

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESTUDIO DEL EFECTO RESIDUAL Y DE LA PERSISTENCIA DE
INSECTICIDAS UTILIZADOS EN SOJA PARA EL CONTROL DE *Rachiplusia nu*

por

Bernardo Nicolás DURAND DELGADO
Gonzalo Daniel MACHADO ECHEZARRETA

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO

URUGUAY

2017

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. Adela Ribeiro

Dra. Lucía Pareja

Ing. Agr. Horacio Silva

Fecha:

29 de agosto de 2017

Bernardo Nicolás Durand Delgado

Gonzalo Daniel Machado Echezarreta

AGRADECIMIENTOS

A la directora Ing. Agr. Adela Ribeiro, del Dpto. de Producción Vegetal, Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” de Paysandú.

A la Dra. Lucía Pareja Profesor Adjunto Polo Agroalimentario y Agroindustrial Centro Universitario Paysandú UdelaR.

Al Ing. Agr. Horacio Silva, del Dpto. de Producción Vegetal, Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” de Paysandú.

A la Ing. Agr. Silvana Abatte, del Dpto. de Producción Vegetal, Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” de Paysandú.

Al Ing. Agr. Oscar Bentacourt, del Dpto. de Estadística y Cómputos, Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” de Paysandú.

Y a todos aquellos que de alguna manera contribuyeron al logro de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1. <u>IMPORTANCIA DE SOJA EN EL MUNDO</u>	2
2.2. <u>IMPORTANCIA DE SOJA EN EL URUGUAY</u>	3
2.3. <u>Rachiplusia nu</u> (Lepidóptera: Noctuidae)	4
2.3.1. <u>Distribución geográfica</u>	4
2.3.2. <u>Importancia económica y daños</u>	4
2.3.3. <u>Hospederos</u>	5
2.3.4. <u>Descripción de los estados de desarrollo</u>	6
2.3.4.1. <u>Adulto</u>	6
2.3.4.2. <u>Huevo</u>	6
2.3.4.3. <u>Larva</u>	7
2.3.4.4. <u>Pupa</u>	7
2.3.5. <u>Biología</u>	7
2.3.6. <u>Enemigos naturales</u>	8
2.4. <u>INSECTICIDAS</u>	9
2.4.1. <u>Modo de acción y penetración en el cuerpo del insecto</u>	9
2.4.2. <u>Espectro de acción</u>	11
2.4.3. <u>Propiedades fisicoquímicas</u>	11
2.4.4. <u>Persistencia</u>	12
2.5. <u>ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS</u>	13
2.5.1. <u>Métodos generales de análisis de residuos</u>	13
2.5.2. <u>Métodos MRM de extracción y clean up para residuos de plaguicidas</u>	14
2.5.2.1. <u>QuEChERS acetato</u>	15
2.5.2.2. <u>QuEChERS citrato</u>	16
2.5.3. <u>Adaptaciones de Quechers a matrices con bajo contenido de agua</u>	16
2.5.4. <u>Técnicas instrumentales</u>	16
2.5.5. <u>Espectrometría de masas</u>	17
2.5.6. <u>Sistema LC-MSMS</u>	18
2.5.6.1. <u>Sistemas de ionización</u>	18
2.5.6.2. <u>Ionización a presión atmosférica (API)</u>	18
2.5.6.3. <u>Electrospray (ESI)</u>	18

2.5.6.4. Analizadores	19
2.5.6.5. Analizador triple cuadrupolo (QqQ).....	19
2.5.7. <u>Parámetros de valoración de métodos analíticos</u>	19
2.5.8. <u>Criterios para la identificación y confirmación de</u> <u>residuos de plaguicidas según DG-SANCO</u>	20
2.5.8.1. Requisitos de cromatografía	20
2.5.8.2. Requisitos en espectrometría de masas.....	20
2.5.8.3. Diseño factorial de los experimentos y optimización	22
2.5.8.4. Etapa de un proceso de optimización	23
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	25
3.1. EXPERIMENTOS DE CAMPO Y LABORATORIO	25
3.2. ANÁLISIS QUÍMICOS	27
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	38
4.1. RESULTADOS DE CAMPO	38
4.1.1. <u>Efecto de los tratamientos sobre larvas de distintos</u> <u>estados de desarrollo</u>	40
4.1.2. <u>Enemigos naturales</u>	41
4.2. RESULTADOS DE LABORATORIO	45
4.2.1. <u>Cría de larvas con folíolos tratados con</u> <u>insecticidas</u>	45
4.2.2. <u>Análisis químico</u>	46
4.2.2.1. Estudio de recuperación	46
4.2.2.2. Diseño factorial 1.Extracción	49
4.2.2.3. Diseño factorial 2. Clean up	51
4.2.2.4. Muestras de campo	52
4.2.2.5. Determinación de las curvas de disipación para clorpirifos y triflumuron.....	53
5. <u>CONCLUSIONES</u>	55
6. <u>RESUMEN</u>	56
7. <u>SUMMARY</u>	57
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	58
9. <u>ANEXOS</u>	68

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Gradiente fase móvil para LC modo negativo	30
2. Parámetros operacionales optimizados para el análisis de pesticidas en modo negativo.....	30
3. Gradiente fase móvil para LC modo positivo	31
4. Parámetros operacionales optimizados para el análisis de pesticidas en modo positivo	32
5. Parámetros evaluados en diseño factorial para la etapa de extracción	34
6. Diseño factorial para cada factor de evaluación	35
7. Diseño de los experimentos con variaciones de sales	36
8. Porcentaje de larvas de lepidóptero por especie en parcelas de soja tratadas con insecticidas.....	38
9. Número promedio de larvas de lepidópteros por metro en parcelas tratadas con insecticidas	38
10. Número de larvas de lepidópteros, según tamaño, por metro en parcelas de soja tratadas con insecticidas.....	41
11. Porcentaje promedio de mortalidad de larvas de <i>Rachiplusia nu</i> alimentadas con hojas de soja a las que se le aplicaron insecticidas en el campo y se recogieron a los 2, 6, 12 y 22 días post aplicación.....	45
12. Valores de recuperación para clorpirifos según la concentración en vial	48
13. Valores de recuperación para triflumuron según la concentración en vial.....	49

Figura No.

1. Imagen del LC-MS/MS utilizado.....	28
2. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-QqQ/MS en modo ESI negativo.....	31
3. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de pesticidas mediante LC-QqQ/MS en modo ESI positivo	32
4. Esquema de extracción de plaguicidas en muestras de foliolos.....	37
5. Mortalidad de larvas de lepidópteros con respecto al testigo corregida por fórmula de Henderson y Tilton	40
6. Número total de predadores por metro en días post aplicación de insecticidas en parcelas de soja	42
7. Número total de predadores por metro según especie en días post aplicación de insecticidas en parcelas de soja	43
8. Diseño compuesto centrado	47
9. Porcentaje de recuperación y RSD para clorpirifos	50
10. Porcentaje de recuperación y RSD para triflumuron	50
11. Porcentaje de recuperación y RSD para clorpirifos	51
12. Porcentaje de recuperación y RSD para triflumuron	51
13. Diagrama del proceso de análisis de insecticidas	52
14. Curva de disipación de clorpirifos 0,25: 6 horas post aplicación.....	53
15. Curva de disipación de triflumuron. 0,25: 6 horas post aplicación.....	54

1. INTRODUCCIÓN

La soja es uno de los cultivos que sufre el mayor ataque de plagas, principalmente insectos. Entre ellos se destacan las orugas defoliadoras, como la oruga medidora *Rachiplusia nu*, junto a otras especies de lepidópteros. Sin embargo la planta de soja tiene una extraordinaria capacidad para compensar la defoliación provocada por esta clase de insectos.

Para evitar que este tipo de plagas ocasionen daños que afecten la producción del cultivo se hace necesario recurrir a la aplicación de productos químicos.

La mayoría de los insecticidas químico-sintéticos, cuyo objetivo específico es matar los insectos plaga, actúan como "neurotóxicos" sobre el sistema nervioso central y periférico de los insectos. Dependiendo del producto utilizado, dosis y condiciones de aplicación, pueden tener un impacto letal o subletal en otros organismos, por ejemplo, insectos polinizadores de plantas y artrópodos benéficos como parasitoides y depredadores de plagas. Es por ello que uno de los objetivos de la protección de cultivos es disminuir el uso de plaguicidas convencionales no selectivos.

Los insecticidas reguladores del crecimiento, conocidos como IGRs (Insect Growth Regulators), son productos que actúan de distintos modos sobre los insectos y tienen buena acción contra las orugas defoliadoras, respetando la fauna benéfica.

En el presente trabajo se evaluó el efecto residual y de persistencia de los insecticidas clorpirifos y triflumuron en el control de *Rachiplusia nu* sobre un cultivo de soja.

Los resultados generados de este trabajo pretenden brindar una herramienta analítica para su aplicación en estudios posteriores de monitoreo ambiental, y contribuir a un uso más racional a la hora de aplicar dichos productos, teniendo en cuenta su efecto en el tiempo sobre agro ecosistemas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTANCIA DE SOJA EN EL MUNDO

El cultivo de soja es uno de los más importantes a nivel mundial, su semilla es fuente de proteína y se utiliza también para obtención de aceite vegetal. Dicho incremento en área, se dió gracias a una mayor demanda de alimentos y aceite. En comparación con otros cultivos alimentarios importantes, la soja ha experimentado el mayor porcentaje de aumento en los últimos 40 años, frente a las 29 millones hectáreas en 1968 a 97 millones de hectáreas en 2008. Esto representa el 6% del total de suelos con capacidad arable (Goldsmith, 2008).

El mundo ha crecido en su producción de granos de soja durante los últimos diez años un 44%, pasando de unas 222 a 320 millones de toneladas, estimadas para el año 2016. La soja es uno de los cultivos de bajo volumen de producción, frente a los “pesos pesados” como el trigo, el maíz y el arroz que alcanzaron, entre los tres cereales para la zafra 2016, casi 2.200 millones de toneladas (Lacelli e Ybran, 2016).

Durante los últimos años, Estados Unidos, Brasil y Argentina produjeron siempre más del 80% de grano de soja a nivel mundial. En un segundo grupo de productores se encuentran China, Paraguay, India y Canadá; sin embargo es preciso señalar que entre estos países más todos los demás países que cultivan soja en el mundo, no alcanzan la producción de Argentina. Es notable el crecimiento de Brasil y en general de los tres países del Mercosur (junto a Argentina y Paraguay). Brasil representaba hace 11 zafras casi un cuarto de la producción mundial y el “bloque Mercosur” algo más de un 40%. Para la zafra 2016 dichos guarismos ascienden a casi un tercio y más de la mitad respectivamente (Lacelli e Ybran, 2016).

Este aumento en la participación de la producción mundial de grano, se dió también por la caída del bloque norteamericano (Estados Unidos más Canadá) de 40 a 35% y del bloque asiático (China más India) del 11 al 6%. Como estos cuatro países están en el hemisferio norte y terminan su ciclo unos meses antes que los cultivos del sur, determinan que las estimaciones y la influencia de las condiciones climáticas y de la evolución de las cosechas sobre los mercados se vea balanceada y, en cierta medida, equilibrada y no haya tanta volatilidad en los precios dentro de un año (Lacelli e Ybran, 2016).

Debido a su alto nivel de proteína, alrededor de 98% de la harina de soja se utiliza en la ganadería y la acuicultura, -un porcentaje más pequeño es procesada para hacer la harina de soja y proteínas para el consumo humano- y un porcentaje aún menor se usa para producir un refresco vegetal conocido como "Mao Dou" en China, o también

"edamame" en Japón y por otro lado soja verde o frijoles de soja en los Estados Unidos (Shanmugasundaram y Yan, 2010).

El aceite de soja se utiliza en la fabricación de numerosos alimentos procesados, productos como el caso de margarina, y en la preparación de alimentos fritos. El consumo de aceite de soja aumentó dramáticamente con el conocimiento de la relación entre las grasas animales y las enfermedades cardiovasculares. Con el fin de obtener un sabor estable y fresca para su uso como aceite comercial, el aceite de soja es hidrogenado. Sin embargo, el conocimiento en los últimos años de los efectos perjudiciales de las grasas trans, iniciaron el desarrollo de nuevas variedades de soja con bajo contenido de linolénico que son más estables sin hidrogenación. La soja es el único vegetal que suministra proteína de igual calidad que la de fuentes animales, y es por esta razón que hace tiempo se consume en Asia como fuente principal de proteínas en los alimentos tradicionales tales como el tofu, leche de soja, brotes, verdura verde, y muchos otros. En los últimos años, muchos de estos alimentos han aumentado considerablemente en popularidad fuera de Asia, mientras que los avances en la tecnología de los alimentos han hecho posible el uso de la soja en nuevas maneras, la creación de alimentos que son familiares para los consumidores, pero que contienen soja con fines nutricionales. En cuanto a la producción, actualmente los productores se enfrentan a desafíos en la siembra de cultivos, incluyendo el clima y sus impredecibles, enfermedades, plagas, malezas y variable de los suelos (Strange y Scott 2005, Lal 2009).

Los investigadores y los productores trabajan juntos en cada uno de estos desafíos para mejorar y asegurar la cantidad y calidad de la producción de soja. Algunas estrategias para aumentar los rendimientos es incluir el uso de fertilizantes y plaguicidas, mientras que otros implican el desarrollo de nuevas variedades que se adapten mejor a las necesidades de los agricultores. En soja, el desarrollo localizado de variedades es importante para que los productores usen aquellas que se adapten bien a condiciones locales, tales como el clima, prácticas agronómicas y fotoperíodo (Panthee, 2010).

2.2. IMPORTANCIA DE SOJA EN EL URUGUAY

En los comienzos del nuevo siglo, siguiendo lo ocurrido en los otros países del Mercosur se comienza a dar en Uruguay un fuerte proceso de expansión de la agricultura, impulsado principalmente por el crecimiento del área cultivada de soja. Son diversas las causas que generan esta expansión, siendo las principales: la generalización del uso de los cultivos transgénicos y la siembra directa, las medidas de política económica en Argentina, la estandarización de labores que incrementan la competitividad, etc. (Souto, 2014).

El sector agropecuario transita así por un proceso de profundas transformaciones, generando un incremento del producto interno bruto agropecuario del

13% anual acumulado entre los años 2007 y 2014. En el mismo período, el valor bruto de producción aumentó un 243% en dólares corrientes y los mayores aumentos que explican este crecimiento corresponden a la producción de granos (570%). Dentro de este, la soja que tenía una participación casi nula a fines del siglo pasado, llega al 35% del valor bruto de producción agrícola en el año 2014 (Souto, 2014).

El área agrícola del país, si bien se expandió en forma creciente, aún no ha llegado a los máximos históricos. Desde la zafra 2003-04 la soja es el cultivo de mayor área sembrada en el país, partiendo de 248 mil hectáreas sembradas esa zafra en expansión ininterrumpida a lo largo de los años alcanzando 1.334 mil hectáreas en la zafra 2014/2015, al mismo tiempo que los rendimientos obtenidos pasaron de 1720 a 2331 kg/ha. Tanto el aumento de área como de rendimientos determinaron que la producción pasara de 478 a 3.109 mil toneladas producidas (Souto, 2014).

Este crecimiento determinó que el área en la última década se ampliara 54% y la producción 24% anualmente. Asociado a una fuerte concentración productiva y el incremento de área se explica en un 67% por las superficies de cultivo de más de 1.000 hectáreas (Souto, 2014).

En el año 2014 el precio promedio de la soja exportada era de 510 US\$ por tonelada, el cual presentó una caída pronunciada alcanzando un valor de 370 US\$ a mediados de 2016, lo que equivale a una caída del 28% (Silva, 2015).

En la zafra 2015/2016 la soja sigue siendo el cultivo agrícola de secano predominante ocupando un 86% del área, 1161 mil hectáreas, pero con una caída de 13% respecto a la zafra anterior. Del total de soja sembrada, el 70% corresponde a cultivo de primera, un 15% menos que la anterior zafra (Rava y Souto, 2016).

2.3. *Rachiplusia nu* (Lepidóptera: Noctuidae)

2.3.1. Distribución geográfica

Es una especie que se distribuye desde Canadá hasta el sur de América del Sur, con gran tendencia a distribuirse en el cono austral (Gamundi y Buhmann, 1983). En Uruguay es común en todo el territorio (Chiaravalle, 2006).

2.3.2. Importancia económica y daños

Rachiplusia nu fue citada primera vez en Uruguay por Darwin en 1833, pero recién en la zafra 1940-1941 se registró su presencia como plaga en el cultivo de girasol (*Helianthus annuus*, Ruffinelli, 1942). Puede alcanzar poblaciones que comprometen los cultivos de lino, soja, espinaca y praderas pero siempre en forma esporádica (Chiaravalle, 1996).

Según Aragón y Flores (2006) las infestaciones de este insecto en soja pueden iniciarse a partir de mediados de diciembre y alcanzar los máximos niveles enero y febrero. La primera generación ataca alfalfa, lino y otros cultivos en octubre-noviembre y a partir de diciembre los ataques se expanden a girasol y soja.

Si bien no se presentan todos los años causando daños que afecten la producción, son una seria amenaza para el cultivo de soja en años secos y con altas temperaturas que favorecen su desarrollo (Chiaravalle, 1996).

Cuando las larvas son pequeñas se alimenta solamente del parénquima, sin perforar la epidermis, mientras que cuando son grandes sí lo hacen, pero sin comer las nervaduras. Las hojas así dañadas toman un aspecto de red característico que permite identificar a la especie por el tipo de daño. Los ataques comienzan por las hojas inferiores y se extienden a las superiores, a medida que las larvas avanzan su desarrollo (Chiaravalle, 1996).

En general, los dos últimos estadios larvales de *R. nu* muestran tasas de consumo, crecimiento y eficiencia alimentaria representativas de la etapa larval completa, ya que el 82% del consumo y crecimiento ocurre hacia el final de la etapa larval (24% en el quinto estadio y 58% en el sexto estadio), Scriber y Slansky (1981). Resultados obtenidos por Silva (2004) indican que el consumo de *R. nu* en los dos últimos estadios larvales, alimentados en base a *Lotus corniculatus*, fue de 266 mg/larva lo que equivale a un 81,3% del consumo total. Valores superiores fueron obtenidos en soja por Gamundi y Buhmann (1983) quienes determinaron que el consumo de los últimos dos estadios fue del 95% del total.

En el cultivo de soja, los ataques severos generan reducción del aparato fotosintético de la planta que compromete severamente el rendimiento de las plantas y contenido de aceite de la semilla. Si se suma a esto la destrucción directa de la inflorescencia, y que pueden dañar total o parcialmente vainas tiernas se comprende el hecho de que los productores adopten frecuentemente medidas de control químico contra esta lagarta (Chiaravalle, 1996).

Por otro lado, el daño más importante en el cultivo de girasol se realiza durante las primeras generaciones, luego es posible observar casi total control que hacen de la oruga los enemigos naturales (Ruffinelli, 1942).

2.3.3. Hospederos

Es una especie polífaga atacando desde malezas a plantas cultivadas y dentro de éstas se destacan lino, alfalfa y especialmente girasol y soja donde constituyen una plaga de importancia (Gamundi y Buhmann, 1983). Colombo da Luz et al. (2014)

determinaron que está relacionada con 91 plantas huéspedes pertenecientes a 27 familias botánicas destacándose Asteraceae y Fabaceae.

Según Pereyra (1995) la importancia de la polifagia en el estatus de una plaga y en su dinámica de poblaciones, radica en que las poblaciones pueden desarrollarse simultáneamente en diversas plantas huéspedes cultivadas o silvestres en una misma región, y en forma continua en los periodos favorables.

Rachiplusia nu manifiesta preferencia por ciertas plantas huéspedes y esto depende de la disponibilidad temporal y espacial de dichas plantas, lo que influye en la supervivencia, el crecimiento y la fecundidad de esta especie (Pereyra, 1995). Mareggiani y Pelicano (2010) indican que presenta preferencia por girasol y lino, donde es plaga clave, siendo de menor abundancia en soja, praderas de leguminosas y espinaca.

La soja parece ser un alimento óptimo para esta especie. Sin embargo, el éxito de la primera generación (descendientes de las generaciones hibernantes o migrantes) depende de la disponibilidad de plantas primaverales tempranas (por ejemplo, melilotus), ya que la soja no se encuentra disponible hasta comienzos del verano. Del mismo modo, el éxito de los individuos que pasan el invierno, dependería de las especies de plantas otoñales o posteriores a dichos cultivos (Pereyra, 1995).

2.3.4. Descripción de los estados de desarrollo

2.3.4.1. Adulto

En descanso sus alas se disponen en forma de techo a dos aguas y presenta un mechón prominente de escamas erizadas en el dorso del tórax. Mide de 13-18 mm de longitud con una expansión alar de 28-34 mm. Alas anteriores de coloración grisácea con tonalidades castañas, que dibujan una serie de líneas, estrías y manchas en toda la superficie. En el centro del ala una mancha plateada en forma “Y” junto con el segundo par de alas de coloración predominantemente anaranjada con márgenes posteriores oscuros, la diferencia de otras especies de Plusiinae (Chiaravalle, 1996).

2.3.4.2. Huevo

Las posturas se distribuyen de forma aleatoria y los huevos son colocados individualmente en el envés de la hoja. Éstos son de contorno circular, planos de 0,3 mm de altura por 0,5 mm de diámetro en su base (Colombo da Luz et al., 2014). Su coloración es blanco-amarillento brillante cuando están recién puestos, tornándose pálido amarillento al avanzar el desarrollo embrionario y se tornan cada vez más oscuros hasta alcanzar la eclosión de las larvas. Al finalizar la incubación, aparecen dos puntos oscuros en el área polar que corresponden a la cabeza y al escudo protorácico de la larva (Barrionuevo, 2011).

2.3.4.3. Larva

Es del tipo eruciforme, de coloración general verde claro en los tres segmentos torácicos y los diez segmentos abdominales con líneas longitudinales blancas a cada lado del cuerpo y en el dorso, aunque su tonalidad es sumamente variable pasando de verde claro a verde oscuro, cabeza y patas torácicas de color negro (Colombo da Luz et al., 2014). En el primer estadio presenta una longitud de 2,7 mm (Gamundi y Buhmann, 1983) para alcanzar un máximo de 30-40 mm en su último estadio. La parte anterior del cuerpo es más estrecha que la posterior, la cabeza es pequeña y solo posee tres pares de patas falsas insertas en el 5to., 6to. y 9no. segmento abdominal. Debido a esto, cuando camina junta el tórax con el abdomen y vuelve a estirarse, de ahí el nombre común de "lagarta medidora" (Chiaravalle, 1996).

2.3.4.4. Pupa

La pupa es obteca adéctica, alargada y cilíndrica, con tegumento liso. Se encuentra sobre el cultivo, dentro de un capullo transparente de hilos de seda construido por la larva antes de pupar (prepupa, Colombo da Luz et al., 2014). Dorsalmente castaño oscuro a negruzca y ventralmente castaño claro a rojizo, se oscurece gradualmente en los días próximos a la emergencia del adulto. Posee una longitud en la hembra de 12-13 mm, y ancho de 2,9-3,1 mm y en el macho una longitud de 15-16 mm y ancho de 3,2-3,9 mm (Barrionuevo, 2011). En su extremidad caudal se observan dos apéndices medianos grandes y encurvados y cuatro laterales menores (Ruffinelli, 1942). Colombo da Luz et al. (2014) no encontraron diferencias entre machos y hembras, obteniendo resultados para ambos de 16 mm de longitud y 5 mm de ancho.

2.3.5. Biología

En condiciones de campo, los adultos, de hábitos nocturnos, tienen un vuelo corto y en zig-zag (Chiaravalle, 1996). Las hembras copulan entre una y cuatro veces e inician la puesta poco después. En condiciones naturales los huevos son depositados en forma aislada sobre las hojas, preferentemente en el envés y los adhiere mediante un cemento (Ruffinelli, 1942). El pico de postura tiene lugar al segundo día de vida y el periodo de puesta puede alargarse hasta 20 días, siendo lo normal de 9 a 10. Según Gamundi y Buhmann (1983) cada hembra es capaz de poner entre 699 y 2280 huevos. La longevidad de los adultos es de 21 días para las hembras y 23 para los machos.

Ruffinelli (1942) determinó que la duración de los estados de desarrollo depende la temperatura, del alimento consumido y del número de estadios de la larva y que existen variaciones entre las generaciones.

La incubación de los huevos en condiciones de campo insume entre 6 y 9 días Ruffinelli (1942). A 25°C este período es de aproximadamente 3 días, el porcentaje de

eclosión en laboratorio es cercano al 90% y las larvas recién emergidas se alimentan del corion (Chiaravalle, 1996).

Estudios realizados por Pereyra y Sánchez (1991), en larvas de distinta edad, alimentadas con soja, determinaron que *R. nu* atraviesa por un periodo larval de aproximadamente 16 días, a lo largo del cual experimenta entre cinco y seis mudas, siendo más frecuentes los individuos con seis estadios larvales (69%) que los de cinco (31%). Se observan variaciones importantes en los porcentajes de larva con cinco y seis estadios en función del alimento, y al mismo tiempo el consumo diario se incrementa con la edad de la larva.

Ruffinelli (1942) indica que el período larval en condiciones de campo es de entre 6 y 18 días y el ciclo total de huevo a adulto de entre 28 y 31 días. Silva (2004), en larvas alimentadas con *L. corniculatus*, estimó una duración promedio del ciclo larval de 15,39 días, similar a la citada por Gamundi y Buhmann (1983) a 23 °C con soja como alimento. En cambio Chiaravalle (1996) alimentándolas con dieta artificial formulada por Greene et al. (1976), obtuvo una duración de la fase larval de 13 días y un ciclo total de 25 días a 27°C.

Ruffinelli (1942) afirma que pasa el invierno en estado de pupa; sin embargo, se la ha encontrado, como lo mencionan Silveira Guido y Carbonell (1965), alimentándose en pleno agosto de malezas e inclusive sobre cultivos de espinaca. Esto indicaría que no posee diapausa invernal y que es activa todo el año, siendo la generación de invierno más extensa en el tiempo a causa de las bajas temperaturas.

Culminada la etapa larval, la oruga para crisalidar confecciona un capullo o envoltura pupal delicado y transparente de sedas blancas, que queda adherida a algún pliegue de la hoja. Este período de pupa tiene una duración promedio de nueve días (Ruffinelli, 1942).

Rachiplusia nu posee tres a cuatro generaciones anuales, la de mayor duración es la invernante y la cumple sobre malezas y praderas, teniendo los primeros vuelos a fin de primavera. La siguiente generación ocurre sobre cultivos de segunda donde generalmente los ataques son muy intensos. Posee dos generaciones más que afectan más a las praderas que a los cultivos, teniendo un control natural muy importante (Chiaravalle, 1996).

2.3.6. Enemigos naturales

Por su condición de especie polífaga, ciclo de vida corta y gran potencial reproductivo, esta especie debería ser una plaga de importancia primaria. Sin embargo, es común observar su presencia en diversos cultivos sin generar daños mayores, la excepción a esto lo constituye el girasol donde generalmente exige medidas de control.

La explicación de esta “baja incidencia” es, sin duda, el abundante control natural que ejercen parasitoides, depredadores y patógenos (Ruffinelli 1942, Chiaravalle 1996).

Su complejo de predadores está compuesto por nábidos y geocóridos (hemípteros), crisopas (neurópteros), coccinélidos y carábidos (coleópteros), arácnidos, entre otros (Mareggiani y Pelicano, 2010). La mayoría de estos se alimentan de huevos y larvas pequeñas, además de una gran diversidad de otros insectos y ácaros (Aragón y Flores, 2006).

Entre los parasitoides se encuentran *Cotesia sp.*, avispa que ataca larvas de primer estadio y *Copidosoma truncatellum* (Mareggiani y Pelicano, 2010). También es atacada por un complejo de patógenos, que incluye a dos hongos, *Nomuraea rileyii* y *Entomophthora gammae*, cuya aparición se asocia con lluvias frecuentes, que permiten su desarrollo y difusión en la población. Las larvas afectadas quedan adheridas a las hojas, llegando a registrarse niveles de 40-80% de mortalidad, según las zonas. El virus de “poliedrosis nuclear” también tiene un rol importante. Los poliedros son microcristales de proteína que contienen partículas de virus. Las larvas que lo ingieren pierden su color, reducen su alimentación y movilidad y mueren en 5-7 días, cuando aparecen colgando cabeza abajo, con aspecto flácido, en las hojas de la parte superior de la planta. Su aparición natural también está relacionada con períodos de lluvia (Mareggiani y Pelicano, 2010). En Uruguay es frecuente encontrar larvas afectadas por hongos entomopatógenos, principalmente *Entomophthora sp.*, que pueden provocar un alto porcentaje de mortalidad (Chiaravalle, 1996).

Copidosoma sp. es sin duda, el principal enemigo natural. Esta avispa deposita de uno a tres huevos en los huevos de *R. nu* y por poliembrónia los mismos se dividen centenares de veces. La parasitación no impide la emergencia y posterior desarrollo de la larva, pero una vez que esta prepara el capullo para pupar muere por efecto de los parasitoides que consumen todo su cuerpo. Las larvas parasitadas destruyen un área foliar incluso mayor que las no parasitadas. Sin embargo, estos parasitoides no permiten la emergencia de los adultos, reduciendo la nueva generación (Chiaravalle, 1996).

2.4. INSECTICIDAS

2.4.1. Modo de acción y penetración en el cuerpo del insecto

El clorpirifos ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$) pertenece al grupo químico de los organofosforados. Son un grupo muy importante de compuestos que varían enormemente en estructura y propiedades químicas. Todos son ésteres derivados del ácido fosfórico con diferentes combinaciones de oxígeno, carbono, azufre y nitrógeno. Del conjunto de los insecticidas, suelen ser los que presentan una mayor toxicidad sobre los organismos vertebrados, aunque la mayoría de ellos son químicamente inestables o poco persistentes (López Soler, 2008).

Ponse (2006) indica que la mayoría de los organofosforados actúan como insecticidas de contacto, fumigantes y de acción estomacal, pero también se encuentran materiales sistémicos, que cuando se aplican al suelo y a las plantas son absorbidos por hojas, tallos, corteza y raíces, circulan en la savia haciéndola tóxica para los insectos que se alimentan.

En el sistema nervioso de los insectos y animales superiores, durante la sinapsis el impulso es transmitido por la acetilcolina, la acetilcolinesterasa hidroliza el neurotransmisor acetilcolina hasta acetato y colina en el espacio sináptico, permitiendo que la sinapsis puede ser anulada para otra transmisión (Zubay, 1983).

El modo de acción de este insecticida es inhibir la enzima acetilcolinesterasa, al unirse a la enzima forman un complejo covalente y estable, impidiendo la hidrólisis de la acetilcolina (Eldefrawi, 1985). Una acumulación de acetilcolina provoca que los canales catiónicos estén permanentemente abiertos, causando una hiperexcitación que se traduce en temblores, convulsiones y finalmente parálisis, provocando la muerte del animal. En los insectos, la acción de esta clase de insecticidas está confinada al sistema nervioso porque es donde se encuentran las sinapsis colinérgicas. La fosforilación de la acetilcolinesterasa por parte de los organofosforados es muy persistente (Barberá 1989, Ware y Whitacre 2004).

El triflumuron ($C_{15}H_{10}C_1F_3N_2O_3$) es un insecticida que pertenece a la familia de las benzoilureas cuyo modo de acción es inhibir la síntesis de quitina. Las benzoilureas, inhiben proteínas, las cuales estimulan la absorción de calcio por las vesículas. El calcio es necesario para el transporte de las microfibrillas de quitina desde las vesículas a las células epidérmicas de la epidermis. Esto es fundamental para que el insecto forme su nuevo exoesqueleto, por lo tanto al inhibirse la deposición de las microfibrillas el insecto no puede mudar adecuadamente, provocándole la muerte (Londershausen, 1996).

Flores (2009) indica que estos productos poseen un coeficiente octanol agua (K_{ow}), parámetro que determina la facilidad de penetración por vía dérmica, bajo por lo tanto la vía dérmica no es su modo de ingreso. Se comporta como no sistémico, la ingestión es la principal forma que le permite el control (Hammann y Sirrenberg, 1980).

Su eficacia está determinada principalmente cuando se los aplica en los primeros estados larvales (L1, L2). Los efectos letales se manifiestan en el momento de la muda, observándose anomalías en la procutícula, principalmente en la parte endocuticular, que presenta interrupción del crecimiento y pérdida de apariencia laminar (Santiago-Álvarez, 1998). Como consecuencia, el tegumento no puede proteger al insecto, y se producen larvas deformes, adultos de menor fertilidad, sin desarrollo embrional de huevos o las larvas nacen muertas (Leiva, 2013).

2.4.2. Espectro de acción

Para evitar que las especies plaga provoquen daños que afecten la producción del cultivo se hace necesario recurrir a la aplicación de productos químicos. El uso de los mismos causa gran preocupación dado que es una de las herramientas agrícolas que están más asociadas con el daño ambiental ya que incluso respetando las indicaciones de las etiquetas y siendo mínimo el efecto perjudicial sobre mamíferos superiores, pueden afectar organismos como peces, aves, reptiles y mamíferos menores (Pineda et al., 2000).

Los insecticidas neurotóxicos, dependiendo del producto utilizado, dosis y condiciones de aplicación, pueden tener un impacto letal o subletal en otros organismos, por ejemplo, insectos polinizadores de plantas y artrópodos benéficos como parasitoides y predadores de plagas, además de contaminar productos alimenticios para los niveles tróficos superiores (Pineda et al., 2000) .

La re-evaluación de la US EPA en 2009 identificó preocupaciones sobre riesgos agudos y crónicos para pájaros, mamíferos, vertebrados terrestres, peces y vertebrados acuáticos. Encontró 278 incidentes ecológicos entre 1974 y 2005 asociados al uso de clorpirifos, el cual fue el agente “probable” o “altamente probable” de causa de 108 de los 121 incidentes acuáticos denunciados (tales como muerte de peces) y de 70 de los 107 incidentes terrestres, principalmente muertes de pájaros y abejas.

Clorpirifos es muy tóxico, de forma crónica y aguda, para organismos acuáticos. Genera descoordinación motora, retraso en la maduración, daño en el crecimiento y la reproducción, malformaciones y disminución de las poblaciones. Es genotóxico, inmunotóxico y alterador endocrino, embriotóxico, teratogénico y es neurotóxico para el desarrollo (Watts, 2012).

Los insecticidas reguladores del crecimiento son productos que actúan de distinto modo sobre los insectos y tienen buena acción contra las orugas defoliadoras, respetando la fauna benéfica. Controla los estadios larvales de insectos holometábolos en cambio no afectan a los insectos adultos y no son efectivos contra áfidos y arañas (Hammann y Sirrenberg, 1980). Coppen y Jepson (1996) determinaron que no causan efectos de mortalidad en insectos adultos, pero en muchas especies las hembras tratadas ponen huevos estériles o sin capacidad para desarrollarse.

2.4.3. Propiedades fisicoquímicas

Clorpirifos es considerado uno de los insecticidas usados en forma más extendida, y el uso se da en la mayor parte de las regiones. Es un sólido cristalino de color blanco a tostado que se disuelve entre los 41,5 – 45,5 °C. Es relativamente estable a hidrólisis en un pH natural y soluciones acuosas ácidas. Su estabilidad disminuye a medida que aumenta el pH. La estabilidad hidrolítica, combinada con la fotólisis acuosa

con una media de 30 días, y la relativamente baja volatilización y degradación bajo condiciones aeróbicas, indican que clorpirifos puede ser persistente en las aguas de algunos sistemas acuáticos con tiempos de residencia hidrológica relativamente largos (NMFS, 2008).

El triflumuron posee baja solubilidad en agua, esta aumenta con la temperatura, es de aproximadamente 0,014 mg/ l a 10°C y de 0,200 mg/l a 60°C. No se espera que la solubilidad sea dependiente del pH, ya que triflumuron no tiene propiedades ácidas/ básicas. Por lo tanto, no hay datos del efecto del pH. El triflumuron no es altamente inflamable, ni explosivo ni oxidante.

Triflumuron no reacciona con materiales de contenedores tales como acero inoxidable #316, aluminio, latón, cobre, HDPE, teflón, nylon, viton y polipropileno, pero si tiene reactividad con acero liso. Su estabilidad permite el almacenamiento en condiciones prácticas y comerciales (ECHA, 2015).

2.4.4. Persistencia

Clorpirifos es menos persistente bajo condiciones tropicales caracterizadas por una degradación microbiana más rápida, fotodegradación y volatilización. Su persistencia aumenta cuando la temperatura es menor, cuando disminuye el pH y la luz. Estas son las condiciones del ártico, y por eso es razonable suponer que la persistencia será mayor bajo estas condiciones (Chai et al., 2008).

Los procesos regulatorios, por lo general, no han requerido estudios de bioacumulación para clorpirifos, supuestamente porque se ha asumido que las sustancias químicas clasificadas como organofosforados no tienen probabilidad de ser bioacumulables, por lo cual hay pocos estudios disponibles. Sin embargo, los trabajos que existen muestran un grado importante de bioacumulación en varias especies, con una revisión del fabricante, Dow Chemical Company, informando un valor de 5.100 BCFs en peces, lo cual excede el valor umbral de 5.000 BCFs. Adicionalmente la mayor parte de los valores publicados de log Kow cumplen o sobrepasan el valor umbral de 5, y solamente hay un valor más bajo (4,7). Se ha medido clorpirifos en peces del ártico, y esas mediciones indican un potencial de bioacumulación (Watts, 2012).

Hay un amplio rango de vidas medias publicado en la literatura para persistencia en el suelo, que va de unos pocos días hasta 4 años, en dependencia de la tasa de aplicación, el tipo de ecosistema y factores ambientales varios. La vida media de disipación es significativamente más larga en suelos orgánicos que en suelos minerales (Gebremariam et al., 2012).

Baskaran et al. (1999) encontraron una vida media de clorpirifos de 462 días en suelo australiano de tierra rojiza-café bajo condiciones de laboratorio de temperatura

constante de 25°C y humedad (60% de capacidad de retención máxima de agua), y tasas de aplicación de termiticida de 1000 mg/kg.

En una evaluación de insecticidas para tratamiento de termitas en suelo, en Arizona, 22% de clorpirifos aplicados con 1% de ingrediente activo estaba aún presente en el suelo un año después de la aplicación: la concentración inicial fue de 1420 + 214 ppm (partes por millón o mg/kg), y la cantidad de residuos después de un año fue de 315 + 48 ppm. (Baker y Bellamy, 2006).

Triflumuron presenta baja solubilidad en agua. En el suelo es medianamente a no persistente, con una movilidad ligera a inmóvil. No volátil y con una bioacumulación mediana. Sus metabolitos, la fenilurea (4-trifluorometoxilada) y el ácido 2-clorobenzóico no son persistentes en el suelo, se degradan más rápidamente en la interfase agua sedimento y son de mediana a muy móviles en el suelo (UNA, 2017).

2.5. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

En la agricultura, la presencia de residuos de agroquímicos se debe principalmente al uso indiscriminado de éstos donde su eliminación depende de diversos factores como el crecimiento propio del vegetal, la acción de agentes atmosféricos como el viento y la lluvia, el grado de solubilidad y volatilidad del plaguicida, el tipo de degradación química que sufra y la naturaleza del propio plaguicida (Ortiz et al., 2003).

La detección de niveles de residuos de agroquímicos, que se encuentran en una concentración baja frente a la presencia de otros compuestos que se encuentran en grandes cantidades (componentes de la matriz), hace que se requiera de una preparación de muestra exhaustiva de modo que los componentes de la matriz no interfieran con aquellos productos que se desean determinar (Ortiz et al., 2003).

2.5.1. Métodos generales de análisis de residuos

Las muestras de los tejidos vegetales tienen una composición química compleja, por lo que para lograr un análisis exitoso se requiere una homogeneización previa de la muestra y una etapa posterior de extracción de los compuestos de interés, seguido de una posterior purificación (clean-up) para eliminar las sustancias que puedan constituir una interferencia a la hora del análisis instrumental.

En la actualidad se tiende a un método de separación de los residuos de contaminantes a partir de la matriz que sea universal, que permita extraer completa y selectivamente la mayor variedad posible de plaguicidas y que sea miniaturizado. La elección del método dependerá de la naturaleza química de los compuestos y de los sustratos en que se encuentren en la muestra (Antonio et al., 2003).

La extracción puede realizarse mediante extracciones sólido-líquido o líquido-líquido con disolventes orgánicos, mediante cartuchos de extracción en fase sólida o con fluidos supercríticos, entre otros.

Extracción con solventes: en general los métodos publicados utilizan mezclas muy variadas de disolventes que se basan en una primera homogeneización con disolventes miscibles con el agua o en la extracción directa con solventes inmiscibles. Los más aplicados son (i) extracción con acetato de etilo eliminando el agua residual con sulfato sódico anhidro; (ii) extracción con acetonitrilo y (iii) homogeneización con acetona y reparto con una mezcla diclorometano /éter de petróleo (Antonio et al., 2003).

La extracción líquido-líquido presenta varias desventajas, es laborioso, en general usa grandes cantidades de solvente con la consiguiente generación de una gran cantidad de residuos, requiere de varias etapas de clean-up, por lo que lleva mucho tiempo. Además muestras que contienen partículas en suspensión pueden formar emulsiones con el solvente orgánico, lo que lleva a mayores tiempos de análisis y variaciones en la reproducibilidad del método (Gan y Bondarenko, 2008).

2.5.2. Métodos MRM de extracción y clean-up para residuos de plaguicidas

La extracción sólido-líquido con solvente es una de las técnicas más ampliamente usadas, como tal o combinada con una forma de agitación mecánica de forma de aumentar la eficiencia de la extracción, por ejemplo ultrasonido o shaker. Los solventes más comunes para la extracción de agroquímicos son el ACN, el AcOEt y la acetona ya que permiten la extracción de un amplio rango de plaguicidas (Turiel, 2008). La selección de un solvente u otro depende de la composición química de la matriz y de las características de los plaguicidas a analizar. El ACN es un solvente caro y tóxico, pero la principal ventaja es que prácticamente no extrae componentes lipofílicos, que muchas veces son los principales interferentes a la hora de realizar un análisis. El AcOEt es parcialmente miscible en agua. Por su polaridad, es capaz de extraer compuestos no polares de aquellas matrices con alto contenido en lípidos. La principal ventaja es que las pequeñas cantidades de agua presentes en el extracto pueden ser fácilmente removidas mediante el agregado de sales anhidras, sin la necesidad del agregado de otros solventes para realizar particiones líquido-líquido (Mol et al., 2007). La principal desventaja del AcOEt es que por su relativa baja polaridad, muchos plaguicidas polares no se reparten en la fase AcOEt, por lo que las recuperaciones de este tipo de plaguicidas pueden ser bajas. Para evitar esto algunos métodos multi-residuos realizan un salting-out utilizando grandes cantidades de sales, tales como Na_2SO_4 , NaCl y MgSO_4 . De esta forma las sales compiten con los analitos de interés por la solvatación con el agua, disminuyendo su afinidad por la fase acuosa y migrando hacia la fase orgánica. Otros co-solventes polares, como metanol y etanol, han sido usados para aumentar la polaridad de la fase orgánica. Diclorometano (CH_2Cl_2) y n-hexano han sido también usados para la extracción de plaguicidas de baja polaridad a pesar de que estos últimos son altamente tóxicos para el ser humano (Lambropoulou y Albanis, 2007).

En 2003 buscando superar todos los inconvenientes prácticos de los métodos multi-residuo existentes de la época y aprovechando la selectividad de los espectrómetros de masas, se introdujo una nueva metodología de análisis de residuos de plaguicidas en material vegetal, denominada QuEChERS (acrónimo en inglés de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe). Este método implica dos etapas fundamentales: en la primera, los plaguicidas se extraen con acetonitrilo en presencia de sulfato de magnesio y cloruro de sodio. La segunda etapa corresponde a una purificación mediante dispersión en fase sólida utilizando una amina primaria secundaria (PSA). En la actualidad se realizan diferentes modificaciones a este método, de manera que continuamente se logran adaptaciones a nuevas matrices o compuestos de diferentes características (Ahumada, 2011).

El método QuEChERS original se desarrolló para matrices con alto contenido en agua (~80%) por lo que matrices de bajo contenido en humedad, requieren la adición de agua previo a la extracción con solventes. El agua le provee la humedad necesaria para mejorar la accesibilidad del solvente en la matriz. Para el análisis de plaguicidas en mediante QuEChERS, se ha reportado el uso de diferentes cantidades de agua (Payá et al., 2007).

Es fácilmente adaptable según el tipo de matriz, los agroquímicos a analizar y el equipamiento del laboratorio. En los últimos años se han desarrollado varias modificaciones en el método original, intentando mejorar las recuperaciones en matrices complicadas y de insecticidas problemáticos como captan, folpet, diclofluanid, pimetrozina y clorotalonil (Lehotay, 2006). Dichas modificaciones consisten en el uso de sales que actúan como buffer durante la extracción para, de esta forma, mantener el pH en un valor adecuado para favorecer la recuperación de este tipo de plaguicidas. Así se desarrollaron dos variaciones de esta metodología que actualmente son muy utilizadas: QuEChERS acetato y QuEChERS citrato (Mol et al., 2007).

2.5.2.1. QuEChERS acetato

Lehotay et al. (2006) demostraron que manteniendo el pH de la solución extractiva entre 4 a 5 se mejora la estabilidad de algunos plaguicidas, como la pimetrozina, por lo que los autores proponen usar una solución de ácido acético (HAc) en ACN y acetato de sodio (NaOAc) como buffer, ya que ambos compuestos se encuentran típicamente en las frutas y por lo tanto no se introducen nuevas interferencias. Además, para mantener el número de pasos del método, agregaron HAc en el ACN y cambiaron NaCl por NaOAc. De esta forma se genera una fuerte actividad buffer, que estabiliza a los agroquímicos lábiles. La desventaja es que el clean-up con PSA pierde efectividad por la alta capacidad del buffer (Anastassiades et al., 2003).

2.5.2.2. QuEChERS citrato

Anastassiades et al. (2003), buscaron una alternativa al método QuEChERS acetato con el fin de evitar el problema asociado al clean-up. El uso de una mezcla de citrato disódico y trisódico en la etapa de salting-out mostró muy buenos resultados excepto para matrices como limón, lima y frambuesas que presentan un pH menor a tres y que requieren el agregado de hidróxido de sodio (NaOH) para ajustar el pH.

2.5.3. Adaptaciones de QuEChERS a matrices con bajo contenido de agua

Como se mencionó anteriormente el método original se desarrolló para matrices con alto contenido en agua (~80%). Por lo que matrices de bajo contenido en humedad como el arroz y otros cereales, previo a la extracción con solventes, requieren la adición de agua. Particularmente para el análisis de agroquímicos en arroz (blanco y paddy), se han logrado diferentes modificaciones de este método. En general estas modificaciones incluyen: cambios en el tipo y cantidad de sales, cantidad de PSA utilizada, la adición de ácido acético o fórmico al solvente de extracción (Nguyen et al., 2008).

Además, se ha determinado el uso de bajas temperaturas durante el clean-up con el fin de precipitar compuestos lipídicos y ceras del extracto, esta práctica constituye una etapa de purificación extra cuando se tratan matrices con alto contenido de compuestos lipídicos, pero presenta la desventaja de que los compuestos más lipofílicos se pueden perder (Payá et al., 2007).

2.5.4. Técnicas instrumentales

Como consecuencia de las características particulares de los plaguicidas y la necesidad de contar con métodos cada vez más precisos, específicos, exactos, rápidos y robustos, las técnicas cromatográficas resultan ser la opción más adecuada para este tipo de determinaciones cuantitativas. La cromatografía es probablemente la técnica analítica más empleada en laboratorios debido a numerosas razones: i) la sensibilidad de los métodos de detección existentes, ii) la capacidad de separar, identificar y analizar de manera cualitativa y cuantitativa, y iii) la alta rapidez de los análisis cromatográficos (Ahumada y Zamudio, 2011).

Anteriormente, la mayoría de los métodos de rutina para el análisis de plaguicidas en muestras de origen ambiental o alimentario, se basaron principalmente en la cromatografía gaseosa (GC) con diferentes detectores tales como detector de captura de electrones (ECD), detector de nitrógeno y fósforo (NPD) o detector fotométrico de llama (FPD). La limitante de estos detectores es que son específicos y selectivos, por lo tanto no son detectores universales, ni otorgan información acerca de la estructura de los compuestos, por lo que no son adecuados para el desarrollo en un método multi-residuo (Alder et al., 1991).

Hoy en día, la introducción del detector de masas (MS) permite la identificación y confirmación simultánea de compuestos con una adecuada sensibilidad. Este detector puede ser acoplado tanto a un cromatógrafo de gases (GC-MS) como a un cromatógrafo de líquidos (LC-MS), permitiendo la separación e identificación de mezclas complejas en un solo análisis (Alder et al., 1991).

2.5.5. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica que se utiliza en química para obtener las estructuras químicas de los compuestos orgánicos bajo estudio (química estructural). Es decir que la primera y principal aplicación es y ha sido la identificación de compuestos puros en el campo de la química orgánica (Somogyi, 2008).

Cuando la espectrometría de masas se combina con una técnica separativa, ya sea cromatográfica o electroforética, se puede proceder al análisis de mezclas, cuyos componentes son separados en una primera etapa por la técnica cromatográfica seleccionada, por ejemplo: cromatografía gas-líquido (CGL), cromatografía líquida de alta resolución: (en inglés: High-Performance Liquid Chromatography: HPLC) o en el correspondiente equipo de electroforesis, como por ejemplo: Electroforesis Capilar (EC, Lemma-Gray et al., 2008).

La espectrometría de masas tiene importantes ventajas en términos de velocidad, sensibilidad y especificidad con respecto a otros métodos de análisis químico y tiene aplicación de valor en diferentes campos científicos. Sin embargo, está limitada, en parte, por los requisitos de preparación de la muestra antes del análisis. En la mayoría de los casos, la muestra debe ser colocada al vacío para el análisis (por ejemplo: MALDI) o disuelta o extraída en un solvente y nebulizada (por ejemplo: ESI) dentro del espectrómetro de masas. El requerimiento de introducir la muestra en el sistema de vacío restringe las posibilidades de realizar mediciones in situ (Pomilio et al., 2011). Anteriormente, la técnica de cromatografía de líquidos era poco utilizada para el análisis de residuos de plaguicidas. Sin embargo, los fabricantes de agroquímicos fueron desarrollando compuestos cada vez más polares, de menor volatilidad y más termolábiles, los que no pueden ser analizados por GC, impulsando un aumento en el número de métodos analíticos de residuos de plaguicidas empleando cromatografía líquida primero con detector UV, posteriormente con detector de arreglo de diodos (LC-DAD) y en los últimos años con la incorporación de instrumentos de LC-MS y LC-MS/MS que proveen una gran sensibilidad y eficiencia (Gan y Bondarenko, 2003).

En los últimos años el uso de LC-MS/MS ha crecido enormemente, principalmente debido a la alta sensibilidad, que permite alcanzar niveles de detección muy bajos y a la elevada capacidad para la identificación y confirmación de los plaguicidas por la posibilidad de realizar espectros de masa, por lo que han permitido el desarrollo de métodos sensibles capaces de identificar contaminantes a niveles trazas en muestras ambientales y alimentos (Jeannot et al., 2000).

2.5.6. Sistema LC-MSMS

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS), de forma muy genérica, es un proceso mediante el cual, un ión formado en una fuente de iones que es seleccionado en la primera etapa del análisis, se hace reaccionar, para luego analizar en una segunda etapa, los iones generados a partir de éste. El tipo de información obtenida puede variar dependiendo del tipo de analizador utilizado en las diferentes etapas de análisis y de las reacciones llevadas a cabo entre las etapas de análisis (Glishy Burinsky, 2008).

Inicialmente, se desarrollaron comercialmente los instrumentos del tipo sector magnético. Posteriormente se desarrolló el cuadrupolo, que es un analizador de masas relativamente pequeño que puede ser configurado para filtrar iones en un rango limitado de m/z . Realizando un barrido (scanning) en todo el rango de m/z de interés y detectando cuantos iones pasan a través del filtro, se adquiere un espectro de masas (Glishy Burinsky, 2008).

2.5.6.1. Sistemas de ionización

Después de la introducción de la muestra desde el sistema LC, ésta es ionizada en la fuente de ionización. Existen diferentes tipos de fuentes de ionización; termospray, particle beam, foto-ionización a presión atmosférica (APPI) e ionización a presión atmosférica (API), siendo esta última una de las más utilizadas (Barceló, 2005).

2.5.6.2. Ionización a presión atmosférica (API)

Es un proceso de ionización suave, a presión atmosférica (P. atm.) con una alta eficiencia, en comparación con otras formas de ionización convencionales. Incluye un grupo de interfases llamadas ionización química a presión atmosférica (APCI) y electrospray (ESI, Picó et al., 2000).

2.5.6.3. Electrospray (ESI)

En sus comienzos, la ESI era considerada como una fuente de ionización dedicada al análisis de proteínas. Posteriormente se extendió su uso no solamente al análisis de polímeros y biopolímeros, sino también a moléculas polares más pequeñas. Permite alcanzar una elevada sensibilidad y se acopla fácilmente a la cromatografía líquida de Hoffman y Stroobant (2007).

La ionización se produce aplicando un fuerte campo eléctrico, a presión atmosférica, a un líquido que pasa a través de un capilar a determinado flujo. El campo eléctrico se obtiene aplicando una diferencia de potencial (positiva o negativa según la aplicación) entre 3 y 6 kV, entre el capilar y el electrodo contrario, separado por una distancia de entre 0,3 y 2 cm., lo que produce un campo eléctrico del orden de 10^6 V m⁻¹. Este campo induce una acumulación de cargas (positivas o negativas según el potencial aplicado) en la superficie del líquido a la salida del capilar, generando gotas

altamente cargadas. Estas gotas, luego pasan a través de una cortina de gas inerte caliente (usualmente nitrógeno) o a través de un capilar calentado para eliminar las moléculas de solvente de Hoffman y Stroobant (2007).

2.5.6.4. Analizadores

Desde la fuente de ionización utilizada, los iones son transferidos al espectrómetro de masas, donde son separados según su relación m/z . El analizador opera en condiciones de vacío que aseguran el desplazamiento de los iones con la máxima eficacia. Los diferentes tipos de analizadores incorporados en los sistemas LC-MS/MS son el triple cuadrupolo (QqQ) y el tiempo de vuelo (ToF) y los sistemas híbridos: cuadrupolo acoplado a trampa de iones lineal (QqLiT) y cuadrupolo acoplado a tiempo de vuelo (QToF). A continuación se detalla el analizador de triple cuadrupolo utilizado en este trabajo (Pareja, 2012).

2.5.6.5. Analizador triple cuadrupolo (QqQ)

Este sistema está formado por dos cuadrupolos con una celda de colisión entre ellos (tercer cuadrupolo). Los iones generados en la fuente de ionización son dirigidos hacia el primer cuadrupolo (Q1) en donde se seleccionan los iones precursores de los analitos a estudiar, éstos son acelerados hacia el segundo cuadrupolo (Q2) o cámara de colisión que consiste en un hexapolo que contiene un gas de colisión (generalmente N₂) y donde tiene lugar la fragmentación inducida por colisión (CID). Los iones fragmento generados en la celda de colisión son direccionados al tercer cuadrupolo (Q3) en un segundo paso de filtrado, para conseguir aislar y analizar un ión precursor e iones producto. De esta forma se utilizan el primer y tercer cuadrupolos como analizadores (Hopfgartner et al., 2004).

2.5.7. Parámetros de validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico es un requisito primordial se desea obtener resultados técnicamente válidos, exactos, confiables y reproducibles. La validación es necesaria ya que permite conocer los parámetros de desempeño del método y proporcionar un alto grado de confianza y seguridad en el mismo y en los resultados que se obtienen al aplicarlo. Es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto (UNIT, 2005).

La validación del método es una exigencia de los organismos de acreditación nacionales o internacionales, y debe ser apoyada y extendida mediante la verificación de la performance de dicho método durante los análisis de rutina. Si es posible, todos los procedimientos (pasos) involucrados en un método deben validarse. A nivel internacional, organismos tales como la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), International Standardization Organisation (ISO), Codex

Alimentarius, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Eurachem, etc., han establecido guías para la validación de métodos analíticos. Específicamente para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y ración, en la Unión Europea y por medio de la Dirección General de Sanidad y Protección del Consumidor (DG-SANCO) se establecen criterios generales de validación para los laboratorios oficiales que realizan el control o la vigilancia de residuos de plaguicidas en alimentos y ración de animales, a través del documento No. SANCO/12571/2013 (Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed), en vigencia desde el 01/01/2014 (European Commission, 2013).

El documento no solamente establece criterios acerca de cuáles son los parámetros a evaluar (cifras de mérito) para la validación de una metodología sino también ofrece lineamientos acerca de cómo se debe realizar el transporte, muestreo y procesamiento de la muestra a ser analizada, preparación de estándares, métodos de extracción, confirmación de resultados, cuantificación, y expresión de resultados. Las cifras de mérito a evaluar a la hora de realizar la validación de una metodología son las siguientes: precisión, selectividad y especificidad, exactitud, veracidad, límites de detección y cuantificación, linealidad, efecto matriz, robustez (European Commission, 2013).

A partir de 2016 existe una nueva versión del documento SANCO; el documento SANTE/11945/2015. Este trabajo, se basó en los criterios DG-SANCO versión 2014, no solo para la validación de los métodos desarrollados sino también para la identificación, confirmación y cuantificación de los compuestos de interés a través del documento No. SANCO/12571/2013 (Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed), en vigencia desde el 01/01/2014 (Colazzo, 2016).

2.5.8. Criterios para la identificación y confirmación de residuos de plaguicidas según DG SANCO

2.5.8.1. Requisitos en cromatografía

El tiempo de retención del compuesto en la muestra debe coincidir con el del estándar en la curva de calibración, ya sea en solvente o en matriz (en LC la tolerancia es de 2,5%, en GC la tolerancia es de 0,5%, Colazzo, 2016).

2.5.8.2. Requisitos en espectrometría de masas

La identificación depende de la selección de iones diagnóstico adecuados. Siempre que sea posible debe seleccionarse el ión molecular para realizar la identificación y confirmación del plaguicida de interés. En general los iones m/z mayores que 100 presentan mayor seguridad como iones diagnóstico. Además los iones

isotópicos, especialmente los de Cl o Br son particularmente útiles a la hora de la confirmación (Colazzo, 2016).

Los picos observados en los cromatogramas generados para cada compuesto deben presentar una relación señal-ruido (S/N del inglés signal-to-noise) mayor que 3, con tiempos de retención, forma de pico, y relación de las abundancias de iones que coincidan con el estándar utilizado para la calibración. El ión que presente la mayor intensidad debe ser utilizado para la cuantificación. Además como la selectividad depende del detector, se deben seguir criterios de identificación determinados establecidos según el tipo de detector (Colazzo, 2016).

Otro criterio que se debe cumplir para la identificación es la relación de iones fragmento. La intensidad relativa de los iones detectados, expresada en porcentaje de intensidad del ión o fragmento más abundante, se debe corresponder con la del estándar en las mismas condiciones de concentración y medida (Colazzo, 2016).

Por otro lado cuando se miden fragmentos de masa mediante técnicas que no son de full scan se debe seguir un sistema de identificación por puntos para asegurar una correcta interpretación de los datos. Según la Directiva 96/23/EC de la Unión Europea, las técnicas basadas en GC-MS requieren de 4 puntos de identificación, que corresponden a 3 iones fragmento y el tiempo de retención, mientras que las técnicas de LC-MS/MS requieren de 5 puntos de identificación; 2 iones precursores, cada uno con su ión fragmento y el tiempo de retención (European Commission, 2011).

Límite de detección: es la concentración mínima del analito que puede ser determinada cuantitativamente con una precisión y veracidad adecuada.

Límite de cuantificación: se define como la mínima concentración o masa del compuesto que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión adecuada (media de recuperación para cada producto representativo en el rango de 70 a 120%, con una RSD $\leq 20\%$, Vial y Jardy, 1999).

Para la estimación del LOD y del LOQ existen diferentes aproximaciones, una de las más utilizadas es la relación S/N. De esta forma se considera que el LOD se corresponde con la concentración del compuesto que presenta una relación señal-ruido mayor o igual a 3 y el LOQ se corresponde con la concentración del compuesto para la cual se observa una relación señal-ruido mayor o igual a 10 (Vial y Jardy, 1999).

Veracidad: se define como el grado de concordancia entre el valor promedio esperado y el valor de referencia aceptado (valor real). En el caso de existir materiales de referencia se expresa como el z-score, en ausencia de materiales de referencia se expresa como el porcentaje de recuperación (Vial y Jardy, 1999).

Linealidad: la habilidad del método de obtener resultados experimentales (en un determinado rango) proporcionales a la concentración del analito (Haslová y Zrostilková, 2003).

Robustez: es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inalterado por pequeñas y deliberadas variaciones en los parámetros operacionales del método y que provee la seguridad de obtención de resultados confiables durante su normal ejecución (Haslová y Zrostilková, 2003).

Efecto matriz (EM): es la influencia de uno o más componentes de la muestra detectados durante la medición de la masa o concentración de un compuesto. La respuesta de ciertos analitos en algunos sistemas de determinación (por ejemplo, GC, LC-MS, ELISA) puede verse afectada por la presencia de compuestos co-extraídos de la muestra (matriz). A pesar de que el mecanismo exacto de supresión o aumento de la señal ocasionado por la matriz no se conoce exactamente se asume que los componentes de la matriz afectan el proceso de ionización en la interface API aumentando o disminuyendo la cantidad de iones de analito formados (Haslová y Zrostilková, 2003).

2.5.8.3. Diseño factorial de los experimentos y optimización

Muchas de las primeras aplicaciones de los métodos de diseño experimental se llevaron a cabo en áreas relacionadas con la agricultura y la biología, de ahí que gran parte de la terminología utilizada provenga de estos antecedentes agrícolas. Pero no fue hasta 1930 cuando se aplicó por primera vez en la industria. Terminada la segunda guerra mundial, los métodos de diseño experimental se introdujeron en las industrias químicas y de transformación de Europa y Estados Unidos. Recientemente ha surgido un renovado interés por el diseño experimental que actualmente se aplica en multitud de áreas que emplean de forma extensiva la experimentación (Hernández, 2005).

El término diseño experimental se utiliza habitualmente para describir las etapas de identificación de los factores que pueden influir en el resultado de un experimento, de modo que se minimicen los efectos de los factores incontrolados, así como las etapas de utilización del análisis estadístico para separar y evaluar los efectos de los diversos factores implicados. Haciendo uso de tests de significancia se puede determinar qué factores son influyentes en el resultado y cuáles no. Dado que son muchos los factores que afectan a los resultados experimentales se pueden necesitar diseños experimentales muy complejos. Son muchos los tipos de diseño experimental existentes de los cuales se describen, a continuación, los más utilizados (Kellner et al., 1998).

Diseños de “screening”

Así se denominan a aquellos diseños en los que existen dos niveles para cada factor, de entre los cuales el más utilizado es el diseño factorial completo (full factorial

design) a dos niveles, también denominado diseño 2^k , siendo k el número de factores. Si el número de factores de un experimento es pequeño, los diseños factoriales completos pueden llevarse a cabo de forma sencilla y rápida. Sin embargo, si el número de factores es grande, el número de experimentos aumenta de forma drástica, de forma que cuando éstos son muchos es necesario intentar discernir cuáles de ellos son realmente importantes o influyentes en el experimento. Ello puede llevarse a cabo determinando los denominados efectos de los factores. Muchos programas estadísticos permiten calcular numéricamente la influencia de cada factor o de la combinación de varios de ellos sobre el experimento en sí, permitiendo eliminar aquellos que realmente ejercen poca o ninguna influencia (Hernández, 2005).

A la hora de llevar a la práctica un diseño experimental, es preciso tener en cuenta un aspecto importante. Existen una serie de factores incontrolados durante el transcurso de un experimento, pero los errores en un método debido a esa variación incontrolada no son aleatorios durante mucho tiempo, ya que los errores en medidas sucesivas están correlacionados. Esto puede conducir a que se produzcan errores de tipo sistemático en los resultados. Con objeto de superar este problema de forma efectiva se utiliza la técnica de aleatorización que consiste en llevar a cabo los experimentos de forma aleatoria, asegurando así que los errores en cada nivel de los factores debidos a factores incontrolados no estén correlacionados (Hernández, 2005).

2.5.8.4. Etapas de un proceso de optimización

Básicamente, un proceso de optimización consta, según Hernández (2005) de tres pasos:

1.- Selección de una función objeto. Se trata de seleccionar aquel criterio o variable que se pretende optimizar (maximizar o minimizar). Frecuentemente, dicha variable suele ser la señal analítica o el tiempo de análisis. En casos más complicados, sin embargo, se idean una serie de funciones obtenidas combinando varios criterios, como pueden ser la selectividad, sensibilidad, precisión entre otros. Esta función también se denomina función respuesta sólo que se trata de una respuesta obtenida a partir de otras.

2.- Selección de los factores más importantes. Como ya se ha señalado, se puede hacer llevando a cabo un diseño experimental de screening que permite, mediante la determinación de los efectos de los factores, así como de su influencia en la respuesta medida, determinar qué factores son los que realmente influyen en el resultado.

3.- Optimización. Se trata de encontrar la combinación de factores que maximice o minimice dicha función objeto. En términos matemáticos encontrar los máximos y los mínimos son procesos virtualmente idénticos. Para ello puede distinguirse entre optimización simultánea y secuencial. En la primera la relación entre respuesta y factores se obtiene llevando a cabo un diseño experimental, construyendo un

modelo matemático e investigando a través de este modelo la relación entre las variables. Por otro lado, la optimización secuencial se basa en un diseño de experimentos inicial, seguido de otros experimentos llevados a cabo en una cierta dirección que será función de esos experimentos iniciales. No se trata de buscar la relación existente entre la respuesta y los factores, sino que la superficie de respuesta se busca realizando experimentos en una cierta dirección.

Un buen método de optimización tiene dos cualidades importantes: produce un conjunto de condiciones experimentales que proporcionan la respuesta máxima o, al menos, una respuesta que sea próxima al óptimo, y lo hace así con el número más pequeño posible de etapas experimentales de ensayo. En la práctica, la velocidad y conveniencia del procedimiento de optimización resulta extremadamente importante, pudiendo ser suficiente en algunos casos utilizar un método que alcance de manera razonable un valor próximo al óptimo verdadero en un número pequeño de pasos (Hernández, 2005).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EXPERIMENTOS DE CAMPO Y LABORATORIO

El experimento se instaló en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (EEMAC) de la Facultad de Agronomía, al sur del Dpto. de Paysandú (32°32’S; 58°07’W), y se realizó entre noviembre de 2013 y marzo del 2014 sobre un cultivo de soja variedad Nidera A 8009 RG sembrado en noviembre de 2013.

Los datos del clima se obtuvieron en la estación meteorológica de la EEMAC.

El diseño experimental fue de parcelas al azar con tres tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos fueron los siguientes:

T1: clorpirifos (483 ml/ha concentrado emulsionable 48%)

T2: triflumuron (52 ml/ha concentrado emulsionable 48%)

T3: testigo (sin aplicación)

Cada parcela midió 4 m. por 10 m. Las aplicaciones se realizaron con mochila experimental herbicida de CO₂, con barra de 6 picos, con boquilla de abanico plano, en un volumen de 120 L/ha de caldo el 27/2/2014 a las 17 hs.

Para obtener las larvas del experimento se capturaron insectos adultos en trampa de luz y larvas a campo mediante red entomológica y paño vertical en praderas de alfalfa (*Medicago sativa*) ubicadas en la Estación Experimental. Las larvas obtenidas en campo se criaron en grupos de 15-20 alimentadas con alfalfa hasta llegar al estado de pupa, estas fueron ubicadas individualmente en cajas de Petri con el fondo cubierto con papel humedecido. Al emerger los adultos se los acondicionó en cilindros plásticos de 15 cm. de diámetro por 30 cm. de altura cubiertos con malla en la parte superior y en la inferior con papel humedecido. En cada jaula se colocaron 3 hembras y un macho y se los alimentó con una dieta en base a miel, azúcar y cerveza. Las mallas fueron extraídas diariamente y colocadas en cajas plásticas de 15 cm. de largo por 8 cm. de alto, cubiertas por papel film y con el fondo cubierto con papel humedecido. Las larvas emergidas, destinadas a los tratamientos, se colocaron en grupos de 15-20 y se alimentaron con folíolos de soja hasta alcanzar el segundo estadio.

Para el estudio de residualidad biológica, se recolectaron folíolos de soja en cada parcela a los 2, 6, 12 y 22 días post aplicación. En placas de Petri (60 x 15 mm.) se colocó una larva con 2 a 3 hojas y se alimentaron durante 7 días, controlando diariamente la mortalidad. Se realizaron 20 repeticiones para cada fecha y tratamiento.

En laboratorio se determinó el número de larvas muertas calculando el porcentaje de mortalidad a través de la fórmula de Abbott.

Para evaluar la residualidad de los insecticidas a campo, para los diferentes tratamientos se determinó el número de larvas de lepidóptero por metro según tamaño y la mortalidad se corrigió en base a la fórmula de Henderson y Tilton del año 1955.

Fórmula de Henderson y Tilton

$$\text{Corregido\%} = \left(1 - \frac{\text{n en Co antes del tratamiento} * \text{n en T después del tratamiento}}{\text{n en co después del tratamiento} * \text{n en T antes del tratamiento}} \right) * 100$$

Dónde: n = población de insectos, T = tratado, Co = Control

Para el cálculo de mortalidad de larvas en laboratorio se utilizó la fórmula de Abbott del año 1925.

Fórmula de Abbott

$$\text{Corregido\%} = \left(1 - \frac{\text{n en T después del tratamiento}}{\text{n en co después del tratamiento}} \right) * 100$$

Dónde: n = población de insectos, T = tratado, Co = Control

Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza y test de comparación de medias LSD Fisher utilizando el programa InfoStat para determinar las diferencias estadísticas entre métodos.

Para el análisis estadístico de los insectos a campo se ajustó un modelo lineal generalizado asumiendo que la variable de interés tiene distribución de Poisson

$$\text{Ln}(\mu) = \beta_0 + \text{Pi} + \text{Dj} + (\text{PD})_{ij}$$

Si la interacción no fue significativa la misma fue excluida del modelo.

Las medias de los efectos significativos fueron comparadas por el método DGC.

Se usó el paquete estadístico Infostat versión 25/2/2016.

3.2. ANÁLISIS QUÍMICOS

Estándares

Estándares de plaguicidas de pureza en el rango 97-99% adquiridos de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania) y LGC Standards.

Solventes

Acetonitrilo calidad UV/HPLC grado ACS suministrado por Pharmco-AAPER (Brookfield, CT, USA); agua tipo 1 (ASTM) con resistencia específica de 18 MΩ, obtenida a partir de un sistema de purificación de agua Barnstead™ Easypure™ RoDi Thermo Fischer Scientific (Marietta, OH, USA)

Sales

Alúmina (Al₂O₃), sulfato de magnesio (MgSO₄) adquiridos a J.T. Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). El MgSO₄ fue calcinado en mufla durante 5 h. a 500°C de forma de eliminar los ftalatos y el agua residual.

Cloruro de sodio (NaCl) fue suministrado por Panreac Química S.A (Barcelona, España).

Adsorbentes

-C-18, de 40 μm. de tamaño de partícula adquirido en Varian (Palo alto, CA, USA).

Instrumental

LC-MS/MS

Cromatógrafo de líquidos Agilent Serie 1200 (Waldbronn, Alemania), equipado con bomba binaria Agilent Serie 1200 (G1312A), inyector automático de alto rendimiento Agilent Serie 1200 (G1367B) con termostato del sistema Agilent 1290 Infinity (G1330B), micro-desgasificador de vacío Agilent Serie 1200 (G1379B) y compartimento termostatizado de columna Agilent 1260 Infinity (G1316A TCC). El

control puede ser realizado mediante el software correspondiente o mediante el módulo de control Agilent Instant Pilot (G4208A).

Columna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C18, 4,6x150 mm.; 5 µm. de tamaño de partícula, de Agilent Technologies.

El detector de masas es del tipo triple cuadrupolo con trampa de iones lineal ABSciex 4000 QTRAP® (Toronto, Canadá), equipado con una fuente de ionización a presión atmosférica Turbo V™.



Figura 1. Imagen del HPLC-MS/MS utilizado

La adquisición de datos y cuantificación se realizó mediante el Software Analyst® (ABSciex) Ver. 1.5.1 Build 1508.

Otros

Procesadora Metvisa CUT4; vortex Wisd VM-10; centrífuga Thermo Scientific SL16; pHímetro Oakton pH Tutor; concentrador de muestras Biotage TurboVap® LV; baño de ultrasonido Wisd Laboratory Instruments Wiseclean.

Análisis de residuos de insecticidas

Para el análisis químico, de cada tratamiento se extrajeron folíolos del estrato superior de las plantas de cada parcela (repetición) a las 6 h, y a los 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, 20 días post aplicación para su posterior análisis en laboratorio. Sin embargo para la etapa de búsqueda y validación del método más adecuado se utilizaron folíolos de soja del mismo cultivo antes de la aplicación de insecticidas que fueron almacenados en freezer.

El análisis de residualidad de los insecticidas en los folíolos se desarrolló en base a una metodología analítica de extracción y clean-up para una posterior determinación mediante LC-QqQ/MS.

Primeramente se ajustaron las condiciones cromatográficas para lograr una buena separación de los compuestos en estudio. Las condiciones cromatográficas optimizadas fueron: tipo de columna, flujo de la fase móvil, fase móvil (solventes, proporción y gradiente) y volumen de inyección. En el modo de ionización positivo, para la determinación del clorpirifos se seleccionó el ión $[M+H]^+$ como ión precursor, mientras que para el triflumuron que se analizó en modo negativo tomándose el ión molecular $[M-H]^-$. Se utilizó una fase móvil con MeOH (0,1% Ac. Fórmico)/ H₂O (NH₄Ac 10 mM) para favorecer la formación de aductos.

Posteriormente se optimizaron las condiciones del espectrómetro de masas: las transiciones a ser monitoreadas para cada uno de los compuestos, junto con los parámetros de voltaje de fragmentación (DP) y energía de colisión (CE), potencial de entrada (EP) y potencial de salida de la celda de colisión (CXP).

Para llevar a cabo la optimización se prepararon estándares individuales de los plaguicidas a una concentración de 100 µg/L, y luego fueron inyectados directamente en el espectrómetro de masas utilizando una bomba de jeringa a 10 µL/min.

Una vez optimizados los parámetros en el espectrómetro de masas para los plaguicidas de interés, se prosiguió a evaluar las condiciones cromatográficas, principalmente el gradiente de la fase móvil. Se estudiaron diferentes gradientes utilizando como principales solventes ACN y agua al 0,1% de ácido fórmico, evaluando los picos cromatográficos de los plaguicidas con el fin de obtener una buena separación y poderlos identificar apropiadamente.

Modo negativo (triflumuron)

Cuadro 1. Gradiente fase móvil para LC modo negativo

Tiempo (min.)	Flujo ml/min.	FM A	FM B
0,00	0,6	80,0	20,0
1,00	0,6	80,0	20,0
4,00	0,6	0,0	100,0
7,00	0,6	0,0	100,0
9,00	0,6	80,0	20,0
12,00	0,6	80,0	20,0

A: agua 10 mM acet amonio B: MeOH 0,1% ac.fórmico

Cuadro 2. Parámetros operacionales optimizados para el análisis de plaguicidas en modo negativo

Ión precursor	Ión fragmento	Tiempo de retención (min.)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
357.2	153.9	8,3	-89	-10	-12	-32
357.2	175.4	8,3	-89	-10	-32	-16

DP; declustering potential (V), CE; energía de colisión (eV) y CXP; potencial de salida de la celda de colisión (5 V).

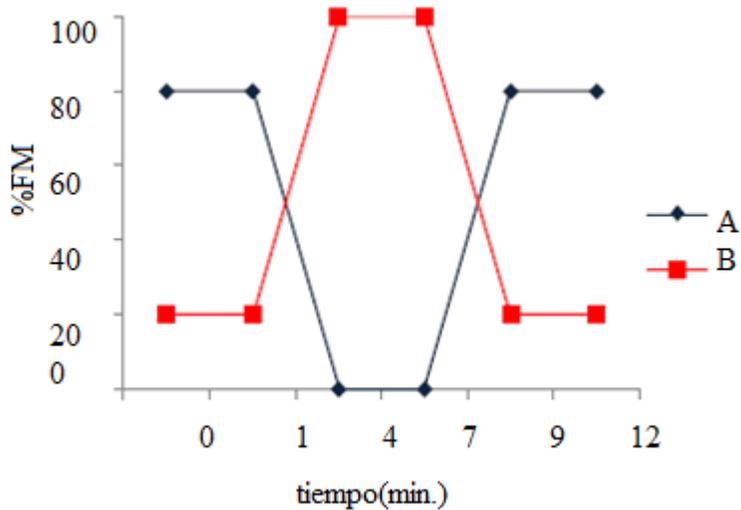


Figura 2. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de plaguicidas mediante LC-QqQ/MS en modo ESI negativo

Modo positivo

Cuadro 3. Gradiente fase móvil para LC modo positivo

Tiempo (min.)	Flujo ml/min.	FM A	FM B
0	0,6	90	10
1	0,6	90	10
14	0,6	0	100
16	0,6	0	100
22	0,6	90	10
28	0,6	90	10

A: agua 10 mM acet. amonio B: MEOH 0,1% ac.fórmico

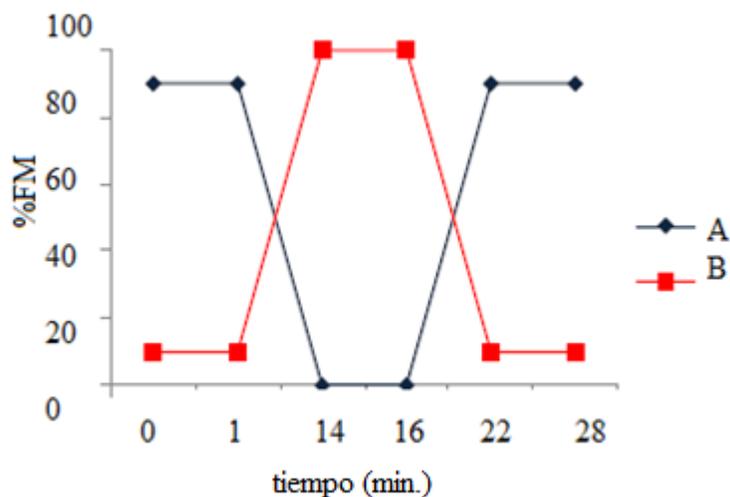


Figura 3. Gradiente de fase móvil utilizado para el análisis de plaguicidas mediante LC-QqQ/MS en modo ESI positivo

Cuadro 4. Parámetros operacionales optimizados para el análisis de plaguicidas en modo positivo

Compuesto	Ión precursor	Ión fragmento	Tiempo de retención (min.)
cialotrina lambda	467.1	225.0	18,0
cialotrina lambda	467.1	141.2	18,0
ciflutrin beta	451.1	127.0	18,0
ciflutrin beta	451.1	191.0	18,0
cipermetrina	433.1	127.0	18,0
cipermetrina	433.1	191.0	18,0
tiametoxam	292.0	211.1	10,0
tiametoxam	292.0	246.1	10,0
tiametoxam	292.0	181.2	10,0
tiametoxam	292.0	152.2	10,0
clorpirifos	349.95	198.0	18,3
clorpirifos	349.95	97.0	18,3
carbaril	202.2	145.0	14,3
carbaril	202.0	127.1	14,3
carbaril	202.2	117.1	14,3
carbaril	202.2	115.3	14,3
acetamiprid	223.2	99.2	11,7
acetamiprid	223.2	126.1	11,7
acetamiprid	223.2	90.2	11,7

bifentrin	440.1	181.2	19,3
bifentrin	440.1	166.2	19,3

Compuesto	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
cialotrina lambda	16.0	10.0	23.0	12.0
cialotrina lambda	16.0	10.0	23.0	15.0
ciflutrin beta	26.0	10.0	23.0	18.3
ciflutrin beta	26.0	10.0	23.0	13.5
cipermetrina	20.0	10.0	23.0	16.9
cipermetrina	20.0	10.0	23.0	16.9
thiametoxam	88.0	10.0	23.0	15.0
thiametoxam	88.0	10.0	23.0	13.0
thiametoxam	88.0	10.0	23.0	29.0
thiametoxam	88.0	10.0	23.0	43.0
clorpirifos	71.0	10.0	23.0	16.0
clorpirifos	71.0	10.0	23.0	6.0
carbaril	68.0	10.0	12.0	10.0
carbaril	68.0	10.0	35.0	10.0
carbaril	68.0	10.0	33.0	10.0
carbaril	68.0	10.0	46.0	10.0
acetamiprid	55.0	10.0	47.0	10.0
acetamiprid	55.0	10.0	25.0	10.0
acetamiprid	55.0	10.0	53.0	10.0
bifentrin	36.0	10.0	21.0	10.0
bifentrin	36.0	10.0	55.0	10.0

DP; declustering potential (V). CE; energía de Colisión (eV) y CXP; potencial de salida de la celda de colisión (5 V).

Una vez optimizadas las condiciones de análisis en el LC-MS/MS se diseñaron las metodologías de extracción y clean-up para la matriz en estudio; foliolos de planta de soja. Las metodologías seleccionadas fueron el método de QuEChERS (MA) que se basa en una extracción con solvente, en general ACN, y una etapa de purificación dispersiva con diferentes adsorbentes; PSA o Al₂O₃, C-18, CaCl₂ o MgSO₄ y/o carbón grafitizado (GCB) y el método de acetato de etilo (MB) que se basa en la extracción de los componentes de interés con el solvente AcOEt.

Se evaluaron diferentes combinaciones de estos reactivos y solventes mediante la comparación de los porcentajes de recuperación y desviación estándar relativa a una concentración de 200 µg/kg.

Así mismo se evaluaron dos posibles métodos de purificación preliminares;

Clean up

A: 750 mg CaCl₂. 50 mg C-18. 125 mg Al₂O₃. 50 mg GCB

B: 750 mg MgSO₄. 50 mg C-18. 125 mg Al₂O₃

La metodología que presentó mejores resultados preliminares fue la seleccionada para optimizar la metodología final.

La optimización de dicho método consistió en la realización de un diseño experimental de tipo factorial. Para la optimización de la etapa de extracción el diseño factorial consistió en tres niveles de cuatro variables resultando en 17 experimentos diferentes, mientras que para la etapa de purificación fue de 5 niveles y 3 variables, resultando en 15 experimentos.

Este estudio se realizó con la metodología QuEChERS modificada, a partir de una muestra de soja previamente fortificada con los insecticidas de interés en una concentración de 200 µg/kg hoja por triplicado.

Los parámetros operacionales a evaluar en la etapa de extracción fueron: cantidad de agua, cantidad de solvente, cantidad de MgSO₄ y tiempo de agitación según el cuadro 5.

Cuadro 5. Parámetros evaluados en diseño factorial para la etapa de extracción

Parámetro	Cantidades evaluadas		
agua (g)	2,5	5,0	10,0
acetoniitrilo (mL)	10	15	20
MgSO ₄ (g)	3	4	6
tiempo de agitación (min.)	2	4	5

Cuadro 6. Diseño factorial para cada factor de evaluación

No. de exp.	Cant. agua(ml)	Cant. ACN(mg)	Cant. MgSO ₄ (mg)	Tiempo de agit. (min.)
1	2,5	10	3	2
2	2,5	10	3	5
3	2,5	10	6	2
4	2,5	10	6	5
5	2,5	20	3	2
6	2,5	20	3	5
7	2,5	20	6	2
8	2,5	20	6	5
9	5,0	15	4	4
10	10,0	10	3	2
11	10,0	10	3	5
12	10,0	10	6	2
13	10,0	10	6	5
14	10,0	20	3	2
15	10,0	20	3	5
16	10,0	20	6	2
17	10,0	20	6	5

Posteriormente a la optimización de las condiciones de extracción de los plaguicidas de interés, se realizó el diseño experimental con el fin de optimizar la cantidad de adsorbentes utilizadas para la purificación de los extractos. Para esto se realizaron 15 experimentos con tres repeticiones cada uno.

Cuadro 7. Diseño de los experimentos con variaciones de sales

No. experimento	Alúmina(mg)	C-18(mg)	MgSO ₄ (mg)
e1	0,075	0,05	0,75
e2	0,100	0,04	0,65
e3	0,100	0,04	0,85
e4	0,100	0,06	0,65
e5	0,100	0,06	0,85
e6	0,125	0,03	0,75
e7	0,125	0,05	0,55
e8	0,125	0,05	0,75
e9	0,125	0,05	0,95
10	0,125	0,07	0,75
e11	0,150	0,04	0,65
e12	0,150	0,04	0,85
e13	0,150	0,06	0,65
e14	0,150	0,06	0,85
e15	0,175	0,05	0,75

La metodología final de análisis se presenta en la figura 4. Como se puede observar consiste en pesar una muestra de 2,5 g de muestra de foliolos de soja, luego se le agregan 10 ml de agua y 10 ml de ACN para luego agitar manualmente 1 minuto. Posteriormente se le adicionan las sales e inmediatamente se agita manualmente por 2 minutos y después se lo centrifuga durante 5 minutos. Luego de este paso, se extraen 5 ml de la muestra líquida y se le adicionan 125 mg de alúmina, 70 mg de C-18 y 750 mg de MgSO₄ y después se agita por 30 segundos en vortex y se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm.

Finalmente se toma 1 ml de la muestra, después se filtra con jeringa y filtro descartable de 0,22 μm a un vial ambarambar de ml.



Figura 4. Esquema de extracción de plaguicidas en muestras de folíolos

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS DE CAMPO

Cuando se analizó la proporción de especies en el total de larvas de lepidópteros (cuadro 8), *R. nu* siempre tuvo menor densidad de individuos que *A. gemmatalis*, resultados que fueron similares a los obtenidos por Valverde et al. (2008). Dicha proporción se mantuvo a lo largo de la evaluación y para cada uno de los tratamientos (cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de larvas de lepidóptero por especie en parcelas de soja tratadas con insecticidas

	Días post aplicación									
	0		2		6		12		22	
	Ag	Rn	Ag	Rn	Ag	Rn	Ag	Rn	Ag	Rn
Testigo	35,3	0,8	47,1	7,7	56,5	9,4	66,2	4,8	48,1	5,6
clorpirifos	29,8	2,6	8,7	9,6	8,2	4,7	15,2	2,8	25,3	5,3
triflumuron	29,3	2,1	17,3	9,6	16,5	4,7	9,0	2,1	12,8	2,8
subtotal	94,5	5,5	73,1	26,9	81,2	18,8	90,3	9,7	86,3	13,8

Ag: *A. gemmatalis*; Rn: *R. nu*.

Cuadro 9. Número promedio de larvas de lepidópteros por metro en parcelas tratadas con insecticidas

Tratamiento	Días post aplicación				
	0	2	6	12	22
Testigo	15,3 a	6,3 a	6,2 a	11,4 a	19,1 a
clorpirifos	13,8 a	2,1 b	1,2 b	2,9 b	10,9 b
triflumuron	13,3 a	3,1 b	2,0 b	1,8 b	5,6 c
Total	42,4	11,6	9,4	16,1	35,6

Medias seguidas por la misma letra, en las columnas, no difieren significativamente ($p \leq 0,05$)

Dos días post aplicación la población de larvas de lepidópteros fue significativamente menor en los tratamientos insecticidas que en el testigo, sin diferencias entre ellos. Estas diferencias se mantuvieron hasta el día 22 post aplicación; en ese momento, en las parcelas tratadas con triflumuron se registró menor población que en las tratadas con clorpirifos. En los días dos y seis post aplicación, la población en

el testigo disminuyó en relación al día cero, esta disminución pudo estar dada por factores naturales como pasaje del estado de larva a pupa o muerte de larvas por agentes biológicos (Avalos et al. 2004, Aragón y Flores 2006). A los 12 días la población en este tratamiento aumentó y siguió creciendo hasta el final del experimento (cuadro 9, anexo 1).

A los 2 días post aplicación se esperaba que hubieran diferencias significativas en el número de lepidópteros vivos entre clorpirifos y triflumuron (Giuggia et al., 2011), debido a las diferencias en el modo de acción de cada producto, sin embargo, en este trabajo ese efecto no se observó.

Giuggia et al. (2011) quienes trabajaron con clorpirifos y novaluron en soja sobre el control de *R.nu* y *Achyra bifidalis* en la localidad de Cuatro Vientos, Argentina, obtuvieron resultados similares para el tratamiento con clorpirifos hasta los 6 días, ya que a los 14 días no registraron diferencias con el testigo en dicha evaluación donde explican los autores que pudo estar dado por un descenso en el número de larvas de la población testigo, todo lo contrario a lo que ocurrió en nuestro caso.

Cuando se utilizaron reguladores de crecimiento se obtuvieron resultados diferentes a los encontrados por Giuggia et al. (2011) estos autores, para el caso de novaluron no obtuvieron diferencias significativas con el testigo en ninguna de las fechas, contrariamente a nuestro caso que se encontraron diferencias significativas hasta el día 22 para triflumuron. Esto puede estar explicado por el tamaño de larvas que se contabilizaron en cada experimento, en nuestro caso se contaron todos los estadios (1 al 6), mientras que en el otro caso solo se contabilizaron larvas mayores a 1,5 cm.

En el muestreo realizado el día 22 los tres tratamientos presentaron diferencias significativas. El menor número de larvas se registró en el tratamiento con triflumuron, lo que podría estar indicando un mayor efecto residual de este insecticida en comparación con clorpirifos. En este último tratamiento, aunque se mantuvieron las diferencias significativas con el testigo, la población de larvas fue casi el doble que la registrada en las parcelas con triflumuron.

No se registró interacción día- tratamiento, por lo tanto, no se analizó estadísticamente la evolución de la población de larvas a través del tiempo en cada tratamiento.

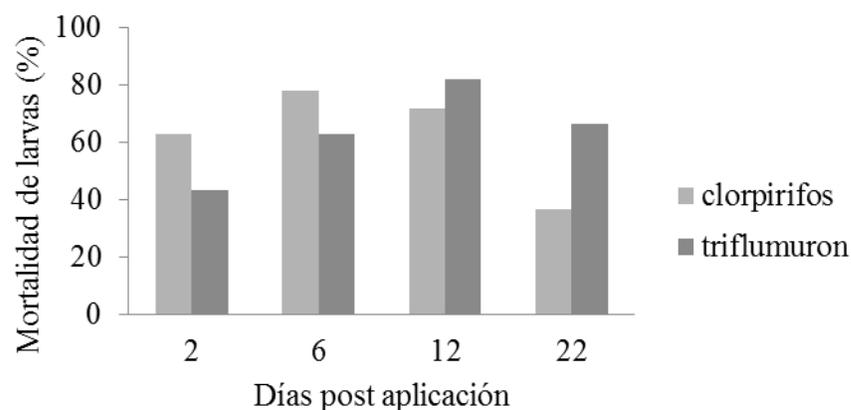


Figura 5. Mortalidad de larvas de lepidópteros con respecto al testigo corregida por fórmula de Henderson y Tilton

Clorpirifos alcanzó una mortalidad del 78% el segundo día post aplicación y el triflumuron el 82% el día 12, en los demás días la mortalidad alcanzada por ambos insecticidas estuvo por debajo de lo exigido por el MIP (figura 5).

4.1.1. Efecto de los tratamientos sobre larvas de distintos estados de desarrollo

En general se registró un predominio de lagartas chicas durante todo el experimento. Las poblaciones de lagartas chicas y grandes al inicio del experimento no fueron significativamente diferentes. En el caso de las larvas grandes, en el transcurso de los días, ambos tratamientos con insecticidas no presentan diferencias, entre sí pero sí un menor número en relación al testigo. Al día 22 esta tendencia cambió y únicamente el tratamiento con triflumuron presentó el menor número, sin diferencias entre testigo y clorpirifos (cuadro 10, anexo 2).

Las larvas chicas mostraron la misma tendencia que las grandes al presentar diferencias entre las parcelas tratadas y el testigo, a excepción del día 6 donde no hubo diferencias entre tratamientos. Esta tendencia fue similar a la obtenida por Braga da Silva et al. (2003) con insecticidas reguladores de crecimiento y por Chiaravalle et al. (2011) sobre *R. nu* y *A. gemmatalis*.

Cuadro 10. Número de larvas de lepidópteros, según tamaño, por metro en parcelas de soja tratadas con insecticidas

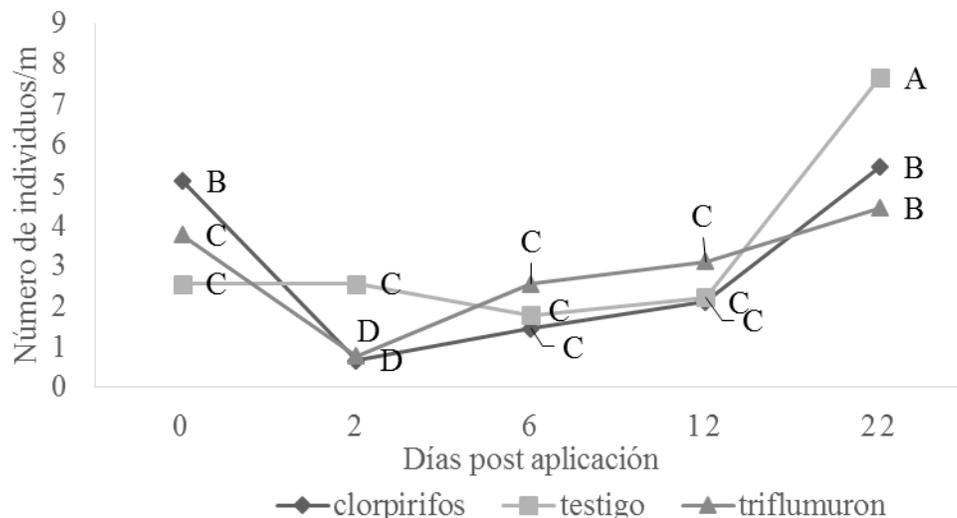
Tratamiento	Días post aplicación									
	0		2		6		12		22	
	G	Ch	G	Ch	G	Ch	G	Ch	G	Ch
Testigo	3,6 a	11,8a	2,4 a	3,9 a	4,3 a	1,9 a	3,0 a	8,4 a	6,2 a	12,9 ^a
clorpirifos	4,2 a	9,6 a	1,2 b	0,9 b	0,4 b	0,8 a	0,7 b	2,2 b	5,8 a	5,1 b
triflumuron	4,3 a	9,0 a	1,2 b	1,9 b	0,7 b	1,3 a	0,7 b	1,1 b	1,9 b	3,7 b
Total	12,1	30,3	4,9	6,7	5,4	4,0	4,3	11,8	13,9	21,7

G: larvas grandes, estadios cuatro a seis, Ch: larvas chicas, estadios uno a tres. Medias seguidas por la misma letra, en las columnas, no difieren significativamente ($p \leq 0,05$).

La menor densidad de larvas de tamaño grande (cuadro 10) pudo estar afectada por la acción de enemigos naturales sobre larvas chicas provocando que estas no pudieran lograr un mayor tamaño. Como indica Nicholls (2008) la disminución de las poblaciones de insectos en un cultivo están asociadas a mortalidad y emigración donde actúan factores bióticos y abióticos que regulan la densidad dentro del agro ecosistema.

4.1.2. Enemigos naturales

El número de predadores (figura 6), tuvo un descenso en las parcelas de clorpirifos y triflumuron a los 2 días post aplicación, registrándose diferencias significativas entre los tratamientos insecticidas y el testigo lo que demuestra un efecto de los productos sobre los insectos (anexo 3). En las siguientes fechas de muestreo se observaron leves diferencias a favor de las parcelas donde se aplicó triflumuron pero estas no fueron significativas, a los 22 días la parcela testigo presentó el mayor número de predadores con diferencias estadísticas sobre los tratamientos con insecticidas.



Medias seguidas por la misma letra, no difieren significativamente en cada día post aplicación ($p \leq 0,05$).

Figura 6. Número total de predadores por metro en días post aplicación de insecticidas en parcelas de soja.

Los resultados obtenidos a los 2 días post aplicación reflejan una caída en el número de individuos en las parcelas tratadas pero no en el testigo, lo que indica un impacto negativo de los insecticidas sobre los insectos benéficos. No se analizó estadísticamente la evolución para cada tratamiento debido a que no existió interacción día-tratamiento (anexo 3). En los días 6 y 12 no se registran diferencias entre tratamientos probablemente por influencia de los insecticidas sobre las parcelas testigo aunque no se puede afirmar que sea un efecto directo de los insecticidas ya que puede haber otros factores actuando. La influencia de los insecticidas permaneció hasta el día 22 post aplicación donde sí hubo diferencia de los tratamientos con respecto al testigo.

El hecho de no registrar diferencias pudo estar dado porque los predadores se caracterizan por ser estrategas K y presentan un metabolismo ralentizado, ajustando sus poblaciones a las características de un determinado hábitat, y teniendo en cuenta, de algún modo, la carga biótica que es capaz de soportar por largo tiempo (Ortuño et al., 2011). Por lo tanto, en este experimento, los predadores podrían haber ajustado su población a la disponibilidad de alimento que, como se observó antes, descendió luego de la aplicación de insecticidas.

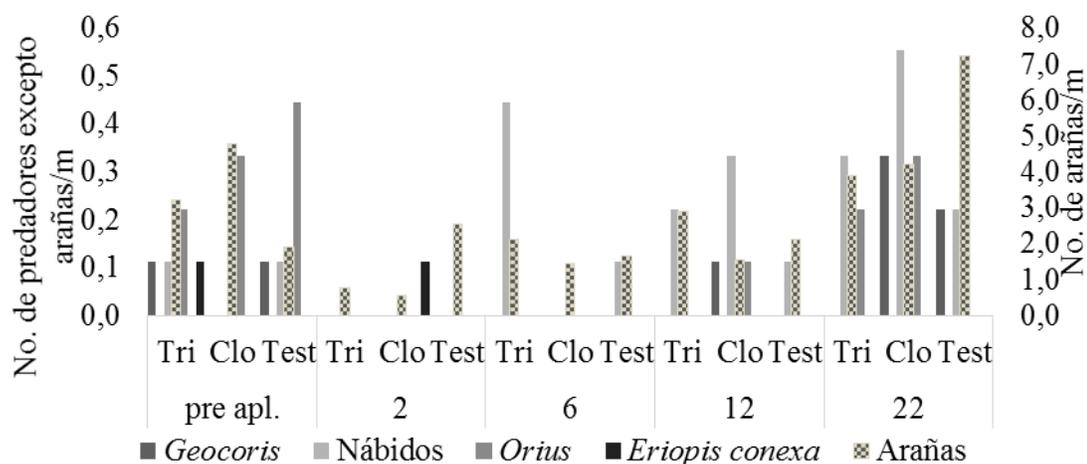
Por otro lado, en las parcelas testigo hubo mayor presencia de predadores solo a los 2 y 22 días post aplicación con respecto a las parcelas con insecticidas, pero en el resto de los momentos de muestreo no hubo diferencias significativas. Este efecto pudo

estar asociado a factores del ambiente que actuaron sobre la población de estos enemigos naturales.

El hecho de que no aumentara la población de predadores en las parcelas de triflumuron con respecto a las de clorpirifos no coincide con lo encontrado por Leiva (2013) quien indica que una característica común de los IGR es que la larva rápidamente deja de comer y es presa de enemigos naturales (parásitos y predadores) que multiplican su población gracias a la presencia de plagas que pierden su potencial de daño.

A su vez estos resultados no se asemejan con los que obtuvieron Ribeiro et al. (2008), quienes registraron efectos adversos de los insecticidas sobre los predadores en soja e indicaron que el clorpirifos fue el insecticida menos selectivo.

Por otro lado, en un experimento con carábidos en praderas permanentes, se evaluó el efecto de las benzoilureas y piretroides y no se encontraron diferencias significativas entre los productos utilizados. Esto indicaría que los IGR causaron un impacto mayor a lo esperado (Merino, 2004). Algo similar encontraron Lorini (1992), De Castro et al. (2012) quienes evaluaron el impacto de triflumuron sobre las poblaciones de artrópodos en caña de azúcar, y en un cultivo de soja sobre enemigos naturales de *A. gemmatilis*, respectivamente.



tri: triflumuron, clo: clorpirifos. test: testigo

Figura 7. Número total de predadores por metro según especie en días post aplicación de insecticidas en parcelas de soja.

Al momento previo a la aplicación el número total de predadores fue de 3,8 insectos por metro, de los cuales el 86,8% correspondieron a arañas de diverso tamaño. Esta mayor proporción de arañas se mantuvo a lo largo de toda la evaluación a campo y su mayor densidad se registró el día 22 (5,1/m) cuando representaron un 86,4% del total

de predadores seguido por los nápidos con un 6,7% (0,4/m) (figura 7). Estos resultados estarían indicando que las arañas podrían ser las que presentan menor sensibilidad a la aplicación de insecticidas con respecto a las demás especies, concordando con (Lorini, 1992), ya que siempre estuvieron presentes en todas las parcelas aunque presentaron un descenso a los 2 días de aplicado los productos. Otra causa de esta fluctuación pudo deberse a que presentan tasas metabólicas bajas, y a que poseen la capacidad de reducirla en periodos de inanición lo que genera que frente a fluctuaciones de presas la población de estos predadores se mantenga invariable (Turnbull 1973, Greenstone y Bennett 1980).

Cuando se analizaron las parcelas por separado, luego de la aplicación y hasta el día 12 se pudo observar una tendencia hacia un mayor número de individuos en las parcelas donde se aplicó triflumuron comparado con aquellas con clorpirifos. Pasada esta fecha la tendencia se revirtió y en las parcelas tratadas con clorpirifos se registró un mayor número de predadores.

Para el caso de los nápidos, en las parcelas testigo se registraron valores de 0,1 individuos por metro pre aplicación alcanzando el mayor número a los 22 días con 0,2 individuos por metro. Sin embargo, en las parcelas con triflumuron, al inicio de la evaluación se partió de bajas poblaciones (0) y a los 6 días se ubicó en 0,4 ind. /m, manteniéndose poco variable en las siguientes fechas.

Para clorpirifos, en las primeras fechas de muestreo no se registró la presencia de nápidos, y recién a los 12 días se encontró una densidad de 0,3/m la cual aumentó y fue máxima a los 22 días con 0,6. Este resultado puede estar explicado por el aumento de las larvas de lepidópteros en esas fechas, ya la presencia y abundancia de estos predadores está afectada principalmente por el factor alimento (Ojeda Peña, 1971).

4.2. RESULTADOS DE LABORATORIO

4.2.1. Cría de larvas con folíolos tratados con insecticidas

Cuadro 11. Porcentaje promedio de mortalidad de larvas de *R. nu* alimentadas con hojas de soja a las que se le aplicaron insecticidas en el campo y se recogieron a los 2, 6, 12 y 22 días post aplicación.

Ev.	Día post aplicación							
	2		6		12		22	
	tri.	clo.	tri.	clo.	tri.	clo.	tri.	clo.
1	11,0	82,9	18,4	40,8	7,0	3,5	-	-
2	96,4	85,7	25,5	43,9	12,0	17,0	13,5	-
3	96,2	88,7	47,4	70,5	62,9	60,8	27,0	7,0
4	96,2	96,2	73,7	77,4	80,8	55,8	33,5	13,5
5	100,0	96,2	81,3	79,5	83,3	55,8	33,5	18,5
6	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	61,7	35,0	20,0
7	100,0	100,0	100,0	100,0	89,2	57,0	35,0	20,0

Ev: día de evaluación. tri: triflumuron. clo: clorpirifos. Se utilizaron medias corregidas por Abbott en el año 1925.

Cuando se valoró la residualidad de los insecticidas en laboratorio, se registraron diferencias entre los productos evaluados sobre el efecto en las lagartas. Clorpirifos tuvo una acción más rápida sobre las larvas y con los folíolos de 2 días post aplicación, y el primer día de evaluación alcanzó el 83% de mortalidad. Triflumuron tuvo una acción algo más lenta, pero al segundo día de evaluación, el 96% de las larvas alimentadas con esos folíolos habían muerto.

Cuando se evaluó el comportamiento a los 6 días post aplicación, ambos productos presentaron una respuesta más lenta pero aun así lograron un 80% de mortalidad al quinto día de evaluación.

Al día 12 post aplicación el clorpirifos dejó de tener eficiencia en cambio el triflumuron alcanzó el 80% de mortalidad cuando las larvas se alimentaron con esos folíolos durante 4 días consecutivos.

Finalmente a los 22 días, la concentración de insecticida no permitió lograr una mortalidad adecuada de larvas para ninguno de los dos productos.

Durante la evaluación se pudo constatar que larvas tratadas con triflumuron presentaron deformaciones, ajustado al modo de acción que tiene el insecticida al inhibir la formación de quitina, y como era de esperar, esto no se observó en aquellas que consumieron folíolos tratados con clorpirifos.

Estos resultados fueron similares a los que obtuvieron Giuggia et al. (2011) cuando evaluaron, a campo, la eficiencia de control en soja de *R. nu* comprando neurotóxicos y reguladores de crecimiento. En este caso los IGRs mostraron mejor control a largo plazo que los neurotóxicos. Dichos autores señalan que en las evaluaciones realizadas a los 14 DDA mostraron que los tratamientos con IGRs fueron los de mayor eficiencia insecticida comprobando su mayor poder residual respecto de los insecticidas neurotóxicos.

De Gaspari et al. (1982) registraron también una mayor residualidad para el control de *A. gemmatilis* de diflubenzuron a los 15 días post aplicación con respecto a clorpirifos.

Los valores de mortalidad obtenidos el día 12 en folíolos tratados con clorpirifos, se vieron afectados al calcularlos mediante la fórmula de Abbott, ya que ésta corrige por la mortalidad que se da en las larvas testigo, que en ese día tuvieron una alta mortalidad que no pudo ser explicada.

4.2.2. Análisis químico

4.2.2.1. Estudio de recuperación

En los cuadros 12 y 13 se muestran los resultados preliminares de las dos metodologías de clean up en donde se evaluaron distintas sales que componían el proceso de clean up.

Una vez definida metodología de purificación que a priori era mejor para la matriz del estudio, se procedió a la aplicación de los 2 diseños factoriales para la optimización de los parámetros de extracción y clean-up.

Por último se procedió a la validación del método, tal como lo establecen las normativas oficiales de control de calidad de la unión europea. Las cifras de mérito estudiadas fueron; veracidad a partir del porcentaje de recuperación, reproducibilidad intermedia y repetitividad a partir de la determinación de la RSD, límite de detección y cuantificación y linealidad.

En este caso se optó por aquellos métodos que arrojaran valores de recuperación entre 70 y 120% y que a su vez mostraran un RSD menor a 20%.

Los porcentajes de recuperación se obtuvieron mediante la fortificación de una muestra blanco (libre de los plaguicidas de interés) con una mezcla que contenía todos los insecticidas a ser analizados. Se fortificó a tres niveles (5; 10; y 200 µg/kg) y se realizó la extracción por triplicado. Para la fortificación, se adicionó 100 µL del mix de estándares de concentración apropiada, a una porción de 2,5 g de soja en un tubo tipo

Falcon de 50 mL. Se dejó en campana durante 2 h para permitir la evaporación del solvente y se homogeneizó agitando manualmente para la posterior extracción.

El diseño experimental utilizado para la optimización del método fue el de diseño compuesto centrado que consiste en una combinación de un diseño factorial completo o fraccionado y de un diseño adicional, que es frecuentemente un diseño en estrella, en los que el punto central de ambos coincide. Si se considera un diseño formado por un diseño factorial completo a dos niveles unido con un diseño en estrella, se obtiene que el número de experimentos viene dado por:

$$\text{No. exp.} = 2^k - p + 2k + n_0$$

donde k es el número de factores, p el valor de reducción del diseño completo y n_0 es el número de experimentos en el centro del diseño (Massart et al., 1997).

La figura 8 muestra un diseño compuesto centrado de tres factores. La distancia α de los puntos del diseño estrella puede ser diferente para cada punto. En un diseño uniforme en el que la distancia es la misma para todos los puntos, suele tomarse

$$\alpha = 2k - p/4$$

con objeto de estimar el error experimental cometido se suelen realizar réplicas de experimentos. En este sentido, normalmente suelen hacerse al menos tres réplicas del punto central.

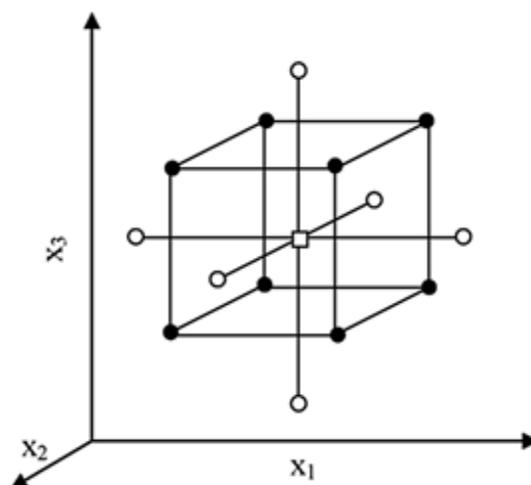


Figura 8. Diseño compuesto centrado

Sin embargo, el diseño compuesto centrado a pesar de presentar buenas propiedades estadísticas, presenta una gran desventaja de tipo experimental: el diseño en

estrella fuera del cubo hace que aumenten los niveles de cada factor. En muchas ocasiones el ajuste de estos niveles es difícil de llevar a cabo desde un punto de vista experimental (Massart et al., 1997).

A la hora de llevar a la práctica un diseño experimental, es preciso tener en cuenta un aspecto importante. Existen una serie de factores incontrolados durante el transcurso de un experimento, pero los errores en un método debido a esa variación incontrolada no son aleatorios durante mucho tiempo, ya que los errores en medidas sucesivas están correlacionados. Esto puede conducir a que se produzcan errores de tipo sistemático en los resultados. Con objeto de superar este problema de forma efectiva se utiliza la técnica de aleatorización que consiste en llevar a cabo los experimentos de forma aleatoria, asegurando así que los errores en cada nivel de los factores debidos a factores incontrolados no estén correlacionados (Massart et al., 1997).

Cuadro 12. Valores de porcentajes de recuperación para clorpirifos a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (clorpirifos en modo positivo)

	Conc. vial c/punto 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Conc. vial c/punto 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Clean up A		Clean up B	
Rec A1 500 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	48,6	Rec B1 500 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	55,9
Rec A2 500 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	44,7	Rec B2 500 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	57,5
Rec A3 500 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	41,3	Rec B3 500 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	49,7
Rec A4 500 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	43,9	Rec B4 500 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	63,6
Rec A5 500 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	40,1	Rec B5 500 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	55,4
Promedio	43,7	Promedio	56,4
Desv estándar	3,3	Desv estándar	5
RSD	7,5	RSD	8,8

Cuadro 13. Valores de porcentajes de recuperación para triflumuron a 200 µg/kg. (triflumuron en modo negativo)

	Conc. vial c/punto 100 µg/kg		Conc. vial c/punto 100 µg/kg
Clean up A		Clean up B	
Rec A1 500(µg/kg)	20,7	Rec B1 500(µg/kg)	21,5
Rec A2 500(µg/kg)	28,8	Rec B2 500(µg/kg)	34,3
Rec A3 500(µg/kg)	25,5	Rec B3 500(µg/kg)	17,4
Rec A4 500(µg/kg)	34,9	Rec B4 500(µg/kg)	40,4
Rec A5 500(µg/kg)	29,8	Rec B5 500(µg/kg)	26,4
Promedio	27,9	Promedio	28
Desv estándar	5,3	Desv estándar	9,4
RSD	18,9	RSD	33,4

De los métodos de extracción ensayados ninguno generó porcentajes de recuperación aceptables para los compuestos de acuerdo a las directivas del Documento SANCO/12571/2013 que establece deben encontrarse en el rango 70-120%, aun así se optó por el método B por tener un rango de valores superior.

4.2.2.2. Diseño factorial 1. Proceso de extracción

Una vez seleccionado el solvente de extracción y el clean up preliminar se realizó un diseño factorial para optimizar los distintos factores de los pasos de extracción (DF1) y de clean up (DF2) con tres variables cada uno (figuras 9 y 10).

En el caso de DF1, los mejores resultados se obtuvieron con el experimento número 12 ya que los porcentajes de recuperación y RSD cumplen con los parámetros de la guía SANCO para todos los compuestos evaluados. Este experimento consistió en la utilización de 10ml de agua, 10 ml de ACN, 6 mg de MgSO₄ y 2 minutos de agitación. A partir de los parámetros de extracción optimizados se prosiguió a realizar el DF2 y así optimizar los parámetros de la purificación (clean up).

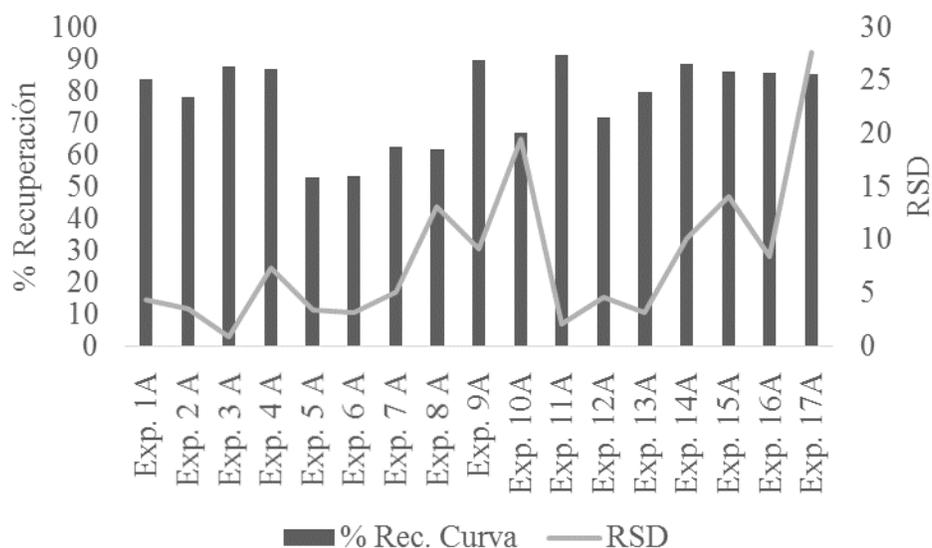


Figura 9. Porcentaje de recuperación y RSD para clorpirifos

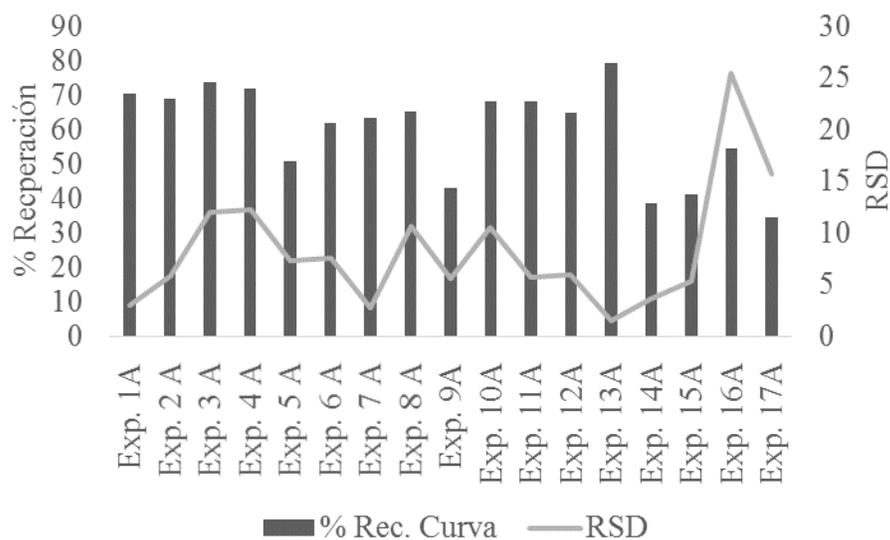


Figura 10. Porcentaje de recuperación y RSD para triflururon

En algunos casos, por distintos factores propios del proceso de extracción, se obtuvo un menor volumen de la muestra, por lo tanto esto llevó a que en algunos experimentos se hicieron tres repeticiones y en otros solo dos.

A partir de los porcentajes de recuperación obtenidos, se decidió continuar con la metodología optimizada en el experimento 12 y se procedió a definir cuál experimento del factorial era mejor para la etapa de purificación.

Diseño factorial 2. Clean up

El último paso para la obtención del método de extracción, consistió en una variación de cada una de las sales (figuras 11 y 12).

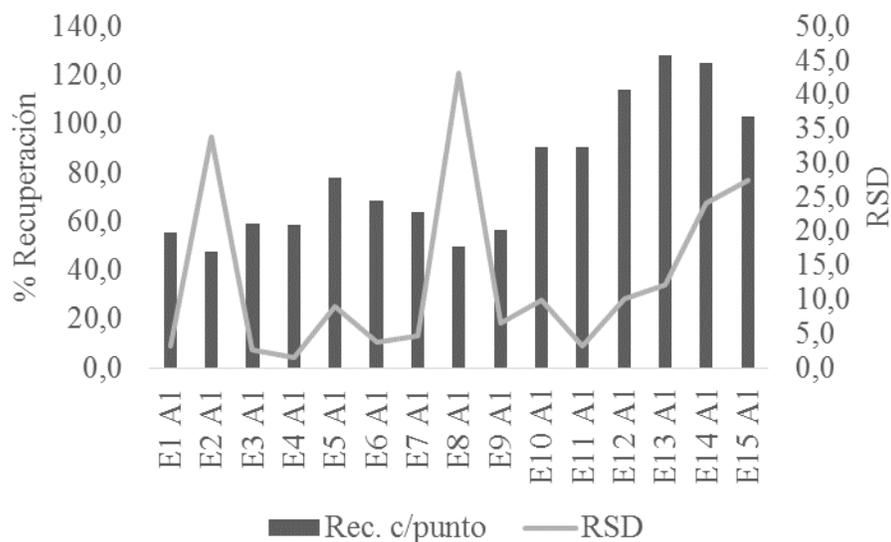


Figura 11. Porcentaje de recuperación y RSD para clorpirifos

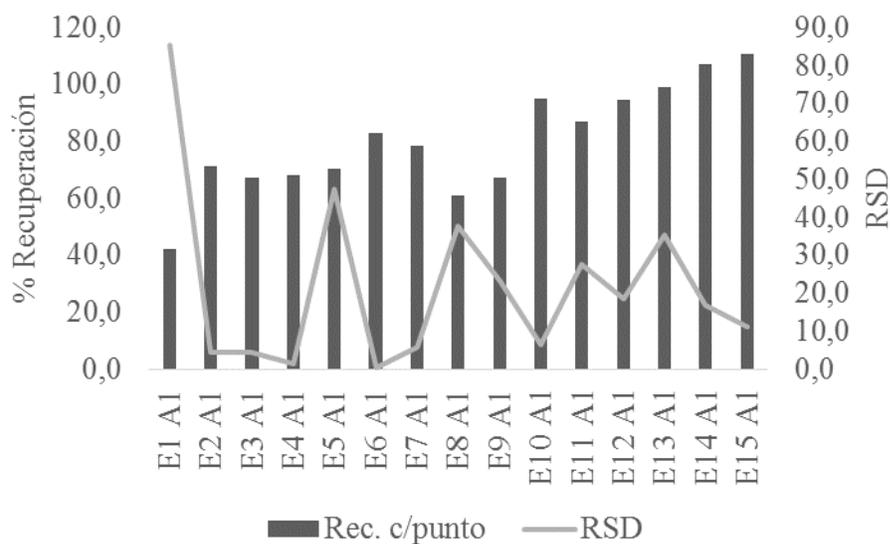


Figura 12. Porcentaje de recuperación y RSD para triflumuron

Como se observa en la figura 11 a partir del E10 y hasta el E15 podrían ser aptos para la evaluación de los compuestos en relación a los porcentajes de recuperación obtenidos, pero el E15 presentó RSDs mayores a los rangos aceptables.

Algo similar sucedió para el triflumuron (figura 12) donde a partir del E10 y hasta el E15 se presentan como competentes para la evaluación de compuestos dado que cumplen con los parámetros requeridos. Como una situación de compromiso se decidió usar el E10 ya que permitía evaluar todos los compuestos ensayados según los criterios de la normativa SANCO.

4.2.2.3. Muestras de campo

Las muestras de campo fueron sometidas al análisis de residualidad luego de determinar un modelo de extracción adecuado.

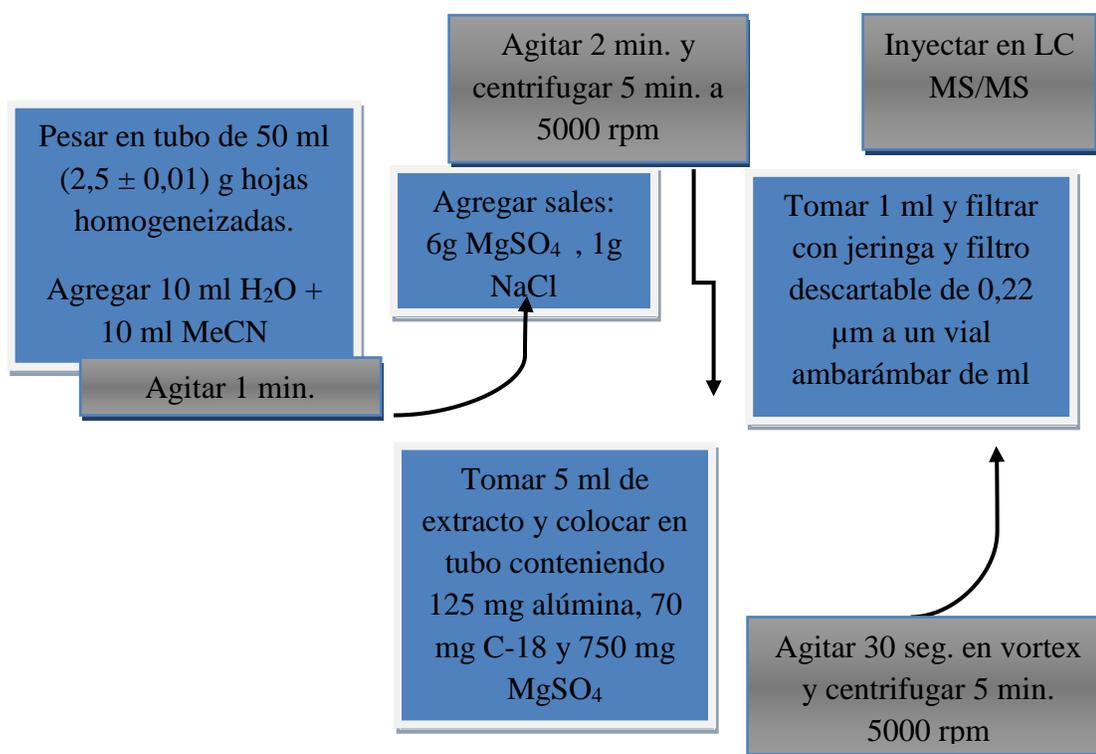


Figura 13. Diagrama del proceso de análisis de insecticidas

4.2.2.4. Determinación de las curvas de disipación para clorpirifos y triflumuron

A partir del análisis de las muestras obtenidas a las 6 horas y a los 1,2,3,5,7,10,12 y 20 días se obtuvieron las curvas de disipación para triflumuron y clorpirifos en función del tiempo (figuras 14 y 15).

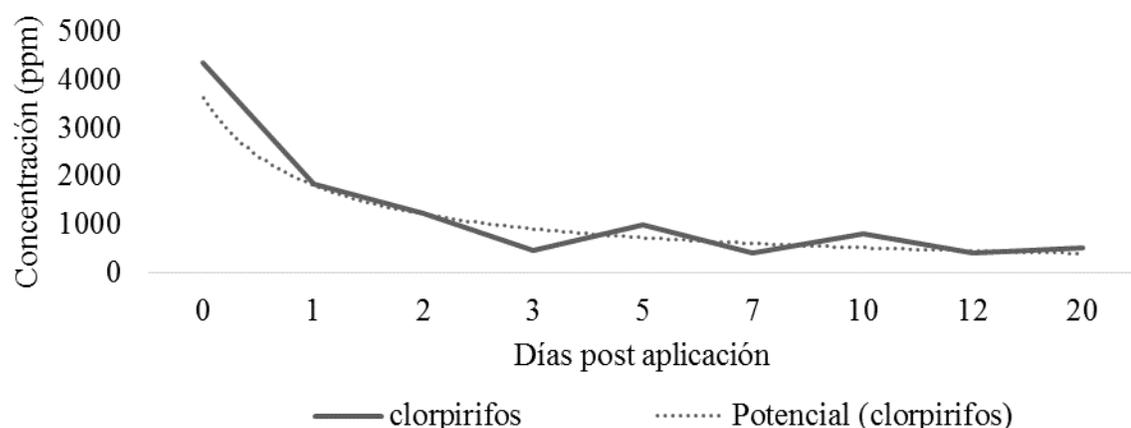


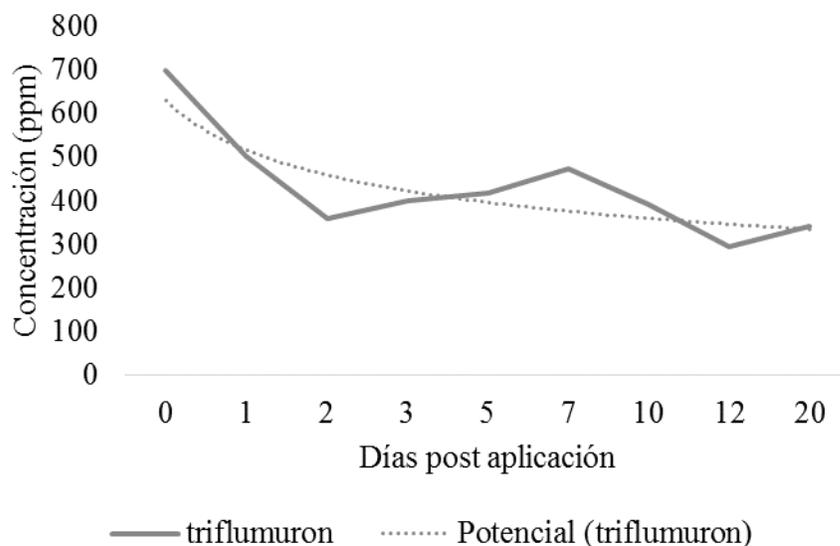
Figura 14. Curva de disipación de clorpirifos, 0: 6 horas post aplicación

La curva de clorpirifos (figura 14) comienza con alta concentración a las 6 hs. después de la aplicación y posteriormente descendió considerablemente hasta llegar a valores muy bajos al día 20. Resultados similares fueron obtenidos por Meng-Xiao et al. (2014) en distintas verduras determinando que a los 21 días, la concentración del insecticida fue realmente baja (514 mg/kg).

Este comportamiento explica por qué la concentración del insecticida en las hojas no permitió lograr un 80 % de mortalidad, en el experimento de cría de larvas de *R. nu*, con folíolos recolectados los 12 días post aplicación. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Giuggia et al. (2010) quienes constataron que clorpirifos a los 14 días post aplicación tuvo baja eficiencia de control sobre esta especie de lepidóptero.

Un efecto que podría tomarse en cuenta como una propiedad positiva, es que a los 20 días de haber aplicado este insecticida, la concentración en hoja es baja lo que generaría menor persistencia en suelo luego de que las hojas se descomponen al llegar a maduración del cultivo.

En un experimento para determinar la persistencia de la toxicidad de clorpirifos en el anfibio *Hyella cruvispina* y el pez *Cnesterodon decemmaculatus*, después de su aplicación en cultivos experimentales de soja en Argentina, Mugni et al. (2012) encontraron que la persistencia de la toxicidad en el suelo era de un 100% para *H. cruvispina* por 42 días, luego disminuía lentamente a 30% al cabo de 140 días.



0: 6 horas post aplicación

Figura 15. Curva de disipación de triflumuron

La concentración de triflumuron en función del tiempo (figura 15) mostró una tendencia similar a la de clorpirifos pero con una caída un poco más lenta. Esto determinó una mayor residualidad del insecticida en los folíolos a lo largo del tiempo. La concentración del insecticida en hoja, tiene correlación con los resultados obtenidos en laboratorio cuando se alimentaron las larvas de *R.nu* donde se registró un máximo de mortalidad de casi un 90 % a los 12 días, cosa que no ocurrió en el caso de clorpirifos.

Para lograr una mortalidad de 80% de una población de *R. nu* y de *A. gemmatilis* simultáneamente, Silva (1988) aplicó una dosis de 68,9 ml/ha de un insecticida IGR (diflubenzuron), lo que representa una mayor concentración a la que se evaluó en este trabajo.

5. CONCLUSIONES

Se demostró la mayor residualidad en el control de *R. nu* de triflumuron con respecto a clorpirifos a campo y en laboratorio.

La aplicación de ambos insecticidas pudo tener cierto impacto negativo sobre enemigos naturales.

La metodología analítica desarrollada, mediante LC-QqQ/MS, resultó válida para la determinación de clorpirifos y triflumuron en folíolos de soja.

La técnica de análisis químico permitiría determinar si los residuos de los insecticidas en folíolos son suficientes para lograr una mortalidad del 80%.

La baja concentración del insecticida clorpirifos, luego de 12 días determinaría una menor persistencia en suelo luego de que las hojas se descomponen al llegar a maduración del cultivo.

Triflumuron presentó mayor concentración en hoja que clorpirifos con el transcurso del tiempo, sin embargo, sería necesario continuar con el análisis por un mayor período para determinar en qué punto la concentración es mínima.

Una de las contribuciones más destacables del trabajo fue determinar la residualidad de insecticidas agrícolas en hojas de soja, punto que no ha sido abordado por la literatura especializada.

Se desarrolló una metodología, hasta ahora no existente para folíolos de soja, para la determinación de clorpirifos y triflumuron, y que además permite el análisis de otros compuestos como acetamiprid, bifentrin, carbaril, cialotrina, ciflutrin, cipermetrina y thiametoxam.

Para completar este estudio, sería necesario estudiar si cuando estos folíolos caen, los insecticidas permanecen algún tiempo en el suelo.

6. RESUMEN

Los trabajos se realizaron en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (Facultad de Agronomía) (32°32’S; 58°07’W), durante el período noviembre 2013 marzo 2014 sobre un cultivo de soja variedad Nidera A 8009 RG, sembrado en noviembre de 2013. El experimento en campo se realizó con un diseño de parcelas al azar con tres tratamientos: clorpirifos (483 ml/ha concentrado emulsionable 48%), triflumuron (52 ml/ha concentrado emulsionable 48%), testigo (sin aplicación) y tres repeticiones, con el objetivo de evaluar el efecto residual y de persistencia de los insecticidas en el control de *Rachiplusia nu* en soja. El estudio de residualidad de control se realizó alimentando larvas de *R. un* con folíolos recogidos de cada parcela a los 2, 6, 12 y 22 días post aplicación. Para la determinación de residuos de clorpirifos y triflumuron en folíolos de soja se empleó una metodología analítica desarrollada mediante LC-QqQ/MS. Triflumuron provocó una mortalidad del 80% hasta 12 días post aplicación, en cambio clorpirifos solo alcanzó esa mortalidad hasta el segundo día. Los resultados analíticos concuerdan con los resultados biológicos. La curva de disipación de triflumuron presenta una caída un poco más lenta que la de clorpirifos lo que explica su mayor residualidad a lo largo del tiempo, la de clorpirifos comenzó con alta concentración a las 6 h después de la aplicación, pero al día 20 los valores fueron muy bajos. De los métodos de extracción ensayados ninguno generó porcentajes de recuperación aceptables para los compuestos de acuerdo a las directivas del Documento SANCO, sin embargo, los resultados obtenidos indican que la metodología utilizada puede ser útil para determinar hasta cuándo los residuos en hoja son suficientes para lograr una adecuada mortalidad de larvas en el cultivo.

Palabras clave: Lepidópteros; IGR’s; Neurotóxicos; Cultivo de soja; Control químico; Selectividad; Residualidad.

7. SUMMARY

The works were carried out in the Experimental Station "Dr. Mario A. Cassinoni "(Faculty of Agronomy) (32 ° 32'S, 58 ° 07'W) during the period November 2013 March 2014 on a Nidera A 8009 RG soybean crop planted in November 2013. The field experiment was carried out (483 ml / ha emulsifiable concentrate 48%), triflumuron (52 ml / ha emulsifiable concentrate 48%), control (no application) and three replications, with a randomized plots design with three treatments: residual effect and persistence of insecticides in the control of *Rachiplusia nu* in soybean. The control residuality study was performed feeding R. nu larvae with leaflets collected from each plot at 2, 6, 12 and 22 days post application. For the determination of chlorpyrifos and triflumuron residues in soybean leaflets, an analytical methodology developed using LC-QqQ / MS was used. Triflumuron caused a mortality of 80% up to 12 days post application, whereas chlorpyrifos only reached that mortality until the second day. The analytical results agree with the biological results. The triflumuron dissipation curve shows a slightly slower drop than chlorpyrifos which explains its greater residual over time, that of chlorpyrifos started with high concentration at 6 h after application, but at day 20 Values were very low. From the extraction methods tested none generated acceptable recovery percentages for the compounds according to the directives of the SANCO Document, however, the results obtained indicate that the methodology used can be useful to determine how long the leaf residues are sufficient to achieve An adequate mortality of larvae in the crop.

Keywords: Lepidoptera; IGR's; Neurotoxic; Soya cultivation; Chemical control; Selectivity; Residuality.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahumada, D.; Zamudio, A. 2011. Análisis de residuos de plaguicidas en tomate mediante el uso de QuEChERS y cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas. *Revista Colombiana de Química*. 40 (2): 227-245.
2. Alder, L.; Greulich, K.; Kempe, G.; Vieth, B. 2006. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*. 25 (6): 838-865.
3. Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*. 86 (2): 412-431.
4. Aragón, J.; Flores, F. 2006. Control integrado de plagas en soja en el sudeste de Córdoba. (en línea). Marcos Juárez, INTA. s.p. Consultado 8 abr. 2017. Disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/control-integrado-de-plagas-en-soja-en-el-sudeste-de-cordoba>.
5. Avalos, S.; Mazzuferi, V.; La Porta, N.; Serra, G.; Berta, C. 2004. El complejo parasítico (Hymenoptera y Díptera) de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner. y *Rachiplusia nu* Guenee. (Lepidoptera: Noctuidae) en alfalfa y soja. *Agriscientia*. 11 (2): 67- 75.
6. Baker, P.; Bellamy, D. 2006. Field and laboratory evaluation of persistence and bioavailability of termiticides to desert subterranean termite *Heterotermes aureus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*. 99 (4): 1345-53.
7. Barberá, C. 1989. Pesticidas agrícolas. 4a. ed. Barcelona, Omega. 603 p.
8. Barceló, D. 2005. *Comprehensive analytical chemistry*. Amsterdam, Elsevier. v. 43, 487 p.
9. Barrionuevo, M. 2011. Redescrición de los estados preimaginales de *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Sociedad Entomológica Argentina*. 70 (3-4): 169-184.
10. Baskaran, S.; Kookana, R.; Naidu, R. 1999. Degradation of bifenthrin, chlorpyrifos and imidacloprid in soil and bedding materials at termiticidal application rates. *Pesticide Science*. 55 (12): 1222-1228.

11. Braga Da Silva, M.; Corrêa Costa, E.; Boss, A. 2003. Controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) com reguladores de crescimento de insetos. *Ciencia Rural*. 33 (4): 601-605.
12. Chai, L.; Mohd-tahir, N.; Bruun; Hansen, H. 2009. Dissipation of acephate, chlorpyrifos, cypermethrin and their metabolites in a humid-tropical vegetable production system. *Pest Management Science*. 65 (2): 189-196.
13. Chiaravalle, W. 1996. *Rachiplusia nu* (Gueneé) “lagarta del girasol”. In: Bentancourt, C.; Scatoni, I. eds. *Lepidópteros de importancia económica; reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales*. Montevideo, Hemisferio Sur. pp. 99-106.
14. _____.2006. *Rachiplusia nu* (Guenée). In: Bentancourt, C.; Scatoni, I. eds. *Lepidópteros de importancia económica en Uruguay; reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales*. Buenos Aires, Hemisferio Sur. pp. 353-359.
15. _____.; Aznarez, G.; Sillon, M. 2011. Eficacia de insecticidas Lage en el control de lagartas en soja zafra 2011. (en línea) Montevideo, s.e. s.p. Consultado 8 abr. 2017. Disponible en http://www.lageycia.com/archivos/research_84_file.pdf
16. Colazzo, M. 2016. Desarrollos metodológicos para el estudio compartimental (agua, suelo y peces) de la presencia de residuos de plaguicidas en el río Uruguay. Tesis Magister en Química. Montevideo, Uruguay. Facultad de Química. 145 p.
17. Colombo Da Luz, M.; Sampaio De Azevedo Filho, W. 2014. Caracterização morfológica dos estágios imaturos de *Rachiplusia nu* (GUENÉE, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) e lista de plantas hospedeiras. *Caderno de Pesquisa*. 26 (3): 65-76.
18. Coppen, G.; Jepson, P. 1996. The effects of the duration of exposure on the toxicity of diflubenzuron, hexaflumuron and teflubenzuron to various stages of II instar *Schistocerca gregaria*. *Pest Management Science*. 46 (2): 191-197.
19. De Castro, I.; De Sene, A.; Roberto, V.; Junqueira, P. 2012. Impacto do inseticida triflumurom sobre populações de artrópodos de superfície de solo associados a cana-de-açúcar. In: *Workshop Agroenergia (6o., 2012, Ribeirão Preto, SP)*. Trabalhos apresentados. Brodowski, s.e. 1 disco compacto.

20. De Hoffmann, E.; Stroobant, V. 2007. Mass spectrometry; principles and applications. 3rd.ed. Chichester, Wiley. 401 p.
21. ECHA (Agencia Europea de Productos Químicos, IT). 2015. Triflumuron product type-18. (en línea). s.l.pp. 1-76. Consultado 14 jun. 2017. Disponible en http://dissemination.echa.europa.eu/Biocides/ActiveSubstances/1407-18/1407-18_Assessment_Report.pdf.
22. Eldefrawi, A. 1985. Acetylcholinesterases and anticholinesterases. In: Kerkut, G.; Gilbert, L. eds. Comprehensive insect physiology; biochemistry and pharmacology. Oxford, Pergamon. cap. 12, pp. 115-130.
23. European Commission. 2002. Council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Brussels. 36 p.
24. _____. 2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed. Uppsala. 41 p.
25. _____. 2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Almería. 42 p.
26. Flores, F. 2009. ¿Hacia dónde vamos en el manejo de plagas? (en línea). Marcos Juárez, INTA. s.p. Consultado 21 jun. 2017. Disponible en http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-hacia_dnde_vamos_en_el_manejo_de_plagas_.pdf.
27. Gamundi, J.; Buhmann, M. 1983. Algunos aspectos biológicos y consumo foliar en soja de la "oruga medidora" *Rachiplusia nu* Guenée en condiciones de laboratorio. In: Jornadas Fitosanitarias Argentinas (5as., 1983, Rosario). Trabajos presentados. Oliveros, INTA. pp. 7-9.
28. Gan, J.; Bondarenko, S. 2008. Determination of pesticides in water. In: Tadeo, J. ed. Analysis of pesticides in food and environmental samples. Boca Raton, CRC. pp. 232-243.
29. Gebremariam, S.; Beutel, M.; Yonge, D.; Flury, M.; Harsh, J. 2012. Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. In: Whitacre, D. ed. Reviews of environmental contamination and toxicology. New York, Springer. pp. 123-175.
30. Giuggia, J.; Boito, G.; Giovanini, D.; Crenna, A.; Gerardo, U. 2011. Eficiencia de control de "orugas defoliadoras" en soja (*Glycine max* L.), con insecticidas neurotóxicos y reguladores del crecimiento de los insectos.

Universidad Nacional de Cuyo. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. 43 (1): 143-153.

31. Glish, G.; Burinsky, D. 2008. Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 19 (2): 161-172.
32. Goldsmith, P. 2008. Economics of soybean production, marketing, and utilization. *In*: Johnson, L.; White, P.; Galloway, R. eds. *Soybeans; chemistry, production, processing, and utilization*. Urbana, AOCS. pp. 117-150.
33. Greene, G.; Leppla, N.; Dickerson, W. 1976. Velvetbean caterpillar; a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*. 69 (4): 487-488.
34. Greenstone, M.; Bennett, A. 1980. Foraging strategy and metabolic rate in spiders. *Ecology*. 61 (5): 1255-1259.
35. Hammann, R.; Sirrenberg, W. 1980. Laboratory evaluation of SIR 8514, new chitinsynthesis inhibitor of the benzoylated urea class. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*. 33 (51): 1-34.
36. Hajšlová, J.; Zrostlikova, J. 2003. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A*. 1000 (1): 181-197.
37. Hernández, J. 2005. Nuevas metodologías de análisis de pesticidas por electroforesis capilar. Tesis Doctoral. Tenerife, España. Universidad de La Laguna. 245 p.
38. Hopfgartner, G.; Varesio, E.; Tschäppät, V.; Grivet, C.; Bourgoigne, E.; Leuthold, L. 2004. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *Journal of Mass Spectrometry*. 39 (8): 845-855.
39. Jeannot, R.; Sabik, H.; Sauvard, E.; Genin, E. 2000. Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters. *Journal of Chromatography A*. 879 (1): 51-71.
40. Juan, A.; Picó, Y.; Font, G. 2003. Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Revista de Toxicología*. 20 (3): 166-175.

41. Kellner, R.; Mermet, J.; Otto, M.; Widmer, H. 1998. Analytical chemistry; the approved text to the FECS curriculum analytical chemistry. New York, Wiley-VCH. 916 p.
42. Lacelli, G.; Ybran, R. 2016. Informe estadístico mercado de la soja. Voces y Ecos. 9 (35): 22–24.
43. Lambropoulou, D.; Albanis, T. 2007. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques; a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 389 (6): 1663-1683.
44. Lal, R. 2009. Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition. Food Security. 1 (1): 45-57.
45. Lehotay, S. 2006. Quick, easy, cheap, effective, rugged safe approach for determining pesticide residues. In: Martínez, J.; Garrido, A. eds. Pesticide protocols. Almería, Humana Press. pp. 239-260.
46. Leiva P. 2013. Para poder usar insecticidas poco tóxicos hay que hacer inteligencia. (en línea). Pergamino, INTA. s.p. Consultado 7 mar. 2016. Disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/para-poder-usar-insecticidas-poco-toxicos-hay-que-hacer-inteligencia>.
47. Lemma-Gray, P.; Valušová, E.; Carroll, C.; Weintraub, S.; Musatov, A.; Robinson, N. 2008. Subunit analysis of bovine heart complex I by reversed-phase high-performance liquid chromatography, electrospray ionization–tandem mass spectrometry, and matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry. Analytical Biochemistry. 382 (2): 116-121.
48. Londershausen, M. 1996. Review; approaches to new parasiticides. Pest Management Science. 48 (4): 269-292.
49. López Soler, N. 2008. Evaluación de mecanismos de resistencia a insecticidas en *Frankliniella occidentalis* (Pergade); implicación de carboxilesterasas y acetilcolinesterasas. Tesis Doctoral. Valencia, España. Universidad de Valencia. 190 p.
50. Lorini, I. 1992. Efecto de insecticidas de acción fisiológica sobre enemigos naturales de *Anticarsia gemmatilis* en soja. In: Soja; resultados de pesquisa 1991-1992. Chapecó, EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. pp. 140-143.

51. Mareggiani, G.; Pelicano, A. 2010. Zoología agrícola. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 256 p.
52. Massart, D.; Vandeginste, B.; Buydens, L.; Lewi, P.; Smeyers-Verbeke, J. 1997. Handbook of chemometrics and qualimetrics; part A. Amsterdam, Elsevier. v. 20, 867 p.
53. Merino, J. 2004. Evaluación de triflumuron, flufenoxuron y lambdacihalotrina sobre la fauna de carábidos en una pradera permanente. Tesis licenciado en Agronomía. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 54 p.
54. Mol, H.; Rooseboom, A.; van Dam, R.; Roding, M.; Arondeus, K.; Sunarto, S. 2007. Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 389 (6): 1715-1754.
55. Mugni, H.; Demetrio, P.; Paracampo, A.; Pardi, M.; Bulus, G.; Bonetto, C. 2012. Toxicity persistence in runoff water and soil in experimental soybean plots following chlorpyrifos application. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 89 (1): 208-212.
56. Nguyen, T.; Han, E.; Seo, M.; Kim, S.; Yun, M.; Lee, D.; Lee, G. 2008. A multi-residue method for the determination of 203 pesticides in rice paddies using gas chromatography/mass spectrometry. Analytica Chimica Acta. 619 (1): 67-74.
57. Nicholls, C. 2008. Control biológico de insectos; un enfoque agroecológico. Medellín, Universidad de Antioquia. 217 p.
58. Niell, S.; Pareja, L.; Geis Asteggiant, L.; Cesio, M.; Heinzen, H. 2010. Comparison of extraction solvents and conditions for herbicide residues in milled rice with liquid chromatography-diode array detection analysis (LC-DAD). Food Additives and Contaminants. 27 (2): 206-211.
59. NMFS (National Marine Fisheries Service, US) 2008. Consultation biological opinion; EPA registration of pesticides containing chlorpyrifos, diazinon, and malathion. (en línea). Silver Spring, MO. 482 p. Consultado 10 abr. 2017. Disponible en http://www.nmfs.noaa.gov/pr/pdfs/pesticide_biop.pdf.
60. Ojeda Peña, D. 1971. Biología y hábitos de *Nabis capsiformis* Germar (Hemiptera.: Nabidae). Revista Peruana de Entomología. 14 (2): 297-303.

61. Ortiz, B.; López, M.; Fernández, M.; Yruela, M.; Navas, J.; López, J.; Lirola, J.; Morales, A.; García, J.; Martín, A.; Alfonso, J.; Martín, R.; Marqués, F.; Ejido, J.; Caballero, E. 2003. Aplicación de plaguicidas. 2^a. ed. Andalucía, España, s.e. 235 p.
62. Ortuño, V. 2011. Diversidad de los insectos, y sus afines, en las cuevas: una visión ecológica para la conservación. In: del Egidio M.; Juanes, D. eds. La ciencia del arte III; ciencias experimentales y conservación del patrimonio. Madrid, Ministerio de Cultura. Subdirección General de Publicaciones, Información y Documentación. pp. 175 – 187.
63. Panthee, D. 2010. Varietal improvement in soybean. In: Singh, G. ed. The soybean; botany, production and uses. Wallingford, CABI. pp. 92–112.
64. Pareja, L. 2012. Estudio de residuos de pesticidas en cultivos de arroz de Uruguay por métodos analíticos modernos y evaluación de procesos fotoquímicos para la remediación de aguas de campo. Tesis de doctorado. Montevideo, Uruguay. Facultad de Química. 344 p.
65. Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A. 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389 (6): 1697-1714.
66. Pereyra, P.; Sánchez, N. 1991. Tablas de vida de *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae) en laboratorio. In: Reunión Argentina de Ecología. (15a., 1991, Rosario). Trabajos presentados. s.n.t. pp. 1-9.
67. _____. 1995. Ecología nutricional de la “Oruga Medidora” *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 57 (1-4): 41-44.
68. Picó, Y.; Font, G.; Moltó, J.; Manes, J. 2000. Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 882 (1): 153-173.
69. Pineda, S.; Budia, F.; Gobbi, A.; Viñuela, E.; Estal, P. 2000. Efectividad biológica de Spinosad y del regulador del crecimiento Metoxifenocida (RH-2485) sobre huevos de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*. 26 (4): 483-491.

70. Pomilio, A.; Bernatené, E.; Vitale, A. 2011. Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 45 (1): 47-79.
71. Ponce, G.; Cantú C.; Flores, A.; Zapata, R.; Fernández, I. 2006. Modo de acción de los insecticidas. (en línea). Nuevo León, UANL. s.p. Consultado 15 ago. 2017. Disponible en http://www.respyn.uanl.mx/vii/4/ensayos/modo_accion.htm.
72. Rava, C.; Souto, G. 2016. Oleaginosos y derivados; situación y perspectivas. *Anuario OPYPA 2016*: 157-179.
73. Restaino, E.; Giménez, A. 1994. Girasol y soja; algunos aspectos tecnológicos de producción para el litoral oeste de Uruguay. Montevideo, INIA. 154 p. (Boletín de Divulgación no. 47).
74. Ribeiro, A.; Silva, H.; Castiglioni, E.; Bartaburu, S. 2008. Efecto de la aplicación de insecticidas sobre enemigos naturales de insectos plaga en soja. *Cangüé*. no. 30: 30 – 35.
75. Ruffinelli, A. 1942. La oruga del girasol y sus parasites naturales. *Revista de la Asociación de Ingenieros Agrónomos*. 14 (4): 29-35.
76. Santiago-Álvarez, C. 1988. Insecticidas que inhiben la formación de la cutícula. *In: Belles, X. ed. Insecticidas biorracionales*. Madrid, CSIC. pp. 251-269.
77. Scriber, J.; Slansky, Jr, F. 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Annual Review of Entomology*. 26 (1): 183-211.
78. Shanmugasundaram, S.; Yan, M. 2010. Vegetable soybean. *In: Singh, G. ed. The soybean; botany, production and uses*. Wallingford, CABI. pp. 427–460.
79. Silva, G. 2004. Capacidad de consumo de *Rachiplusia nu* en leguminosas forrajeras. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 23 p.
80. Silva, P. 2015. Histórica caída del precio de la soja en 2014. *El Observador*, Montevideo, UY, ene. 2:1.
81. Silveira G.; Carbonell, J. 1965. Los insectos enemigos del girasol en el Uruguay. Facultad de Agronomía (Montevideo). Boletín no. 81. 64 p.
82. Somogyi, A. 2008. Mass spectrometry instrumentation and techniques. *In: Vékey, K.; Telekes, A.; Vertes, A. eds. Medical applications of mass spectrometry*. Amsterdam, Elsevier. pp. 93-140.

83. Souto, G. 2014. Oleaginosos y derivados; situación y perspectivas. Anuario OPYPA 2014: 147-165.
84. Strange, R.; Scott, P. 2005. Plant disease; a threat to global food security. Annual Review of Phytopathology. 43. 83–116.
85. Thurman, E.; Ferre, I.; Fernández-Alba, A. 2005. LC-MS. I: Basic principles and technical aspects of LC-MS for pesticide analysis. *In*: Barceló, D. ed. Chromatographic-mass spectrometric; food analysis for trace determination of pesticide residues. Amsterdam, Elsevier. pp. 368-400.
86. Turiel, E.; Martín-Esteban, A. 2008. Sample handling of pesticides in food and environmental samples. *In*: Tadeo, J. ed. Analysis of pesticides in food and environmental samples. Boca Ratón, CRC. pp. 36-56.
87. Turnbull, A. L. 1973. Ecology of the true spiders (Araneomorphae). Annual Review of Entomology. 18 (1): 305-348.
88. UNA (Universidad Nacional, CR) 2017. Manual de plaguicidas de Centroamérica; triflumuron. (en línea). Heredia. s.p. Consultado 10 abr. 2017. Disponible en <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/562-triflumuron>.
89. UNIT (Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, UY). 2005. ISO/IEC, UNIT-ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Montevideo. 38 p.
90. US EPA (United States Environmental Protection Agency, US). 2009. Chlorpyrifos summary document registration review; initial docket march 2009. Washington, D. C. 32 p.
91. Valverde, L.; Romero Sueldo, M.; Colomo, M.; Berta, C.; Dode, M. 2008. Lepidópteros noctuidos plagas en el cultivo de soja en Tucumán, Argentina. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. 34. 377-386.
92. Vial, J.; Jardy, A. 1999. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. Analytical Chemistry. 71 (14): 2672-2677.
93. Ware, G.; Whitacre, D. 2004. The pesticide book. 6th. ed. Ohio, MeisterPro. 488 p.
94. Watts, M. 2012. Chlorpyrifos as a possible global persistent organic pollutant. (en línea).Oakland, s.e. pp. 1-34. Consultado 11 abr. 2017. Disponible en

<http://www.pananz.net/wp-content/uploads/2014/09/Chlorpyrifos-as-a-POP.pdf>

95. Zubay, G. 1983. Biochemistry. 2nd. ed. Massachusetts, Addison-Wesley. 1268 p.

9. ANEXOSAnexo 1**Total lepidópteros****Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos**

	Df.	Deviance	Resid. df.	Resid.dev	Pr.(>Chi)
NULL			44	645,2778	
Bloque	2	7,1623	42	638,1155	0,0278
PROD	2	142,4103	40	495,7052	<0,0001
Día	4	342,0320	36	153,6731	<0,0001
PROD: día	8	89,9688	28	63,7043	<0,0001

Efectos fijos

	Estimate	Std. error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3,8231	0,0986	38,7677	<0,0001
Bloque2	-0,1112	0,0747	-1,4899	0,1362
Bloque3	-0,2036	0,0765	-2,6603	0,0078
PRODTEST	0,107	0,1237	0,8645	0,3873
PRODTRI	-0,0328	0,1281	-0,2561	0,7979
Día12	-1,5622	0,2157	-7,2424	<0,0001
Día2	-1,8758	0,2464	-7,6141	<0,0001
Día22	-0,2353	0,1352	-1,741	0,0817
Día6	-2,4224	0,3146	-7,6999	<0,0001
PRODTEST: día12	1,2697	0,252	5,0392	<0,0001
PRODTRI: día12	-0,4527	0,3426	-1,3215	0,1863
PRODTEST: día2	0,9916	0,2924	3,3916	0,0007
PRODTRI: día2	0,4206	0,3236	1,2994	0,1938
PRODTEST: día22	0,4556	0,177	2,5738	0,0101
PRODTRI: día22	-0,768	0,2221	-3,4578	0,0005
PRODTEST: día6	1,5205	0,3522	4,3165	<0,0001
PRODTRI: día6	0,5253	0,4036	1,3016	0,1931

Anexo 2

Anticarsia grandes

Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. df	Resid. dev	Pr(>Chi)
NULL			44	310,73	
Bloque	2	0,62	42	310,11	0,7347
Tratamiento	2	44,24	40	265,87	<0,0001
Día	4	91,84	36	174,03	<0,0001
Tratamiento: día	8	69,37	28	104,65	<0,0001

Efectos fijos

	Estimate	Std. error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	2,33	0,2	11,5	<0,0001
Bloque 2	-0,09	0,15	-0,59	0,5555
Bloque 3	-0,11	0,15	-0,74	0,4588
Tratamiento testigo	0	0,26	0	>0,9999
Tratamiento triflumuron	0,07	0,26	0,26	0,7963
Día12	-2,67	0,73	-3,66	0,0003
Día 2	-2,67	0,73	-3,66	0,0003
Día 22	0,3	0,25	1,21	0,2269
Día 6	-18,56	1207,84	-0,02	0,9877
Tratamiento testigo: día 12	2,4	0,78	3,06	0,0022
Tratamiento triflumuron: día	0,63	0,9	0,69	0,4882
Tratamiento testigo: día 2	2,01	0,8	2,53	0,0115
Tratamiento triflumuron: día	0,63	0,9	0,69	0,4882
Tratamiento testigo: día 22	0,1	0,34	0,28	0,7761
Tratamiento triflumuron: día	-1,17	0,41	-2,83	0,0046
Tratamiento testigo: día 6	18,69	1207,84	0,02	0,9877
Tratamiento triflumuron: día	16,51	1207,84	0,01	0,9891

Anticarsia chicas

Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. df	Resid. dev	Pr(>Chi)
NULL			44	571,91	
Bloque	2	7,53	42	564,38	0,0232
Tratamiento	2	104,7	40	459,68	<0,0001
Día	4	303,06	36	156,62	<0,0001
Tratamiento: día	8	53,06	28	103,56	<0,0001

Efectos fijos

	Estimate	Std. error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3,42	0,12	28,36	<0,0001
Bloque2	-4,30E-03	0,09	-0,05	0,9629
Bloque3	-0,24	0,1	-2,41	0,0162
Tratamiento testigo	0,22	0,15	1,52	0,1294
Tratamiento triflumuron	-0,05	0,16	-0,31	0,7562
Día12	-1,45	0,25	-5,82	<0,0001
Día 2	-2,5	0,39	-6,35	<0,0001
Día 22	-0,7	0,19	-3,74	0,0002
Día 6	-2,5	0,39	-6,35	<0,0001
Tratamiento testigo: día12	1,09	0,29	3,74	0,0002
Tratamiento triflumuron: día	-0,75	0,43	-1,74	0,0813
Tratamiento testigo: día2	1,36	0,44	3,09	0,002
Tratamiento triflumuron: día	0,74	0,49	1,52	0,1289
Tratamiento testigo: día 22	0,75	0,23	3,23	0,0012
Tratamiento triflumuron: día	-0,36	0,29	-1,24	0,2167
Tratamiento testigo: día 6	0,54	0,48	1,13	0,2597
Tratamiento triflumuron: día	0,4	0,52	0,78	0,4333

Rachiplusia grandes

Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. df	Resid. dev	Pr (>Chi)
NULL			44	90,58	
Bloque	2	12,76	42	77,82	0,0017

Tratamiento	2	4,36	40	73,46	0,1129
Día	4	13,18	36	60,28	0,0104

Efectos fijos

	Estimate	Std. error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	1,42	0,27	5,19	<0,0001
Bloque2	-0,76	0,25	-2,99	0,0028
Bloque 3	-0,71	0,25	-2,86	0,0042
Tratamiento testigo	-0,14	0,23	-0,58	0,5587
Tratamiento triflumuron	-0,53	0,26	-2,01	0,0446
Día12	-0,6	0,38	-1,59	0,1112
Día 2	0,14	0,31	0,46	0,6476
Día 22	0,41	0,29	1,4	0,1601
Día 6	-0,51	0,37	-1,4	0,1618

Rachiplusia chicas

Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. df	Resid. dev	Pr (>Chi)
NULL			44	79,04	
Bloque	2	12,59	42	66,46	0,0018
Tratamiento	2	1,66	40	64,8	0,4368
Día	4	16,6	36	48,19	0,0023

Efectos fijos

	Estimate	Std. error	z value	Pr (> z)
(Intercept)	-3,41	1,16	-2,95	0,0032
Bloque 2	0,22	0,67	0,33	0,7394
Bloque 3	1,5	0,55	2,72	0,0065
Tratamiento testigo	0,51	0,52	0,99	0,3225
Tratamiento triflumuron	0,61	0,51	1,19	0,2323
Día12	1,1	1,15	0,95	0,3414
Día 2	1,61	1,1	1,47	0,1418
Día 22	2,64	1,04	2,55	0,0108

Día 6	1,39	1,12	1,24	0,215
-------	------	------	------	-------

Total lepidópteros grandes

Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. df	Resid. dev	Pr(>Chi)
NULL			44	294,61	
Bloque	2	6,33	42	288,28	0,0422
Tratamiento	2	39,36	40	248,92	<0,0001
Día	4	87,34	36	161,59	<0,0001
Tratamiento: día	8	57,83	28	103,75	<0,0001

Efectos fijos

Estimate	Std. error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	2,71	0,17	15,53 <0,0001
Bloque 2	-0,27	0,13	-2,12 0,0341
Bloque 3	-0,28	0,13	-2,18 0,0289
Tratamiento testigo	-0,17	0,24	-0,72 0,4738
Tratamiento triflumuron	0,03	0,23	0,11 0,9093
Día12	-1,85	0,44	-4,2 <0,0001
Día 2	-1,24	0,34	-3,62 0,0003
Día 22	0,31	0,21	1,47 0,1416
Día 6	-2,25	0,53	-4,28 <0,0001
Tratamiento testigo: día12	1,68	0,51	3,28 0,001
Tratamiento triflumuron: día	-0,03	0,62	-0,04 0,9666
Tratamiento testigo: día2	0,86	0,44	1,96 0,0495
Tratamiento triflumuron: día	-0,03	0,48	-0,05 0,9572
Tratamiento testigo: día 22	0,25	0,31	0,8 0,424
Tratamiento triflumuron: día	-1,14	0,36	-3,17 0,0015
Tratamiento testigo: día 6	2,45	0,58	4,24 <0,0001
Tratamiento triflumuron: día	0,38	0,68	0,55 0,5793

Total lepidópteros chicas

Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. dev	Pr(>Chi)
NULL			44	560,61	
Bloque	2	3,73	42	556,88	0,1552
Tratamiento	2	101,67	40	455,21	<0,0001
Día	4	294,12	36	161,09	<0,0001
Tratamiento: día	8	51,62	28	109,47	<0,0001

Efectos fijos

	Estimate	Std. error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3,41	0,12	28,40	<0,0001
Bloque 2	0,00	0,09	0,00	>0,9999
Bloque 3	-0,16	0,10	-1,68	0,0937
Tratamiento testigo	0,21	0,15	1,44	0,1497
Tratamiento triflumuron	-0,06	0,15	-0,39	0,6989
Día12	-1,46	0,25	-5,88	<0,0001
Día 2	-2,37	0,37	-6,43	<0,0001
Día 22	-0,63	0,18	-3,43	0,0006
Día 6	-2,51	0,39	-6,38	<0,0001
Tratamiento testigo: día12	1,13	0,29	3,88	0,0001
Tratamiento triflumuron: día	-0,63	0,42	-1,52	0,1290
Tratamiento testigo: día 2	1,27	0,42	3,03	0,0024
Tratamiento triflumuron: día	0,81	0,46	1,78	0,0743
Tratamiento testigo: día 22	0,72	0,23	3,16	0,0016
Tratamiento triflumuron: día	-0,27	0,28	-0,99	0,3234
Tratamiento testigo: día 6	0,68	0,47	1,44	0,1507
Tratamiento triflumuron: día	0,60	0,50	1,20	0,2311

Anexo 3

Total enemigos naturales

Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. df	Resid. dev	Pr(>Chi)
NULL			41	206,50	
Bloque	2	17,34	39	189,16	0,0002
PROD	2	3,21	37	185,96	0,2014
Día	4	84,65	33	101,31	<0,0001
PROD: día	8	26,86	25	74,45	0,0007

Efectos fijos

	Estimate	Std. error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	2,51	0,17	14,98	<0,0001
Bloque 2	0,16	0,13	1,21	0,2246
Bloque 3	0,44	0,12	3,66	0,0002
PROD TEST	-0,69	0,26	-2,71	0,0066
PROD TRI	-0,30	0,23	-1,34	0,1814
Día12	-0,88	0,27	-3,24	0,0012
Día 2	-1,50	0,44	-3,44	0,0006
Día 22	0,06	0,21	0,31	0,7583
Día 6	-0,89	0,32	-2,80	0,0051
PROD TEST: día 12	1,12	0,41	2,73	0,0063
PROD TRI: día 12	0,69	0,37	1,85	0,0647
PROD TEST: día 2	1,50	0,53	2,85	0,0044
PROD TRI: día 2	-0,08	0,60	-0,14	0,8917
PROD TEST: día 22	1,04	0,32	3,27	0,0011
PROD TRI: día 22	0,10	0,31	0,32	0,7492
PROD TEST: día 6	0,52	0,45	1,15	0,2495
PROD TRI: día 6	0,49	0,42	1,19	0,2342