

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 919 857**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 25/30 (2006.01)

A01N 25/12 (2006.01)

A01N 63/34 (2010.01)

A01P 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012 PCT/US2012/039293**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12162472**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12789642 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2022 EP 2713750**

54 Título: **Gránulos de biocontrol dispersables en agua estabilizados**

30 Prioridad:

26.05.2011 US 201161490334 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.07.2022

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)
Rosentalstrasse 67
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**TYLER, TAMMY y
SWANSON, JAMES ALAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 919 857 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Gránulos de biocontrol dispersables en agua estabilizados

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones de biocontrol granulares dispersables en agua y a su uso. En particular, la presente invención se refiere a composiciones de gránulos dispersables en agua que contienen esporas hidrófobas que tienen una estabilidad biológica mejorada.

10

ANTECEDENTES

Las aflatoxinas son toxinas producidas por especies de *Aspergillus* que crecen en varios cultivos, en particular en cacahuetes, maíz o cereales antes y después de la cosecha del cultivo, así como durante el almacenamiento. La biosíntesis de las aflatoxinas implica una vía policétida compleja que comienza con acetato y malonato. Un compuesto intermedio importante es la esterigmatocistina y la O-metilesterigmatocistina, que son precursores directos de las aflatoxinas. Productores importantes de aflatoxinas son *Aspergillus flavus*, la mayoría de las cepas de *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus ochraceoroseus*, *Aspergillus rambelli*, *Emericella astellata*, *Emericella venezuelensis*, *Bipolaris* spp., *Chaetomium* spp., *Farrowia* spp., y *Monocillium* spp., en particular *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Plant Breeding (1999), 118, pp 1-16). También se conocen especies adicionales de *Aspergillus*. El grupo de las aflatoxinas consiste en más de 20 toxinas diferentes, en particular las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, ácido ciclopiazónico (CPA, por sus siglas en inglés).

15

20

25

La protección de los cultivos frente a las aflatoxinas que contaminan los granos de los cultivos es un problema constantemente recurrente en agricultura, horticultura y otras prácticas de cultivo de plantas. Para ayudar a combatir este problema, se ha descubierto que determinadas cepas de *Aspergillus* no toxigénicas aisladas que se producen de forma natural en los campos agrícolas han resultado eficaces para prevenir la contaminación por aflatoxinas mediante la exclusión competitiva de las cepas toxigénicas.

30

35

Para determinadas aplicaciones agrícolas, hortícolas y otras aplicaciones relacionadas, es deseable a menudo formular biocontroles como gránulos para esparcir o difundir ampliamente en seco que se aplican utilizando un esparcidor granular, mientras que para otros patrones de uso, materiales de este tipo se formulan adecuadamente como polvos humectables o gránulos dispersables en agua (WDGs, por sus siglas en inglés) que están diseñados para mezclarse en grandes volúmenes de agua, tales como mezclas de tanque, y finalmente se aplican como un spray foliar suspendido en agua. El desafío de suministrar productos biológicamente estables para estos dos enfoques puede ser diferente.

40

La patente de EE.UU. 6.027.724 se refiere a composiciones que comprenden cepas no toxigénicas de *Aspergillus* que se cultivan como cepas individuales en fuentes alimenticias granulares, tales como, por ejemplo, arroz, centeno, etc.; o se incorporan en matrices alimentarias extrudidas, tales como, por ejemplo, matrices de gluten de trigo-caolín.

45

La publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20090060965 se refiere a una formulación de gránulos dispersables en agua que contiene cepas no toxigénicas de *Aspergillus*; un agente aglutinante; un agente que tiene propiedades osmoprotectoras y adhesivas; un agente de soporte y una fuente de nutrientes. El WDG puede dispersarse en agua y aplicarse como una suspensión de conidios pulverizable para la prevención de la contaminación por aflatoxinas en los alimentos.

50

Existe una necesidad continua de desarrollar formulaciones de gránulos dispersables en agua que contengan cepas no toxigénicas de *Aspergillus* que tengan una estabilidad mejorada durante el procesamiento y el almacenamiento a largo plazo.

SUMARIO DE LA INVENCION

55

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición de biocontrol en forma de un gránulo dispersable en agua, que comprende:

1 a 75 % en peso de esporas de al menos una cepa de *Aspergillus* no toxigénica;

60

25 a 95 % en peso de azúcar hidrosoluble;

2 a 10 % en peso de N-metil N-oleil taurato de sodio;

0,5 a 5 % en peso de alquilnaftalenosulfonato de sodio; y

65

0,1 a 3 % en peso de poliorganosiloxano,

en donde el azúcar hidrosoluble comprende 4-O-beta-D-galactopiranosil-alfa-D-glucopiranososa en forma de lactosa anhidra.

Otro objeto descrito es un método para preparar un gránulo dispersable en agua que contiene al menos una cepa no toxigénica de *Aspergillus*. Métodos adecuados para preparar composiciones granuladas dispersables en agua de la invención implican (1) pulverización de agua en lecho fluido o equipo de granulación en bandeja (2) secado por pulverización (3) compactación en seco y (4) extrusión de una pasta humedecida con agua. Se prepara una pasta humedecida con agua mezclando todos los componentes inertes excepto las esporas de *Aspergillus*, mezclando las esporas de *Aspergillus* con los componentes inertes molidos y mezclando la combinación de esporas con agua para formar una materia prima de pasta húmeda adecuada para extrudir en un gránulo de un diámetro y una longitud adecuados.

También se describe un gránulo dispersable en agua que contiene al menos una cepa no toxigénica de *Aspergillus*, producido mediante los métodos anteriores.

La invención también proporciona un método para reducir la contaminación por aflatoxinas de plantas de cultivo agrícola, que comprende dispersar una composición de biocontrol de gránulos dispersables en agua tal como se define en la reivindicación 1 en un vehículo acuoso aceptable desde el punto de vista agrícola; y aplicar la dispersión acuosa a las plantas, al suelo alrededor de las plantas o al lugar de crecimiento de las plantas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se indicó arriba, materiales aislados de determinadas cepas de *Aspergillus*, tales como *Aspergillus flavus* (*A. flavus*), *Aspergillus parasiticus* (*A. parasiticus*), *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) y *Aspergillus sojae* (*A. sojae*) producen poco o nada de aflatoxinas y, sin embargo, son muy agresivos. Por ejemplo, se ha encontrado que determinadas cepas no toxigénicas aisladas de *A. flavus* que se producen de forma natural en los campos agrícolas son eficaces para prevenir la contaminación por aflatoxinas por cepas toxigénicas. Véanse, por ejemplo, materiales aislados descritos en las patentes de EE.UU. 5171686, 5294442, 5292661 y 6027724. Estos materiales aislados son agentes eficaces para la reducción de la contaminación por aflatoxinas en cultivos de plantas útiles cuando se formulan como un WDG de acuerdo con la invención.

La presente invención está dirigida a una composición de biocontrol de gránulos dispersables en agua (WDG) estabilizados como se define en la reivindicación 1; y a su uso para reducir la contaminación por aflatoxinas en cultivos. Más específicamente, la invención se refiere a una formulación de WDG que comprende al menos una cepa no toxigénica de *Aspergillus*, tal como *A. flavus*, y lactosa anhidra.

Las composiciones de WDG también pueden comprender estabilizantes, sinérgidas y agentes colorantes.

En una realización, la al menos una cepa de *A. flavus* no toxigénica se selecciona de: NRRL 21882, NRRL 30797 y NRRL 18543, y mezclas de las mismas. La carga hidrosoluble es 4-O-beta-D-galactopiranosil-alfa-D-glucopiranososa en forma de lactosa anhidra. El tensioactivo aniónico es N-metil-N-oleil taurato de sodio. La composición también contiene un agente antiespumante seleccionado de poliorganosiloxanos.

Se proporciona una composición de biocontrol en forma de un gránulo dispersable en agua, que comprende:

(A) 5 a 75 % en peso de esporas de al menos una cepa de *Aspergillus* no toxigénica;

(B) 30 a 60 % en peso de un azúcar hidrosoluble;

(C) 2 a 10 % en peso de N-metil N-oleil taurato de sodio;

(D) 0,5 a 5 % en peso de alquilnaftalenosulfonato de sodio; y

(E) 0,1 a 3 % en peso de poliorganosiloxano,

en donde el azúcar hidrosoluble comprende 4-O-beta-D-galactopiranosil-alfa-D-glucopiranososa en forma de lactosa anhidra.

La suma de las proporciones de los diversos componentes (A) - (E) no es mayor que 100 % en peso y las concentraciones exactas de los componentes pueden variar en función de la presencia de agua o impurezas, por ejemplo.

Los gránulos dispersables en agua de la invención (gránulos que se dispersan fácilmente en agua) tienen composiciones que son sustancialmente similares a las de los polvos humectables. Pueden prepararse por granulación, ya sea por vía húmeda (poniendo en contacto las esporas finamente divididas con la carga inerte y un

poco de agua, p. ej., de 1 a 30 por ciento en peso, o con una solución acuosa de un agente dispersante o aglutinante, seguido de secado y cribado), o por vía seca (compactación seguida de trituración y cribado).

5 Gránulos adecuados pueden tener virtualmente cualquier forma deseada, por ejemplo, esferas, cilindros, elipses, varillas, conos, discos, agujas y formas irregulares. En una realización, los gránulos son aproximadamente cilindros. Los gránulos tienen típicamente un tamaño de partícula de:

- WDG extrudido ~ 0,5 mm a 2,5 mm
- 10 • WDG granulado en bandeja ~ 0,25 mm a 2,8 mm
- WDG secado por pulverización ~ 0,1 mm a 1,5 mm;

15 Se pueden utilizar tamaños fuera de este intervalo según sea necesario o apropiado.

En una granulación por vía húmeda, la primera etapa en el procedimiento es la combinación en seco de los componentes inertes, sin incluir las esporas, seguido de molienda y luego la combinación de las esporas de *A. flavus* con la mezcla inerte molida. A continuación, la combinación de esporas/materiales inertes se mezcla lentamente mientras se incorpora una cantidad adecuada de agua en peso (por ejemplo, de 25 a 35 % en peso) para obtener una pasta húmeda o una masa húmeda (materia prima).

20 La materia prima se extrude y el producto extrudido se seca, p. ej., en un secador de lecho fluido para eliminar el exceso de agua. Una cantidad objetivo de agua en los gránulos secos es 1 - 12 %, más particularmente menos de 10 % y lo más particularmente menos de 5 %. Los gránulos secados se pueden tamizar para eliminar los componentes finos.

30 Tasas y tiempos de aplicación adecuados para las cepas de *Aspergillus* no toxigénicas utilizadas en las composiciones de la invención son equiparables a las tasas y los tiempos existentes indicados en las etiquetas de productos actuales para productos que contienen cepas de este tipo. Por ejemplo, la marca afla-guard® *Aspergillus flavus* NRRL 21882 es un gránulo dispersable que contiene 0,0094 % de ingrediente activo con un mínimo de $1,2 \times 10^8$ UFC/kg que se puede aplicar a una tasa de 10-20 kg/acre. Las formulaciones de WDG se suspenden en agua y se aplican como una pulverización foliar a 20 GPA con una tasa de UFC por acre similar a afla-guard®.

35 Las composiciones de acuerdo con la invención son adecuadas para reducir las aflatoxinas desplazando hongos productores de aflatoxinas en cultivos de plantas útiles. Cultivos adecuados de plantas útiles incluyen cacahuetes, maíz, algodón y frutos secos. Los componentes utilizados en la composición de la invención se pueden aplicar de diversa manera, conocida por los expertos en la técnica, en diversas concentraciones. La tasa a la que se aplican las composiciones dependerá del tipo particular de aflatoxinas a controlar, del grado de control requerido y del momento y método de aplicación.

40 En una realización, el WDG de la invención se diluye en agua y se aplica a una tasa de 10 a 100 g de ingrediente activo (esporas) por hectárea, más particularmente de 20 a 50 g i.a./ha. Dosis de aplicación de 24 y 49 g de i.a./ha son particularmente adecuadas.

45 En otra realización, aplicaciones en V5, V10 o VT son adecuadas cuando el WDG de la invención se diluye con agua y se aplica a los cereales para reducir la contaminación por aflatoxinas en el grano del cultivo cosechado.

50 Se debe entender que los cultivos también incluyen aquellos cultivos que han sido modificados para que sean tolerantes a herbicidas o clases de herbicidas (p. ej., inhibidores de ALS, GS, EPSPS, PPO, ACCasa y HPPD) mediante métodos convencionales de cultivo selectivo o mediante ingeniería genética. Ejemplos de cultivos que se han vuelto tolerantes a herbicidas por métodos de ingeniería genética incluyen, p. ej., variedades de maíz resistentes a glifosato y glufosinato, disponibles comercialmente bajo las marcas comerciales RoundupReady® y LibertyLink®.

55 Cultivos también se han de entender como los que se han vuelto resistentes a insectos nocivos por métodos de ingeniería genética, por ejemplo, maíz Bt (resistente al barrenador europeo del maíz), algodón Bt (resistente al picudo algodnero) y también algodón VIP (resistente al cogollero del maíz y al gusano soldado). Ejemplos de maíz Bt son los híbridos de maíz Bt 176 de NK® (Syngenta Seeds). La toxina Bt es una proteína que se forma de forma natural por la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis*. Ejemplos de toxinas o plantas transgénicas capaces de sintetizar tales toxinas se describen en los documentos EP-A-451 878, EP-A-374 753, WO 93/07278, WO 95/34656, WO 03/052073 y EP-A-427 529. Ejemplos de plantas transgénicas que comprenden uno o más genes que codifican resistencia a insecticidas y expresan una o más toxinas son KnockOut® (maíz), Yield Gard® (maíz), NuCOTIN33B® (algodón), Bollgard® (algodón), Agrisure Viptera™ 3111 (cereal). Los cultivos de plantas o material de semillas de las mismas pueden ser resistentes a los herbicidas y, al mismo tiempo, resistentes a la alimentación de insectos (eventos transgénicos «apilados»). Por ejemplo, la semilla puede tener la capacidad de expresar una proteína insecticida Cry3

65 y/o VIP, mientras que al mismo tiempo es tolerante al glifosato.

También debe entenderse que los cultivos incluyen aquellos que se obtienen por métodos convencionales de reproducción o ingeniería genética y contienen los denominados rasgos de salida (p. ej., estabilidad al almacenamiento mejorada, mayor valor nutricional y sabor mejorado).

5 **EJEMPLOS**

Los siguientes Ejemplos ilustran adicionalmente algunos de los aspectos de la invención, pero no pretenden limitar su alcance. Cuando no se especifique lo contrario a lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, los porcentajes son en peso (% p/p).

10

Ejemplo 1

Se preparó un lote de 210 g de un gránulo dispersable en agua (50 WG) con la siguiente composición:

15 **Ingredientes utilizados:** Esporas de aislado de *Aspergillus flavus* NRRL 21882 50 %; poliorganosiloxano (Rhodorsil EP 6703) 0,10 %; alquil naftaleno sulfonatos de sodio (Agnique ANS3DNPW) 2 %; N-metil N-oleil taurato de sodio (Geropon T-77) 8 %; Lactosa anhidra (resto)

20

A. La primera etapa del procedimiento fue la combinación en seco de los materiales inertes, sin incluir las esporas, seguido de molienda. La mezcla de materiales inertes molida se combinó luego con las esporas de *A. flavus* en un mezclador Waring. La mezcla de esporas/materiales inertes, así obtenida, se cargó en un mezclador Hobart y se mezcló lentamente mientras se incorporaba ~30 % de agua en peso para obtener una masa húmeda (materia prima).

25

B. A continuación, la materia prima se transfirió a una extrusora llena con un tamiz de 0,8 mm. El material extrudido se secó en un secador de lecho fluidizado para eliminar el exceso de agua y los gránulos se transfirieron a un equipo de tamizado para eliminar los componentes finos fuera del intervalo especificado de: 0,8 mm de diámetro y 2 a 5 mm de longitud.

30 **Ejemplos 2 - 5**

Resultados de Diluciones y Sembrado en Placas para la Enumeración de unidades formadoras de colonias de *Aspergillus flavus* NRRL 21882 por gramo (UFC/g)^a

nº	Formulación	Media de UFC/g ^b	RSD ^c (%)
2	WDG del ejemplo 1	7,03 × 10 ⁹	10,4
3	Esporas puras de material aislado NRRL 21882	1,17 × 10 ¹⁰	19,0
4	Materia prima del ejemplo 1 (A.)	6,73 × 10 ⁹	14,9
5	WDG del ejemplo 1 almacenado a 38 °C durante cuatro semanas	2,84 × 10 ⁹	13,5

^a Aproximadamente 0,1 g del artículo de prueba se suspendieron en 9,9 mL de tampón fosfato + Tween 80 al 0,2 %, diluido 10⁻⁵ (nº 7) o 10⁻⁶ (todas las demás) y 0,1 mL de las tres diluciones más grandes se esparció por duplicado en las placas de agar DRBC. Las colonias se contaron después de dos días de incubación a 30 °C.

^bUFC/g = la suma de recuentos de placas duplicadas / 0,2 mL) X factor de dilución X 10 mL de suspensión / peso de la submuestra. Promediar los valores de las cinco submuestras para la media de UFC/g. ^cDesviación estándar relativa = (desviación estándar/ media de UFC/g) X 100 %

35

Ejemplo 6

Se preparó un lote de 500 g de un gránulo dispersable en agua (50 WG) con la siguiente composición:

40

A. La primera etapa del procedimiento fue la combinación en seco de los materiales inertes, sin incluir las esporas, seguido de molienda. La mezcla de materiales inertes molida se combinó luego con las esporas de *A. flavus* en un mezclador Waring. La mezcla de esporas/materiales inertes, así obtenida, se cargó en un mezclador Hobart y se mezcló lentamente mientras se incorporaba ~30 % de agua en peso para obtener una masa húmeda (materia prima).

45

B. A continuación, la materia prima se transfiere a una extrusora llena con un tamiz de 0,8 mm. El material extrudido se secó en un secador de lecho fluidizado para eliminar el exceso de agua y los gránulos se

ES 2 919 857 T3

transfirieron a un equipo de tamizado para eliminar los componentes finos fuera del intervalo especificado de: 0,8 mm de diámetro y 2 a 5 mm de longitud.

5 Resultados de diluciones y sembrado en placas para la enumeración de unidades formadoras de colonias de *Aspergillus flavus* NRRL 21882 por gramo (UFC/g)^a

nº	Formulación	Media de UFC/g ^b	RSD ^c (%)
7	Esporas puras de material aislado NRRL 21882 (Lote nº 45252)	$1,17 \times 10^{10}$	19
8	Materia prima del ejemplo 1	$8,3 \times 10^9$	26
9	WDG del ejemplo 6 (inicial)	$6,5 \times 10^9$	25
10	WDG del ejemplo 6 (2 semanas TA)	$5,3 \times 10^9$	9
11	WDG del ejemplo 6 (1 mes TA)	$5,8 \times 10^9$	15
12	WDG del ejemplo 6 (3 meses TA)	$5,3 \times 10^9$	10
13	WDG del ejemplo 6 (6 meses TA)	$6,5 \times 10^9$	19
14	WDG del ejemplo 6 (9 meses TA)	$7,3 \times 10^9$	14
15	WDG del ejemplo 6 (12 meses TA)	$5,9 \times 10^9$	7

^a Aproximadamente 0,1 g del artículo de prueba se suspendieron en 9,9 mL de tampón fosfato + Tween 80 al 0,2 %, diluido 10^{-5} (nº 7) o 10^{-6} (todas las demás) y 0,1 mL de las tres diluciones más grandes se esparció por duplicado en las placas de agar DRBC. Las colonias se contaron después de dos días de incubación a 30 °C.

^bUFC/g = la suma de recuentos de placas duplicadas / 0,2 mL) X factor de dilución X 10 mL de suspensión / peso de la submuestra. Promediar los valores de las cinco submuestras para la media de UFC/g.

^cDesviación estándar relativa = (desviación estándar/ media de UFC/g) X 100 %

Los datos anteriores indican que la formulación de WDG de la invención tiene una excelente estabilidad biológica.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de biocontrol en forma de un gránulo dispersable en agua, que comprende:
- 5 (A) 1 a 75 % en peso de esporas de al menos una cepa de *Aspergillus* no toxigénica;
(B) 25 a 95 % en peso de un azúcar hidrosoluble;
(C) 2 a 10 % en peso de N-metil N-oleil taurato de sodio;
(D) 0,5 a 5 % en peso de alquilnaftalenosulfonato de sodio; y
(E) 0,1 a 3 % en peso de poliorganosiloxano,
10 en donde el azúcar hidrosoluble comprende 4-O-beta-D-galactopiranosil-alfa-D-glucopiranososa en forma de lactosa anhidra.
2. La composición de biocontrol de la reivindicación 1, en donde la cepa de *Aspergillus* comprende *A. flavus*.
3. La composición de biocontrol de la reivindicación 2, en donde la cepa de *A. flavus* se selecciona de una cepa biológicamente pura que tiene todas las características de identificación de una cepa seleccionada de NRRL 21882, NRRL 30797 y NRRL 18543, y mezclas de las mismas.
- 15
4. Un método para reducir la contaminación por aflatoxinas de un cultivo agrícola, que comprende aplicar a la planta, lugar de crecimiento o producto vegetal una cantidad efectiva reductora de aflatoxinas de una solución de pulverización acuosa de la composición de biocontrol de la reivindicación 1.
- 20
5. El método de la reivindicación 4, en el que el cultivo agrícola se selecciona del grupo que consiste en cacahuetes, cereales, algodón y frutos secos.