

Estimación de la eficacia de los fungicidas con **cobre** tras el lavado

La nueva técnica se basa en el análisis espectral y de imagen obtenido por microscopía electrónica

El presente trabajo surge a partir de la idea de que la distribución de la materia activa (tamaño y número de partículas) sobre la planta, una vez que ha desaparecido el líquido portante, es de suma importancia para estimar la efectividad de la aplicación, ya que influye sobre la persistencia del producto frente a la acción del medio ambiente, que tiende a lavarlo o a degradarlo.

Rafael Villalba¹,
M^a Asunción Irlles²,
Javier Boned³,
Antonio Trapero⁴ y
Enrique Moltó¹.

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).

²Departamento de Biología Animal. Morfología Microscópica. Facultad de Biología. Universitat de València.

³Isagro España. Madrid. jboned@isagro-espana.com

⁴Departamento de Agronomía. Universidad de Córdoba.

Los fungicidas preventivos a base de cobre se aplican sobre el follaje, los brotes y los frutos. Sirven para proteger las partes cubiertas del ataque de hongos patógenos y su acción fungicida se debe a que bloquean la germinación de las esporas por la acción del metal presente en la superficie (Primo y Carrasco, 1990).

La calidad de los formulados plaguicidas a base de sales de cobre se establece a través de diversos métodos que se encuentran recogidos en la bibliografía (FAO, 1991). Además, se han desarrollado métodos complementarios para estimar el tamaño de las partículas de los formulados, por cuanto se ha considerado éste como un factor fundamental de su calidad y rendimiento agronómico.

Creemos de gran importancia conocer, además de la cantidad de producto que queda en la hoja, la distribución de los tamaños de partícula sobre las hojas, por entender que la persistencia y la velocidad de liberación de cobre metal de las sales precipitadas dependen de la manera en que éste se encuentra repartido, y no únicamente de la cantidad total presente.

Sin embargo, hasta hace poco, la calidad de un formulado se medía por medio de los llamados "granulómetros" por difracción de láser (Hassemann, 2002). Es importante señalar que, con este método, se realiza una estimación indirecta de la

calidad del producto, por cuanto la determinación se efectúa sobre el caldo de la aplicación (principio activo, coformulantes y líquido portante), y no sobre las partículas de cobre dispuestas sobre el material vegetal.

Para paliar este defecto, se desarrolló la técnica denominada de las "improntas", (Soriano y Porras, 1994; Soriano, 1998) con el fin de conocer la distribución del cobre sobre la hoja tratada. Dicha técnica se basa en la reacción entre el ácido rubeánico y la sal de cobre, la cual genera un precipitado negro que, en principio, reproduce la distribución original de las partículas de cobre sobre la superficie tratada. Este depósito se traspasa a un folio, que posteriormente se escanea y se cuantifica integrando la superficie que cubre.

Efectividad de la aplicación

El presente trabajo surge como consecuencia de la idea de que la distribución de la materia activa (tamaño y número de partículas) sobre la planta, una vez que ha desaparecido el líquido portante, es de suma importancia para estimar la efectividad de la aplicación, ya que influye sobre la persistencia del producto frente a la acción del medio ambiente, que tiende a "lavarlo" o a degradarlo. En el caso del lavado, no sólo se produce una pérdida de eficacia del producto, sino que también se favorece la contaminación del medio ambiente.

La espectrometría de masas permite conocer con exactitud la cantidad de cobre depositada en una hoja. Paralelamente, la microscopía electrónica permite, con un determinado tratamiento, observar las partículas que quedan depositadas sobre las hojas después de la evaporación del agua, e incluso puede servir para conocer la composición de dichas partículas. En el caso que nos ocupa, las imágenes generadas por el microscopio permiten analizar la distribución del tamaño de las partículas y su permanencia después de un proceso de lavado. Así pues, mediante la espectrometría de masas se puede conocer la cantidad de materia activa depositada, mientras que con la microscopía electrónica se puede averiguar cómo se encuentra distribuida.

En este trabajo se emplean ambas técnicas con el fin de desarrollar un método que permita estimar la calidad y la eficacia de las aplicaciones de los fungicidas a base de cobre, con el fin de evaluar la calidad del mismo. Este método se aplica al estudio del comportamiento de tres productos comerciales sobre hojas de mandarina, con el fin de:

- Evaluar la cantidad de cobre que se deposita en las hojas al realizar un determinado tratamiento y averiguar la cantidad que se pierde tras el lavado.

- Conocer la distribución del producto sobre las hojas, en cuanto a cantidad de partículas, tamaño y homogeneidad, antes y después del lavado.

- Estudiar cómo afecta la distribución del producto a la resistencia de la deposición tras el lavado.

Descripción de los experimentos

Se realizaron dos experimentos independientes: uno con el objetivo de determinar la cantidad de cobre depositada en las hojas y la que permanece tras el lavado, utilizando espectrometría de masas (experimento 1), y el otro con el fin de estudiar la distribución del tamaño de las partículas que quedaban sobre las hojas, empleando imágenes de microscopía electrónica y un programa de análisis de imágenes (experimento 2).

En ambos experimentos se trabajó con hojas jóvenes de Clementino, de 5-7 cm de longitud, y la pulverización se realizó con una torre de Potter. Éste es un dispositivo de laboratorio y, por tanto, permite evitar condiciones que son incontrolables en los ensayos de campo (por ejemplo, la presión instantánea en las boquillas que distribuyen el producto, la velocidad y dirección del viento, la temperatura, etc.), así como realizar una pulverización homogénea en tamaño y distribución. En los experimentos se aplicaron distintos volúmenes de agua, a distintas presiones, sobre papeles hidrosensibles, observando el tamaño de las gotas y el recubrimiento obtenido. Se optó por aplicar un volumen de 0,2 ml a

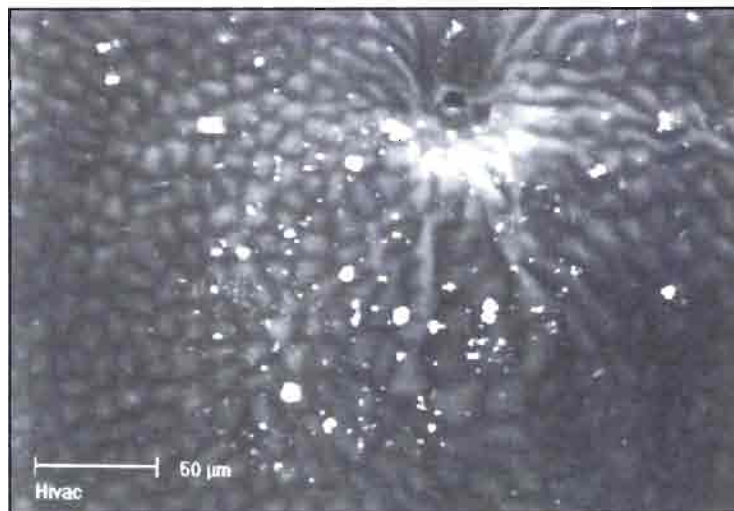


Foto 1. Imagen del depósito de sales de cobre sobre la hoja de mandarina, en la que se evidencia el epitelio y un estoma.

0,12 bares.

En el estudio se emplearon tres formulaciones comerciales a las dosis recomendadas por el fabricante en la etiqueta, que fueron:

- Producto A (polvo mojable, 50% de Cu en forma de oxocloruro): 200 g/hl.

- Producto K (polvo mojable, 50% de Cu en forma de hidróxido cúprico): 150 g/hl.

- Producto C (Cuproflow, líquido autosuspendible, 38% de Cu en forma de oxocloruro): 100 g/hl.

En los ensayos del experimento 1, se utilizaron siete hojas por tratamiento más siete hojas testigo (sin tratamiento). En los ensayos del segundo experimento se utilizaron treinta hojas para cada producto ensayado, de las cuales quince se sometieron al proceso de lavado.

En ambos casos, los ensayos comenzaron con el tratamiento de las hojas (excepto las testigo del experimento 1) en la torre de Potter, en las condiciones de presión y volumen arriba indicadas. Posteriormente, se dejó secar al aire el producto aplicado. Después se aplicó un proceso de lavado a las hojas correspondientes, que consistió en sumergirlas en un vaso de precipitado de 200 ml de capacidad, lleno de agua destilada, durante diez segundos, al mismo tiempo que se les daba diez giros en torno al vaso. Por último, las hojas se dejaron secar al aire.

Técnicas empleadas

Para determinar el contenido de cobre depositado en las hojas tras el tratamiento, o el cobre re-

manente después del tratamiento y lavado de las mismas, se incubaron las hojas durante tres días en una solución de HCl 0,1 N. De ahí, se tomó una alícuota que, tras dilución correspondiente, se utilizó para medir la concentración de Cu por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer (Marchal et al. 2002, no publicado).

Las medidas del tamaño de partícula se realizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido ambiental Philips XL30 ESEM, con el que se obtuvieron imágenes de las hojas, siempre en las mismas condiciones, con un aumento de 800x y una resolución de 0,2 micras. Debido a que se trabajó en condiciones naturales, no existe ningún punto crítico ni se empleó ningún recubrimiento metálico que pudiese alterar la distribución de las partículas ni su contenido en cobre. En la **foto 1** se muestra una imagen conseguida por este sistema.

A continuación, se realizó el análisis de las partículas presentes en cada imagen con un microanalizador de energías dispersivas de Rayos X (PhilipsEdax digital, modelo New XL-30 132-25), para comprobar la presencia de cobre en las mismas. De cada imagen se seleccionaron quince partículas de cada una de las clases de tamaño en que se dividió arbitrariamente la población: menores de 1 mm², entre 1 y 5 mm², y mayores de 5 mm². El análisis se realizó identificando los elementos presentes en el espectro obtenido después de haber definido un punto o un área en la partícula problema.

Con el empleo de un programa para el análisis digital de imágenes, se puede obtener una exhaustiva información de la población de partículas depositadas en las hojas tratadas, así como ordenarlas por clases según tamaños. El primer paso del tratamiento de la imagen consiste en el filtrado del ruido de fondo, según se muestra en las **fotos 2 y 3**.

Tras una umbralización, se separan las partículas del resto

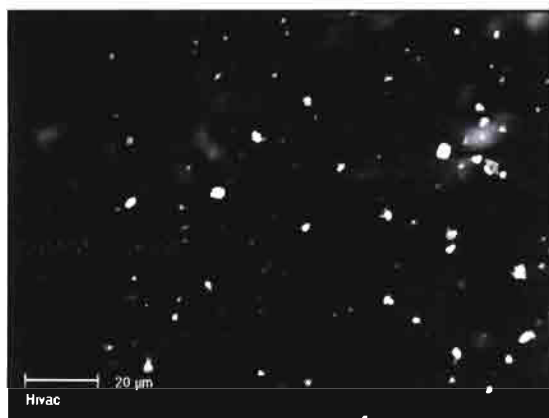


Foto 2. Imagen original.

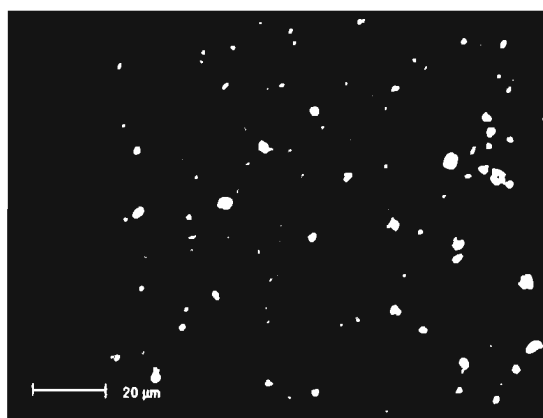


Foto 3. Imagen filtrada.

de la imagen y, posteriormente, se mide el área, como parámetro representativo de su tamaño. Por último, se clasifican según los intervalos de tamaño prefijados (menores de 1 mm², entre 1 y 5 mm², y mayores de 5 mm²).

Resultados

Cantidad de cobre depositada sobre las hojas y efecto del lavado

Los resultados del experimento 1 se muestran en la **figura 1**. En ella aparecen los intervalos de confianza al 95% y las medias de las cantidades de cobre que se depositan en cada tratamiento. El índice 1 se refiere a la medida realizada antes del lavado y el índice 2 a la medida después del lavado. La cantidad de cobre depositada no es proporcional a la concentración de cobre que cabría esperar, dado que, según las especificaciones de los fabricantes, la relación de concentraciones de cobre en los caldos preparados es 100 (producto A):75 (Producto K):38,5 (producto C).

Sin embargo, se observa que las diferencias de deposición entre los tratamientos K1 y C1 no son estadísticamente significativas, mientras que sí lo son las diferencias entre éstos y A1: inicialmente el tratamiento con el producto A permite depositar más cobre que los demás (no olvidemos que el caldo tiene la mayor concentración de cobre), aunque la dispersión de datos en las siete hojas es mayor que con los otros dos tratamientos. A pesar de ello, tras el lavado (A2), este tratamiento es el que significativamente deja menos cobre.

El producto K, que es el segundo que deposita más cobre, sufre un ligero lavado, sin significación estadística, mientras que la cantidad de cobre depositada en las hojas con el producto C se mantiene tras el lavado.

Tamaño y composición de las partículas producidas en los tratamientos

Los resultados muestran diferencias importantes en el número

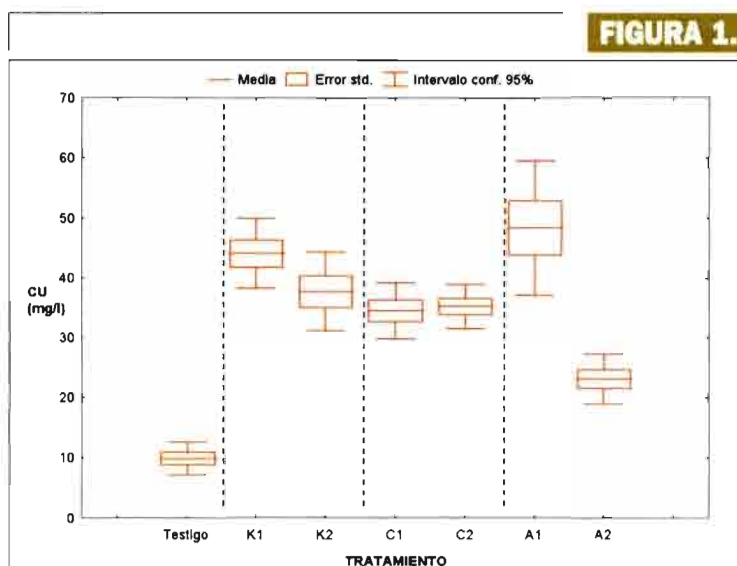
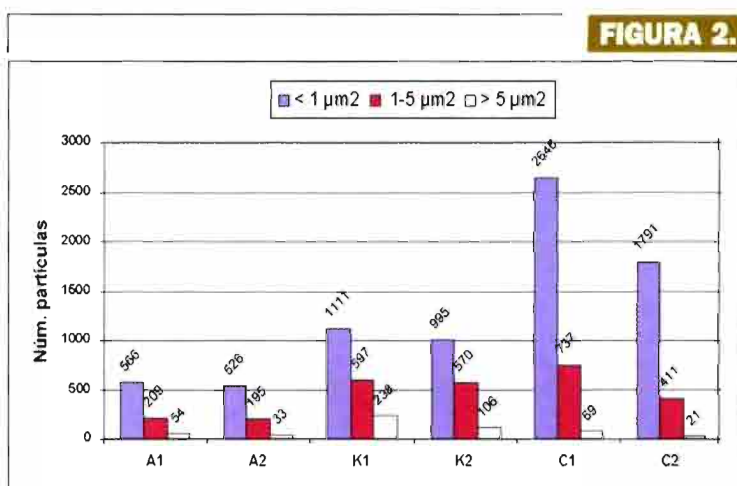
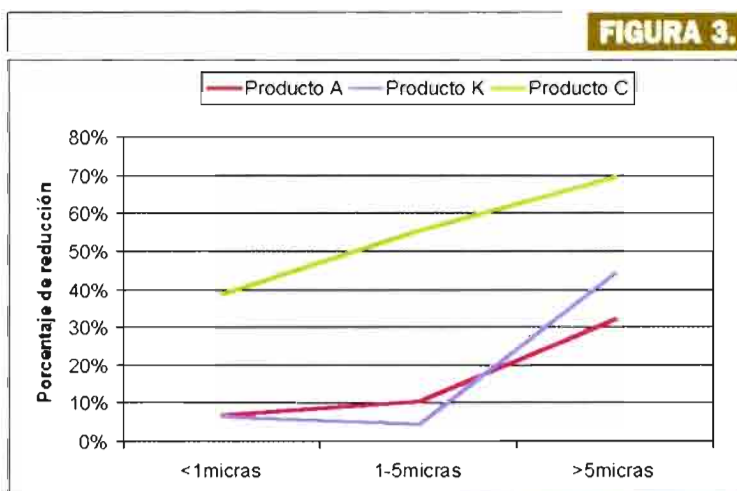


Diagrama box-whisker del contenido en cobre observado tras el tratamiento realizado con los productos A, C y K (índice 1) y después del lavado (índice 2).



Número de partículas por unidad de superficie antes y después del lavado en función del tipo de producto.



Porcentaje de reducción de partículas durante el lavado en función del tamaño de las partículas y del tipo de producto.

ro y la distribución de los tamaños de las partículas depositadas por cada producto (**figura 2**). Se comprueba que, como cabría esperar, con el lavado se reduce el número de partículas (columnas A2, K2 y C2 frente a A1, K1 y C1). Hay que observar que, tanto antes como después del lavado, la cantidad de partículas presentes en el producto C es mayor que la cantidad de partículas presentes en el producto K y en el producto A. Esto se debe a la distribución granulométrica que presenta el producto C, que tiene un elevado número de partículas pequeñas, en comparación con los otros dos productos.

Para comparar el comportamiento de las partículas tras el lavado se utiliza la **figura 3**. En ella se muestra, para los tres productos, el porcentaje de reducción del número de partículas producido por el lavado en función del tamaño de las partículas. Los porcentajes se han calculado a partir de la diferencia entre el número de partículas antes y después del lavado. Se observa, en los tres casos, que las mayores reducciones se producen en las partículas mayores de 5 mm². Si unimos los puntos, aparece una pendiente positiva que indica que las partículas más grandes se eliminan en mayor medida durante el proceso de lavado. Dada la gran insolubilidad de estos productos, si suponemos que no hay una reducción del tamaño por una disolución parcial de las partículas, podemos pensar que el fenómeno se debe a la mejor adherencia de las partículas que quedan, y que esta capacidad de sujeción se debe al tamaño: las partículas grandes tienen menor superficie de contacto por unidad de masa que las pequeñas y, por tanto, se desprenden más fácilmente durante el lavado.

Una vez analizado el número de partículas, su distribución por tamaños y cómo se comportan tras el lavado, es importante saber cuántas de las partículas contienen cobre. La primera fila de la **figura 4** muestra imágenes en las que aparecen las partículas colo-

En este trabajo se ha desarrollado una metodología para estimar la eficacia de los fungicidas de cobre tras el lavado. Para ello se han definido un conjunto de parámetros que están relacionados con la cantidad y distribución de la materia activa y con la persistencia del producto sobre la planta, factores que, en principio, podemos suponer que influyen de una manera muy importante sobre la eficacia

del producto. Para medir la cantidad de materia activa depositada, se ha empleado la espectrometría de masas, mientras que la distribución de la misma se ha estudiado mediante imágenes de microscopía electrónica, la cual, además, permite conocer la distribución de las partículas que contienen cobre. Asimismo, se ha definido un proceso de lavado arbitrario. Estos procedimientos se han

aplicado al estudio de tres productos comerciales (A, K y C) sobre hojas de mandarina. Como resultado del estudio se observa que el producto C es el que mejor se mantiene sobre las hojas tras el lavado, probablemente debido a que se distribuye en partículas de menor tamaño, lo que facilita su adherencia, ya que el cobre se encuentra en la mayoría de esas partículas pequeñas. ■

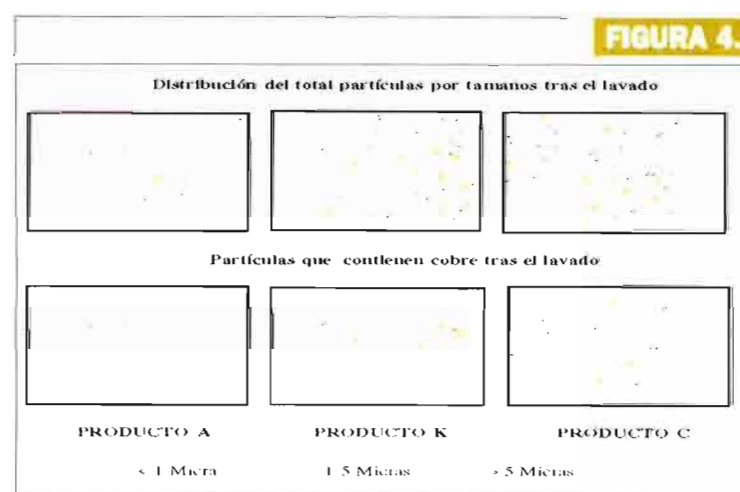
readas según tamaño, mientras que la segunda muestra las partículas que contienen cobre.

Se observa que la diferencia en la cantidad de partículas que contienen cobre dependiendo del tipo de producto es notable. Se deduce de la **figura 5** que el producto C presenta un 83% y un 88% más de partículas con cobre que los productos K y A. Si nos fijamos en las partículas que contienen cobre en cada una de las categorías de tamaño establecidas, podemos suponer que la diferencia de comportamiento frente al lavado de los productos A y K frente al C se debe a que el porcentaje de partículas menores de 1 μm^2 que tienen cobre es mayor en el producto C.

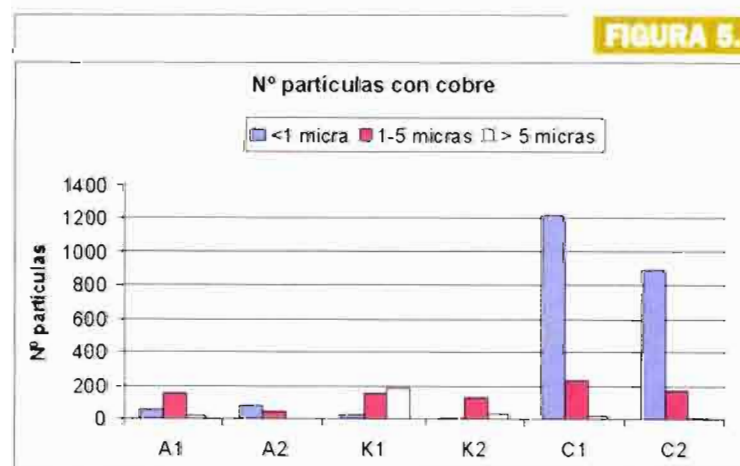
Conclusiones

El presente trabajo propone una nueva manera de estimar la eficacia de los fungicidas con cobre, a través de la cantidad de cobre depositada en las hojas y de la distribución del tamaño de las partículas depositadas.

En este estudio se ha trabajado con tres productos comerciales, denominados A, K y C, pulverizados sobre hojas a la dosis comercial. Esta dosis representa una concentración relativa en la proporción 100:75:38,5. Según el método propuesto, la cantidad inicial de cobre depositada no respeta esta relación. Se observa una deposición mayor con el producto A, aunque con una gran dispersión de los resultados, menor con el producto K, y ligeramente menor con el C, la relación entre las cantidades de cobre de-



Distribución de partículas por tamaños sobre las hojas y determinación de las partículas que contienen cobre



Número de partículas que contienen cobre en cada una de las categorías de tamaño sobre la muestra antes y después del lavado.

positadas es de 100:92:71, por lo que se deposita una mayor proporción de cobre con los productos K y C de la que cabía esperar, sobre todo de este último. Se ha comprobado que el producto C no es el que deposita más cobre en términos absolutos, sino que

deja más en la hoja tras el lavado, debido a que la cantidad de partículas es mayor, a que su tamaño es menor, lo que facilita la adherencia e impide su lavado, y a que el cobre se encuentra en la mayoría de esas partículas pequeñas.

El producto K es el siguiente

en términos de resistencia al lavado. El producto A, aunque deposita más cobre inicialmente, también lo pierde en mayor medida, debido a que el cobre se encuentra en las partículas grandes, que son la mayoría para este producto, y son las que más fácilmente se lavan.

El estudio nos lleva a concluir que, tanto el tamaño de las partículas como su contenido en cobre influye sobre la persistencia del producto y, por tanto, sobre su eficacia fungicida.

Conscientes de la limitación en el número de muestras con las que se ha trabajado, nos proponemos ampliar los ensayos. No obstante, nuestro trabajo realiza una propuesta metodológica innovadora para evaluar la eficacia de los productos fungicidas que está muy relacionada con lo que sucede en los tratamientos de campo reales. ■

Bibliografía

FAO (1991). Specifications for Plant Protection Products. AGP/CP/251 (Super-sedes AGP/CP/84)

Hassemann, R. (2002) Particle size analysis in ceramics manufacture. International ceramics. Issue 1. pp 31-34

Primo, E., Carrasco, J. M. (1990). Química agrícola 2. Plaguicidas y fitorreguladores. Editorial Alambra Universidad.

Soriano, M. L. (1998). Calidad de la aplicación de los productos fitosanitarios: nuevas tecnologías en maquinaria de aplicación. Phytoma 102: 200-205.

Soriano, M. L., Porras, A. (1994). Método de evaluación de la distribución y persistencia de fungicidas cúpricos en hojas de olivo. Cuadernos de fitopatología: 1: 115-121, 1168-182.