

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 689**

21 Número de solicitud: 202330013

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A01N 31/08 (2006.01)

A61K 31/722 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.01.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.08.2024

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2023/070077

71 Solicitantes:

**COPAL SCIENTIFIC SL (100.0%)
PASEO ALAMEDA DE OSUNA, 50L, 4B
28042 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

IRIARTE CELA, Mercedes

54 Título: **PRODUCTO CON PROPIEDADES ANTIOOMICETOS PARA EL CONTROL DE
ENFERMEDADES EN SILVICULTURA, AGRICULTURA Y ACUAPONÍA**

57 Resumen:

Producto con propiedades antioomicetos para el control de enfermedades en silvicultura, agricultura y acuaponía. Está compuesto por ácido tánico en 1% en peso, y chitosán 1% en peso, que, combinados por mezclado en una disolución con ácido acético al 1% y sintetizados en un rango de temperatura entre los 50 y los 70 °C producen un líquido con un potente efecto antioomiceto, con una solubilidad en agua lenta y progresiva, comprobándose que el producto perdura, al menos, durante 48 horas liberando producto en disolución acuosa. Este producto se ha probado con éxito tanto en laboratorio como en entorno real para el tratamiento de salmones afectados por Saprolegnia, en árboles Quercus y plantas de pimiento afectados por Phytophthora, y en cangrejos de río afectados por Aphanomyces astaci. Toda esta experimentación no limita el alcance del uso del producto en otras aplicaciones de prevención, tratamiento y control de oomicetos.

ES 2 977 689 A1

DESCRIPCIÓN

PRODUCTO CON PROPIEDADES ANTIOOMICETOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN SILVICULTURA, AGRICULTURA Y ACUAPONÍA

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se refiere a un producto de nuevo procedimiento de síntesis del sector químico. El producto tiene aplicación para la prevención, tratamiento y control del crecimiento
10 de oomicetos o pseudohongos patógenos en silvicultura, agricultura y acuaponía.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Este producto se desarrolla con el fin de resolver el problema de la infección por oomicetos
15 de transmisión por medios acuosos, tales como la SAPROLEGNIOSIS, la seca (PHYTOPHTHORA) y la enfermedad producida por APHANOMYCES ASTACI. Este problema no está resuelto, bien porque los productos empleados tienen efectos colaterales en los individuos, el ser humano o el entorno, bien porque no tienen la suficiente efectividad.

20 La saprolegniosis es una enfermedad causada por varias especies patógenas del género SAPROLEGNIA que atacan a organismos acuáticos en sus estadios embrionarios. Las pérdidas económicas producidas por la saprolegniosis se estiman en millones de euros. Hasta 2002, esta enfermedad se mantenía bajo control en la acuicultura gracias al uso de verde de malaquita. Sin embargo, el uso de verde de malaquita ha sido prohibido en todo el mundo
25 debido a sus efectos cancerígenos y toxicológicos. Este hecho ha resultado en una desprotección de la acuicultura de peces de agua dulce.

La seca de la encina es una enfermedad causada por la especie patógena PHYTOPHTHORA CINAMOMI. La seca de la encina es actualmente una de las mayores amenazas para la
30 viabilidad de las dehesas Ibéricas y produce un importante impacto económico negativo, especialmente en los alcornocales, lo cual justifica la búsqueda urgente de alternativas para desarrollar nuevas estrategias de control de esta enfermedad. Los tratamientos para cualquier especie de PHYTOPHTHORA son complicados y ninguno ha conseguido controlar de forma efectiva los efectos de estos patógenos. Especialmente importantes son los tratamientos
35 preventivos de la propagación de P. CINNAMOMI, ya que este es un factor importante en la rápida mortalidad de los robles en España y Portugal.

La afanomicosis o peste del cangrejo de río es una enfermedad causada por la especie patógena *APHANOMYCES ASTACI*. La afanomicosis es actualmente la mayor amenaza para la supervivencia de la mayor parte de especies de cangrejo del río del mundo, especialmente en las europeas, lo cual, justifica la búsqueda urgente de alternativas para desarrollar nuevas estrategias de control de esta enfermedad. No existe hasta la fecha ningún tratamiento para esta enfermedad, ni a nivel preventivo ni curativo.

El producto que se presenta en esta invención resuelve los problemas descritos gracias a su comportamiento en disolución, con una liberación lenta y progresiva de los principios activos, permitiendo una concentración mínima mantenida en agua, en particular en sistemas abiertos como piscifactorías o terrenos extensivos, teniendo como consecuencia la inhibición del oomicete en el medio de transmisión y contagio.

A continuación, se detalla el estado de la técnica respecto a productos similares, que, conteniendo compuestos análogos, están desarrollados en otros estados de la materia y con otros fines diferentes a los que se describen en esta invención:

El documento Rubentheren et al. 2015 describe la preparación de composiciones líquidas que contienen quitosano y ácido tánico. Las composiciones se preparan disolviendo el quitosano (al 2%) en una solución de ácido acético (al 2%) y agitando 3 horas a una temperatura de 35°C y mezclando esta solución con ácido tánico (20 o 40 mg de ácido tánico/g de quitosano) manteniendo la agitación y la temperatura durante otra hora. Estas composiciones se utilizan para elaborar films por evaporación sobre una superficie (apartados 2.3 y 2.4, tabla 1, muestras II A y B).

El documento CN105079878A describe una composición que incluye quitosano, ácido acético y ácido tánico que se utiliza para elaborar un recubrimiento antibacteriano. El procedimiento de obtención del recubrimiento comprende la etapa de mezclar con agitación una solución de quitosano disuelto en ácido acético (al 1%) con una solución de ácido tánico y luego depositar la mezcla sobre una superficie (ver ejemplos). La composición que se utiliza para el recubrimiento tiene los mismos ingredientes principales (quitosano, ácidos acético y tánico) y en las mismas proporciones que la composición de la invención (de un 1 a un 4% de quitosano y de ácido tánico).

Los documentos Rivero et al., 2010 y Rivero et al., 2011 divulgan la preparación de composiciones líquidas que comprende solubilizar quitosano (1,5%) en una solución de ácido acético (1,5%) y mezclar en agitación con distintas proporciones de ácido tánico (20-80 mg/g de quitosano) para la elaboración de films.

5

El documento US2011059162A1 divulga diversas composiciones que contienen quitosano y taninos. Los taninos se añaden a la formulación con objeto de mejorar las propiedades antibacterianas y antifúngicas y/o las propiedades mecánicas de las composiciones que solo incluyen quitosano (párrafos 3-5). En la patente se demuestra que las actividades bacteriostática y fungistática aumentaron cuando se utilizaron ambos compuestos (párrafos 151 y 152, tabla 1-2). Los taninos utilizados en la composición pueden ser condensados e hidrolizables, preferiblemente no monoméricos, aunque la composición puede contener hasta un 5% de taninos monoméricos como el ácido tánico (párrafos 6, 59).

10

15 El documento EP3318125A1 muestra una composición para utilizar en el tratamiento de enfermedades producidas por hongos y otros patógenos de plantas que contiene quitosano, un extracto acuoso de *Castanea sativa* rico en taninos y ácido cítrico (ejemplo 3).

20

El documento Lemke et al. 2022 muestra la actividad antifúngica del quitosano disuelto en acético y mezclas de quitosano y cobre frente a un hongo del género *Fusarium* (figura 2, tabla 2)

25

El documento Huang et al. 2021 es un artículo sobre la actividad de disoluciones de quitosano en acético contra el oomiceto *PHYTOPHTHORA* infestans. El crecimiento del patógeno fue inhibido completamente a la mayor concentración de quitosano utilizada, dependiendo el grado de inhibición de la concentración de quitosano incluida en la composición. La composición también afectó a la germinación de las esporas del oomiceto (apartados 3.1 y 3.2).

30

El documento ES2761076A1 divulga composiciones para eliminar agentes patógenos para la agricultura como hongos (*Fusarium culmorum*) y pseudohongos (*PHYTOPHTHORA cinnamomi*). Dichas composiciones (compuestos conjugados) comprenden oligómeros de quitosano y compuestos antimicrobianos, como ácidos polifenólicos. Para obtener los oligómeros del quitosano, primero se disuelve éste en ácido acético en agitación y a 60°C de temperatura (página 5, línea 29-página 8, línea 18; página 11, líneas 5-15, ensayos 1 y 2).

35

El documento Min et al. 1994 muestra el efecto inhibitorio del quitosano sobre el oomiceto patógeno de peces SAPROLEGNIA parasitica (ver figuras 1 y 2).

El documento Stössel y Leuba 1984 se refiere al uso de soluciones de quitosano con ácido acético a distintos pH para inhibir el crecimiento de oomicetos de los géneros APHANOMYCES y PHYTOPHTHORA y otros fitopatógenos. A pH 4 ningunos de los oomicetos crece (resultados, tablas 2 y 3).

El documento Ahmed et al. 2020 es un estudio de la actividad del quitosano (en suspensión o en nanopartículas) frente a varias bacterias y oomicetos patógenos de peces. Las nanopartículas de quitosano fueron efectivas frente a muchas de las bacterias y oomicetos (apartado 3.3). Las suspensiones no mostraron efecto frente a los patógenos por utilizarse a un pH más alto del adecuado, según los autores (apartado 4, discusión).

El documento Zhang et al. 2019 estudia el efecto de soluciones de ácido tánico a varias concentraciones sobre el oomiceto SAPROLEGNIA parasítica patógeno en acuicultura (figura 1, tabla 1).

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un producto de nuevo procedimiento de síntesis, (denominado BioCopal en los informes complementarios del CSIC donde se han hecho los análisis microbiológicos), con propiedades fisicoquímicas tales que le confieren un efecto antioomiceto prolongado. El producto es un líquido más denso que el agua, de difusión lenta en disolución acuosa de, al menos, hasta 48 horas, y que actúa frente al crecimiento de pseudohongos.

Método de obtención

Reactivos:

- a) Ácido etanoico (CH_3COOH)
- b) Chitosán o quitosano (cualquier grado de desacetilización)
- c) Ácido tánico (2,3-dihydroxy-5-({[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5,6-tetrakis({3,4-dihydroxy-5-[(3,4,5-trihydroxyphenyl)carbonyloxy]phenyl}carbonyloxy)oxan-2-yl]methoxy}carbonyl)phenyl 3,4,5-trihydroxybenzoate)
- d) Aditivos y colorantes

Se prepara una disolución de ácido acético al 1% en volumen. Un volumen determinado de esta disolución se calienta en el rango comprendido entre 50 y 70 °C, preferentemente al baño maría. Una vez caliente se le añade un 1% en peso de chitosán respecto del volumen de la disolución, con agitación constante. Una vez disuelto el chitosán se le añade un 1% en peso de ácido tánico respecto del volumen total en la misma disolución. Se agita la mezcla vigorosamente, siempre manteniendo la temperatura, durante el tiempo necesario para su completa disolución (aproximadamente 1 hora). Una vez disuelto, se le puede añadir un porcentaje en peso/volumen no mayor del 5% de cualquier aditivo o colorante autorizado. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se envasa en botellas preservadas de la luz solar y a temperatura por debajo de los 20 °C. El producto final es un líquido viscoso de tonalidad marrón-anaranjada de pH en torno a 4.

Análisis fisicoquímicos

Los ensayos experimentales tanto en laboratorio como en entornos relevantes referidos a cada una de las enfermedades descritas en la introducción se han desarrollado aplicando el producto en diferentes estados de la materia usando la misma formulación, Fig.1, o formulaciones encontradas en otras publicaciones o patentes con compuestos similares, pero con metodologías de obtención diferentes. Únicamente este producto en estado líquido sintetizado con temperatura entre 50 y 70 °C ofrece las ventajas de efectividad como antioomiceto en los medios estudiados. Para constatar estas ventajas se hicieron ensayos con los diferentes productos:

- a) Líquido. Se prueba el producto con dos tipos de síntesis:
 - a. Síntesis a T ambiente.
 - b. Síntesis con T entre 50 y 70°C.
- b) Líquidos descritos en Rubentheren et al. 2015.
 - a. Rubentheren et al. 2015 con ácido tánico al 0,004%.
 - b. Rubentheren et al. 2015 con ácido tánico al 0,008%.
- c) Sólido. La solidificación del producto se puede hacer por curado natural, a temperatura ambiente, sobre una superficie, o bien con curado acelerado mediante estufa con temperaturas entre los 55 a 120 °C, quedando como un bio-film. También es posible generar films por deposición electroforética sobre superficies metálicas.
- d) Gel. La gelificación se puede generar mediante gelificación iónica, embebiendo una porción del producto en una solución de concentración 1M o mayor de

NaOH; o bien, por absorción del producto líquido en geles superabsorbentes e inertes, como el poliacrilato de potasio.

El producto en ningún caso se presenta como un nano-recubrimiento. Ninguna de las metodologías descritas en el documento CN105079878A como la electrólisis en coordinación con deposición electroforética, cuya función es generar un recubrimiento a tamaño nano se aplica en la producción de este producto. Tampoco se emplea la metodología descrita en la patente US2011059162A1 ya que no se trata de nanopartículas, film de hidrogel, bio-espuma, bio-gel o como recubrimiento ni de sólidos ni de liposomas. Muy al contrario, no buscamos un recubrimiento, ni un soporte para liberación de medicamentos. Hemos constatado la efectividad de la solución líquida como fungicida en disolución acuosa frente a presentaciones del producto en sólido, como film de recubrimiento o en gel.

El chitosán, que es la base del producto, se obtiene de los crustáceos y es un biopolímero de aminosacáridos no tóxicos y de fácil absorción. Ya se conocen sus propiedades como fungicida y se aplica en vendajes por ser antihemorrágico y antimicrobiano¹. Sin embargo, estas propiedades no tienen la potencia suficiente para eliminar los OOMICETOS patógenos, por lo que la formulación de esta invención mejora, con mucho, su efecto antioomiceto sin menoscabo del entorno ecológico o natural.

El producto, como se demostrará más adelante, ofrece las siguientes ventajas con respecto a los otros productos sintetizados sin temperatura o aquellos descritos en las patentes reseñadas o en las publicaciones relacionadas en los antecedentes de la invención:

- a) El método de producción es fácil y barato. No necesita equipos de electroforesis, generación de nanopartículas o micelas ni procesos de curado.
- b) La aplicación de temperatura en el proceso de síntesis es vital para generar un producto muy homogéneo, con una matriz polimérica modificada que permite un comportamiento óptimo en disolución acuosa frente a oomicetos patógenos.
- c) El producto tiene un efecto antioomiceto mucho más potente que los otros productos, probados todos en placa Petri.
- d) La liberación de los componentes en disolución acuosa se hace lenta y progresivamente durante, al menos, 48 horas sólo para el producto objeto descrito en

¹ Rafaat, Dina et al. Microbial Biotechnology 2 (2009) 186-201.

esta memoria, cosa que no ocurre con los otros productos. Esta particularidad le confiere un potente efecto a largo plazo en medio acuoso, inhibiendo el crecimiento de los pseudohongos patógenos con una efectividad de un 40% más respecto al producto con metodología de síntesis por debajo de la temperatura del producto que aquí se presenta, un 80% más efectivo que los productos tipo gel y un 100% más efectivos que los productos en sólido.

- e) La liberación lenta de los componentes del producto en disolución acuosa supone una ventaja técnica muy importante, ya que permite no sobre dosificar el medio a controlar ni sobreexponer a las especies (animales o plantas) a un añadido continuado del producto para mantener constante la concentración del producto, inhibiendo el crecimiento del oomiceto.
- f) El producto se muestra inocuo, no tóxico, para los peces, vegetales y cangrejos.
- g) El chitosán no sólo sirve como matriz de soporte, sino que aporta su propio efecto anti-oomiceto y, en el caso de las especies vegetales, potencia su sistema inmunológico natural².

Los productos en sólido y líquido se analizan mediante espectroscopía Raman y UV-Visible. La gelificación iónica da como producto final un compuesto gomoso que pierde todo el ácido tánico, cambia por completo la efectividad del producto y lo hace inerte ante los patógenos. El gel en el poliacrilato de potasio tiene la misma composición que el líquido, razón por la cual sólo se tiene en cuenta el producto sólido y líquido para su análisis.

Espectroscopía Raman

Se analiza mediante espectroscopía Raman la caracterización de los productos, usando un equipo Renishaw InVia con dos líneas láser a 532 y 785nm, empleando tiempos de exposición entre 10 y 20 segundos, y un máximo de 32 acumulaciones.

En las Figs. 2 y 3 se muestran los espectros Raman de los compuestos puros usados en la formulación, y los espectros Raman del producto para las diferentes síntesis líquidas y en sólido, respectivamente. En los espectros Raman del producto original, las bandas entre 1607 y 1713 cm⁻¹ corresponden al ácido tánico, manteniendo la relación de intensidades y el perfil espectral para el líquido, no así para el sólido donde tienen una anchura media de banda mayor y menor intensidad. Esta particularidad revela que el compuesto, aun estando presente,

² Zheng, K. et al. International Journal of Biological Macromolecules 182 (2021) 1670-1680.

se ve mucho más afectado en los modos de vibración debido al entorno químico del polímero. Por otra parte, las bandas en el rango espectral comprendido entre 540 y 1400 cm^{-1} se corresponden con bandas de chitosán y ácido tánico. Estas bandas aumentan su anchura media de banda y pierden el perfil definido de las bandas en el caso del producto en sólido, en forma de film, Fig. 3 línea punteada, lo que denota una pérdida de cristalinidad en su estructura atómica-molecular³. Esto se observa particularmente bien en la zona entre los 1300 y 1400 cm^{-1} , donde las bandas de vibración de tensión simétricas y de deformación en el plano de los grupos $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$, $-\text{OH}$ y $-\text{CN}$ ⁴ desaparecen respecto a los espectros del producto en líquido y al del chitosán original, Fig. 3.

En el caso del producto líquido, se estudian dos síntesis diferentes, con y sin temperatura, observándose que, si bien el sintetizado a temperatura ambiente conserva bien definidas las bandas entre 700 y 1400 cm^{-1} , el líquido sintetizado con temperatura conserva las bandas, aunque menos intensas y estrechas. Esta evidencia fisicoquímica muestra una diferencia estructural entre el producto curado en sólido y el líquido sintetizado con y sin temperatura. El film sólido se muestra como un sólido amorfo donde únicamente se distinguen bien las bandas de ácido tánico. Por otra parte, el efecto de la temperatura en la síntesis del líquido favorece la inclusión de las moléculas de ácido tánico en la estructura polimérica debido a la afinidad electrostática de los grupos funcionales de ambos compuestos como los grupos arilos, ricos en electrones, los grupos aminos e hidroxilos, y esa inclusión menoscaba ligeramente la estructura cristalina original del chitoán sin llegar a romperla (de otra forma el espectro Raman mostraría otras diferencias más acusadas). El control de la temperatura permite mantener la estructura del chitosán al tiempo que conserva la estructura del ácido tánico, ambos perfectamente integrados en una estructura molecular chitosán-ácido tánico, generando un compuesto líquido, un poco más viscoso y denso que el agua, con las particularidades de liberación de ácido tánico y chitosán y de difusión en el medio circundante que se describen más adelante, y que no se dan para el compuesto sintetizado sin temperatura, y ni de lejos con otros estados de la materia como films sólidos, recubrimientos sólidos, biogeles o bioespumas.

Espectroscopía UV-Visible

³ Stuart, B.H. Vibrational Spectroscopy 10 (1996) 79-87. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203195000429>

⁴ Zajac, A. et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 134 (2015) 114-120. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142514009597>

Otra diferencia muy importante que justifica el uso del producto exclusivamente en forma de líquido sintetizado con temperatura es su comportamiento en disolución acuosa. Se usa un equipo NanoDrop ONE UV-Vis y un equipo Shimadzu UV-Vis UV-3600i plus. Las medidas hasta 70 minutos se hacen con este último, ya que es mucho más sensible.

5

Se miden los reactantes puros por separado por UV-Vis, Figs. 4-6. Tomando láminas sólidas del bio-producto y sumergiéndolas en agua, así como la cantidad equivalente del producto líquido sintetizado con temperatura sumergido en agua, se puede constatar mediante espectroscopía UV-Visible un comportamiento completamente distinto con el tiempo en una horquilla de 48 h. Esta prueba fue definitiva para poder administrar el producto en el entorno real, tanto en piscifactoría con salmónidos como en los ensayos con cangrejos, como en el agua de riego para plantas. Mientras el sólido libera todo el ácido tánico inmediatamente y la concentración queda estabilizada desde el primer momento, Fig. 7, el producto líquido muestra una liberación progresiva con el tiempo, Fig. 8. Obsérvese, además, que la intensidad de la absorbancia, relacionada directamente con la concentración del producto en disolución en virtud de la ecuación de Lambert-Beer, es mucho menor para la liberación del compuesto en el sólido, a un máximo de 12 unidades aproximadamente, mientras que, en el caso del producto líquido, donde empieza liberando concentraciones de 12 unidades a tiempo 0, a las 48 horas sigue liberando concentraciones equivalentes por encima de 16 unidades.

20

Así mismo, se hace el ensayo a tiempos de disolución de 70 minutos con el fin de detallar mejor su comportamiento, comparando los siguientes compuestos:

a) Líquido.

25

- a. Producto de síntesis a T ambiente (23 °C).
- b. Producto de síntesis a 35 °C.
- c. Producto de síntesis a T entre 50 y 70 °C. Este en concreto se sintetizó con una temperatura media de 60 °C, y nunca bajó de los 55 °C.

b) Líquidos descritos en Rubentheren et al. 2015.

30

- a. Rubentheren et al. 2015 con ácido tánico al 0,004%.
- b. Rubentheren et al. 2015 con ácido tánico al 0,008%.

Procedimiento experimental

35

Para hacer los análisis de UV-Vis se usa una cubeta de cuarzo, donde se disponen 3 mL de agua ultrapura tipo III, Fig. 10. Para cada caso se añaden 20 µL del producto y se miden los espectros UV-Vis cada 10 minutos hasta cumplir los 70 minutos en total.

Resultados

Como se puede observar en la Fig. 9 el producto sintetizado con temperatura entre 50 y 70 °C es más insoluble en un principio y se deposita en el fondo, mientras que el producto sintetizado a temperatura ambiente (23 °C) y el sintetizado a 35 °C se disuelven inmediatamente. Los resultados de estos dos últimos productos son prácticamente idénticos.

Producto de síntesis a temperatura ambiente (23 °C)

El resultado del ensayo muestra que tan pronto como se añade el producto en el agua, se produce una disolución cuasi total, Fig. 10, y a partir de los 10 minutos la disolución es total, no apreciándose cambios espectroscópicos con el tiempo. Las líneas verticales por debajo de los 250 nm aparecen por la saturación del equipo instrumental en ese rango espectral.

Producto de síntesis a 35 °C

El espectro UV-Vis mostrado en la Fig. 11, es prácticamente idéntico al del producto sintetizado a 23 °C. Sólo uno de los espectros, el medido a los 20 minutos, aparece ligeramente por debajo de las siguientes medidas espectrales. Es decir, el comportamiento es análogo al del producto sintetizado a 23 °C.

Síntesis del producto con T de 50 a 70 °C

Este producto tiene un comportamiento en disolución muy diferente al expresado por el resto de los productos. Tal como se muestra en la Fig. 12, la liberación del ácido tánico y del chitosán es lenta y progresiva con el tiempo, cualidad ésta importantísima para el tratamiento de enfermedades en medio acuoso, ya que permite no sobre dosificar el medio a controlar ni sobreexponer a las especies (animales o plantas) a un añadido continuado del producto. A los 70 minutos, la concentración en agua ha saturado el detector del equipo UV-Vis. Aunque en un principio la cantidad de producto medida a tiempo 0 en agua es inferior a la equivalencia de 1 unidad de absorbancia, tomando como referencia la banda de máximo a 279 nm, transcurrido un tiempo, la concentración de producto aumenta por encima de las 5 unidades de absorbancia, mientras que en el producto a temperatura ambiente libera concentraciones por encima de 2 unidades de absorbancia desde el principio y nunca superan las 3,2 unidades, no observándose cambios con el tiempo.

Rubentheren et al. 2015 con ácido tánico al 0,004%

El comportamiento del producto sintetizado siguiendo las indicaciones descritas en el artículo referido, con una concentración de chitosán del 2%, de ácido acético del 2% y de ácido tánico

al 0,004%, se muestra en la Fig. 13. No existe una dilución progresiva en ningún caso, la concentración del ácido tánico es muy pobre y se libera inmediatamente.

Rubentheren et al. 2015 con ácido tánico al 0,008%

- 5 En el caso del producto descrito en el artículo referido que contiene una concentración de chitosán del 2%, de ácido acético del 2% y de ácido tánico al 0,008%, el comportamiento es análogo al del apartado anterior, tal como se muestra en la Fig. 14. La banda a 279 nm se hace más intensa ya que la cantidad de ácido tánico es mayor, sin embargo, la liberación de los compuestos es inmediata.

10 Además de la diferencia estructural y en dilución del producto original con el resto de los productos descritos en otras patentes o publicaciones, existe otra diferencia entre el producto líquido sintetizado a temperatura ambiente y el sintetizado con calentamiento cuando se provoca un envejecimiento fotoquímico de ambos productos. Al someter los dos productos a la exposición solar continuada, se observan cambios en el color y en la textura. Así, se puede observar que el producto sintetizado a temperatura ambiente se oscurece mucho menos y se mantiene como un líquido ligero; por otra parte, el producto sintetizado con control de temperatura toma un color mucho más oscuro y se torna en un líquido mucho más espeso y denso, Fig. 15.

20 La temperatura, por tanto, favorece la pérdida de independencia estructural del polímero de chitosán, tal como se demostró en el análisis Raman, debido a la inclusión del ácido tánico en la matriz polimérica, dando como producto final un líquido muy homogéneo y bien distribuido. Esta relación entre las dos moléculas muestra efectos más visibles ante el envejecimiento fotoquímico porque el ácido tánico es muy sensible a la radiación, cambiando de color (por cambios electrónicos en los grupos funcionales) que afectan también a la matriz del chitosán, cambiando el color de todo el producto. Mientras que sin temperatura prevalece la estabilidad del chitosán ante el envejecimiento, probablemente por la protección de una estructura micelar alrededor del ácido tánico, manteniendo la independencia de ambos compuestos, y no se colorea todo el producto. Por tanto, sabemos que el almacenaje y la conservación del producto necesita condiciones de oscuridad. La síntesis con temperatura debe hacerse con las condiciones descritas y nunca por encima de 90 °C ya que la estructura del polímero se descompone, generando estructuras poliméricas aleatorias de apariencia gomosa y perdiendo su efectividad antimicrobiana.

Resultados de los ensayos en laboratorio del producto en microorganismos PHYTOPHTHORA, SAPROLEGNIA y APHANOMYCES ASTACI

Los ensayos en el laboratorio sobre placa Petri en cultivo de SAPROLEGNIA, PHYTOPHTHORA y APHANOMYCES ofrecieron resultados muy reveladores. La diferencia del producto sólido y líquido sobre el crecimiento de esos patógenos en placa Petri es determinante para su uso y aplicación. Como se puede observar en la Tabla 1, el halo de inhibición frente a la SAPROLEGNIA es claramente más grande cuando lo que se emplea es una gota de 5µL del producto original, mientras que cuando se emplea un film de recubrimiento o un biogel, su efectividad es manifiestamente menor. Se obtienen los mismos resultados con los otros patógenos.

La diferencia fisicoquímica descrita en el apartado anterior para las diferentes presentaciones del producto en su estructura molecular, entre el producto sólido y el producto en líquido, justifica los resultados de los ensayos en placa Petri. El Dr. Javier Diéguez Uribeondo, investigador científico del CSIC, se ha encargado de hacer los ensayos del producto en los microorganismos. Las pruebas en laboratorio con placa Petri muestran que la presencia del producto produce el enquistamiento y lisis de la zoospora y, por lo tanto, impide la movilidad de las zoosporas y previene la germinación, previniendo el contagio. Estos efectos previenen la dispersión en el medio y, por lo tanto, evitarían el contagio de estos patógenos en diferentes medios.

En la Tabla 1 se pueden ver los resultados del ensayo con todos los productos, reactivos y alternativas de síntesis. Se emplearon muestras en film sólidas, geles y muestras líquidas. Los mejores resultados se aprecian para la muestra del producto original, con halos de inhibición de >8 mm de radio en la placa Petri, seguidas por las muestras del producto sintetizado a temperatura ambiente (23 °C) y a temperatura de 35 °C. En gel muestran halos de inhibición mucho más pequeños, de 5 o 1 mm de radio, mientras que las muestras sólidas en film no tuvieron efecto. En opinión del experto, para halos pequeños, >2-3 mm, se puede tratar de halos de arrastre, de ahí que en el caso del gel en seco y del producto de Rubentheren et al. 2015 con ácido tánico al 0.008%, no exista inhibición del crecimiento del oomiceto.

Teniendo en cuenta los efectos descritos, el **producto original es aproximadamente un 40% más eficiente en placa Petri que el producto líquido sintetizado a temperatura ambiente o a temperatura de 35 °C, un 80% más eficiente que en aplicación gel, y un 100% más**

eficiente que en aplicación de film sólido.

Tabla 1. Resumen de los resultados a las dos semanas de poner en contacto diferentes productos con suspensión de zoosporas de SAPROLEGNIA (el resultado es análogo con PHYTOPHTHORA y APHANOMYCES ASTACI), y descripción del comportamiento físico de cada uno de los productos en disolución acuosa.

Producto	Foto	Halo / r* (mm)	Inhibición del crecimiento del oomiceto en el interior del halo**	Comportamiento del producto en disolución acuosa
Original (síntesis en un rango de T entre 50 y 70 °C)		Sí >8mm	Sí	Se diluye lentamente, en un proceso de difusión progresivo con el tiempo de, al menos, hasta 48 horas
Síntesis a T 23 °C		Sí 4-5 mm	Sí	Se diluye prácticamente por completo inmediatamente
Síntesis a T 35 °C		Sí 4-5 mm	Sí	Se diluye prácticamente por completo inmediatamente
Film sólido curado al aire		No	No	Se diluye inmediatamente liberando menos de la mitad de la concentración de los compuestos que en los productos líquidos
Film sólido curado en horno		No	No	Se diluye inmediatamente liberando menos de la mitad de la concentración de los compuestos que en los productos líquidos
Gel con poliacrilato de potasio con el producto original		Sí 5 mm	Sí	Se diluye en muy poca concentración e inmediatamente
Gel con poliacrilato de potasio seco con el producto original		Sí 1 mm	No	No se diluye, toma agua del entorno
Gel iónico		Sí 1 mm	No	No se diluye
Ácido tánico al 1%		Sí 3-4 mm	Sí	Dilución inmediata
Chitosán diluido al 1% en una disolución de ácido acético al 1%		No	No	Dilución inmediata
<u>Rubentheren et al. 2015</u> con ácido tánico al 0.004%		No	No	Dilución inmediata
<u>Rubentheren et al. 2015</u> con ácido tánico al 0.008%		Sí 1mm	No	Dilución inmediata

*r: radio del halo cuantificado a partir del límite del producto.

** Las pruebas se hacen en una placa Petri de agar PGA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de figuras en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Muestra el producto la misma composición, pero con diferente procedimiento de síntesis: a, en film sólido; b, solución líquida del producto original, y c, gel.

Figura 2.- Espectros Raman de los compuestos puros por separado, chitosán, ácido tánico y ácido acético.

Figura 3. Espectros Raman del producto original, del producto líquido con síntesis a temperatura ambiente y del sólido curado.

Figura 4. Espectro UV-Vis de ácido acético $1,6 \cdot 10^{-4}M$ en disolución acuosa.

Figura 5. Espectro UV-Vis de chitosán al 0,01% (w/v) en disolución acuosa acidulada.

Figura 6. Espectro UV-Vis de ácido tánico al 0,01% (w/v) en disolución acuosa.

Figura 7. Espectro UV-Vis del producto sólido en disolución a tiempo cero, a las 24 h y a las 48 horas.

Figura 8. Espectro UV-Vis del producto líquido original (temperatura entre 50 y 70 °C), en disolución a tiempo cero, a las 24 h y a las 48 horas.

Figura 9. Imagen de las cubetas de cuarzo con el producto original, izquierda, y con el producto sintetizado a 35 °C, derecha.

Figura 10. Espectros UV-Vis del producto sintetizado a temperatura ambiente (24 °C) medidos cada 10 minutos en disolución acuosa.

Figura 11. Espectros UV-Vis del producto sintetizado a temperatura de 35 °C medidos cada 10 minutos en disolución acuosa.

Figura 12. Espectros UV-Vis del producto original, sintetizado en el rango comprendido entre 50 y 70 °C, medidos cada 10 minutos en disolución acuosa.

Figura 13. Espectro UV-Vis del producto descrito en Rubentheren et al. 2015 con ácido tánico al 0,004%, medidos cada 10 minutos en disolución acuosa.

Figura 14. Espectro UV-Vis del producto descrito en Rubentheren et al. 2015 con ácido tánico al 0,008%, medidos cada 10 minutos en disolución acuosa.

Figura 15.- Muestra las imágenes de los productos sintetizados con y sin temperatura foto-envejecidos. De izquierda a derecha, viales con el producto sintetizado sin temperatura y con temperatura; gota del producto sintetizado sin temperatura, muy líquido; gota del producto sintetizado con temperatura, espeso y denso.

Figura 16.- Muestra los espectros UV-Vis de la evolución de la concentración de producto con el tiempo en el interior de la batea.

Figura 17.- Muestra una representación de la evolución de la concentración del producto con el tiempo y su función matemática correspondiente.

Figura 18.- Muestra los espectros UV-Vis de las disoluciones de producto en agua en el ensayo de la piscifactoría.

Figura 19.- Muestra el ajuste por mínimos cuadrados de los datos tomados con UV-Vis a 282, 282,5, 283 y 283,5 nm.

Figura 20.- Muestra dos fotografías de los huevos tratados con el producto (izquierda) y los huevos sin tratar (derecha).

Figura 21.- Muestra las fotografías del periodo de eclosión de los huevos. Izquierda, huevos infectados de SAPROLEGNIA no natos del control; derecha, alevines sanos nacidos de la batea tratada.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Tal como se detalla en la descripción de la formulación, la síntesis del producto es fácilmente industrializable, no tiene problemas para el escalado, como se ha podido comprobar desde los ensayos en laboratorio, desde 100 mL, hasta la producción en un reactor industrial de 5L, obteniendo el mismo producto final. A continuación, se describen 3 ensayos experimentales en entorno real que se han realizado para cada aplicación a modo de ejemplo, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

ENSAYOS DE APLICACIÓN DEL PRODUCTO CONTRA LA SAPROLEGNIOSIS EN SALMONES EN LA PISCIFACTORÍA SAN FRANCISCO DE ASÍS, ORONÓZ-MUGAIRE, NAVARRA.

RESUMEN

El producto se prueba en entorno real en la piscifactoría San Francisco de Asís, Oronoz-Mugaire, Navarra. Se diseña un experimento para el tratamiento curativo y preventivo de *saprolegniosis* en huevos de salmón y en salmones adultos. La metodología consiste en la disolución del bio-producto en las bateas con los huevos de salmón fecundados y en la aplicación por vía tópica y en disolución del producto en los salmones enfermos. Los resultados obtenidos muestran una clara actividad antifúngica preventiva sobre los huevos de salmón, inhibiendo el crecimiento del hongo y cuyo éxito de eclosión fue del **100%**, con **0% de infectados y con alevines vivos y sanos**. Mientras que en los huevos del control (sin tratar) eclosionan sólo el 75% de los huevos, el 25% están infectados, no eclosionaron y murieron. El uso del producto en salmones adultos impidió la transmisión de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La proliferación de SAPROLEGNIA en especies de peces en piscifactoría se ha estudiado ampliamente^{5,6}. La necesidad de encontrar un bio-producto, no tóxico para los animales y no contaminante para el medioambiente, se ha revelado como un desafío en los últimos años. Se ha sintetizado un polímero de origen natural con propiedades fungicidas y amable con el medioambiente y a las especies animales a tratar, en concreto el salmón.

⁵ Sandoval-Sierra, J.V., et al. Aquaculture, **2014**; vol. 434, 462-469.

⁶ Hendrick Van den Berg, A., et al. Fungal Biology Reviews, **2013**; vol. 27-2, 33-42.

El Gobierno de Navarra nos permite hacer un ensayo en entorno real en la piscifactoría *San Francisco de Asís*, de Oronoz-Mugaire (Navarra) en los meses de febrero, marzo y abril de 2022 para el tratamiento de la saprolegniosis en salmones adultos contagiados y en huevos de salmón fecundados.

METODOLOGÍA DE APLICACIÓN EN LA PISCIFACTORÍA

El tratamiento en la piscifactoría se aplica con dos metodologías distintas: un tratamiento tópico para salmones con ulceraciones por SAPROLEGNIA, y el añadido de bio-producto en la cuba de 1000 L en la que están alojados; y otro tratamiento de bio-producto en disolución en las pilas de los bastidores para evitar la proliferación del hongo en los huevos fecundados de salmón.

Salmones adultos

El salmón adulto afectado por SAPROLEGNIA con ulceraciones muy avanzadas en la zona de la cola, se le trata de forma tópica con la aplicación del bio-producto por pincelado. Además, en la misma cuba se introduce un individuo sano para comprobar el efecto del producto en la dispersión de la enfermedad. Todos los días se extrae al individuo de la cuba y se le anestesia antes de proceder al tratamiento por vía tópica. Cada tres días se añade al agua de la cuba el producto para que se haga un baño de 40 minutos y posteriormente se reanuda el ciclo de agua habitual.

Huevas de salmón

Las huevas de salmón se tratan únicamente con el producto en disolución cada dos días, sin aplicar baño, con el agua circulante habitual. Se añade el producto en el fondo del bastidor y se deja que difunda y se disuelva siguiendo el curso natural hacia su salida. La entrada de agua al bastidor se hace por el fondo del mismo a través de una rejilla donde descansan los huevos. De ahí, el agua efluye por la parte superior de la pared opuesta del bastidor desde su entrada. En esa trayectoria, el producto disuelto atraviesa las huevas de salmón.

Se preparan dos bateas con 20 huevos fecundados sanos y 4 huevos infectados en cada una. Una será la batea control, donde no se le aplicará ningún producto, y la otra será la batea donde se le añada el producto.

El producto se aplicó en la propia batea, a razón de ser el lugar donde se albergan los huevos y donde menos velocidad toma el agua. Preferentemente cerca de los huevos y en el principio de la corriente, para que recorra toda la batea.

El primer día de aplicación del bio-producto se toman muestras a tiempos concretos en la zona del interior de la batea próxima a la salida del flujo para controlar la concentración del producto que está a punto de abandonar la zona de acción. Los análisis se hacen en laboratorio con el equipo de UV-Vis-NIR Shimadzu 3600i.

Resultados de la toma de muestras en agua

Los resultados de los análisis muestran que el producto se diluye rápidamente en un primer momento, y su concentración decae siguiendo una función asintótica, Figs. 16 y 17. A partir de ese momento hay una liberación más lenta en el agua. El cálculo de concentraciones se hace por espectroscopía UV-Visible en relación con el máximo de la banda a 279 nm y cuya recta de calibrado se hizo previamente en el laboratorio, como se muestra a continuación.

Procedimiento experimental

Se han registrados espectros UV-Vis de disoluciones de polímero a distintas concentraciones en agua de piscifactoría.

Concentraciones:

Las concentraciones se han calculado como porcentaje (%). Éstas se resumen en la tabla 2 con sus correspondientes volúmenes.

Tabla 2. Volumen de producto correspondiente a diferentes concentraciones

VT		4	mL
C (%)	V _{Cop} (mL)	V _{Cop} (μL)	V _{H2O} (mL)
0,90	0,036	36	3,964
0,80	0,032	32	3,968
0,70	0,028	28	3,972
0,60	0,024	24	3,976
0,50	0,020	20	3,980
0,40	0,016	16	3,984
0,30	0,012	12	3,988
0,20	0,008	8	3,992
0,10	0,004	4	3,996

Condiciones experimentales: rango espectral de 175 a 600 nm, resolución de 0,5 nm, rendija de 0,5 nm (fijo) y velocidad media.

Caracterización espectroscópica:

Ajuste por mínimos cuadrados y recta de calibrado. Dado que el máximo de absorbancia se

obtiene en la mayoría entre 282 y 283,5 nm, se ha evaluado a qué longitud de onda se ajusta mejor la ecuación de la recta. Para ello se hace el ajuste por mínimos cuadrados, Figs. 18 y 19.

- 5 En la Tabla 3 se resumen los parámetros principales obtenidos del ajuste por mínimos cuadrados:

Tabla 3. Principales parámetros del ajuste por mínimos cuadrados.

Longitud de onda (λ , nm)	Pendiente ($a \pm \Delta a$, 1/%)	Ordenada en el origen ($b \pm \Delta b$)	Coefficiente de Pearson (r)	r^2	r^2 ajustado
282,0	$3,22799 \pm 0,237$	$0,40392 \pm 0,125$	0,98669	0,97356	0,96828
282,5	$3,24397 \pm 0,24$	$0,40076 \pm 0,12$	0,98656	0,97310	0,96772
283,0	$3,2242 \pm 0,2376$	$0,40837 \pm 0,125$	0,98669	0,97356	0,96828
283,5	$3,23937 \pm 0,239$	$0,40457 \pm 0,126$	0,98664	0,97345	0,96815

- El mejor ajuste corresponde a longitudes de onda de 282 y 283 nm. Por tanto, la ecuación de la recta corresponde a:

$$y = ax + b \quad [1] \quad \rightarrow \quad y = (a \pm \Delta a) \cdot x + (b \pm \Delta b) \quad [2]$$

$$Abs. máx. = (3,228 \pm 0,237) \cdot C (\%) + (0,404 \pm 0,125) \quad [3]$$

- 15 Esta ecuación es la que se emplea para los cálculos de concentraciones en las muestras tomadas en la piscifactoría.

- Debe tenerse en cuenta que el agua de la batea con los huevos no es estática y fluye continuamente, por lo que, si el producto no tuviera una difusión lenta, todo el producto desaparecería a los pocos minutos.

- El análisis de concentración en función del tiempo revela dos aspectos importantes a tener en cuenta: existe una primera dilución rápida del producto y una concentración que decae progresivamente, pero lentamente, después de los primeros 15 minutos. Esa primera dilución rápida es atribuible a la liberación del ácido tánico menos incluido en la matriz polimérica, a la vista de los espectros UV-Vis, mientras que la liberación lenta del resto de compuesto corresponde al chitosán y al ácido tánico que están en inclusión en la propia matriz.

13 días después de la primera aplicación

13 días después de la primera aplicación se constata una diferencia entre la batea con los huevos tratados y la que no está tratada. En el primer caso, los huevos están sanos y el hongo no ha proliferado desde los huevos enfermos a los huevos sanos, en el segundo caso, los huevos sin tratamiento muestran un crecimiento del hongo por más de un tercio los mismos, Fig. 20.

Período de eclosión

El resultado final del ensayo es un éxito total. En los huevos del control (sin tratar) eclosionan el 75% de los huevos y el 25% están infectados, no eclosionan y mueren. **Los huevos tratados con el producto eclosionan el 100%, con 0% de infectados y con alevines vivos y sanos**, Fig. 21.

CONCLUSIONES

El ensayo en entorno real en la piscifactoría Oronoz-Mugaire, Navarra, constata la efectividad preventiva de la saprolegniosis del producto con el éxito de la eclosión del **100%** de los huevos de salmón tratados, libres de saprolegniosis, frente a los huevos de salmón no tratados, cuyos huevos sólo eclosionaron en un 75%, quedando un 25% infectados y muertos. Como resultado del tratamiento durante 10 días, las ulceraciones de los salmones adultos no progresan y el individuo adulto sano que está junto con el enfermo en la cuba no se contagia de la enfermedad.

Ejemplo 2

ENSAYOS DE APLICACIÓN DEL PRODUCTO CONTRA LA PHYTOPHTHORA EN QUERCUS Y PLANTAS DE PIMIENTO EN EL REAL JARDÍN BOTÁNICO (CSIC). MADRID

RESUMEN

El producto se prueba en laboratorio en repetidos ensayos con cepas de PHYTOPHTHORA CINAMOMI y PHYTOPHTHORA INFESTANS con diferentes derivados del producto, en estado sólido, en estado gel y en estado líquido. Como en el caso de la SAPROLEGNIA, el bio-producto en estado líquido es mucho más efectivo, con halos de inhibición de más de un 80% de efectividad respecto a los films sólidos y al gel. Una vez acabados los ensayos de laboratorio se diseña un experimento con plántulas de alcornoque y pimiento en el que se están haciendo las aplicaciones del bio-producto líquido con el fin de comprobar su efectividad frente al pseudo-hongo.

INTRODUCCIÓN

La infección por el pseudo-hongo PHYTOPHTHORA en Quercus y solanáceas como la encina, alcornoque, plantas de pimiento o tomate, se ha hecho extensiva en los últimos años. El tratamiento de esta enfermedad o su prevención está siendo un desafío debido a la dificultad de encontrar un producto no contaminante o tóxico para el entorno del árbol/planta y de fácil aplicación. En particular, el mercado del cerdo ibérico está siendo una de las áreas más afectadas por esta infección.

METODOLOGÍA DE APLICACIÓN EN PLÁNTULAS

A la luz de los exitosos resultados obtenidos de la aplicación del bio-producto en los ensayos en placa Petri en laboratorio con cepas de SAPROLEGNIA, se diseña un experimento en el Real Jardín Botánico (CSIC) con plántulas del alcornoque y plantas de pimiento.

Se utilizaron 10 plántulas de alcornoque (QUERCUS SUBER) de unos 50 cm de longitud, y 10 plántulas de pimiento (CAPSICUM ANNUM) de alrededor de 30 cm de longitud sin síntomas de infección por PHYTOPHTHORA (control). Las raíces de 5 plántulas de cada especie fueron tratadas con el biocida (líquido y gel) a concentración mínima inhibidora por 1h. o con agua destilada (control) y posteriormente expuestas a zoosporas P. CINNAMOMI (para alcornoque) y P. CAPSICI (para pimiento) a concentraciones 10 z/ml durante 1h. Al cabo de una hora adicional las raíces fueron observadas utilizando un microscopio invertido.

CONCLUSIONES

Las plantas tratadas con el producto no se vieron afectadas por el crecimiento del hongo en las raíces, resultando en un 100% en la prevención de la enfermedad.

Ejemplo 3

ENSAYOS DE APLICACIÓN DEL PRODUCTO BIOCOPAL CONTRA LA PLAGA DE HONGOS EN CANGREJOS EN EL REAL JARDÍN BOTÁNICO (CSIC). MADRID

RESUMEN

El producto, se prueba en cangrejos de río autóctonos en 5 acuarios con 10 cangrejos en cada uno, de unos 10 cm de longitud. En los acuarios infectados, los cangrejos tratados con el producto sobrevivieron todos, mientras que los no tratados murieron todos.

INTRODUCCIÓN

Los patógenos fúngicos y pseudo hongos (como los oomycetos) son responsables de algunas de las enfermedades más graves que ocurren en la vida silvestre. Durante las últimas décadas, las poblaciones naturales de especies amenazadas animales han experimentado un número creciente de infecciones fúngicas. Algunos de los patógenos responsables de estas enfermedades están asociados con los primeros documentados eventos de extinción en varias especies causados por la infección y que resultan en tasas crecientes de pérdida de biodiversidad (Fisher et al. 2012). Probablemente, uno de los casos más notorios es la llamada "plaga del cangrejo de río" causada por el organismo similar a un hongo APHANOMYCES ASTACI SCHIKORA (oomicetos). Este patógeno está considerado entre las cien peores especie invasoras del mundo⁷, y ha destruido la mayoría de las poblaciones nativas de cangrejos de río de agua dulce en Europa⁸.

Con el tiempo, la plaga del cangrejo de río se ha convertido en una de las plagas de invertebrados más conocidas enfermedades debido a los recientes avances en biología del desarrollo, biología celular, genómica, taxonomía molecular y filogenia. Además, el desarrollo de herramientas moleculares para la identificación de A. ASTACI está proporcionando una mejor comprensión de la biología y genética molecular del patógeno de la plaga del cangrejo de río⁹.

Sin embargo, las investigaciones sobre tratamientos y control de esta enfermedad no han dado resultados y existe en la actualidad una carencia de conocimiento sobre la prevención y control de la peste del cangrejo. Especialmente importantes son los tratamientos preventivos de la propagación de A. ASTACI, ya que este es un factor clave en la rápida mortalidad de las especies europeas, asiáticas y oceánicas.

En este trabajo, se ha investigado el efecto del producto sobre dos especies causante de la enfermedad, A. ASTACI, en: (i) condiciones de laboratorios sobre distintos estadios del desarrollo biológico de estos patógenos (relacionados con la propagación), y (ii) en instalaciones controladas con cangrejos mantenidos en acuarios.

METODOLOGÍA DE APLICACIÓN EN ACUARIOS

Se utilizaron 5 acuarios y en cada uno se colocaron 10 cangrejos de la especie autóctona

⁷ <http://www.issg.org>

⁸ Unestam 1972, Edgerton et al. 2004, Diéguez-Urbeondo et al. 2006

⁹ Rezinciuc, R. et al. The Biology of Crayfish Plague Pathogen *Aphanomyces astaci*. Chapter (2015) Disponible: https://www.researchgate.net/publication/280921076_The_Biology_of_Crayfish_Plague_Pathogen_Aphanomyces_astaci_Current_Answers_to_Most_Frequent_Questions

ibérica AUSTROPOTAMOBIVUS PALLIPES de unos 10 cm de longitud. En los 3 primeros acuarios se añadieron zoosporas de A. ASTACI hasta conseguir una concentración de 10^3 zoosporas/ml. En el acuario número 4 solo se añadieron zoosporas y en el acuario 5 no se añadieron zoosporas. En cada uno de los acuarios salvo en el acuario 4, se añadió un volumen del producto hasta conseguir la concentración mínima inhibidora de acuerdo con los experimentos *in vitro*. El producto fue añadido a distintos tiempos (6, 12, y 24 h en cada acuario) después de añadir las zoosporas en los acuarios 1,2 y 3 respectivamente.

En el acuario número 4 después de la exposición de los cangrejos a las zoosporas de A. ASTACI se observó una mortalidad del 100 % de los ejemplares al cabo de 10 días. En el acuario número 5, en el que los cangrejos solamente fueron expuestos al tratamiento, todos los cangrejos supervivieron después de dos meses. De igual manera, en los acuarios 1, 2 y 3 ninguno de los ejemplares fue afectado por el patógeno y sobrevivieron durante los dos meses que transcurrió el experimento.

CONCLUSIONES

El tratamiento de los cangrejos con el producto frente a la enfermedad causada por zoosporas de A. ASTACI sobrevivieron todos (100%) los individuos frente a los no tratados, que tuvieron una mortalidad del 100%.

CONCLUSIONES GENERALES

A la luz de los resultados de los ensayos en laboratorio y en entorno relevante sobre la formulación del producto, sus diferentes presentaciones, los efectos de cada una de ellas sobre los patógenos SAPROLEGNIA, PHYTOPHTHORA y APHANOMYCES ASTACI, se puede concluir que:

- a) La formulación original del producto descrita en 3.1 es muy efectiva como anti-oomiceto.
- b) El producto tiene una potente efectividad anti-oomiceto sostenida en el tiempo en medio acuoso, de, al menos, 48 horas.
- c) El producto en estado líquido que no se sintetiza siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1 no tiene la potencia inhibidora de OOMICETOS demostrada para el producto original, y su comportamiento en disolución no es sostenida en el tiempo, disolviéndose inmediatamente.
- d) El producto curado, en estado sólido, no tiene efecto anti-oomiceto sobre el crecimiento de los cultivos de hongos en placa Petri.

- e) El producto curado, en estado sólido, se disuelve inmediatamente en disolución acuosa y proporciona una concentración en disolución de los reactantes considerablemente inferior a los liberados por el producto original.
- 5 f) El producto en estado de gel, no presenta actividad anti-oomiceto para geles iónicos y presenta una actividad anti-oomiceto muy pobre para el producto embebido en geles inertes, como el poliacrilato de potasio.
- g) El producto en estado de gel difunde muy poco el contenido de las perlas de gel en disolución acuosa, y en el caso del gel en seco, absorbe agua del entorno.
- 10 h) El producto sirve para su uso como inhibidor del crecimiento del oomiceto PHYTOPHTHORA en árboles y plantas.
- i) El producto sirve para su uso como inhibidor del crecimiento del oomiceto SAPROLEGNIA en salmónidos.
- j) El producto sirve para su uso como inhibidor del crecimiento del oomiceto APHANOMYCES ASTACI en cangrejos.
- 15 k) Aunque los experimentos que se describen en esta memoria están muy definidos a entornos reales concretos, esto no limita el alcance del uso del producto en otros entornos animales o vegetales que se puedan ver afectados por infestación de oomicetos.

REIVINDICACIONES

Se presenta un producto, para el tratamiento y control de la infestación por oomicetos en silvicultura, agricultura y acuaponía.

5

1. Un producto que está caracterizado por un procedimiento de obtención que comprende las siguientes etapas:

- a) Se prepara una disolución de ácido acético al 1% en volumen.

10

- b) Un volumen determinado de esta disolución se calienta en el rango comprendido entre 50 y 70 °C, preferentemente al baño maría.

- c) Una vez caliente se le añade un 1% en peso de chitosán (cualquier grado de desatelización) respecto del volumen de la disolución, con agitación constante y manteniendo la temperatura.

15

- d) Una vez disuelto el chitosán se le añade un 1% en peso de ácido tánico respecto del volumen total, en la misma disolución.

- e) Se agita la mezcla vigorosamente, siempre manteniendo la temperatura, durante el tiempo necesario para su completa disolución (aproximadamente 1 hora).

- f) Una vez disuelto, se le puede añadir un porcentaje en peso/volumen no mayor del 5% de cualquier aditivo o colorante autorizado. El pH final está en torno a 4.

20

2. Un producto obtenido según el procedimiento de la reivindicación 1 cuyas características técnicas son:

- a) Un producto líquido, más espeso que el agua, de color marrón, donde la inclusión del ácido tánico en la matriz del chitosán, estimulado por la temperatura, altera ligeramente la estructura molecular polimérica de este último, dando como consecuencia un compuesto más insoluble en agua que el mismo producto sintetizado fuera del rango de temperatura especificado en la reivindicación 1.

25

- b) Un producto con un efecto de difusión lenta en agua, de duración comprobada de, al menos, hasta 48 horas, que sólo ocurre para el producto sintetizado por el procedimiento especificado en la reivindicación 1.

30

- c) Un producto con un potente efecto anti-oomicete de acción prolongada, siendo un 40% más efectivo sobre cultivo en placa Petri de oomicetos que el producto sintetizado con otro procedimiento de obtención y fuera del rango de temperatura especificado en la reivindicación 1; un 80% más efectivo que un producto con la misma composición en presentación en gel; y un 100% más efectivo que cualquier otro producto con los mismos componentes en presentación en sólido.

35

3. Un producto obtenido según el procedimiento de la reivindicación 1, para su uso en un

método de prevención, tratamiento y control del pseudo-hongo PHYTOPHTHORA en árboles y plantas afectados por la enfermedad, bien por endoterapia, bien por riego directo en las raíces de los árboles, o por cualquier otro método de aplicación.

- 5 4. Un producto obtenido según el procedimiento de la reivindicación 1, para su uso en un método de prevención, tratamiento y control del pseudo-hongo SAPROLEGNIA en salmónidos por disolución del producto en el agua de cultivo de huevos fecundados y en el agua de los tanques donde están los peces adultos.
- 10 5. Un producto obtenido según el procedimiento de la reivindicación 1, para su uso en un método de prevención, tratamiento y control del pseudo-hongo APHANOMYCES ASTACI en cangrejos, mediante un método de tratamiento por disolución del producto en el agua que contiene los ejemplares adultos o sus huevos fecundados.
6. Un producto obtenido según el procedimiento de la reivindicación 1, para su uso en un método de prevención, tratamiento y control de anti-oomicetos relacionado con enfermedades que afectan a animales y plantas.

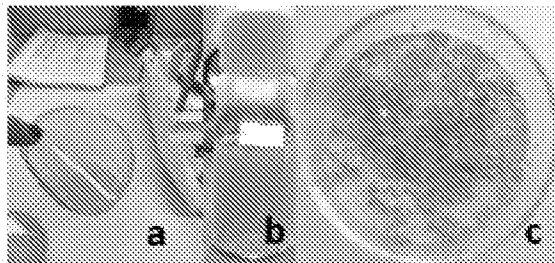


Figura 1.

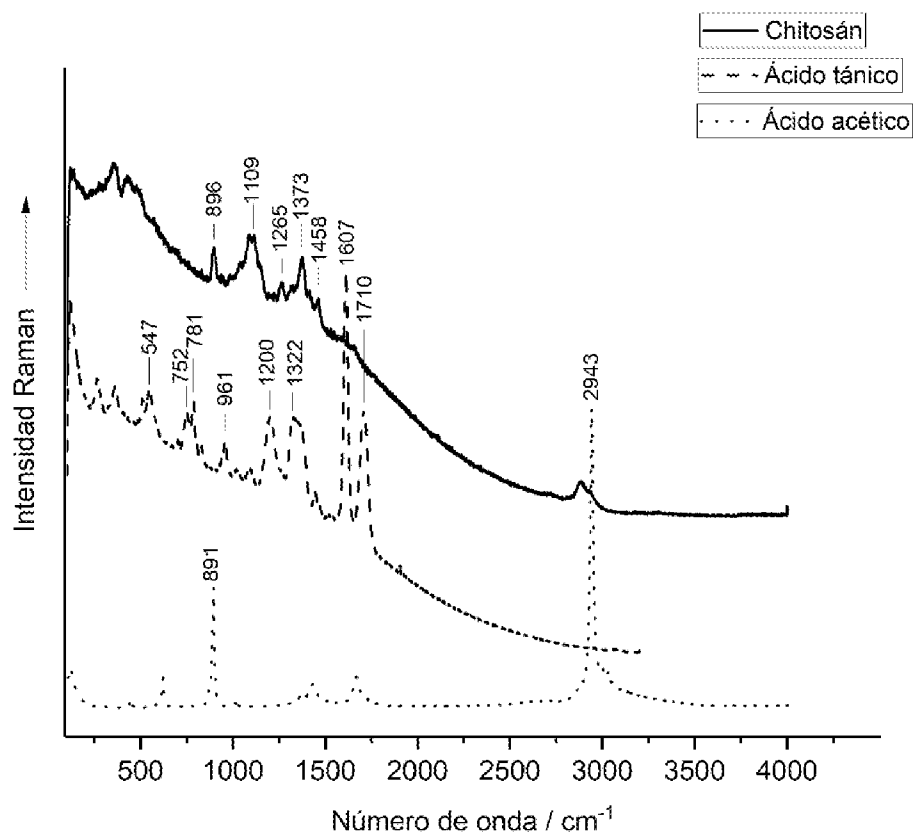


Figura 2.

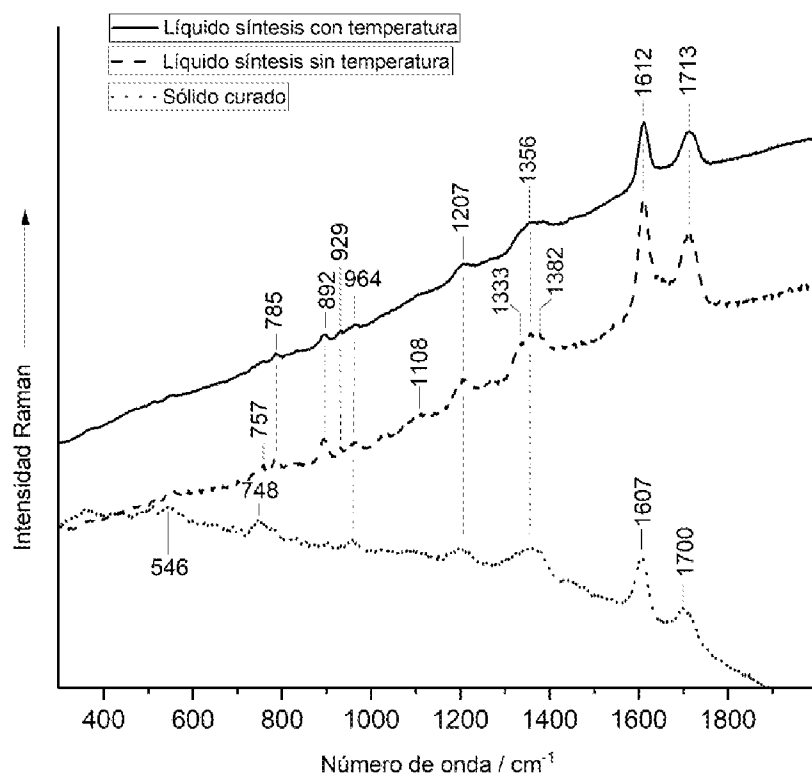


Figura 3.

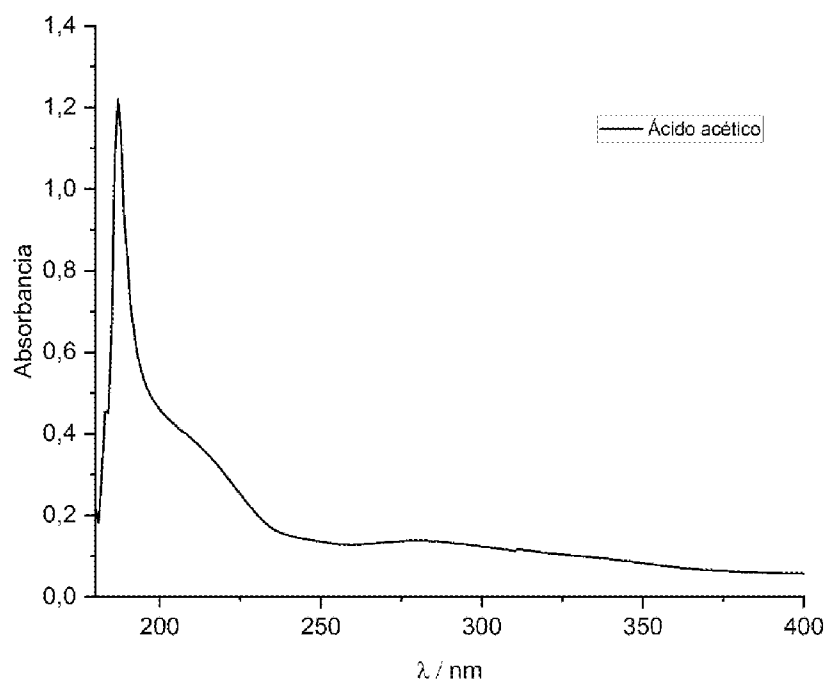


Figura 4.

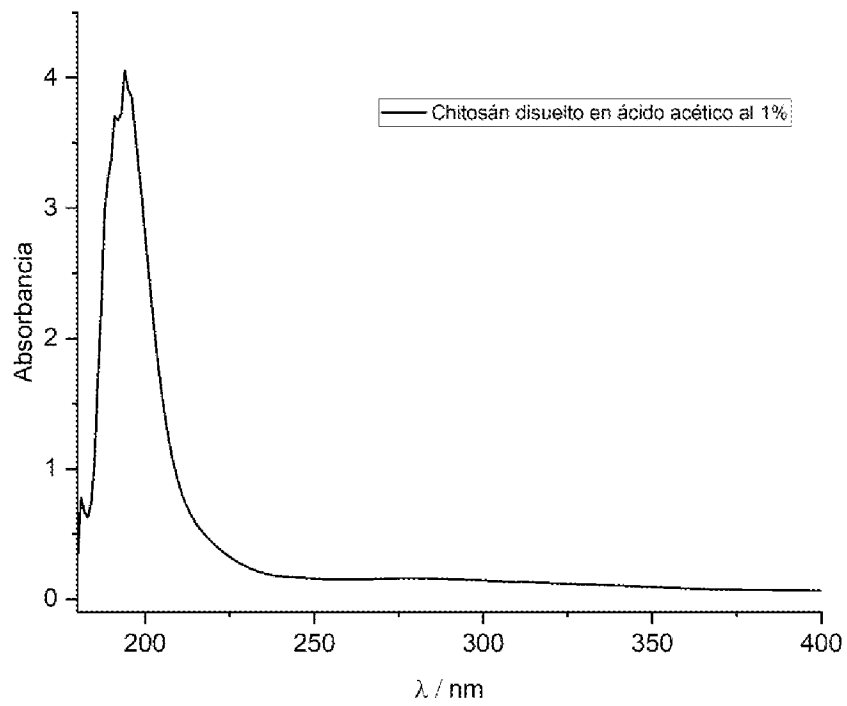


Figura 5.

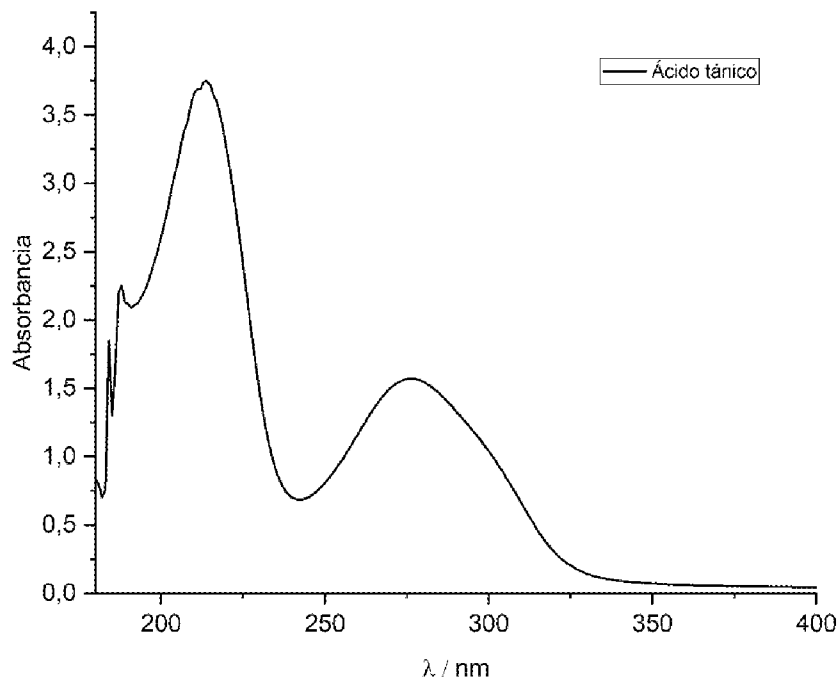
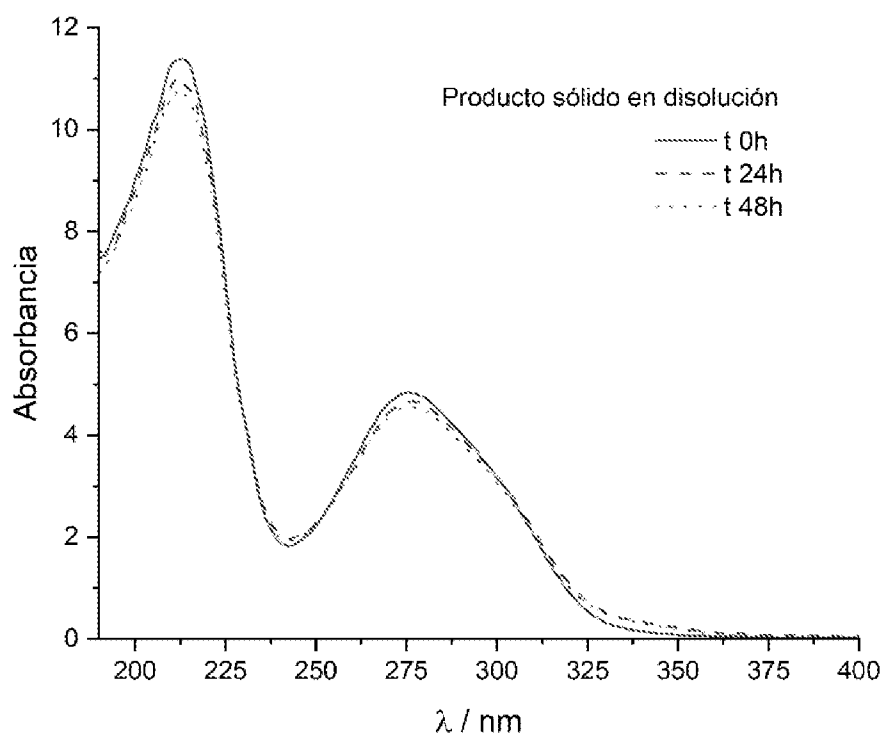
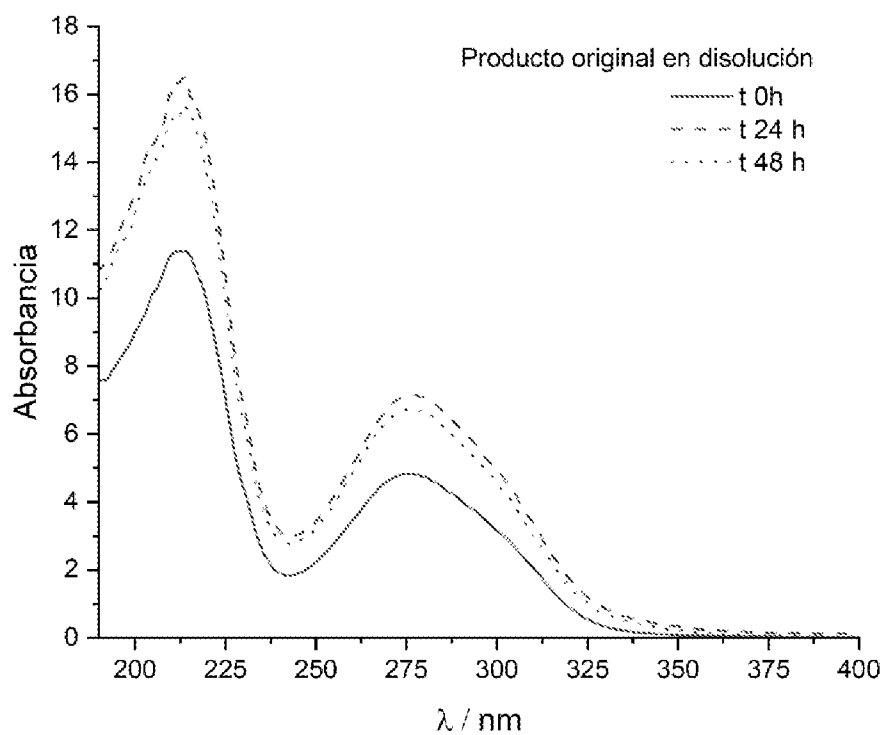


Figura 6.

**Figura 7.****Figura 8.**

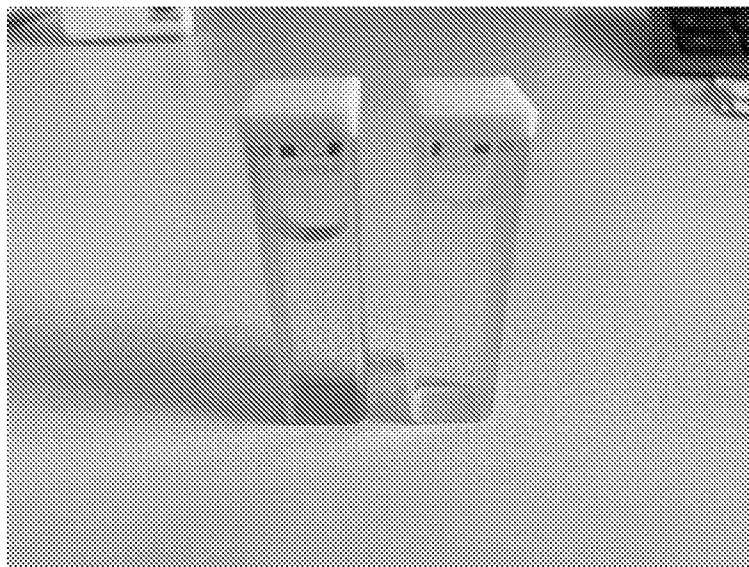


Figura 9.

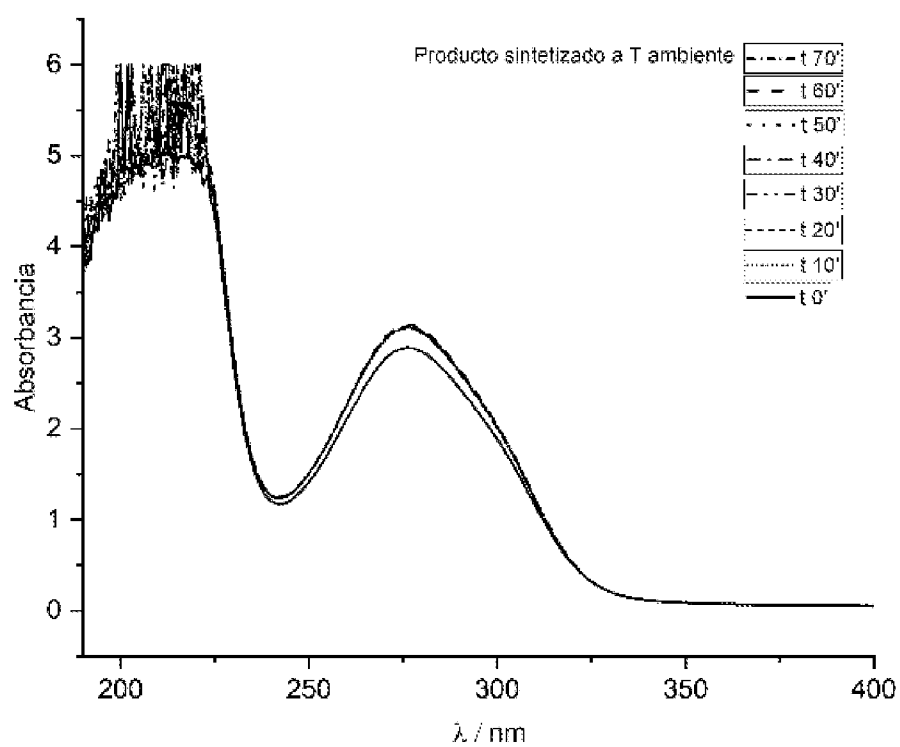


Figura 10.

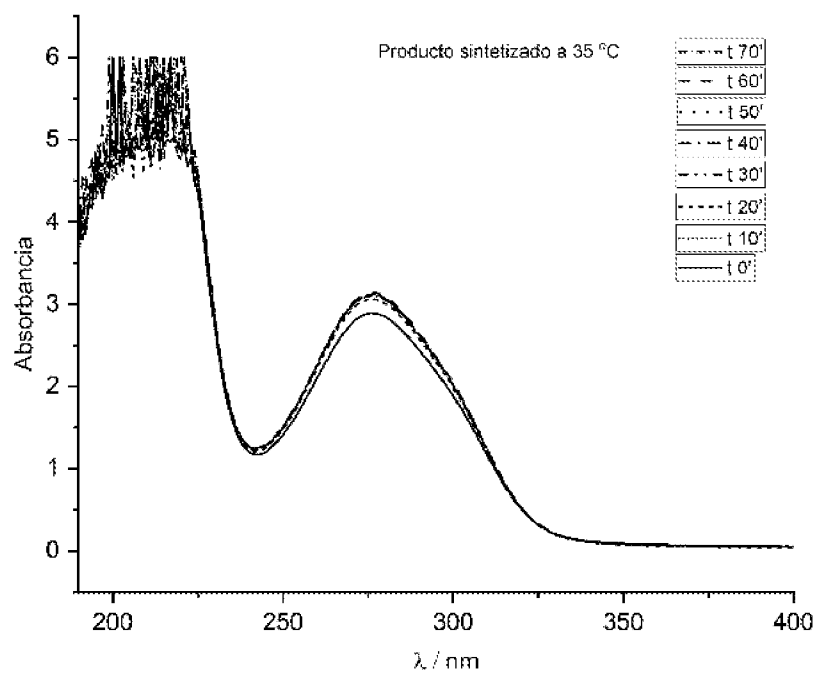


Figura 11.

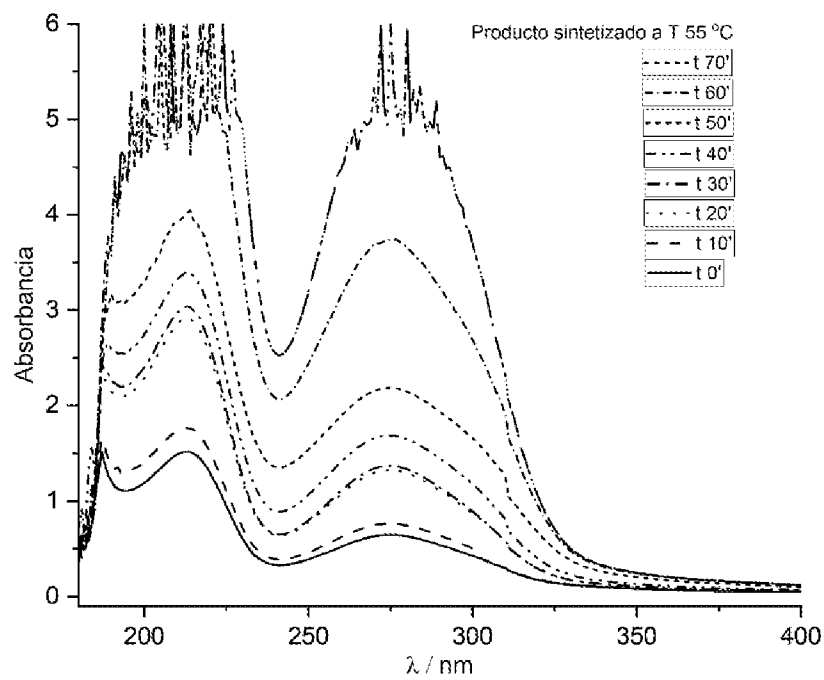


Figura 12.

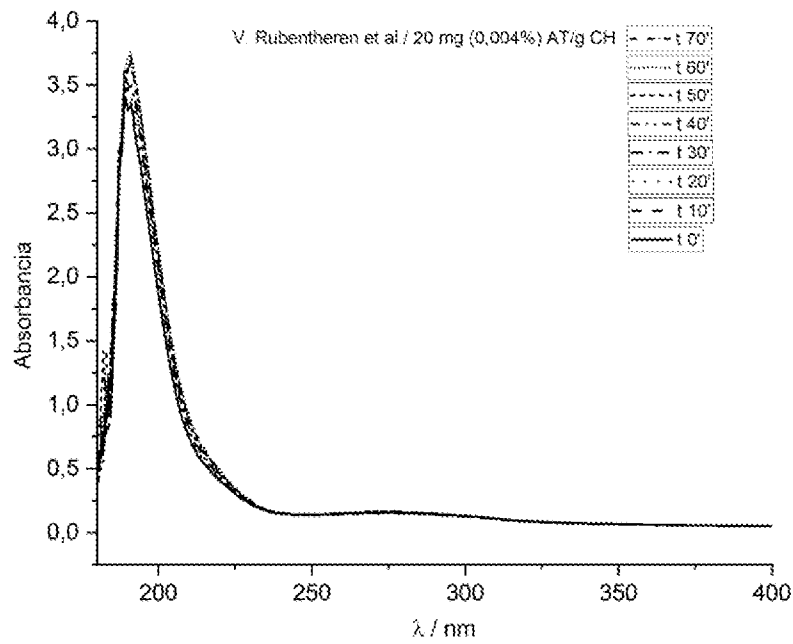


Figura 13.

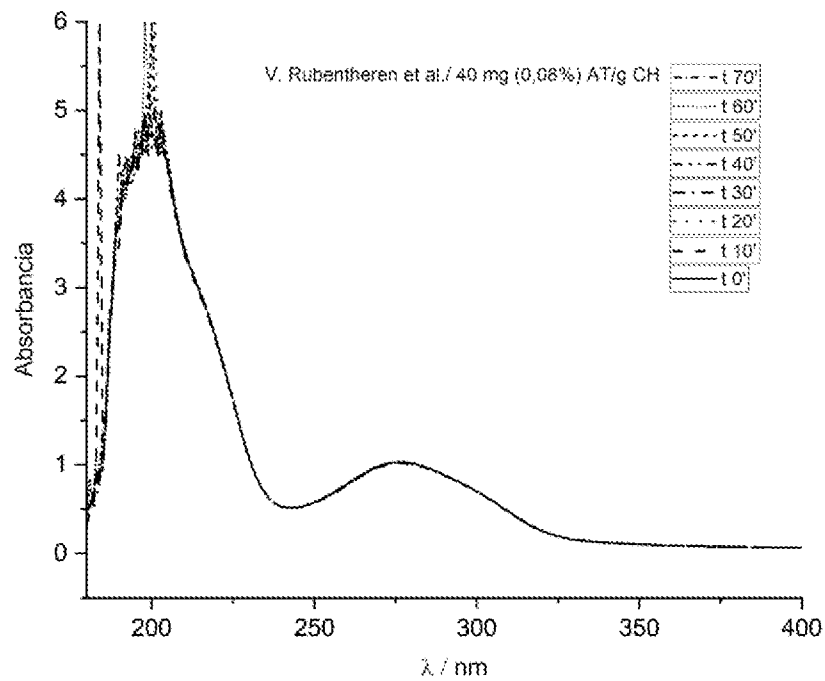


Figura 14.

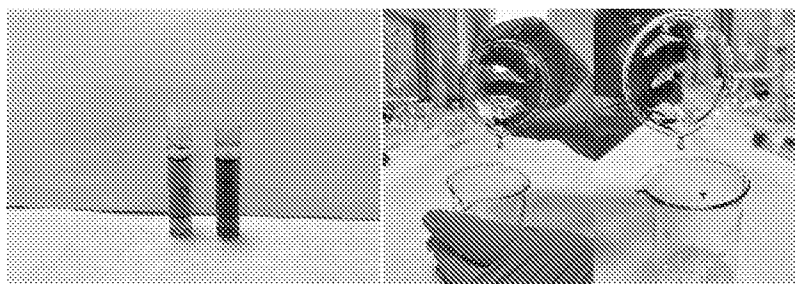


Figura 15.

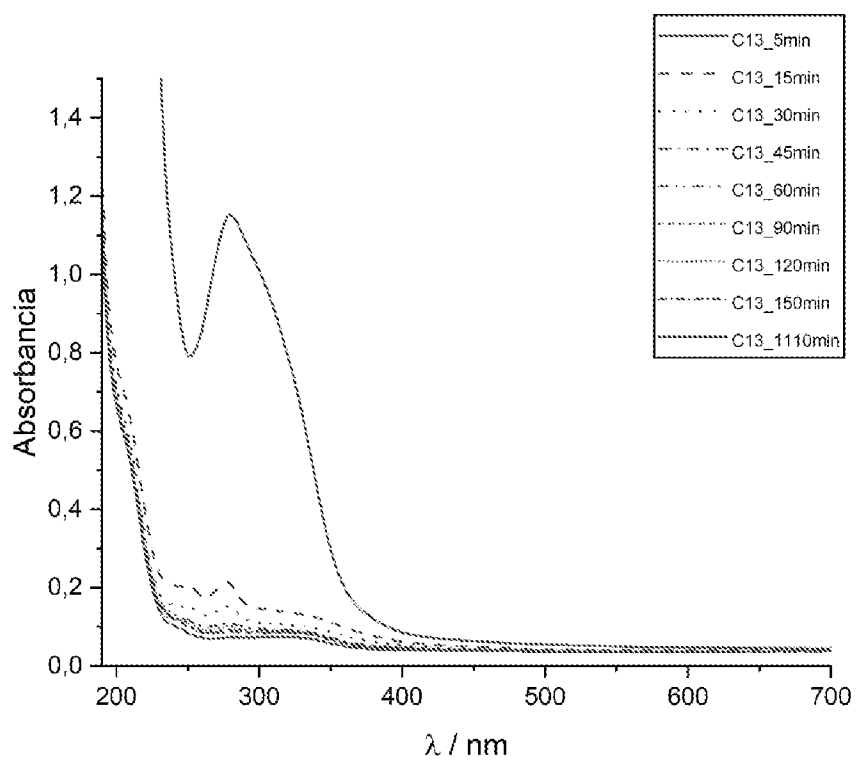


Figura 16.

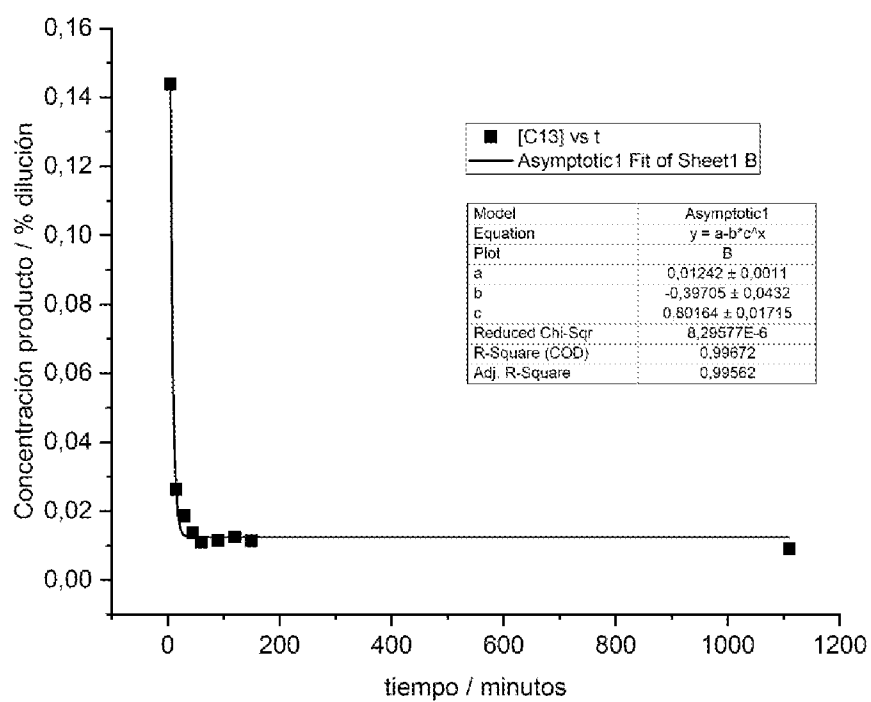


Figura 17.

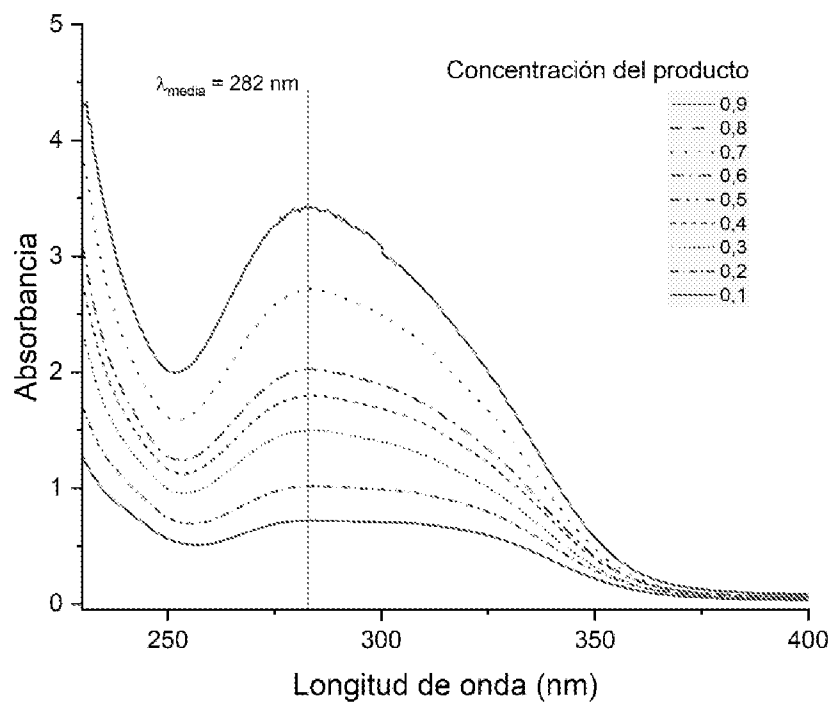


Figura 18.

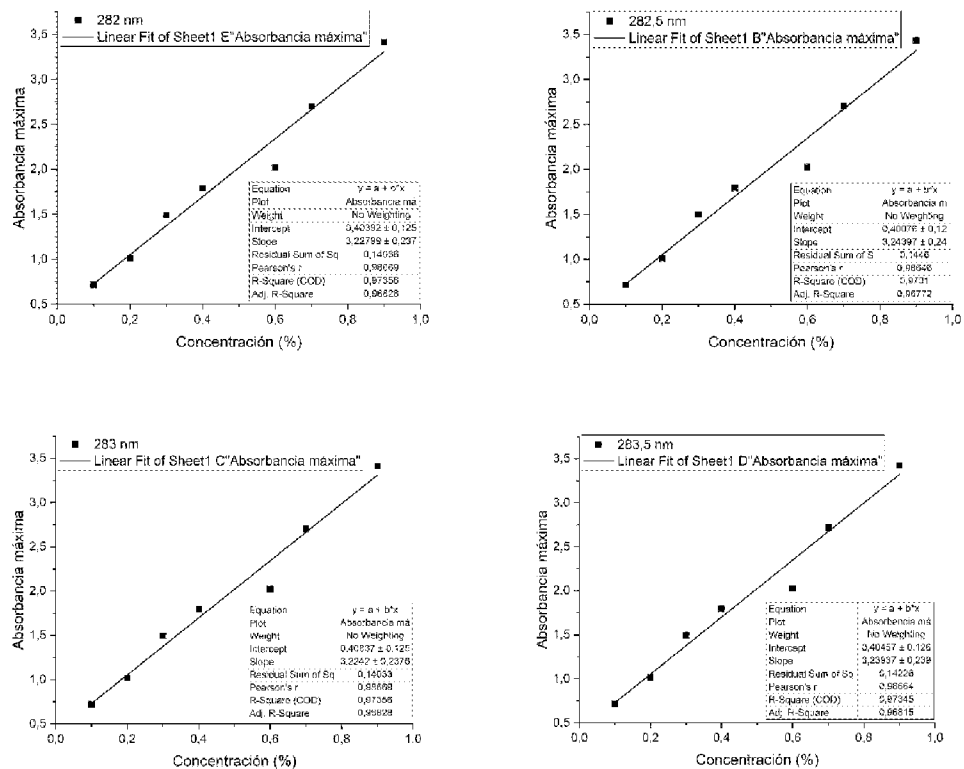


Figura 19.

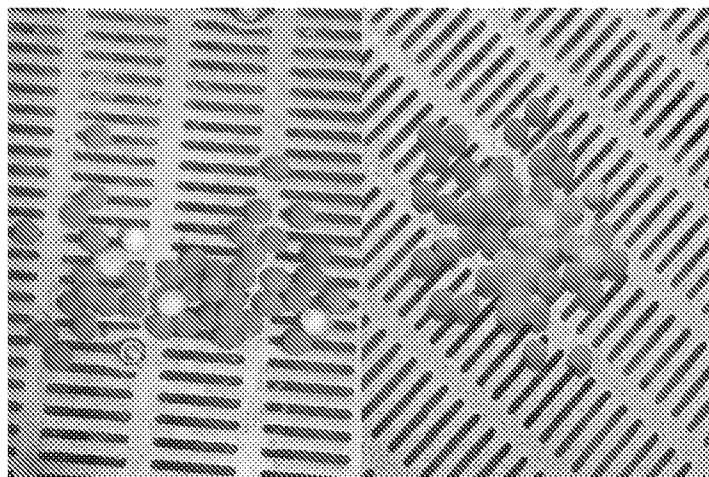


Figura 20.

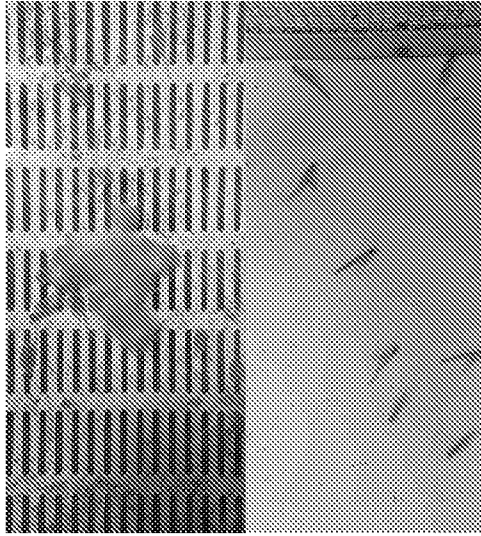


Figura 21.