                                                                                  | 53             |
| 6   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 2.19 c                                                                                  | 79             |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 48 El porcentaje promedio de infestación de la superficie foliar y la efectividad de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra la mancha amarilla de la hoja - Pyrenophora tritici-repentis PYRNTR*

| No. | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) |                |
|-----|------------------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
|     |                              |       | % superficie infestación de L-1                                                         | % efectividad* |
| 1   | Control                      | -     | 8.75 a                                                                                  | —              |
| 2   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 1 N   | 4.06 c                                                                                  | 54             |
| 3   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 0.8 N | 5.69 bc                                                                                 | 35             |
| 4   | PROLIPOSOMAS Difenoconazol   | 0.6 N | 6.19 b                                                                                  | 29             |

|                     |                           |       |         |    |
|---------------------|---------------------------|-------|---------|----|
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol | 0.4 N | 6.44 b  | 26 |
| 6                   | Dafne 250 CE              | 1 N   | 5.88 bc | 33 |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                           |       | 1.77    |    |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 49 Zona verde preservada de trigo de invierno.*

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) BBCH 75 |
|---------------------|------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                              |       | %<br>L-2 L-1                                                                                    |
| 1                   | Control                      | -     | 20.00 b                                                                                         |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 31.25 a                                                                                         |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 25.00 b                                                                                         |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.6 N | 22.50 b                                                                                         |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 22.50 b                                                                                         |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 33.75 a                                                                                         |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       | 4.96                                                                                            |

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 50 Contenido de masa fresca, rendimiento de grano, masa de mil granos, contenido de proteína - de trigo de invierno.*

| No. | Combinaciones experimentales | Dosis | Contenido de masa fresca |                    | Producción* |                    | Masa de mil granos |                    | % de proteína de masa seca |                    |
|-----|------------------------------|-------|--------------------------|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
|     |                              |       | kg                       | % frente a control | t/ha        | % frente a control | g                  | % frente a control | % de masa seca             | % frente a control |
| 1   | Control                      | -     | 9.71 a                   | 100                | 6.61 a      | 100                | 31.73 a            | 100                | 12.78 a                    | 100                |
| 2   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 9.94 a                   | 102                | 6.76 a      | 102                | 32.23 a            | 102                | 12.95 a                    | 101                |
| 3   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 10.16 a                  | 105                | 6.96 a      | 105                | 32.97 a            | 104                | 13.07 a                    | 102                |
| 4   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.6 N | 10.31 a                  | 106                | 6.96 a      | 105                | 31.19 a            | 98                 | 13.05 a                    | 102                |
| 5   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 9.66 a                   | 99                 | 6.51 a      | 98                 | 32.33 a            | 102                | 13.04 a                    | 102                |

|                     |              |     |      |     |      |     |       |     |       |     |
|---------------------|--------------|-----|------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|
| 6                   | Dafne 250 CE | 1 N | 9.83 | 101 | 6.68 | 101 | 32.50 | 102 | 12.84 | 100 |
|                     |              |     |      |     | a    |     | a     |     | a     |     |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |              |     | 0.76 |     | 0.60 |     | 2.14  |     | 1.46  |     |

\* el rendimiento del grano fue recalculado a 15% de humedad

#### Resultados:

Durante la primera aplicación realizada en la fase de desarrollo BBCH 32-33 de la planta cultivable, se observaron síntomas de infestación por el hongo *Zymoseptoria tritici*, causante de la septoriosis rayada de las hojas de trigo, en las hojas inferiores del trigo de invierno, variedad Tobak, a un nivel de 3% del área foliar infestada. Por otro lado, la infestación por *Blumeria graminis*, causante del oídio, se situó en un nivel del 2%. Tres semanas después de la primera aplicación, se realizó un segundo tratamiento en la fase de desarrollo BBCH 45-47 de la planta cultivable; en ese momento se observó que las plantas estaban infestadas por *Zymoseptoria tritici* en los pequeños campos de control del orden del 8,44% en la hoja L-4, y las plantas en los pequeños campos de control estaban infestadas por *Blumeria graminis* del orden de 14% en la hoja L-4 y 5,13% en L-3. La eficacia de los fungicidas probados tres semanas después de la primera aplicación fue del 57-89% en L-4 y del 85-93% en L-3 en el caso del oídio, mientras que en el caso de la septoriosis rayada de hojas del trigo estaba en un nivel de 7-28% (Tabla 45, Tabla 46a).

Aproximadamente dos semanas después de la segunda aplicación, se observó una intensidad de mildiú polvoriento en las hojas superiores de aproximadamente el 22% en la hoja L-3 y aproximadamente el 7% en L-2 en los pequeños campos de control. La efectividad del fungicida probado, dependiendo de la dosis empleada, fue del 47-79% en la hoja L-3 y del 62-88% en la hoja L-2. El agente comparativo inhibió la enfermedad en un 65% en la hoja L-3 y en un 78% en la hoja L-2. Por otro lado, la septoriosis rayada de las hojas ocurrió con una intensidad de aproximadamente el 13% en la hoja L-3 y aproximadamente el 7% en la hoja L-2 en los pequeños campos de control. La efectividad del fungicida probado, dependiendo de la dosis empleada, fue del 26-46% en la hoja L-3 y del 15-61% en la hoja L-2. El agente comparativo inhibió el desarrollo de la enfermedad en un 39% en la hoja L-3 y en un 50% en la hoja L-2 (Tabla 45, Tabla 46a).

Durante la evaluación realizada en la fase de desarrollo BBCH 75-77 del trigo de invierno variedad Tobak, se observó la aparición de enfermedades como septoriosis foliar rayada, roya parda y mancha foliar amarilla. La septoriosis rayada ocurrió en la hoja subbandera L-2 y en la hoja bandera L-1 a un nivel de 29,69% y 9,19%, respectivamente. La eficacia del agente proliposomal probado osciló entre 23 y 50 % en L-2 y entre 51 y 70 % en L-1 (Tabla 46b). A su vez, *Puccinia recondita* y *Pyrenophora tritici-repentis* aparecieron en la hoja bandera en un nivel de 10% y 9%, respectivamente, en los pequeños campos de control. La eficacia del fungicida probado en forma de proliposomas fue del 53-82% para la roya parda y del 26-54% para la mancha amarilla de la hoja, dependiendo de la dosis

empleada. Por otro lado, el agente comparativo Daphne 250 EC inhibió el desarrollo de la roya parda en un 79% y el desarrollo de la mancha foliar amarilla en un 33% (Tabla 47, Tabla 48).

En la fase de desarrollo BBCH 75 de las plantas, el área verde de las hojas de la subbandera L-2 y de la bandera L-1 fue mayor para todas las combinaciones probadas en comparación con el control (Tabla 49).

El rendimiento de grano, la masa de mil granos y el contenido porcentual de proteína estuvieron en el mismo nivel para todas las combinaciones experimentales probadas (Tabla 50).

#### Conclusiones:

1. En el experimento realizado no se encontraron síntomas de acción fitotóxica del fungicida en forma de proliposomas en diferentes dosis ni del agente estándar Dafne 250 EC en plantas de trigo de invierno de la variedad Tobak.
2. El fungicida probado en forma de proliposomas en dosis de 0,8 N y 1 N aplicado contra *Blumeria graminis* tuvo mejores resultados que el agente comparativo Dafne 250 EC.
3. Los proliposomas probados aplicados dos veces en la dosis de 1 N redujeron la incidencia de *Zymoseptoria tritici* mejor que el agente estándar Dafne 250 EC.
4. Los proliposomas probados aplicados en la dosis de 1 N inhibieron el desarrollo de *Puccinia recondita* al nivel del agente comparativo.
5. El fungicida investigado en forma de proliposomas en dosis de 0,8 N y 1 N aplicado contra *Pyrenophora tritici-repentis* tuvo mejores resultados que el agente comparativo Daphne 250 EC.
6. El uso de proliposomas y Dafne 250 EC en promedio no afectó el tamaño y la calidad (masa de mil granos, contenido porcentual de proteína) del rendimiento del trigo de invierno, variedad Zyta.

Ejemplo 23. Evaluación biológica de la eficacia de los proliposomas que contienen difenoconazol (Ejemplo 1) en el control del oídio (*Blumeria graminis* (*Erysiphe graminis*)), septoriosis rayada de las hojas de trigo (*Mycosphaerella graminicola* (anam. *Zymoseptoria tritici*)) en trigo de invierno, variedad Opoka.

**Tabla 51 Fitotoxicidad**

| No. | Combinaciones experimentales | Dosis | Fitotoxicidad                               | Fitotoxicidad                                | Fitotoxicidad                                           | Fitotoxicidad                                              |
|-----|------------------------------|-------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
|     |                              |       | **DAA 7<br>(después del primer tratamiento) | **DAA 21<br>(después del primer tratamiento) | **DAA 29<br>(después del primer tratamiento)<br>**DAA 8 | **DAA A 36<br>(después del primer tratamiento)<br>**DAA 15 |

|                     |                               |       |         |         | (después del<br>segundo<br>tratamiento) | (después del<br>segundo<br>tratamiento) |
|---------------------|-------------------------------|-------|---------|---------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
|                     |                               |       | BBCH 37 | BBCH 45 | BBCH 59                                 | BBCH 65                                 |
|                     |                               |       | %       | %       | %                                       | %                                       |
| 1                   | Control                       | -     | 0 a     | 0 a     | 0 a                                     | 0 a                                     |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 0 a     | 0 a     | 0 a                                     | 0 a                                     |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 0 a     | 0 a     | 0 a                                     | 0 a                                     |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.6 N | 0 a     | 0 a     | 0 a                                     | 0 a                                     |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 0 a     | 0 a     | 0 a                                     | 0 a                                     |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 0 a     | 0 a     | 0 a                                     | 0 a                                     |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       |         |         |                                         |                                         |
| control = 0         |                               |       |         |         |                                         |                                         |

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

Tabla 52a. El porcentaje medio de infestación de la superficie foliar y la eficacia de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra la septoriosis rayada de las hojas de trigo - *Zymoseptoria tritici* SEPTTR

| No.                 | Combinaciones<br>experimentales | Dosis | **DAA21 (después del<br>primer tratamiento)    |                   | **DAA A 36 (después<br>del primer tratamiento) |                   | **DAA A 36 (después<br>del primer tratamiento) |                   |
|---------------------|---------------------------------|-------|------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------|-------------------|
|                     |                                 |       | BBCH 47-49                                     |                   | BBCH 65                                        |                   | BBCH 65                                        |                   |
|                     |                                 |       | %<br>infestación<br>de<br>superficie<br>de L-4 | %<br>efectividad* | %<br>infestación<br>de<br>superficie<br>de L-3 | %<br>efectividad* | %<br>infestación<br>superficial<br>de L-2      | %<br>efectividad* |
| 1                   | Control                         | -     | 7.94 a                                         | —                 | 14.19 a                                        | —                 | 7.75 a                                         | —                 |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol   | 1 N   | 5.75 a                                         | 28                | 6.06 c                                         | 57                | 1.06 b                                         | 86                |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol   | 0.8 N | 5.81 a                                         | 27                | 6.69 c                                         | 53                | 1.88 b                                         | 76                |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol   | 0.6 N | 6.06 a                                         | 24                | 7.19 bc                                        | 49                | 2.00 b                                         | 74                |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol   | 0.4 N | 6.63 a                                         | 17                | 9.50 b                                         | 33                | 3.25 b                                         | 58                |
| 6                   | Dafne 250 CE                    | 1 N   | 6.19 a                                         | 22                | 6.38 c                                         | 55                | 0.94 b                                         | 88                |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                                 |       | 2.13                                           |                   | 2.52                                           |                   | 2.16                                           |                   |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

Tabla 52b. El porcentaje medio de infestación de la superficie foliar y la eficacia de los fungicidas en la protección del trigo de invierno contra la septoriosis rayada de las hojas de trigo - *Zymoseptoria tritici* SEPTTR

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 49 (después del primer tratamiento) **DAA 28 (después del segundo tratamiento) BBCH 75 |             | **DAA 49 (después del primer tratamiento) **DAA 28 (después del segundo tratamiento) BBCH 75 |             |
|---------------------|------------------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|                     |                              |       | % infestación superficial L-2                                                                | % eficacia* | % infestación de superficie L-1                                                              | % eficacia* |
| 1                   | Control                      | -     | 25.63 a                                                                                      | —           | 9.88 a                                                                                       | —           |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 11.31 c                                                                                      | 56          | 2.56 c                                                                                       | 74          |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 12.63 c                                                                                      | 51          | 4.06 bc                                                                                      | 59          |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.6 N | 13.31 be                                                                                     | 48          | 4.44 bc                                                                                      | 55          |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 15.38 b                                                                                      | 40          | 5.56 b                                                                                       | 44          |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 11.56 c                                                                                      | 55          | 4.06 bc                                                                                      | 59          |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       | 2.33                                                                                         |             | 1.98                                                                                         |             |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

Tabla 53 Zona verde preservada de trigo de invierno.

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | **DAA 49 (después del primer tratamiento)<br>**DAA 28 (después del segundo tratamiento) BBCH 75 |
|---------------------|------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                              |       | %<br>L-2 L-1                                                                                    |
| 1                   | Control                      | -     | 42.50 c                                                                                         |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 60.00 b                                                                                         |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 61.25 b                                                                                         |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.6 N | 61.25 b                                                                                         |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 56.25 b                                                                                         |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 68.75 a                                                                                         |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       | 5.15                                                                                            |

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

Tabla 54 Contenido de masa fresca, rendimiento de grano, masa de mil granos, contenido de proteína - de trigo de invierno.

| No.                 | Combinaciones experimentales  | Dosis | Contenido de masa fresca |                    | Producción* |                    | Masa de mil granos |                    | % de proteína de masa seca |                    |
|---------------------|-------------------------------|-------|--------------------------|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
|                     |                               |       | kg                       | % frente a control | t/ha        | % frente a control | g                  | % frente a control | % de masa seca             | % frente a control |
| 1                   | Control                       | -     | 12.25<br>b               | 100                | 8.23 a      | 100                | 41.01 a            | 100                | 9.15 a                     | 100                |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 13.10<br>a               | 107                | 8.76 a      | 107                | 42.92 a            | 105                | 8.86 a                     | 97                 |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 13.20<br>a               | 108                | 8.87 a      | 108                | 42.34 a            | 103                | 9.29 a                     | 102                |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.6 N | 12.78<br>ab              | 104                | 8.54 a      | 104                | 42.52 a            | 104                | 9.37 a                     | 102                |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 12.81<br>ab              | 105                | 8.59 a      | 104                | 42.58 a            | 104                | 8.98 a                     | 98                 |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 13.01<br>a               | 106                | 8.70 a      | 106                | 43.26 a            | 105                | 9.12 a                     | 100                |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       | 0.59                     |                    | 0.40        |                    | 2.07               |                    | 0.93                       |                    |

\* el rendimiento de grano se recalculó a 15% de humedad

#### Resultados:

Durante la primera aplicación realizada en la fase de desarrollo BBCH 32-33 de la planta cultivable, se observaron síntomas de infestación por *Zymoseptoria tritici*, que causa septoriosis rayada de las hojas de trigo, a un nivel del 2% del área foliar infestada, en las hojas inferiores de trigo de la variedad Opoka.

Tres semanas después de la primera aplicación se realizó un segundo tratamiento en la fase de desarrollo BBCH 45 de la planta cultivable. En ese momento, la infestación promedio de plantas por *Zymoseptoria tritici* en la hoja L-4 en los pequeños campos de control era aproximadamente del 8%. La eficacia de los fungicidas probados tres semanas después de la primera aplicación fue del 17-28% en el caso de la septoriosis rayada de las hojas de trigo (Tabla 52a).

Aproximadamente dos semanas después de la segunda aplicación, se observó septoriosis rayada en las hojas superiores con una intensidad de aproximadamente el 14 % en la hoja L-3 y de aproximadamente el 8 % en la L-2 en los pequeños campos de control. La efectividad de los fungicidas probados fue del 33-57% en la hoja L-3 y del 58-86% en la hoja L-2. El agente comparativo inhibió el desarrollo de la enfermedad en un 55% en la hoja L-3 y en un 88% en la hoja L-2 (Tabla 52a).

Durante la evaluación realizada en la fase de desarrollo BBCH 75 del trigo de invierno variedad Opoka, se observó la ocurrencia de septoriosis rayada de hojas en la hoja

subbandera L-2 y en la hoja bandera L-1 en un nivel de 25.63% y 9.88%, respectivamente. La eficacia del agente proliposoma probado osciló entre el 40 y el 74% para la septoriosis rayada de las hojas de trigo. El agente comparativo inhibió el desarrollo de la enfermedad en un 55% en la hoja L-2 y en un 59% en la hoja L-1 (Tabla 52b).

En la fase de desarrollo BBCH 75 de las plantas, el área verde de las hojas de la subbandera L-2 y de la bandera L-1 fue mayor para todas las combinaciones probadas, en comparación con el control (Tabla 53).

#### Conclusiones:

1. En el experimento realizado no se encontraron efectos fitotóxicos del fungicida en forma de proliposomas en diferentes dosis ni del agente estándar Dafne 250 EC en plantas de trigo de invierno de la variedad Opoka.
2. El fungicida probado en forma de proliposoma aplicado dos veces en la dosis de 1 N redujo la aparición de *Zymoseptoria tritici* mejor que el agente estándar Dafne 250 EC.
3. Se observó un aumento en el área de la hoja verde (GLA) después de la aplicación del agente proliposomal estudiado en todas las dosis probadas y del agente comparativo Dafne 250 EC, en comparación con el control.
4. En los pequeños campos tratados con proliposomas, independientemente de la dosis empleada, se observó un aumento del rendimiento y de la masa de mil semillas, en comparación con los pequeños campos de control.

Ejemplo 24. Evaluación biológica de la eficacia de la acción de los proliposomas que contienen difenoconazol (Ejemplo 1) en el control de la pata negra (*Leptosphaeria maculans*) en colza de invierno variedad Architect.

Tabla 55 Fitotoxicidad.

| No. | Combinaciones experimentales  | Dosis | Fitotoxicidad      |                        |                     |
|-----|-------------------------------|-------|--------------------|------------------------|---------------------|
|     |                               |       | **DAA 7<br>BBCH 59 | **DAA 33<br>BBCH 65-67 | **DAA 70<br>BBCH 85 |
|     |                               |       | %                  | %                      | %                   |
| 1   | Control                       | -     | 0 a                | 0 a                    | 0 a                 |
| 2   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 0 a                | 0 a                    | 0 a                 |
| 3   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 0 a                | 0 a                    | 0 a                 |
| 4   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.5 N | 0 a                | 0 a                    | 0 a                 |
| 5   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 0 a                | 0 a                    | 0 a                 |

|                     |              |     |     |     |     |
|---------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
| 6                   | Dafne 250 CE | 1 N | 0 a | 0 a | 0 a |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |              |     |     |     |     |

**Tabla 56 El porcentaje medio de infestación superficial y eficacia fungicida en la protección de la colza de invierno contra la pata negra - *Leptosphaeria maculans* LEPTMA.**

| No.                 | Combinaciones experimentales  | Dosis | **70 DAA<br>BBCH 85       |                |
|---------------------|-------------------------------|-------|---------------------------|----------------|
|                     |                               |       | % área de brote infestada | % efectividad* |
| 1                   | Control                       | -     | 26.71 a                   | —              |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 10.56 b                   | 60             |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 11.82 b                   | 56             |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.5 N | 12.43 b                   | 53             |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 13.08 b                   | 51             |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 11.52 b                   | 57             |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       | 4.87                      |                |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

**Tabla 57 Rendimiento de grano, masa de mil semillas y contenido de aceite.**

| No.                 | Combinaciones experimentales  | Dosis | Producción* |                    | Masa de mil granos |                    | Contenido de aceite |                    |
|---------------------|-------------------------------|-------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                     |                               |       | t/ha        | % frente a control | g                  | % frente a control | % de masa seca      | % frente a control |
| 1                   | Control                       | -     | 1.79 b      | 100                | 4.59 a             | 100                | 47.88 a             | 100                |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 2.48 a      | 139                | 4.92 a             | 107                | 47.86 a             | 100                |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 2.40 a      | 134                | 4.72 a             | 103                | 47.94 a             | 100                |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.5 N | 2.27 a      | 127                | 4.65 a             | 101                | 48.04 a             | 100                |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 2.21 a      | 123                | 4.61 a             | 100                | 48.38 a             | 101                |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 2.33 a      | 130                | 4.73 a             | 103                | 48.50 a             | 101                |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       | 0.41        |                    | 0.27               |                    | 0.69                |                    |

\* el rendimiento de grano se recalculó a 9% de humedad

Resultados:

La infestación de la colza de invierno, variedad Architect, por *Leptosphaeria maculans* evaluada en la fase BBCH 85 fue de nivel medio y alcanzó el 27% en los pequeños campos de control. La infestación por el patógeno fue suficiente para evaluar la eficacia de los fungicidas probados.

Conclusiones:

1. Ni el fungicida ensayado en forma de proliposomas, independientemente de la dosis empleada, ni el agente comparativo Dafne 250 EC en la dosis de 1 N, no han demostrado ningún efecto fitotóxico en las plantas de colza de invierno de la variedad Architect.
2. El fungicida estudiado en forma de proliposomas, independientemente de la dosis empleada, y el agente comparativo Dafne 250 EC inhibieron significativamente el desarrollo de la pata negra en las plantas de colza de invierno. Se observó un aumento de la eficacia de los proliposomas con el aumento de la dosis aplicada.
3. El fungicida investigado en forma de proliposomas a la dosis de 1 N aplicado contra *Leptosphaeria maculans* tuvo un mejor rendimiento que el agente comparativo Dafne 250 EC.
4. En los pequeños campos tratados con proliposomas, independientemente de la dosis empleada, se observó un aumento significativo del rendimiento y un aumento moderado de la masa de mil semillas en comparación con los pequeños campos de control.

Ejemplo 25. Evaluación biológica de la eficacia de los proliposomas que contienen difenoconazol (Ejemplo 1) en el control de *Sclerotinia sclerotiorum* en colza de invierno variedad Architect.

*Tabla 58 Fitotoxicidad.*

| No.                 | Combinaciones experimentales | Dosis | Fitotoxicidad           |                          |                          |
|---------------------|------------------------------|-------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                     |                              |       | **DAA 7<br>BBCH 67<br>% | **DAA 31<br>BBCH 75<br>% | **DAA 51<br>BBCH 85<br>% |
| 1                   | Control                      | -     | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 2                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 3                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 4                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.5 N | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 5                   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 6                   | Dafne 250 CE                 | 1 N   | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                              |       |                         |                          |                          |

control = 0

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 59 El porcentaje promedio de infestación superficial y efectividad fungicida en la protección de la colza de invierno contra *Sclerotinia sclerotiorum* (SOLESC).*

| No.                 | Combinaciones experimentales  | Dosis | 51 **DAA<br>BBCH 85       |                |
|---------------------|-------------------------------|-------|---------------------------|----------------|
|                     |                               |       | % área de tallo infestada | % efectividad* |
| 1                   | Control                       | -     | 28.10 a                   | —              |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 11.60 c                   | 59             |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 12.50 bc                  | 56             |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.5 N | 13.35 bc                  | 52             |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 14.70 b                   | 48             |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 13.10 bc                  | 53             |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       | 2.67                      |                |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 60 Rendimiento de grano, masa de mil semillas y contenido de aceite.*

| No.                 | Combinaciones experimentales  | Dosis | Producción* |                    | Masa de mil granos |                    | Contenido de aceite |                    |
|---------------------|-------------------------------|-------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                     |                               |       | t/ha        | % frente a control | g                  | % frente a control | % de masa seca      | % frente a control |
| 1                   | Control                       | -     | 2.17 c      | 100                | 4.32 a             | 100                | 48.25 a             | 100                |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 2.61 a      | 120                | 4.54 a             | 105                | 48.42 a             | 100                |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 2.49 ab     | 115                | 4.49 a             | 104                | 48.47 a             | 100                |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.5 N | 2.37 abc    | 109                | 4.46 a             | 103                | 48.30 a             | 100                |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 2.36 bc     | 109                | 4.38 a             | 101                | 48.32 a             | 101                |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 2.45 ab     | 113                | 4.64 a             | 107                | 48.32 a             | 100                |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       | 0.23        |                    | 0.60               |                    | 0.42                |                    |

\* el rendimiento de grano se recalculó a 9% de humedad

Resultados:

Los primeros síntomas de infestación por *Sclerotinia sclerotiorum* se observaron en la fase BBCH 75. La infestación de plantas de colza de invierno, variedad Architect, por *Sclerotinia sclerotiorum*, evaluada en la fase BBCH 85, fue moderada y alcanzó el 28% en los pequeños campos de control. La infestación por el patógeno fue suficiente para evaluar la

eficacia de los fungicidas probados.

Conclusiones:

1. Ni con el producto ensayado en forma de proliposomas, independientemente de la dosis empleada, ni con el agente de comparación Dafne 250 EC en la dosis de 1 N se observó ningún efecto fitotóxico en las plantas de colza de invierno de la variedad Architect.
2. El fungicida investigado en forma de proliposomas, independientemente de la dosis empleada, y el agente comparativo Dafne 250 EC inhibieron significativamente el desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas de colza de invierno. Se observó un aumento de la eficacia de los proliposomas con el aumento de la dosis aplicada.
3. El fungicida investigado en forma de proliposomas, utilizado contra *Sclerotinia sclerotiorum* en dosis de 0,8 N y 1 N, tuvo mejores resultados que el agente comparativo Dafne 250 EC. Los resultados obtenidos demuestran la posibilidad de una reducción de la dosis al doble preservando una eficacia de la composición de proliposomas a la dosis de 0,5 N comparable con el agente comparativo Dafne 250 EC a la dosis de 1 N.
4. En los pequeños campos tratados con proliposomas, independientemente de la dosis empleada, se observó un aumento del rendimiento, un aumento de la masa de mil semillas, en comparación con los pequeños campos de control.

Ejemplo 26. Evaluación biológica de la eficacia de proliposomas que contienen difenoconazol (Ejemplo 1) en el control de *Sclerotinia sclerotiorum* en colza de invierno, variedad Visby.

Tabla 61 Fitotoxicidad.

| No.                 | Combinaciones experimentales  | Dosis | Fitotoxicidad           |                          |                          |
|---------------------|-------------------------------|-------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                     |                               |       | **DAA 7<br>BBCH 67<br>% | **DAA 32<br>BBCH 75<br>% | **DAA 52<br>BBCH 85<br>% |
| 1                   | Control                       | -     | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.5 N | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       |                         |                          |                          |

control = 0

\*\* DAA - número de días después de la

*Tabla 62 El porcentaje promedio de infestación superficial y efectividad fungida en la protección de la colza de invierno contra Sclerotinia sclerotiorum (SOLESC).*

| No.                 | Combinaciones experimentales  | Dosis | 52 **DAA<br>BBCH 85       |                |
|---------------------|-------------------------------|-------|---------------------------|----------------|
|                     |                               |       | % área de tallo infestada | % efectividad* |
| 1                   | Control                       | -     | 27.75 a                   | —              |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 9.90 c                    | 64             |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 11.70 bc                  | 58             |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.5 N | 11.85 bc                  | 57             |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 13.76 b                   | 50             |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 15.10 b                   | 46             |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       | 3.33                      |                |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 63 Rendimiento de grano, masa de mil semillas y contenido de aceite.*

| No.                 | Combinaciones experimentales  | Dosis | Producción* |                    | Masa de mil granos |                    | Contenido de aceite |                    |
|---------------------|-------------------------------|-------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                     |                               |       | t/ha        | % frente a control | g                  | % frente a control | % de masa seca      | % frente a control |
| 1                   | Control                       | -     | 3.28 a      | 100                | 5.27 a             | 100                | 47.45 a             | 100                |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 3.57 a      | 109                | 5.49 a             | 104                | 47.44 a             | 100                |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 3.40 a      | 104                | 5.47 a             | 104                | 47.75 a             | 101                |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.5 N | 3.32 a      | 101                | 5.45 a             | 103                | 47.85 a             | 101                |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 3.30 a      | 101                | 5.37 a             | 102                | 47.80 a             | 101                |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 3.40 a      | 104                | 5.36 a             | 102                | 47.24 a             | 100                |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       | 0.30        |                    | 0.20               |                    | 0.42                |                    |

\* el rendimiento de grano se recalculó a 9% de humedad

## Resultados:

Los primeros síntomas de infestación por *Sclerotinia sclerotiorum* se observaron en la fase BBCH 75. La infestación de plantas de colza de invierno, variedad Visby, evaluada en la fase BBCH 85 fue moderada y alcanzó el 28% en los pequeños campos de control. La infestación por el patógeno fue suficiente para evaluar la eficacia de los fungicidas probados.

## Conclusiones:

1. Ni con el fungicida ensayado en forma de proliposomas, independientemente de la dosis empleada, ni con el agente de comparación Dafne 250 EC en la dosis de 1 N, no se encontró ningún efecto fitotóxico en la colza de invierno de la variedad Visby.
2. El fungicida investigado en forma de proliposomas, independientemente de la dosis empleada, y el agente comparativo Dafne 250 EC inhibieron significativamente el desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas de colza de invierno. Se observó un aumento de la eficacia de los proliposomas con el aumento de la dosis aplicada.
3. El fungicida investigado en forma de proliposomas en todas las dosis probadas aplicado contra *Sclerotinia sclerotiorum* tuvo mejores resultados que el agente comparativo Dafne 250 EC. Los resultados obtenidos demuestran la posibilidad de reducir la dosis en un 60% manteniendo la misma eficacia de la composición de proliposomas que la del agente de comparación Dafne 250 EC.
4. En los pequeños campos tratados con proliposomas, independientemente de la dosis empleada, se observó un aumento del rendimiento y de la masa de mil semillas, en comparación con los pequeños campos de control.

Ejemplo 27. Evaluación biológica de la eficacia de los proliposomas que contienen difenoconazol (Ejemplo 1) en el control de *Sclerotinia sclerotiorum* en colza de invierno, variedad Alibaba.

*Tabla 64 Fitotoxicidad.*

| No. | Combinaciones experimentales | Dosis | Fitotoxicidad           |                          |                          |
|-----|------------------------------|-------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|     |                              |       | **DAA 7<br>BBCH 67<br>% | **DAA 31<br>BBCH 75<br>% | **DAA 51<br>BBCH 85<br>% |
| 1   | Control                      | -     | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 2   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 1 N   | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 3   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.8 N | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 4   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.5 N | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |
| 5   | PROLIPOSOMAS Difenconazol    | 0.4 N | 0 a                     | 0 a                      | 0 a                      |

|                     |              |     |     |     |     |
|---------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
| 6                   | Dafne 250 CE | 1 N | 0 a | 0 a | 0 a |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |              |     |     |     |     |

control = 0

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 65 El porcentaje promedio de infestación superficial y la efectividad de los fungicidas en la protección de la colza de invierno contra Sclerotinia sclerotiorum SCLESC.*

| No.                 | Combinaciones experimentales  | Dosis | **DAA 52<br>BBCH 85       |                |
|---------------------|-------------------------------|-------|---------------------------|----------------|
|                     |                               |       | % área de tallo infestada | % efectividad* |
| 1                   | Control                       | -     | 28.90 a                   | —              |
| 2                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 11.96 b                   | 59             |
| 3                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 13.90 b                   | 52             |
| 4                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.5 N | 14.40 b                   | 50             |
| 5                   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 17.15 b                   | 41             |
| 6                   | Dafne 250 CE                  | 1 N   | 16.20 b                   | 44             |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |                               |       | 4.97                      |                |

\* efectividad calculada usando la fórmula de Abbott

\*\* DAA - número de días después de la aplicación

*Tabla 66. Rendimiento de grano, masa de mil semillas y contenido de aceite.*

| No. | Combinaciones experimentales  | Dosis | Producción* |                    | Masa de mil granos |                    | Contenido de aceite |                    |
|-----|-------------------------------|-------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|     |                               |       | t/ha        | % frente a control | g                  | % frente a control | % de seco<br>masa   | % frente a control |
| 1   | Control                       | -     | 3.78 b      | 100                | 4.76 a             | 100                | 48.42 a             | 100                |
| 2   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 1 N   | 4.27 a      | 113                | 4.84 a             | 102                | 48.37 a             | 100                |
| 3   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.8 N | 4.21 a      | 111                | 4.87 a             | 102                | 48.48 a             | 100                |
| 4   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.5 N | 4.14 a      | 110                | 4.70 a             | 99                 | 47.52 a             | 98                 |
| 5   | PROLIPOSOMAS<br>Difenoconazol | 0.4 N | 4.13 a      | 109                | 4.44 a             | 93                 | 48.11 a             | 99                 |

|                     |              |     |        |     |        |     |         |     |
|---------------------|--------------|-----|--------|-----|--------|-----|---------|-----|
| 6                   | Dafne 250 CE | 1 N | 4.14 a | 110 | 4.83 a | 101 | 48.55 a | 100 |
| NIR 0.05 (LSD 0.05) |              |     | 0.19   |     | 0.36   |     | 1.48    |     |

\* el rendimiento de grano se recalculó a 9% de humedad

#### Resultados:

Los primeros síntomas de infestación por *Sclerotinia sclerotiorum* se observaron en la fase BBCH 75. La infestación de plantas de colza de invierno, variedad Alibaba, por *Sclerotinia sclerotiorum* evaluada en la fase BBCH 85 fue moderada y alcanzó el 29% en los pequeños campos de control. La infestación por el patógeno fue suficiente para evaluar la eficacia de los fungicidas probados.

#### Conclusiones:

1. No se encontró ningún efecto fitotóxico en la colza de invierno, variedad Alibaba, ni para el fungicida probado en forma de proliposoma, independientemente de la dosis empleada, ni para el agente comparativo Dafne 250 EC en la dosis de 1 N.
2. Los proliposomas investigados, independientemente de la dosis empleada, y el agente comparativo Dafne 250 EC inhibieron significativamente el desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas de colza de invierno. Se observó un aumento de la eficacia de los proliposomas con el aumento de la dosis aplicada.
3. El fungicida investigado en forma de proliposomas en dosis de 0,5 N, 0,8 N y 1 N aplicado contra *Sclerotinia sclerotiorum* tuvo mejores resultados que el agente comparativo Dafne 250 EC. Los resultados obtenidos demuestran la posibilidad de una reducción de la dosis al doble manteniendo la misma eficacia de la composición de proliposomas que en el caso del agente comparativo Dafne 250 EC.
4. El uso de proliposomas y Dafne 250 EC en promedio no afectó el tamaño y la calidad (masa de mil granos, porcentaje de contenido de aceite) del rendimiento de la colza de invierno, variedad Alibaba.