

Extracción y formulación de un bioinsecticida

a partir de amida isobutílica

4,5-dihidro-piperlonguminina extraída del pipilongo (*Piper tuberculatum*)

para el control del pulgón amarillo (*Sipha flava*) en caña de azúcar

(*Sacharum officinarum*)

Extraction and development of a biopesticide from isobutyl amide 4,5-dihydro-piperlonguminina extracted from pipilongo (*Piper tuberculatum*) for control of yellow aphids (*Sipha flava*) in sugarcane (*Sacharum officinarum*)

Edwin Alberto López Devia, Jorge Durán Vanegas, Raúl Cuervo Mulet

Resumen

En este trabajo se determinó –mediante el método espectrofotométrico propuesto por Hansmann y un análisis de varianza con distribución Fisher– la fitotoxicidad del portador o fijador de la butil amida, polivinyl pirrolidona (PVP), con 15 plántulas de caña de azúcar de dos meses de edad, variedad PR

61-632, con una concentración de 4.000 ppm; a este valor la polivinylpirrolidona (PVP) no presentó alteraciones morfológicas en las plántulas y por lo tanto pudo usarse como portador de la 4,5-dihidro-piperlonguminina. Para el análisis de los resultados se aplicó el método estadístico de Hen-derson-Tilton, a partir del cual se probó el efecto insecticida de la 4,5-dihidro-

• Fecha de recepción del artículo: 25-09-2009 • Fecha de aceptación: 24-05-2010.

EDWIN ALBERTO LÓPEZ DEVIA. Ingeniero Agroindustrial de la Universidad de San Buenaventura, seccional Cali, Colombia. Correo electrónico: Edwinlopez5@hotmail.com. **JORGE ANTONIO DURÁN.** Químico de la Universidad de Antioquia, magíster en Educación y Desarrollo Humano de la Universidad de San Buenaventura, seccional Cali - Colombia. Docente-Investigador del programa de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de San Buenaventura, seccional Cali. Correo electrónico: jaduran@usbcali.edu.co. **RAÚL CUERVO.** Biólogo Genético, magíster en Ciencias Biológicas y Doctorado en Ciencias Biológicas (c) de la Universidad del Valle, Cali - Colombia. Director del grupo de investigación Biotecnología. Correo electrónico: racuervo@usbcali.edu.co

* Este artículo es producto del proyecto de investigación: *Extracción y formulación de un bioinsecticida a partir de amida isobutílica 4,5-dihidro-piperlonguminina extraída del pipilongo (*Piper tuberculatum*) para el control del pulgón amarillo (*Sipha flava*) en caña de azúcar (*Sacharum officinarum*)*

piperlonguminina y se determinó como las mejores formulaciones aquellas soluciones que presentaron mortalidades superiores al 97%.

Palabras clave: Portador, extracto, fitotoxicidad, pesticidas.

Abstract

In this study we determined –by using the spectrophotometric method proposed by Hans-mann and an analysis of variance with Fisher-distribution– the phytotoxicity of the carrier or fixer of butyl amide, polyvinyl pyrrolidone (PVP), with 15 two-month old sugar cane seedlings of range PR 61-632, with a concentration of 4,000 ppm. The polyvinylpyrrolidone (PVP) showed no morphological alterations in the seedling to this value and therefore could be used as a carrier of the 4,5-dihydro-piperlonguminina. For the analysis of the results we applied the statistical method of Henderson-Tilton, from which the insecticide effect of the 4,5-dihydro-piperlonguminina was tested and those solutions that showed mortalities above 97% were classified as the best formulations.

Keywords: Carrier, extract, phytotoxicity, pesticide.

Introducción

La caña de azúcar (*Sacharum officinarum*) es un cultivo de gran importancia agroindustrial para el Valle del Cauca y Colombia, sin embargo este cultivo es vulnerable al ataque de un gran número de plagas y enfermedades que inciden en la economía de la región. Una de las plagas más conocidas e importantes es el pulgón amarillo (*Sipha flava*) el cual ocasiona daños económicos considerables a la caña de azúcar, causando con ello reducciones considerables en la producción que oscilan entre el 49% y el 54%. Hasta el momento el control de este insecto se hace mediante insecticidas químicos como el Malathion.

Esta investigación fue llevada a cabo por el grupo de biología molecular y biotecnología aplicada de la Universidad de San Buenaventura seccional Cali y forma parte de un trabajo interdisciplinario más amplio que busca obtener un insecticida alternativo para el control del pulgón amarillo en la caña de azúcar.

El método desarrollado se basó en cuatro fases que permitieron la extracción y evaluación de la amida isobutílica 4,5-dihydro-piperlonguminina del pipilongo (*Piper tuberculatum*). La mortalidad del insecto sometido directamente al bioinsecticida se evaluó estadísticamente.

Metodología

La metodología que se desarrolló en el proyecto constó de cuatro fases. En cada una de ellas se optimizaron los resultados utilizando métodos estadísticos como la *bondad de ajuste y el análisis de varianza*.

Los ensayos biológicos se ejecutaron en la estación experimental de la Universidad de San Buenaventura Cali (USB), ubicada en el corregimiento de Pance (Cali, Valle del Cauca), localizada a 3° 21' de latitud norte, 76° 18' de longitud oeste y a 1.024 msnm, con una temperatura media anual de 23,5 °C, precipitación media anual de 1160 mm y humedad relativa del 77%. La materia prima pipilongo (*Piper tuberculatum*) se obtuvo en los municipios de Villa Rica y Buenos Aires (Cauca).

En la primera fase se realizó la extracción de la butil amida a partir de 250 gramos de tallos del pipilongo, previamente secados y molidos y sometidos a percolación con 1000 mililitros de acetato de etilo durante 72 horas. El extracto se separó por filtración, se concentró por rota evaporación y se sometió a espectroscopía infrarroja y ultravioleta para la identificación de la 4-5- dihydro-piperlonguminina.

En la segunda fase se alcanzó la formulación de la solución bioinsecticida usando

como portador polivinilpirrolidona luego de comprobar su nula fitotoxicidad a partir de la cuantificación del nivel de clorofila en plantas previamente tratadas. Se utilizaron quince plántulas de caña de azúcar de dos a siete meses de edad y se determinó el índice de clorofila mediante análisis por espectrofotometría visible, a longitudes de onda de máxima absorbancia para esta sustancia orgánica dentro del espectro visible (400nm – 750nm). Las longitudes de onda seleccionadas fueron: 665nm, 645nm y 630nm.

En la tercera fase se valoró el efecto insecticida en el control del pulgón amarillo en caña de azúcar a escala de invernadero. Las aplicaciones se realizaron colocando volúmenes de 400 ml con concentraciones de 0 (testigo), 2.5, 5, 25, 50, 100, 250, 500 y 600ppm y usando un aspersor en cada unidad experimental conformada por tres

plántulas de caña de azúcar, variedad PR 61-632, de dos meses de edad e infestadas de pulgón amarillo. El conteo de insectos vivos y muertos se llevó a cabo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas después de las aplicaciones.

Finalmente en la fase cuatro se estandarizó la fórmula con mejor efecto insecticida. Se determinó como la mejor formulación aquella que presentó una mortalidad igual o mayor al 97%, a partir del conteo de insectos vivos y muertos, a las 0, 24, 72 y 120 horas después de la aplicación.

Los resultados obtenidos en el diseño experimental se analizaron utilizando la fórmula de Henderson-Tilton, la cual es empleada para calcular la eficacia corregida (%) en ensayos de pesticidas con infestación de individuos vivos y poblaciones no uniformes.

Figura 1
Preparación del portador polivinilpirrolidona (PVP)

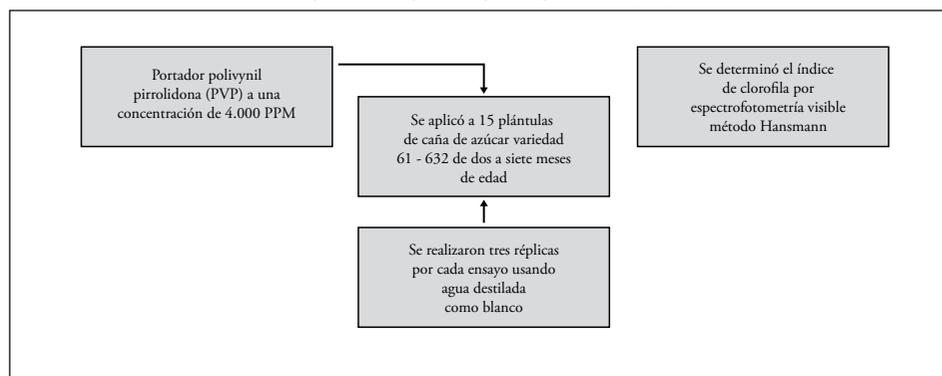
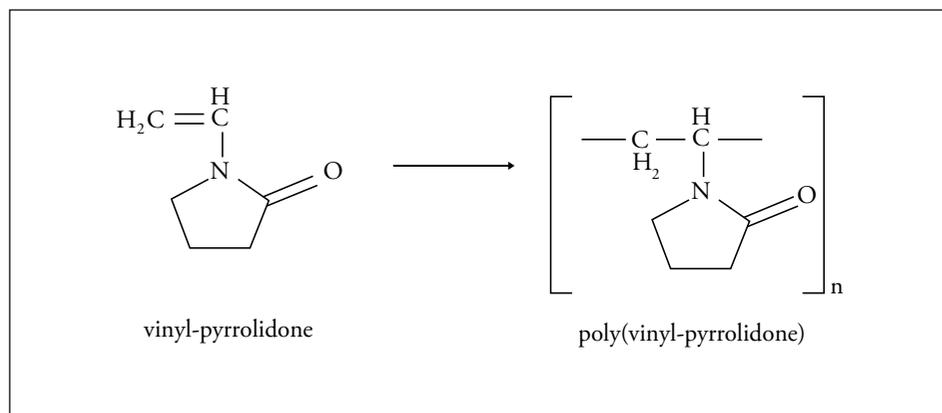


Figura 2
Fórmula estructural PVP



Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Polyvinylpyrrolidone.png>



Foto 1.
Árbol de pipilongo en el
municipio Buenos Aires,
(Cauca)



Foto 2.
Tálamos de pipilongo

Fórmula de Henderson – Tilton

$$\% \text{ Corregido} = 1 \left[\frac{(n \text{ en el } C_0 \text{ antes del tratamiento} * n \text{ en } T \text{ después del tratamiento})}{(n \text{ en el } C_0 \text{ después del tratamiento} * n \text{ en } T \text{ antes del tratamiento})} \right] * 100$$

donde n = población del insecto, T=tratado, C₀ = control.

- Población en diagrama tratado antes del tratamiento.
- Población tratado después del tratamiento.
- Población del control antes del tratamiento.
- Población del control después del tratamiento.



Foto 3.
Ubicación de las
plántulas de caña de
azúcar en la estación
experimental de la
Universidad de San
Buenaventura, Cali.

Resultados

De la primera fase se obtuvieron 200 mililitros de extracto, de los cuales se utilizaron 40 mililitros para la espectroscopía infrarroja (IR) y 6 mililitros para la espectrofotometría ultravioleta (UV). Estos análisis se realizaron en Laboratorios Ecoquímica

Una vez se identificó la 4,5-dihidro-piperlonguminina, se calculó la concentración mediante la ley de Beer's,

$$A = \alpha l c$$

donde:

α = es el coeficiente de absorción de la sustancia = 533.1

l = es la distancia que la luz atraviesa por el cuerpo = 1 cm (medida universal)

A = es la mayor absorbancia que presenta la sustancia = 0.917

Figura 3

Espectro infrarrojo de butil amida

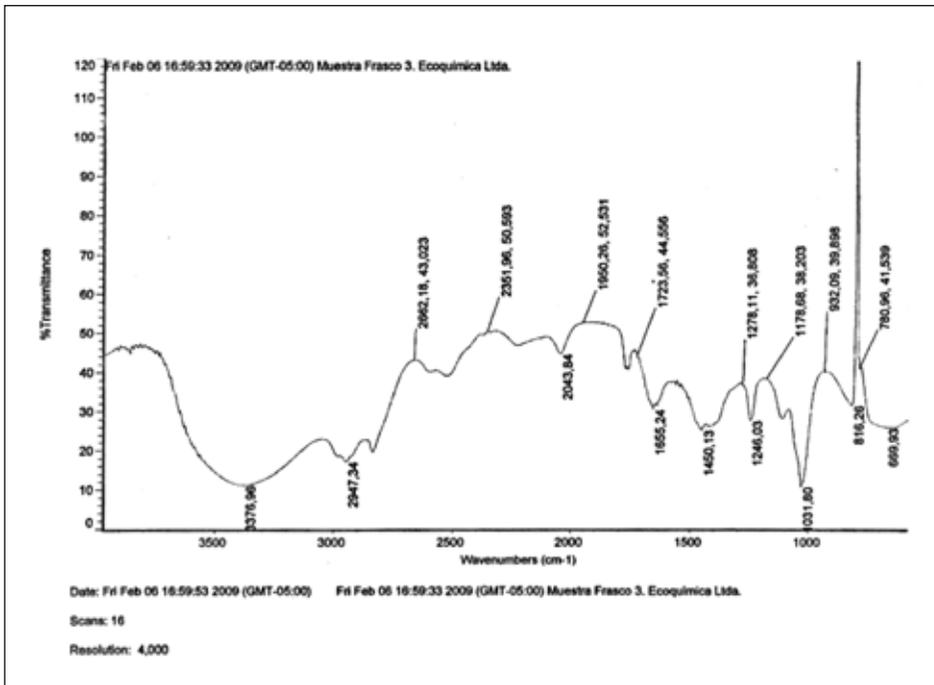
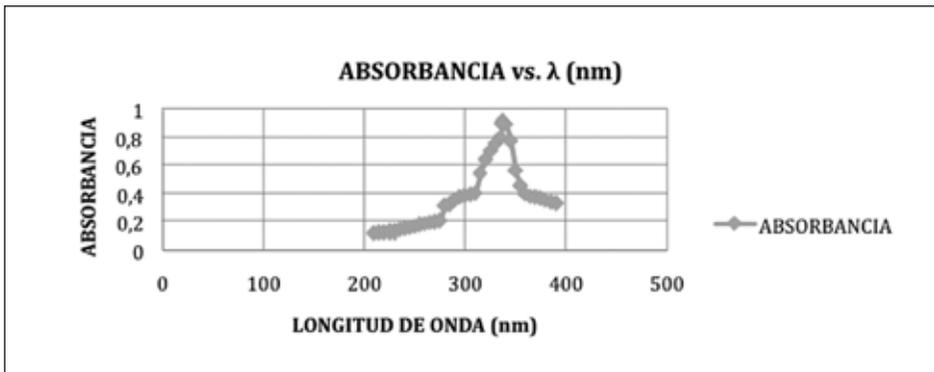


Figura 4

Espectro ultra violeta de butil amida



$$C = \frac{A}{a \cdot l} = \frac{0.917}{533.1 \times 1 \text{ cm}} = 0.0017 \text{ M (MOLAR o moles por Litro)}$$

A partir del peso molecular (486 gr/mol) se determinó la concentración en gramos por litro de amida isobutílica.

La segunda fase mostró resultados positivos en la fitotoxicidad del portador polivinilpirrolidona (PVP) con las 15 plántulas de caña de azúcar variedad PR 61-632 tratadas.

Para la determinación del índice de clorofilas totales de la biomasa se pudo utilizar el método espectrofotométrico propuesto por Hansmann (1973), donde se tomó inicialmente las hojas de las cañas de azúcar (dos gramos), se trituraron y se suspendieron en un volumen de cinco a diez mililitros de acetona-agua al 90% (v/v) como disolvente extractor de los pigmentos. Posteriormente se agitaron y se dejaron reposar en la oscuridad a 4 °C durante 24 horas. Después de este periodo se llevaron a temperatura ambiente, se repuso el disolvente que se perdió por evaporación y se centrifugó. Luego se midió la densidad óptica del sobrenadante a 665, 645 y 630 nm, que son las longitudes de onda a las cuales la clorofila presenta su máxima absorbancia. Como blanco se utilizó el disolvente usado.

Teniendo en cuenta la escala que se utilizó, se puede verificar que las diferencias entre el tratamiento con PVP y el tratamiento sin PVP, es mínima. La siguiente tabla permite corroborar lo que nos enseñan las gráficas anteriores.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de fitotoxicidad para la polivinilpirrolidona aplicada en caña de azúcar, se

puede observar que la clorofila no presenta alteración en su comportamiento, pues las absorbancias a las longitudes de onda seleccionadas (665nm, 645nm, 630nm) no se desvían más del 2% de las absorbancias de las muestras tratadas con ausencia de polivinilpirrolidona a idénticas longitudes de onda.

Antes de presentar los resultados de la fase tres sobre valoración de la solución insecticida en el control del pulgón amarillo en la caña de azúcar a escala invernadero, es importante mencionar que la infestación de plántulas con pulgón amarillo se realizó con un mes de anterioridad a las aplicaciones, mediante el sometimiento directo de la caña de azúcar con el insecto, además de brindarle todas las condiciones óptimas para su desarrollo, tales como el haber realizado las prácticas en verano y sometido la plantas al estrés hídrico y sin realizar limpieza en los linderos. Al momento de las aplicaciones se realizó un conteo inicial de insectos para conocer el punto de partida; se pudo analizar un crecimiento poblacional del pulgón amarillo desde la infestación, lo cual fue mucho más beneficioso para la valoración del bioinsecticida.

En la Tabla 2 se puede ver claramente que las concentraciones que presentan una mayor mortalidad del pulgón amarillo en menor cantidad de tiempo son las correspondientes a 600, 500 y 250 ppm, respectivamente, siendo más efectiva la primera puesto que a las 24 horas de haber realizado las aplicaciones, la población del insecto se redujo considerablemente.

Tabla 1
Promedio de absorbancias y desviación

Longitud de onda / promedios	665 nm	645 nm	630 nm
Promedios con PVP	1,9562	0,64726667	0,3546
Promedios sin PVP	1,94933333	0,64566667	0,35046667
Promedio con PVP / sin PVP	0,00686667	0,0016	0,00413333
% desviación	0,35226321	0,24780461	1,17936866

Tabla 2
Valoración de la amida isobutílica a diferentes concentraciones

Concentración de la amida isobutílica	Horas luego del tratamiento	No. de pulgones amarillos	No. de plántulas infestadas
600 ppm	0	86	3
	24	2	
	48	0	
	72	0	
	96	0	
500 ppm	0	79	3
	24	6	
	48	1	
	72	0	
	96	0	
250 ppm	0	82	3
	24	7	
	48	2	
	72	0	
	96	0	
100 ppm	0	78	3
	24	16	
	48	8	
	72	4	
	96	2	
50 ppm	0	81	3
	24	21	
	48	13	
	72	11	
	96	10	
25 ppm	0	74	3
	24	32	
	48	27	
	72	24	
	96	22	
5 ppm	0	81	3
	24	39	
	48	33	
	72	27	
	96	26	
2,5 ppm	0	80	3
	24	46	
	48	41	
	72	37	
	96	35	
0 ppm (Prueba en Blanco)	0	83	3
	24	81	
	48	79	
	72	80	
	96	81	

Para el análisis de los resultados se aplicó el método estadístico de Henderson-Tilton, a partir del cual se probó la eficiencia del efecto insecticida de la 4,5-dihydro-piperlonguminina en el control del pulgón amarillo (*Sipha flava*).

Finalmente la cuarta fase nos llevó a la determinación de la fórmula con mejor efecto insecticida.

De acuerdo con los datos obtenidos, se determinó como la mejor formulación aquella con una concentración de 600 ppm de 4,5-dihydro-piperlonguminina, ya que generó una mortalidad mayor al 97% a partir del conteo de insectos vivos y muertos, a las 0, 24, 72 y 120 horas después de la aplicación.

Conclusiones

La formulación de butil amida con una concentración 600ppm, es altamente eficiente en el control de pulgón amarillo en caña de azúcar y permite generar a mediano plazo una estrategia de sustitución de los pesticidas organofosforados Malathion y Parathion usados actualmente e igualmente

eficientes pero con los inconvenientes que generan estas sustancias al ecosistema por su alta toxicidad

Con peso usado de talamos de pipilongo, la concentración y volumen de butil amida obtenida y la demanda del bioinsecticida en los sembrados de caña de azúcar, se puede establecer el área por pipilongo por sembrar.

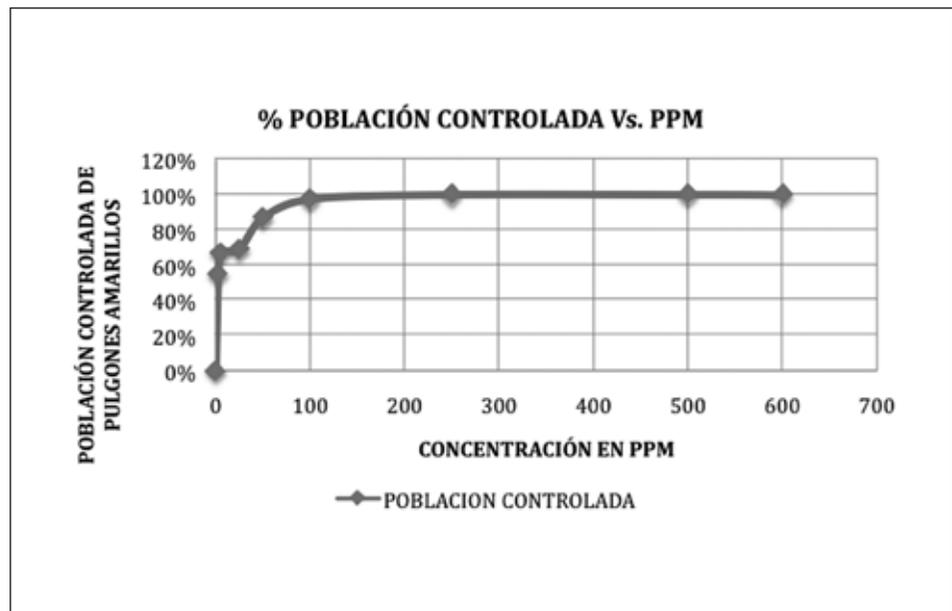
El uso de este bioinsecticida generará los siguientes impactos:

- Fomento del trabajo asociativo rural en torno al cultivo de pipilongo (*Piper tuberculatum*) para su posterior aprovechamiento en los sembrados de caña de azúcar, tanto a nivel regional como nacional.
- Reducción en la generación de emisiones, vertimientos y residuos sólidos producidos por el uso de pesticidas órgano fosforados (Malathion y Parathion).

Finalmente, el trabajo presentado en este artículo marca un sendero por seguir en lo que tiene que ver con sustitución de pesticidas inorgánicos, caracterizados por el efecto dañino al ecosistema, por bioinsecticidas benévolos para el medio ambiente.

Figura 5

Población de pulgones controlada Vs. PPM



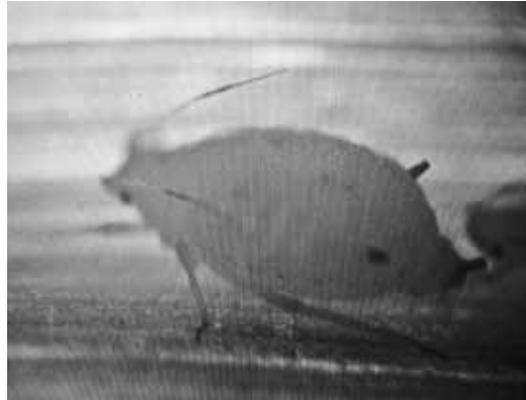
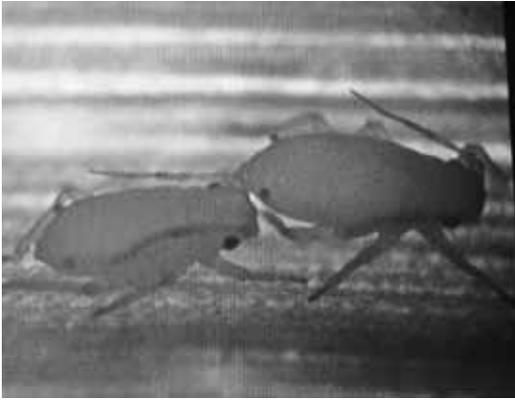


Foto 4.
Pulgón amarillo en plántula
caña de azúcar (USB).

Bibliografía

- III Congreso de la Sociedad Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar y I Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de América Latina y el Caribe. ATACAC. *Memorias*. Cali, septiembre 10 – 14 de 1990, Tomo I.
- ÁLVARO CELIS, et al. *Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae*. *Agronomía colombiana*. Volumen 26. Bogotá. Journal. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia.
- CENICAÑA. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia. *Sanidad vegetal. Plagas. Pulgón amarillo de la caña (Sipha flava)*.
- DELGADO, W., M.E. et al. (2007). *Informe técnico de avance proyecto "Bioprospección participativa de comunidades vegetales asociados a la familia Piperaceae en la región del Sumapaz medio bajo occidental"*. Colciencias-Universidad Nacional de Colombia-Universidad de Cundinamarca. p. 55.
- E. CAROD BENEDICO. *Insecticidas organofosforados. De la guerra química al riesgo laboral y doméstico*. Medifam v.12 n 5. Madrid, mayo 2002.
- Encyclopedia of the Alkaloids, glasby. Volumen 2. I – Z; Pienum Press. New York. Lonoon.
- I.M. SCOTT, H. JENSEN, J.G. SCOTT, M.B. ISMAN, J.T. ARNASON, AND B.J.R. *Philogène. Botanical Insecticides for Controlling Agricultural Pests: Piperamides and the Colorado Potato Beetle Leptinotarsa decemlineata Say (Coleoptera:Chrysomelidae)*, Archives of Insect Biochemistry and Physiology 54:212–225 (2003).
- MARK A. CAPRON and DAVID F. WIEMER. *Piplaroxide, an Ant-Repellent Piperidine Epoxide from Piper tuberculatum*. Department of Chemistry, University of Iowa, Iowa City, Iowa 52242. *J. Nat. Prod.*, **1996**,59 (8), pp 794–795.
- MENJÍVAR, R. (2001). *Insecticidas naturales. Riesgos y beneficios*. En: <http://www.elsalvador.com/hablemos/Ediciones/290701/actualidad.htm>; consulta: febrero de 2007.
- MURCIA, A.M. y H. BERMÚDEZ. (2008). *Evaluación de la actividad insecticida de extractos vegetales de la familia Piperaceae, sobre Spodoptera frugiperda Smith, en condiciones semicontroladas*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá. p. 105.
- M. SCOTT, H. et al. *Philogène. Efficacy of Piper (Piperaceae) Extracts for Control of Common Home and Garden Insect Pests*. *Journal of Economic Entomology* 97(4):1390-1403. 2004.
- Piperlonguminina y estigmasterol, compuestos de raíces y tallos de *Piper auritum*, actividad insecticida de extractos. *Revista Colombiana de Química* Volumen 27, No. 1 de 1998.