



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 324 809**

⑫ Número de solicitud: 200800380

⑬ Int. Cl.:
A01N 25/08 (2006.01)
A01N 57/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **13.02.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **14.08.2009**

Fecha de la concesión: **14.05.2010**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **28.05.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.05.2010

⑯ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑰ Inventor/es: **Undabeytia López, Tomás;
Maqueda Porras, Celia;
Morillo González, Esmeralda;
Sánchez Verdejo, María Trinidad y
Shlomo, Nir**

⑱ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑲ Título: **Formulaciones de liberación lenta de plaguicidas respetuosas con el medioambiente.**

⑳ Resumen:

Formulaciones de liberación lenta de plaguicidas respetuosas con el medioambiente.

La actual invención hace relación a un sistema de liberación lenta de plaguicidas en aplicaciones agrarias, incluyendo pero no limitado únicamente a formulaciones de insecticidas, fungicidas y herbicidas. El sistema incluye un plaguicida incorporado en vesículas formada por lípidos neutros (incrementando así la solubilidad en agua del plaguicida). Las vesículas, que incorporan el plaguicida, están a su vez adsorbidas en un mineral de la arcilla. Las formulaciones son apropiadas para moléculas de plaguicidas de cualquier naturaleza (hidrofóbicas, ácidas y básicas). Esta formulación de plaguicida permite una liberación lenta del ingrediente activo disminuyendo así el riesgo de contaminación de aguas subterráneas y superficiales.

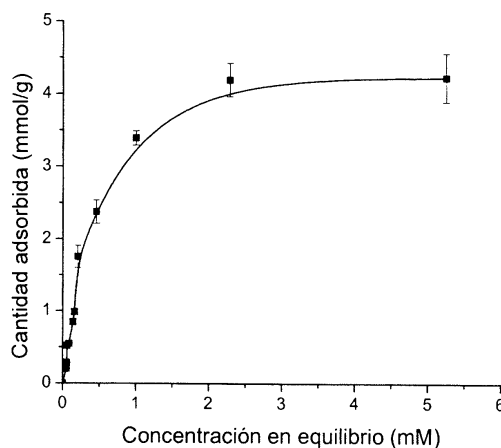


FIG 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de liberación lenta de plaguicidas respetuosas con el medioambiente.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se inscribe en formulaciones de plaguicidas. En particular, hace referencia a formulaciones de liberación lenta con el fin de reducir pérdidas de ingrediente activo evitando aplicaciones repetitivas o mayores dosis, y consecuentemente reduciendo el riesgo de contaminación de aguas y suelos a la vez que manteniendo el efecto deseado del plaguicida sobre el objetivo o diana.

Estado de la técnica

El uso de plaguicidas es esencial para la producción necesaria de alimentos a nivel mundial. Al alcanzar el suelo, los plaguicidas pueden sufrir procesos de disipación tales como degradación microbiana o química, fotodescomposición, volatilización, sorción a los coloides del suelo, etc. Además, pueden ocurrir pérdidas por escorrentías superficiales y lixiviación a lo largo del perfil del suelo. Esto implica una reducción en la eficacia de las formulaciones convencionales que deben ser usadas a mayores dosis para minimizar estas pérdidas, con los consiguientes costes tanto económicos como medioambientales (Geisler *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2006).

El diseño de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas tiene como finalidad el mantener por un mayor tiempo el umbral de concentración de ingrediente activo para el control de la plaga en el suelo o planta mediante su liberación a la velocidad adecuada, reduciendo de esta forma su nivel en el medioambiente porque son necesarias cantidades inferiores o menores aplicaciones para conseguir el efecto biológico deseado. Si únicamente se requiere un grado muy limitado de control, el uso de polímeros o surfactantes suspendidos o disueltos, o complejos polímeros-plaguicidas, pueden reducir la volatilización, lixiviación y arrastre por el viento de éstos (Moore *et al.*, 2002; Green and Beestman, 2007).

Se han desarrollado numerosos métodos de liberación controlada mediante recubrimiento y microencapsulación de plaguicidas tales como atomización, encapsulación en reactores anulares, coacervación compleja, coacervación orgánica, polimerización interfacial, recubrimiento en lecho fluidizado, evaporación del disolvente, recubrimiento en discos giratorios, etc. (Hirech *et al.*, 2003; Piccolo *et al.*, 2006; Bahri and Taverdet, 2007).

Un aspecto importante para el desarrollo de sistemas de liberación controlada es la biodegradabilidad de los productos usados para la encapsulación. Según Wilkins (1990) pueden clasificarse en: (i) sistemas basados en almidón y amilosa; (ii) otros polisacáridos (celulosa y derivados, quitina, quitosán, ácido alginico, dextrano, etc); (iii) proteínas (caseína, albúmina, gelatina, etc.); (iv) ligninas y ácidos húmicos lignocelulósicos; (v) materiales lipofílicos (ceras, gomas); (vi) polímeros sintéticos (polivinilalcohol, polilactato, poliglicolato, otros poliésteres, poliaminas, ácidos poliámínicos, poliacrilamida); (vii) misceláneos (taninos, polihidroxibutirato, polihidroxivalerato).

Como ejemplos se indica la liberación lenta de formulaciones basadas en etilcelulosa de los herbicidas norflurazona y alaclor mediante la técnica de evaporación del disolvente (Fernández-Urrusono *et al.*, 2000; Sopena *et al.*, 2007). La celulosa se puede derivar a otros polímeros debido a la abundancia de los grupos hidroxílicos. Estos nuevos polímeros biodegradables se usan en su lugar debido a la mejora en las propiedades físicas y/o químicas. Kök *et al.* (1999) diseñó formulaciones del insecticida aldicarb usando carboximetilcelulosa, la cual tiene la capacidad de formar un hidrogel en presencia de cationes polivalentes. El almidón sin modificar es también una matriz eficaz para encapsular agentes activos sólidos y/o líquidos. Wing *et al.* (1993) describió cómo la gelatinización de almidón en presencia de agua y herbicida, vía un proceso de extrusión seguido por particularización al tamaño deseable, rendía productos de liberación lenta de herbicidas. La lixiviación de los herbicidas norflurazona, atrazina y simazina era retardada mediante el uso de gránulos de almidón de liberación controlada (Boydston, 1992; Gish *et al.*, 1992). El almidón puede también ser derivado debido a las ventajas inherentes de la nueva matriz. Almidones catiónicos atraparán iones cargados negativamente. Sobre este principio, Zhu and Zhuo (2000) diseñaron formulaciones de liberación lenta del plaguicida 2,4,5-T. La lignina de Kraft se ha evaluado también como agente de liberación controlada para un amplio número de plaguicidas: herbicidas perteneciente a la familia de las fenilureas, metribuzina, alaclor, carbofurano, chloramben, etc. (Wilkins, 1990; Cotterill and Wilkins, 1996; Zhao and Wilkins, 2003). Se han descrito formulaciones basadas en alginato para plaguicidas tales como diclobenilo, imidacloprid, fenamifos, metribuzina, atrazina, trifluralina, tiobencarb, 2,4-D, isoproturón, ciromazina (Gan *et al.*, 1994; Davis *et al.*, 1996; Garrido-Herrera *et al.*, 2006). Polímeros sintéticos tales como poliureas, poliuretanos y poliamidas, se emplean en la mayoría de las formulaciones comerciales de plaguicidas actuales. Las microcápsulas se obtienen generalmente a través de una reacción de polimerización interfacial entre dos monómeros reactantes en una emulsión de fase externa oleosa.

Los minerales de la arcilla también se han usado en formulaciones de liberación controlada para mejorar la resolución de la formulación base. La liberación del plaguicida de gránulos de alginatos depende de la solubilidad del plaguicida atrapado, pero el perfil de liberación se puede modificar mediante la adición de minerales de arcilla en el proceso de gelificación. La montmorillonita retardaba la liberación de alaclor en formulaciones de liberación controlada basadas en alginato, debido a la adsorción del herbicida en la superficie del mineral de la arcilla, mientras que la presencia de otros minerales tales como caolinita y atapulgita producían un efecto barrera en la liberación del herbicida (Gerstl *et al.*, 1998). Se han diseñado formulaciones basadas en mineral de arcilla para la fotoestabilización de

plaguicidas. Margulies y col. (1992) observaron que tras 96 h de irradiación, una formulación montmorillonita-trifluralina retenía el 75% de su actividad frente al 30% de la trifluralina libre. Los minerales de la arcilla se usan también como soportes en formulaciones de organoarcillas de plaguicidas con el fin de reducir su percolación, fotodegradación y volatilización (Margulies *et al.*, 1994; El-Nahhal *et al.*, 2001).

Es deseable un método universal de obtención de formulaciones de liberación controlada para cualquier plaguicida independientemente de la naturaleza ácida/básica de la molécula. La mayoría de las formulaciones previas se han diseñado para moléculas hidrofóbicas. Sin embargo, su uso es de validez limitada para moléculas ácidas, lo que es de interés fundamental en ciertas aplicaciones, tales como el uso de herbicidas aniónicos en suelos calcáreos. Estos herbicidas están cargados negativamente y se retienen pobremente en los coloides del suelo, migrando a capas más profundas del suelo y reduciéndose su eficacia, de forma que se requieren mayores dosis (Black *et al.*, 1999; Sarmah *et al.*, 2000). En la patente US7030062 (Nir y col., 2006) diseñaron formulaciones para herbicidas aniónicos sólo mediante su encapsulación en vesículas o micelas catiónicas formadas por cationes de alquilamonio de larga cadena alifática, las cuales se adsorben por interacciones electrostáticas en montmorillonita. Sin embargo, los cationes y los complejos últimos de arcilla-orgánicos empleados no se consideran de mínimo riesgo toxicológico según la Lista de Inertes de Mínimo Riesgo de la Agencia para la Protección del Medioambiente de Estados Unidos (USEPA). Consecuentemente, hay una necesidad de desarrollar formulaciones eficaces y respetuosas con el medioambiente de plaguicidas, que sean independientes de la naturaleza de la molécula.

Bibliografía

Black, I. D.; Pederson, R. N.; Flynn, A.; Moerkek, M.; Dyson, C. B.; Kookana, R.; Wilhelm, N. Mobility and persistence of three sulfonylurea herbicides in alkaline cropping soils of southeastern Australia. *Aust. J. Exp. Agr.* 1999, 39, 465-472.

Boydston, R. A. Controlled release starch granule formulations reduce herbicide leaching in soil columns. *Weed Technol.* 1992, 6, 317-321.

Clarke, R. J.; Lüpfer, C. Influence of anions and cations on the dipole potential of phosphatidylcholine vesicles: A basis for the Hofmeister effect. *Biophys. J.* 1999, 76, 2614-2624.

Cotterill, J. V.; Wilkins, R. M. Controlled release of phenylurea herbicides from a lignin matrix: Release kinetics and modification with urea. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2908-2912.

Davis, R. F.; Wauchope, R. D.; Johnson, A. W.; Burgoa, B.; Pepperman, A. B. Release of fenamiphos, atrazine, and alachlor into flowing water from granules and spray deposits of conventional and controlled-release formulations. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2900-2907.

El-Bahri, Z.; Taverdet, J. L. Elaboration and characterisation of microparticles loaded by pesticide model. *Powder Technol.* 2007, 172, 30-40.

El-Nahhal, Y.; Undabeytia, T.; Polubesova, T.; Mishaël, Y.; Nir, S.; Rubin, B. Organo-clay formulations of pesticides: reduced leaching and photodegradation. *Appl. Clay Sci.* 2001, 18, 309-326.

Fernández-Urrusuno, R.; Ginés, J. M.; Morillo, E. Development of controlled release formulations of alachlor in ethylcellulose. *J. Microencapsulation* 2000, 17, 331-342.

Gan, Y.; Hussain, M.; Rathor, N. M. Behaviour of an alginate-kaolin based controlled-release formulation of the herbicide thiobencarb in simulated ecosystems. *Pestic. Sci.* 1994, 42, 265-272.

Garrido-Herrera, F. J.; González-Pradas, E.; Fernández-Pérez, M. Controlled release of isoproturon, imidacloprid, and cyromazine from alginate-bentonite-activated carbon formulations. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 10053-10060.

Geisler, G.; Hellweg, S.; Liechti, S.; Hungerbühler, K. Variability assessment of groundwater exposure to pesticides and its consideration in life-cycle assessment. *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 4457-4464.

Gerstl, Z.; Nasser, A.; Mingelgrin, U. Controlled release of pesticides into water from polymer formulations. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3803-3809.

Gish, T. G.; Shirmohammadi, A.; Wienhold, B. J. Field-scale mobility and persistence of commercial and starch-encapsulated atrazine and alachlor. *J. Environ. Qual.* 1994, 23, 355-359.

Green, J. M.; Beestman, G. B. Recently patented and commercialized formulation and adjuvant technology. *Crop Prot.* 2007, 26, 320-327.

Grey, T. L.; Walker, R. H.; Wehtje, T. R.; Hancock, H. G. Sulfentrazone adsorption and mobility as affected by soil and pH. *Weed Sci.* 1997, 45, 733-738.

- Hirech, K.; Payan, S.; Carnelle, G.; Brujes, L.; Legrand, J.** Microencapsulation of an insecticide by interfacial polymerization. *Powder Technol.* 2003, 130, 324-330.
- Jendrasiak, G. L.; Smith, R.; Ribeiro, A. A.** Chaotropic anion-phosphatidylcholine membrane interactions: an ultra high field NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1145, 25-32.
- Kök, F.; Arica, M. Y.; Gencer, O.; Abak, K.; Hasirci, V.** Controlled release of aldicarb from carboxymethyl cellulose microspheres: *in vitro* and field applications. *Pestic. Sci.* 1999, 55, 1194-1202.
- Margulies, L.; Stern, T.; Rubin, B.; Ruzo, L.** Photo-stabilization of trifluralin adsorbed on a clay matrix. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 152-155.
- Margulies, L.; Stern, T.; Rubin, B.** Slow release of S-ethyldipropylcarbamothioate from clay surfaces. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 1223-1227.
- Moore, C. E.; Chow, V. S.-C.; Hopkinson, M. J.; Shannon, T. T.** 2002. Pesticide formulations containing alkoxy-lated tristylphenol hemi-sulfate ester neutralized alkoxyated amine surfactants. U.S. Patent Document 6,495,595 B2.
- Nir, S.; Undabeytia, T.; Yaron-Marcovich, D.; El-Nahal, Y.; Polubesova, T.; Serban, C.; Rytwo, G.; Lagaly, G.; Rubin, B.** Optimization of adsorption of hydrophobic herbicides on montmorillonite preadsorbed by monovalent organic cations: Interaction between phenyl rings. *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34, 1269-1274.
- Nir, S.; Rubin, B.; Mishael, Y.; Undabeytia, T.; Rabinovitch, O.; Polubesova, T.** 2006. Controlled release formulations of anionic herbicides. US Patent Document 7,030,062 B2.
- Piccolo, O.; Borzatta, V.; Delogu, G.; Capparella, E.; De Candia, C.; Gobbi, C.; Di Blasi, G.** 2006. Cyclodextrin complex of compositions comprising pesticide and synergist. WO Patent Document 2006111570.
- Postle, A.** Method for the sensitive analysis of individual molecular species of phosphatidylcholine by high-performance liquid chromatography using post-column fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 1987, 415, 241-251.
- Sarmah, A. K.; Kookana, R. S.; Alston, A. M.** Leaching and degradation of triasulfuron, metsulfuron-methyl, and chlorsulfuron in alkaline soil profiles under field conditions. *Aust. J. Soil Res.* 2000, 38, 617-631.
- Sopeña, F.; Cabrera, A.; Maqueda, C.; Morillo, E.** Ethylcellulose formulations for controlled release of the herbicide alachlor in a sandy soil. *J. Agric. Food Chem.* 2007 (DOI 10.1021/jf071459g).
- Thomae, A. V.; Wunderli-Allenspach, H.; Kramer, S. D.** Permeation of aromatic carboxylic acids across lipid bilayers: the pH-partition hypothesis revisited. *Biophys. J.* 2005, 89, 1802-1811.
- Wilkins, R. M.** 1990. Controlled delivery of crop-protection agents. *Taylor & Francis Ltd, London, UK*.
- Wing, R. E.; Carr, M. E.; Doane, W. M.; Schreiber, M. M.** Controlled release of herbicide from an unmodified starch matrix. *ACS Symposium Series* 1993, 520, 211-219.
- Xiang, T.-X.; Anderson, B. D.** Substituent contributions to the transport of substituted p-toluic acids across lipid bilayer membranes. *J. Pharm. Sci.* 1994, 83, 1511-1518.
- Yao, Y.; Tuduri, L.; Harner, T.; Blanchard, P.; Waite, D.; Poissant, L.; Murphy, C.; Belzer, W.; Aulagnier, F.; Li, Y.-F.; Sverko, E.** Spatial and temporal distribution of pesticide air concentrations in Canadian agricultural regions. *Atmos. Environ.* 2006, 40, 4339-4351.
- Zhao, J.; Wilkins, R. M.** Controlled release of the herbicide, fluometuron, from matrix granules based on fractionated organosolv lignins. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4023-4028.
- Zhu, Z.; Zhuo, R.** Crosslinked quaternary ammonium cornstarch matrix for slow release of carboxylic groups-containing herbicides. *Starch* 2000, 52, 58-63.

60

Breve descripción de la invención

El objeto de la presente invención es una formulación de liberación controlada en la que el plaguicida está unido a vesículas formadas por lípidos neutros y estas vesículas a su vez están adsorbidas sobre un mineral de la arcilla. Los lípidos neutros actúan como un agente que incrementa la solubilidad de plaguicidas hidrofóbicos mediante la incorporación de las moléculas de plaguicidas dentro de las vesículas formadas en solución. Vesículas formadas por lípidos neutros también son capaces de encapsular moléculas de plaguicidas con carga.

65

La PC y los minerales de la arcilla son sustancias aprobadas y consideradas de mínimo riesgo toxicológico por la USEPA, por lo que se trata de formulaciones de liberación lenta respetuosas con el medioambiente.

Los plaguicidas susceptibles de ser incorporados en las vesículas de lípidos neutros pueden ser de naturaleza ácida o básica, o de naturaleza hidrofóbica.

Las vesículas de lípido neutro se adsorben sobre minerales de arcilla, proveyendo una liberación lenta del ingrediente activo que fue previamente encapsulado. Un mineral de arcilla típico es montmorillonita, pero no está limitado únicamente al grupo de las esmectitas.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un método de liberación controlada de plaguicidas que minimice pérdidas no deseadas del ingrediente activo en el medioambiente y mejore la eficacia de la formulación, mediante la utilización de una formulación que incluye la encapsulación de moléculas en vesículas sin restricción de la naturaleza de la molécula (ácida, básica o hidrofóbica) y posterior adsorción de las vesículas en minerales de la arcilla. Alternativamente, los plaguicidas pueden ser incorporados en complejos vesículas-arcilla preformados.

La utilización de la formulación de liberación lenta, descrita en la presente invención, proporciona una mayor concentración de ingrediente activo en la vecindad de la plaga objetivo que la formulación comercial, además disminuye pérdidas del ingrediente activo por mecanismos de lixiviación, disipación y degradación, por lo que su uso disminuye el riesgo de contaminación de aguas subterráneas y superficiales, siendo respetuoso con el medio ambiente.

Breve descripción de las figuras

A fin de comprender la invención y ver cómo puede ser llevada en la práctica, se describe ahora en un cuerpo de texto incorporado, sin limitarse solo al ejemplo, con referencia a las figuras que se acompañan, en las cuales:

Fig. 1 muestra la adsorción de vesículas de PC sobre montmorillonita a una concentración de arcilla de 1.6 g/L.

Fig. 2 muestra las fórmulas químicas de los compuestos usados en la invención.

Fig. 3 muestra la liberación del herbicida de formulaciones comerciales y de arcilla-PC en experimentos en embudos: (a) alaclor (A); (b) atrazina (AT) y (c) sulfentrazona (S). En las formulaciones arcilla-PC, el primer número indica la concentración de arcilla usada en su preparación y el segundo, la concentración de herbicida empleada.

Fig. 4 muestra la cantidad de (a) alaclor (A) y (b) atrazina (AT) retenida en columnas de suelo para las formulaciones comerciales y de arcilla-PC en función de la profundidad en experimentos de lixiviación. En las formulaciones arcilla-PC, el primer número indica la concentración de arcilla usada en su preparación y el segundo, la concentración de herbicida empleada.

Fig. 5 muestra la actividad herbicida en los anillos superiores de columnas de suelo para las formulaciones comerciales y de arcilla-PC de (a) alaclor y (b) atrazina. En las formulaciones arcilla-PC, el primer número indica la concentración de arcilla usada en su preparación y el segundo, la concentración de herbicida empleada.

Fig. 6 muestra la cantidad de alaclor retenida en el suelo en función de la profundidad en experimentos de campo tras 59 (a), 99 (b) y 168 (c) días siguientes a la siembra. En las formulaciones arcilla-PC, el primer número indica la concentración de arcilla usada en su preparación y el segundo, la concentración de herbicida empleada.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a formulaciones de liberación controlada apropiadas para plaguicidas independientemente de su naturaleza ácida/básica. Las formulaciones de plaguicidas se basan en la unión/incorporación de las moléculas de plaguicidas en vesículas y su posterior adsorción en minerales de la arcilla. Las vesículas están formadas por lípidos neutros. El mineral de la arcilla puede elegirse del grupo de las esmectitas (preferentemente montmorillonita), o de los grupos de micas y silicatos fibrosos (como por ejemplo sepiolita).

Una formulación óptima para cualquier plaguicida debe diseñarse de tal forma que haya una eficiente adsorción del plaguicida en el sistema vesícula-arcilla proveyendo un sistema de liberación lenta y evitando pérdidas no deseadas de éste con el consiguiente riesgo al medioambiente como ocurre con formulaciones comerciales. Cuando las vesículas que incorporan las moléculas de plaguicida se adsorben eficazmente en un mineral de la arcilla, proporcionan una alta carga del ingrediente activo (i.a.) en las formulaciones vesículas-arcilla.

La adsorción de los liposomas formados por lípidos neutros sobre la arcilla puede modelizarse adecuadamente mediante la ecuación de Langmuir-Scatchard, que permite el cálculo del valor de la constante de enlace K.

Los cálculos del modelo permiten mejorar el diseño de una formulación de plaguicida basada en arcilla, en donde por una parte se elige una concentración alta de lípido, a fin de conseguir la mayor unión del plaguicida a los liposomas, y por otra parte se busca incrementar la concentración de arcilla para asegurar casi el 100% de la adsorción de los liposomas. Sin embargo, una concentración inferior de arcilla permitirá aumentar el porcentaje de ingrediente activo en la formulación. Por lo que debe alcanzarse un compromiso en el contenido de estos componentes en la formulación.

En una realización particular de la presente invención el lípido neutro de las vesículas es la fosfatidilcolina (PC) que tiene un grupo polar zwiteriónico y dos cadenas de hidrocarburos largas que surgen del enlace de ácidos grasos al resto de glicerol. Las moléculas de plaguicidas se unen/incorporan o por un mecanismo de permeabilidad/partición dentro del interior de las vesículas, o para moléculas cargadas también por interacciones electrostáticas entre partes de la molécula del plaguicida con los grupos polares zwiteriónicos de las moléculas de PC. Sin embargo, las moléculas de plaguicida se encapsulan más eficientemente cuando están en forma neutra.

La composición de los ácidos grasos de la PC no está limitada pero es preferible que sean saturados como en el caso de los ácidos cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico y behénico. La bondad de estas formulaciones es que no son agresivas al medioambiente debido a la nula toxicidad de los principales componentes auxiliares, las moléculas de PC y los minerales de la arcilla.

En otra realización particular de la presente invención el lípido neutro de las vesículas es un esfingolípid.

Los plaguicidas susceptibles de ser unidos/incorporados en la vesícula pueden ser de carácter ácido, básico o hidrofóbicos, y se seleccionan entre los pertenecientes a las familias de triazinas, acetanilidas y ariltriazinonas pero no limitados a éstos pudiéndose extender a otras familias como sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, difeniléteres, dinitroanilinas, uracilos, tiocarbamatos, ciclohexanodionas, ácidos fenoxiacéticos, fenilcarbamatos, ácidos fenoxicarboxílicos, fenilureas, benzonitrilos, etc.

Las moléculas de plaguicidas de carácter aniónico se unen o incorporan al lípido neutro de la vesícula mayoritariamente como neutras, lo que está de acuerdo con estudios que asumen que solo la forma neutra de un ácido o base puede permeabilizar las bicapas de lípidos (Xiang and Anderson, 1994). Sin embargo, pequeñas especies aniónicas pueden también permeabilizar las bicapas de los lípidos neutros. Thomae *et al.* (2005) encontró que los coeficientes de permeabilidad y partición de las especies neutras de ácidos carboxílicos aromáticos pequeños eran generalmente mayores o iguales a las de aquellos de las especies ionizadas desde un pH 2.0 hasta un pH próximo a 7.0, en el cual la permeabilidad era controlada por el anión.

La interacción de aniones con vesículas de PC se cree que ocurre mediante apantallamiento del potencial positivo de los dipolos intrínsecos en el interior de la membrana, lo que es consistente con enlace de aniones dentro de la membrana (Clarke and Lüpfer, 1999). Sin embargo, mecanismos diferentes a la partición pueden estar operando tales como enlace del anión a la superficie externa de PC a través de interacciones electrostáticas como se describió para Cl⁻ (Kotynska and Figaszewski, 2005), o algunos aniones orgánicos mediante un cambio conformacional que permita la interacción electrostática entre el anión y el grupo colina minimizando al mismo tiempo la repulsión con el grupo fosfato (Jendrsiak *et al.*, 1993).

Una formulación eficaz se determina principalmente por su efecto biológico sobre el objetivo diana y su zona cercana, esto significa que el plaguicida debe actuar en el caso particular de herbicidas, principalmente en la zona raíz y no a mayores profundidades en las que no se necesita control biológico. Al reducir la lixiviación del herbicida, se podría incrementar de esta manera el rendimiento biológico de los mismos, lo que permitiría reducir las cantidades aplicadas, ya que las malas hierbas germinan mayormente en las capas superiores del suelo hasta profundidades de 5 a 10 cm.

Las formulaciones de liberación lenta deben diseñarse de forma que haya un compromiso entre la reducción en la lixiviación y el mantenimiento de la actividad herbicida en la capa superior del suelo. Las formulaciones objeto de la presente invención cumplen ambos requisitos ya que la cantidad de herbicida lixiviado se reduce varias veces (comparando con las formulaciones comerciales) y la actividad biológica incrementa en la capa superior del suelo, que es de primordial interés para el control de las malas hierbas a largo plazo.

Con la utilización de una formulación según la presente invención, se consigue una disminución de la lixiviación del ingrediente activo y una mayor actividad plaguicida en las capas superficiales del suelo, con respecto a las formulaciones comerciales.

Por lo tanto, las formulaciones que constituyen la presente invención proveen un mecanismo de liberación controlada que conduce al uso de cantidades más pequeñas de ingrediente activo, ya que se encuentra más concentrado en el sitio principal de actuación debido a la disminución de pérdidas por mecanismos de disipación y degradación.

Ejemplos y descripción

Ejemplo 1

5 Preparación de las formulaciones

a) Preparación de vesículas de fosfatidilcolina

La fosfatidilcolina (PC) usada era una mezcla del 74% de diestearoil-PC (DSPC) y 26% de 1-palmitoil-2-estearoil-PC (PSPC). La PC se disolvió en metanol. El disolvente se eliminó mediante corriente suave de nitrógeno, y la película de lípido se mantuvo primero bajo alto vacío 1 h y luego hidratado otra hora. Los liposomas fueron reducidos de tamaño al hacerlos pasar 13 veces en un proceso de extrusión secuencial que empleaba filtros de policarbonatos de tamaño de poro de $0.1\ \mu\text{m}$ (Avanti Mini-extruder; Avanti Polar Lipids, Inc.). La hidratación del lípido y los procedimientos de ajuste del tamaño se realizaron a 65°C , temperatura por encima de la correspondiente a la de transición de las fases cristalinas gel-líquido (T_m) del lípido con la mayor T_m de la mezcla (59.5°C).

b) Optimización de la adsorción de vesículas de PC en arcilla

La adsorción de liposomas obtenidos en el punto a) sobre la arcilla se llevó a cabo en duplicado en tubos de borosilicato mezclando 10 ml de soluciones de lípido con concentraciones de hasta 12 mM, con 5 ml de una suspensión de montmorillonita bajo agitación continua. La concentración final de arcilla en los tubos era de 1.6 g/L. Tras agitación durante 3 días a 20°C , se centrifugaron los tubos a 20000 g durante 10 min, y se determinó la concentración de PC en el sobrenadante como en Postle (1987). La montmorillonita usada fue una montmorillonita estándar de Wyoming (SWy-2).

La isoterma de adsorción de los liposomas de PC (Fig. 1) en la arcilla es de tipo L que es indicativo de una interacción relativamente fuerte de las moléculas del lípido con la superficie del mineral de la arcilla. Un cálculo del área de empaquetamiento de las moléculas de PC en el plateau de adsorción es de unos $30\ \text{\AA}^2$, que es próximo a la mitad del área común por monómero en monocapas de PC en la interfase aire-agua. Esto indica una deposición en bicapa de las vesículas de PC sobre la superficie de la montmorillonita. Cuando los liposomas de PC se adsorben inicialmente, ellos interaccionan con la arcilla a través de un área de contacto relativamente pequeña, pero más tarde ocurren cambios estructurales que resultan en contactos más próximos entre la mayoría de las moléculas de fosfolípido y los sitios de la arcilla.

Los resultados de la Tabla 1 demuestran que la adsorción de liposomas de PC sobre la arcilla puede modelizarse adecuadamente mediante la ecuación de Langmuir-Scatchard. El valor de la constante de enlace K calculado ($1000\ \text{M}^{-1}$) está en el rango de los valores previamente descritos para la interacción entre varias moléculas de herbicidas y organo-arcillas (Nir *et al.*, 2000), pero es mucho mayor que las que se registran en la interacción de moléculas hidrofóbicas con la arcilla.

Una combinación de 6 mM de PC y 5 g/L de montmorillonita se considera óptima, ya que los cálculos indican en este caso 96.4% de adsorción de los liposomas, mientras que con 1.6 g/L de arcilla la adsorción de los liposomas alcanza sobre un 85%.

TABLA 1

Adsorción de liposomas de PC en montmorillonita. Valores experimentales y calculados. a

Conc. Lípido	Adsorbido	Adsorbido	Conc.
total (mmol/g	exp. (mmol/g	calc.	solución
arcilla). En	arcilla)	(mmol/g	final (mM)
paréntesis (mM).		arcilla)	
0.233	0.202	0.210	0.050
(0.373)			

ES 2 324 809 B1

	0.320	0.284	0.290	0.055
	(0.510)			
5	0.558	0.520	0.510	0.061
	(0.893)			
10	0.598	0.546	0.550	0.084
	(0.957)			
	0.933	0.847	0.849	0.138
15	(1.493)			
	1.110	0.984	1.000	0.208
	(1.783)			
20	1.875 (3.0)	1.618	1.680	0.415
	3.750 (6.0)	3.110	3.210	1.020
	5.625 (9.0)	4.200	4.450	2.290
25	11.25 (18.0)	6.280	5.960	7.940
	0.1 b	0.098	0.087	0.002
30	(0.1)			
	0.6 c	0.582	0.581	0.090
	(3.0)			
35	1.2 c	1.140	1.157	0.300
	(6.0)			

-
- a. Siempre que no se especifique la concentración de arcilla era 1.6 g/L. Los cálculos fueron realizados mediante la ecuación de Langmuir-Scatchard empleando como sitios de adsorción molares totales 3.6 mM por gramo de arcilla; $K=1000 \text{ M}^{-1}$. El valor de R^2 era 0.995 y la raíz del error cuadrático medio era 0.14 mmol/g.
- b. En este caso la concentración de arcilla era 1 g/L.
- c. En este caso la concentración de arcilla era 5g/L.

c) Preparación de las formulaciones arcilla-PC

Las formulaciones de PC con distintos herbicidas se prepararon disolviendo varias cantidades del herbicida en cuestión en una solución 6 mM de PC mediante sonicación, y posterior adición de montmorillonita. Los herbicidas utilizados fueron alaclor (de carácter hidrofóbico), atrazina (de carácter básico) y sulfentrazona (de carácter ácido). La Fig. 2 muestra las fórmulas químicas de dichos compuestos. Las cantidades añadidas de herbicidas eran 1.5-14 mM para alaclor, 1.8-2.4 mM para atrazina y 1.3-5.7 mM para sulfentrazona. La concentración de arcilla era 1.6, 5 o 10 g/L. Después de agitación durante 24 h las suspensiones se centrifugaron a 20000 g durante 10 min, se analizó el herbicida remanente en los sobrenadantes, y los precipitados se liofilizaron dando lugar a las formulaciones. Los herbicidas se analizaron por HPLC (Shimadzu Modelo 10A) equipado con un detector PDA. La columna de fase reversa era una Kromasil 100 C18 de 15 cm. La velocidad del flujo era 1.0 mL min⁻¹. Las fases móviles eran: para sulfentrazona

45% acetonitrilo y 55% agua con 0.65 mM de ácido trifluoroacético; para alaclor 60% acetonitrilo y 40% agua, y para atrazina 50% metanol y 50% agua. Las longitudes de onda se ajustaron a 220 nm para alaclor, 230 nm para atrazina y 242 nm para sulfentrazone. Los tiempos de retención eran 6.26, 5.13 y 4.06 min para alaclor, atrazina y sulfentrazone, respectivamente.

Las concentraciones finales de las formulaciones y el porcentaje en peso de los herbicidas en la formulación se muestran en la Tabla 2. En la preparación de formulaciones de sulfentrazone (plaguicida aniónico), la película de lípido tras el vacío se hidrató con tampón a pH 5.0 (0.096 M citric acid/0.2 M NaOH) en lugar de solo agua como se indicó en la preparación de vesículas de PC del punto a). El contenido de ingrediente activo se determinó mediante sonicación de 5 mg de cada formulación en 20 ml de metanol. Se centrifugaron las suspensiones y se analizó el herbicida en los sobrenadantes.

TABLA 2

Formulaciones herbicida-vesícula-arcilla.a

Arcilla añadida (g/L)	Herbicida añadido (mM)	Notación de la formulación	Ingrediente activo (w/w %)
Alaclor			
5	1.5	A5/1.5	2.0
5	8	A5/8	15.0
5	14	A5/14	24.0
1.6	14	A1.6/14	39.5
Atrazina			
5	1.8	AT5/1.8	3.0
5	2.4	AT5/2.4	4.6
1.6	2.4	AT1.6/2.4	9.5
Sulfentrazone			
5	2.6	S5/2.6	7.4
5	5.7	S5/5.7	19.0
10	5.7	S10/5.7	13.0

a. La concentración inicial de PC era siempre 6 mM.

Un factor primordial en la encapsulación de moléculas ácidas es el pH de la solución. Las sulfentrazone (SFZ) se adsorbía poco en una suspensión de montmorillonita 5 g/L en una solución 6 mM de PC y 2.6 mM de SFZ preparada en un tampón a pH 7.0 Trizma-HCl 1 M. La adsorción aumentaba de 11.8% a 69.5% cuando la solución era preparada en un tampón a pH 5.0. A pH 5.0, la especiación de SFZ en solución era 97.3% como moléculas neutras y el restante 2.7% como aniones, mientras que a pH 7.0 la mayoría de las moléculas de SFZ permanecían como especies aniónicas (73.4%) frente a la neutras (26.6%). Esto indica que las moléculas de sulfentrazone se incorporaban preferencialmente como neutras. Sin embargo, pequeñas especies aniónicas pueden también permeabilizar las bicapas de PC. De hecho, la adsorción de SFZ a pH 7.0 era 4 veces mayor que la cantidad de especies neutras en solución.

Estos resultados indican que en el diseño de formulaciones de moléculas ácidas (SFZ por ejemplo), la optimización para la incorporación de éstas implica elegir en la preparación de liposomas de PC, un medio tampón en el cual la mayoría de las moléculas permanezcan como especies neutras. El rango de pH para los tampones a usar es amplio, de 4 a 10, ya en este rango el grupo polar de PC es zwitteriónico sin carga neta.

Ejemplo 2

Liberación de herbicidas en sistemas de embudos Büchner

5 Se analizó la liberación de herbicidas desde formulaciones de PC (obtenidas en el ejemplo 1, apartado c) así como aquellas de los productos comerciales, en experimentos en embudos tipo Büchner, simulando irrigación en los primeros 0.5 cm de la capa superior de un suelo arenoso.

10 En este experimento, 98.9 g de un suelo arenoso se añadió a un embudo Büchner (9.5 cm diámetro interno) que tenía un papel de filtro en el fondo. La capa del suelo se homogeneizó a una altura de 0.5 cm. Este suelo contenía un 8.6% de $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$, 0.7% de materia orgánica y un pH de 7.8. La superficie del suelo se esparció uniformemente con las diferentes formulaciones de herbicida. La cantidad aplicada de ingrediente activo era 1 kg ha⁻¹. La capa del suelo en cada embudo fue irrigada 43 veces en intervalos de 20 minutos con 15 mL, correspondiendo cada lavado a 2.12 mm de lluvia, o una cantidad equivalente total de 91 mm de lluvia. El volumen eluido tras cada irrigación se recogió y se analizó el herbicida según se ha descrito en el Ejemplo 1. Las formulaciones comerciales usadas fueron Herbimur 15 Atrazina (475 g/L i.a.) para atrazina, Alanex (48% i.a.) para alaclor y Boral (75% i.a.) para sulfentrazona.

20 La Fig. 3 muestra las curvas de elución obtenidas para las formulaciones comerciales de los herbicidas así como las de aquellas basadas en PC. La forma de las curvas de las formulaciones de PC de atrazina muestran dos picos de elución, que es ideal para formulaciones de liberación lenta porque significa que una fracción importante de moléculas unidas del herbicida prorrumpen en los primeros estadios en los que se desea una alta bioeficacia, y la fracción que permanece está más energéticamente unida y se libera más gradualmente que en el caso de la formulación comercial, como se nota en una parte ascendente más baja y una mayor cola extendida. Las formulaciones basadas en PC de alaclor y sulfentrazona dan curvas con un solo pico de elución, pero más aplastadas y más anchas que las de las formulaciones comerciales, las cuales son altamente simétricas denotando estas últimas poca retención de las moléculas de los herbicidas.

30 En el caso de formulaciones de alaclor, el herbicida se eluye completamente de la formulación comercial tras 23 irrigaciones, y tras 58 para aquellas basadas en PC-arcilla. Los porcentajes totales eluidos eran 99.9 ± 2.3 para la formulación comercial, y 100.7 ± 1.8 , 97.3 ± 3.2 , 98.3 ± 2.5 y 97.0 ± 2.2 para las formulaciones basadas en PC-arcilla A5/1.5, A5/8, A5/14 y A1.6/14, respectivamente. Estos resultados son de interés ya que todo el herbicida está disponible para el control de las malas hierbas. La cantidad eluida acumulada de alaclor tras 8 irrigaciones, que es equivalente a 18.8 mm de lluvia era $88.9 \pm 2.0\%$ para la formulación comercial, mientras que recuperaciones de 34.5 ± 0.8 , 53.8 ± 0.5 , 55.6 ± 1.3 y $54.9 \pm 0.6\%$ se obtuvieron respectivamente para las formulaciones PC-arcilla A5/1.5, A5/8, A5/14 y A1.6/14, equivaliendo a una reducción significativa en la lixiviación de 61, 39, 37 y 38%, respectivamente, comparado con la formulación comercial.

40 Las formulaciones atrazina-PC también mostraban una considerable reducción en la lixiviación. Tras 8 irrigaciones, la cantidad acumulada de herbicida lixiviada era $79.3 \pm 0.3\%$ para la formulación comercial, mientras que valores de 15.7 ± 0.1 , 24.2 ± 0.2 y $26.3 \pm 4.3\%$ se obtuvieron para AT5/1.8, AT5/2.4 y AT1.6/2.4, respectivamente, lo que equivale a una reducción en la lixiviación entre un 67 y un 80%. Las cantidades totales eluidas eran 101.8 ± 1.8 para la formulación comercial, 95.7 ± 5.5 para AT5/1.8, 103.4 ± 3.4 para AT5/2.4 y 100.4 ± 0.8 para AT1.6/2.4, indicando otra vez que no estaba ocurriendo una unión irreversible del herbicida en las formulaciones PC-arcilla.

45 La formulación comercial de SFZ eluía más rápidamente que las de los otros herbicidas. La dosis aplicada de SFZ era del orden de 11 veces superior a la máxima dosis recomendada (92 g ha⁻¹). Sin embargo, el fin de estos experimentos de liberación sobre una fina capa del suelo era mostrar si una reducción efectiva en la lixiviación del herbicida podía obtenerse con las formulaciones PC-arcilla. La movilidad de este herbicida está influida enormemente por el pH del suelo ya que la adsorción decrece con el aumento del pH, siendo la mayor disminución a pH por encima del pKa de SFZ (Grey *et al.*, 1997). Consecuentemente, una mínima adsorción al suelo está ocurriendo debido al alto pH, y por tanto la elución de formulaciones de SFZ-PC puede estar únicamente reflejando la liberación del herbicida desde la propia matriz. Las cantidades eluidas totales eran $101.3 \pm 5.1\%$ para la formulación comercial, $107.6 \pm 7.9\%$ para S5/5.7 y $109.7 \pm 11.6\%$ para S10/5.7. La reducción en la lixiviación equivale al 57 y 53% comparado con las cantidades acumuladas eluidas de SFZ tras 5 irrigaciones cuando se comparaba con la formulación comercial, la cual había eluido casi en su totalidad (94%).

55 Las dosis aplicadas en estos experimentos para atrazina y alaclor están dentro del rango aplicado en condiciones de campo.

60 A partir de estos datos se demuestra la liberación lenta de las formulaciones preparadas con PC y herbicidas tanto ácidos como básicos, o hidrofóbicos.

Ejemplo 3

65 *Lixiviado y actividad biológica en columnas de suelos*

Se cortaron tubos de metacrilato de 3.0 cm de diámetro en secciones de 4 y 8 cm, y tres unidades de 4 cm se pegaron junto con una unidad de 8 cm en uno de los extremos para construir una columna de 20 cm. La columna se

cubrió en el extremo opuesto a la unidad de 8 cm con una malla de nylon de 1 mm junto con una capa fina de lana de vidrio (0.5 g) para sujetar firmemente el suelo en la columna. Se empaquetó suelo arenoso (0.164 g) desde la parte superior de la columna (8 cm) creándose una columna de suelo de 16 cm que se podía separar rápidamente en los segmentos de 4 cm. El volumen de poro medido en las columnas de suelo fue de 38 ml.

3 ml de suspensiones de las formulaciones comerciales y de las formulaciones PC-arcilla de atrazina y alaclor (según el ejemplo 1, apartado c) se esparcieron uniformemente en la superficie del suelo a una dosis de 3 kg i.a. ha⁻¹. Los experimentos de columna de suelo se realizaron por triplicado. Se añadió agua destilada equivalente a 70 mm de lluvia (50 ml) desde la parte superior de la columna en dos porciones, dejando al suelo equilibrar durante 24 h entre cada adición y tras la adición final. Los lixiviados se recogieron y se analizó el herbicida.

Cada columna de suelo se separó en segmentos de 4 cm. Por duplicado, 2 g de suelo se secaron a 100°C durante 24 h para determinar la humedad de cada segmento de suelo. La cantidad de herbicida que permanecía en cada segmento se extrajo por triplicado mediante agitación de 5 g de suelo con 15 ml de metanol durante 24 h. Se centrifugaron las suspensiones y se analizó el herbicida por HPLC.

Se usó un bioensayo para calcular la actividad residual de los herbicidas en los dos primeros anillos superiores de las columnas de suelo. Se plantaron con 7 semillas de *Sytaria Viridis* seis vasos que contenían 15 g de suelo de cada segmento para cada formulación, y se irrigaron diariamente durante 2 semanas. La bioactividad de las formulaciones se determinó midiendo la reducción en peso fresco por brote con respecto al control.

Las cantidades extraídas en cada segmento de atrazina y alaclor de las formulaciones comerciales y PC-arcilla (Fig. 4) muestran una considerable reducción en la lixiviación en los anillos superiores en las formulaciones de PC-arcilla, comparando con las formulaciones comerciales. El alaclor que permanecía en los primeros 0-4 cm era 12.3±0.9% del total aplicado para la comercial, mientras que cantidades superiores del orden de 2.3 veces se determinaron para las formulaciones PC-arcilla. No se detectó una clara diferencia a la profundidad inferior (12-16 cm) entre las formulaciones comercial y de PC-arcilla, pero las últimas se acumulaban a una profundidad de 4-8 cm frente a la comercial que lixivaba a mayores profundidades, siendo su fracción mayor entre 8 y 12 cm.

Los resultados del bioensayo para el herbicida alaclor no mostraron diferencias en la actividad herbicida en las capas superiores de las columnas de suelo entre las diferentes formulaciones a causa de la alta sensibilidad de la planta ensayada para este herbicida (Fig. 5).

Las formulaciones PC-arcilla de atrazina actuaban relativamente mejor que las de alaclor cuando se comparaban con la formulación comercial. La cantidad retenida en la capa superior (0-4 cm) era sobre 75% de la aplicada frente a un valor de 53% para la comercial, lo que significa una reducción en la lixiviación del 42%. En el siguiente segmento (4-8 cm) la cantidad de atrazina detectada con la formulación comercial fue 2.5 veces superior a las de PC-arcilla. No se detectó ninguna cantidad lixiviada a la mayor profundidad (12-16 cm) para las formulaciones PC-arcilla a diferencia de la comercial. Estos datos se corroboraron midiendo la actividad herbicida en los anillos superiores (Fig. 5). Se obtuvo un porcentaje de inhibición muy alto (~72%) para las formulaciones PC-arcilla. Este porcentaje de inhibición en la capa superior de la columna es del orden de 2 veces superior que la de la formulación comercial. La tendencia opuesta se observa en el siguiente segmento, una bioactividad del orden de 2 veces superior con la formulación comercial que la de las formulaciones de PC-arcilla, de buen acuerdo con las cantidades extraídas.

La combinación de las cantidades extraídas y los porcentajes de inhibición indican que se puede aplicar una reducción de 2 y 4 veces en la dosis recomendada de alaclor y atrazina, respectivamente, cuando se usan formulaciones de PC-arcilla.

Las formulaciones de liberación lenta deben diseñarse de forma que haya un compromiso entre la reducción en la lixiviación y la actividad herbicida en la capa superior del suelo. Las formulaciones PC-arcilla cumplen ambos requisitos ya que la cantidad de herbicida lixiviado se reduce varias veces y la actividad biológica incrementa en la capa superior del suelo, que es de primordial interés para el control de las malas hierbas a largo plazo.

Ejemplo 4

Bioactividad de formulaciones de SFZ

Se cubrieron macetas de 10 cm de anchura con papel de filtro y se llenaron con 424 g de un suelo francoarenoso dando lugar a una altura de 4 cm. Las formulaciones comercial y de PC-arcilla preparadas en el ejemplo 1 se esparcieron uniformemente en las macetas a la máxima dosis recomendada de 90 g a.i. ha⁻¹. La formulación comercial usada fue Boral (75% a.i.). Se añadió agua equivalente a 250 y 500 m³ ha⁻¹, se recogieron los volúmenes eluidos y se analizó el herbicida. El suelo se removió meticulosamente y se transfirió a vasos conteniendo cada uno de ellos 15 g de suelo tratado. Se plantaron siete semillas de *Setaria Viridis*, y la actividad herbicida se determinó midiendo la reducción en el peso fresco del brote con respecto a un control.

La liberación de SFZ de formulaciones PC-arcilla es dos veces inferior a la comercial bajo una irrigación media (Tabla 3). Bajo gran irrigación, el herbicida eluyó completamente de la comercial a diferencia de las formulaciones PC-arcilla, en las que aproximadamente el 10% de la cantidad aplicada permanecía en el suelo.

TABLA 3

Cantidades de SFZ detectada en los lixiviados de las macetas

Formulación	Agua de irrigación			
	250 m3 ha-1		500 m3 ha-1	
	% eluido	% retenido	% eluido	% retenido
Comercial	82.1	17.9	100	0
S5/5.7	57.8	42.2	89.4	10.6
S10/5.7	63.4	36.6	91.9	8.1

Se comprobó la actividad herbicida en el suelo (Tabla 4). No se observó ninguna actividad herbicida para la formulación comercial bajo gran irrigación de acuerdo con las cantidades que se determinaron que permanecían en el suelo. Las formulaciones PC-arcilla eran altamente bioactivas a pesar de su baja cantidad, lo que puede ser debido a la alta dosis-respuesta de la planta test respecto a este herbicida. Bajo irrigación inferior, la formulación comercial presentaba bastante baja actividad, mientras que la de las formulaciones PC-arcilla era unas 3 veces superior.

TABLA 4

Actividad herbicida en la capa superior de un suelo (4 cm) tratado con formulaciones de SFZ a una dosis de 90 g a.i. ha-1 en función de las cantidades irrigadas. Los porcentajes de inhibición se expresan como reducción en el peso fresco del brote por planta con respecto a un control. a

Formulaci ón	Inhibición (% del control)	
	250 m3 ha-1	500 m3 ha- 1
Comercial	18.4bc	0c
S5/5.7	48.7a	47.3a
S10/5.7	41.3ab	36.9ab

a. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes al nivel del 5% según el test de rango múltiple de Student.

Estos resultados claramente apuntan a la ventaja de las formulaciones PC-arcilla para reducir la lixiviación de herbicidas aniónicos y mejorar la actividad herbicida en los peores escenarios posibles, como en suelos calcáreos y bajo gran irrigación.

Ejemplo 5

Experimentos de campo

5 Se realizó un experimento de campo para comparar y probar la eficacia de varias formulaciones de alaclor. Se plantó Avena Sativa (30 g m⁻²) en un suelo francoarenoso. Este suelo tiene un pH de 8.9, un contenido de Ca(CO₃)₂ de 4.9% y de materia orgánica 1.36%. Se aplicaron las formulaciones comercial y dos de PC-arcilla (A5/8, A1.6/14) en un diseño de bloque aleatorio con 3 replicados. La dosis de alaclor fue 3 kg ha⁻¹.

10 Se realizó el muestreo de columnas de suelo sin alterar de cada parcela hasta una profundidad de 30 cm. Un primer muestreo se realizó tras 59 días, un segundo tras 99 días y un último al final del experimento, tras 168 días. No se necesitó aplicar irrigación. Las parcelas recibieron 46, 158 y 256 L m⁻² de lluvia antes del primer, segundo y tercer muestreo, respectivamente. Las matrices extraídas del suelo sin alterar hasta una profundidad de 30 cm se dividieron en tres segmentos, de 0-10, de 10-20 y de 20-30 cm. Se extrajo la cantidad de alaclor en cada segmento por
15 triplicado usando 5 g de suelo y 10 ml de metanol, y se dejó equilibrar 24 h bajo agitación continua. Se centrifugaron las suspensiones y se analizó el herbicida en los sobrenadantes empleando la misma metodología que en los ejemplos anteriores.

20 Al final del experimento, se cosecharon los brotes de las plantas y se midió su peso fresco.

La reducción del peso fresco con respecto al control fue 48, 52 y 57% para las formulaciones comercial, A5/8 y A1.6/14, respectivamente. Sin embargo, no se notó ninguna diferencia estadística en el rendimiento de la cosecha entre las formulaciones comercial y PC-arcilla.

25 En la Fig. 6 se muestran las cantidades de alaclor en las matrices de las columnas de suelo tras los tres muestreos. La cantidad de alaclor total que permanecía en el campo era similar entre el primer y segundo muestreo. El alaclor retenido respecto al total aplicado para la formulación comercial fue 76.8±6.4 y 79.2±4.2%, para A5/8 fue 79.5±7.7 y 79.8±2.1% y para A1.6/14 fue 82.9±4.6 y 87.9±7.5%. Las recuperaciones fueron mucho menores en el tercer muestreo. No se notó otra vez ninguna diferencia para las tres formulaciones aplicadas en las cantidades totales extraídas. La cantidad retenida de alaclor fue 56.6±3.0, 55.5±2.5 y 52.9±6.2% para la comercial, A5/8 y A1.6/14, respectivamente. Sin embargo, el modelo de distribución cambia de un muestreo al siguiente. En el primer muestreo, una cantidad significativamente mayor se obtuvo en la capa superior para las formulaciones PC-arcilla que para la comercial. El herbicida se acumulaba más a la profundidad de 10-20 cm para la comercial que para las formulaciones PC-arcilla, mientras que las cantidades retenidas eran similares a la mayor profundidad. En el segundo muestreo, se
30 observó una reducción en la cantidad de alaclor en la capa superior para todas las formulaciones. Sin embargo, todavía había diferencia significativa en la capa superior del suelo entre las formulaciones comercial y PC-arcilla, como se notó previamente. La diferencia más importante entre estos muestreos es la mayor acumulación de alaclor en los segmentos más profundos, en los que se observaron incrementos de hasta el 52% y 25%, respectivamente, para las formulaciones comercial y PC-arcilla. Este modelo de distribución se observó también en el tercer muestreo, en el que
40 las recuperaciones de alaclor fueron inferiores a las tres profundidades.

El experimento de campo demuestra claramente una reducción en la lixiviación del herbicida en formulaciones PC-arcilla cuando se compara con la comercial, mientras se mantiene la bioeficacia en la capa superior del suelo. La dosis aplicada está dentro de los límites superiores de la recomendada en aplicaciones agrícolas. Una dosis inferior
45 mostrará una diferencia más impactante en el rendimiento de las cosechas, ya que permanecerá en la capa superior una cantidad inferior para el control efectivo de las malas hierbas, la cual es solo una pequeña fracción de la cantidad aplicada a la mayor dosis usada.

Aunque la invención se ha descrito junto con un cuerpo de texto específico, es evidente que muchas alternativas y variaciones serán aparentes y especializadas a la descrita anteriormente en el arte. Concordantemente, la invención pretende abarcar todas las alternativas y variaciones que caen dentro del espíritu y objetivo de las reivindicaciones adjuntadas.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación de liberación lenta de plaguicida que comprende un plaguicida unido a vesículas formadas por lípidos neutros, estando dichas vesículas que unen o incorporan el plaguicida adsorbidas en un mineral de la arcilla.
2. La formulación de plaguicida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el lípido neutro que forma las vesículas es un fosfolípido, preferentemente de origen natural.
- 10 3. La formulación de plaguicida de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el fosfolípido es fosfatidilcolina, que está considerada como sustancia de mínimo riesgo toxicológico.
4. La formulación de plaguicida de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la mencionada fosfatidilcolina está formada preferentemente por ácidos grasos saturados pero no limitados a éstos.
- 15 5. La formulación de plaguicida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el lípido neutro que forma las vesículas es un esfingolípido.
6. La formulación de plaguicida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el mineral de la arcilla se selecciona entre los grupos esmectita, mica y silicatos fibrosos.
- 20 7. La formulación de plaguicida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho plaguicida es de naturaleza ácida o básica.
8. La formulación de plaguicida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho plaguicida es de naturaleza hidrofóbica.
- 25 9. La formulación de plaguicida de acuerdo con la reivindicación 7 y 8 en la que los plaguicidas se seleccionan entre las familias de triazinas, acetanilidas y ariltiazinonas pero no limitados a éstos pudiéndose extender a otras familias como sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, difeniléteres, dinitroanilinas, uracilos, tiocarbamatos, ciclohexanodionas, ácidos fenoxiacéticos, fenilcarbamatos, ácidos fenoxicarboxílicos, fenilureas, benzonitrilos, etc.
- 30 10. La formulación de plaguicida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el lípido fosfatidilcolina y el mineral de la arcilla son de mínimo riesgo toxicológico.
- 35 11. Un método de elaboración de formulaciones de liberación lenta de plaguicidas de acuerdo con las reivindicaciones 1 a la 10 que comprende las siguientes etapas: a) formación de vesículas de lípido neutro; b) unión o incorporación del plaguicida a las vesículas del punto anterior; c) adsorción de las vesículas que incorporan el plaguicida en un mineral de la arcilla.
- 40 12. Un método de elaboración de formulaciones de liberación lenta de plaguicidas de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado** porque permite el uso de una cantidad más pequeña de ingrediente activo que la formulación comercial.
- 45 13. Un método para destruir plagas que consiste en la aplicación de una cantidad adecuada de la formulación de liberación lenta según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10.
14. Un método para destruir plagas según la reivindicación 13 **caracterizado** porque consigue una mayor concentración de ingrediente activo en la vecindad de la plaga objetivo que la formulación comercial.
- 50 15. Un método para destruir plagas según la reivindicación 13 **caracterizado** porque su uso disminuye pérdidas del ingrediente activo por mecanismos de lixiviación, disipación y degradación.
16. Un método para destruir plagas según la reivindicación 13 **caracterizado** porque su uso disminuye el riesgo de contaminación de aguas subterráneas y superficiales.
- 55 17. Un método para destruir plagas según la reivindicación 13 **caracterizado** porque su uso es respetuoso con el medio ambiente.

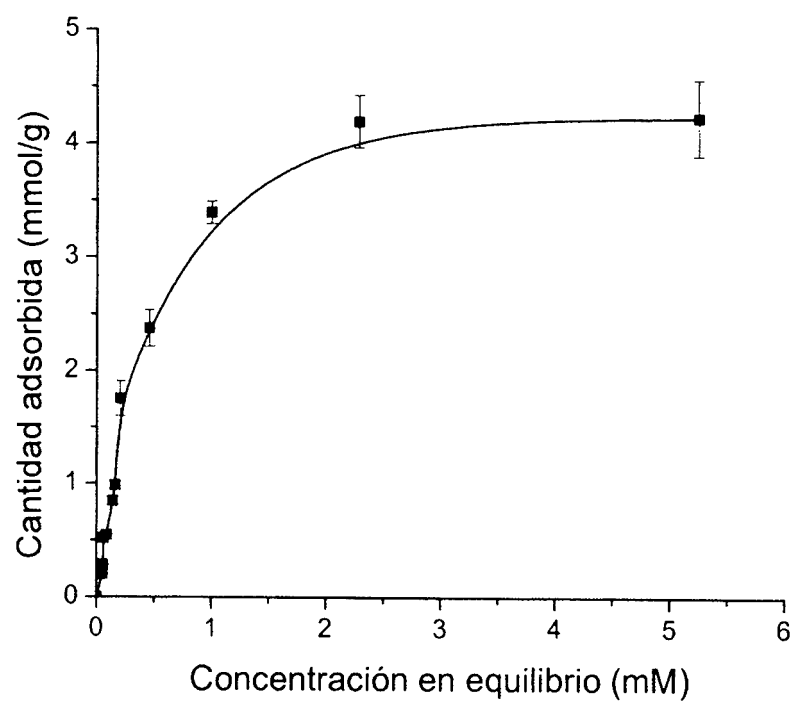


FIG 1

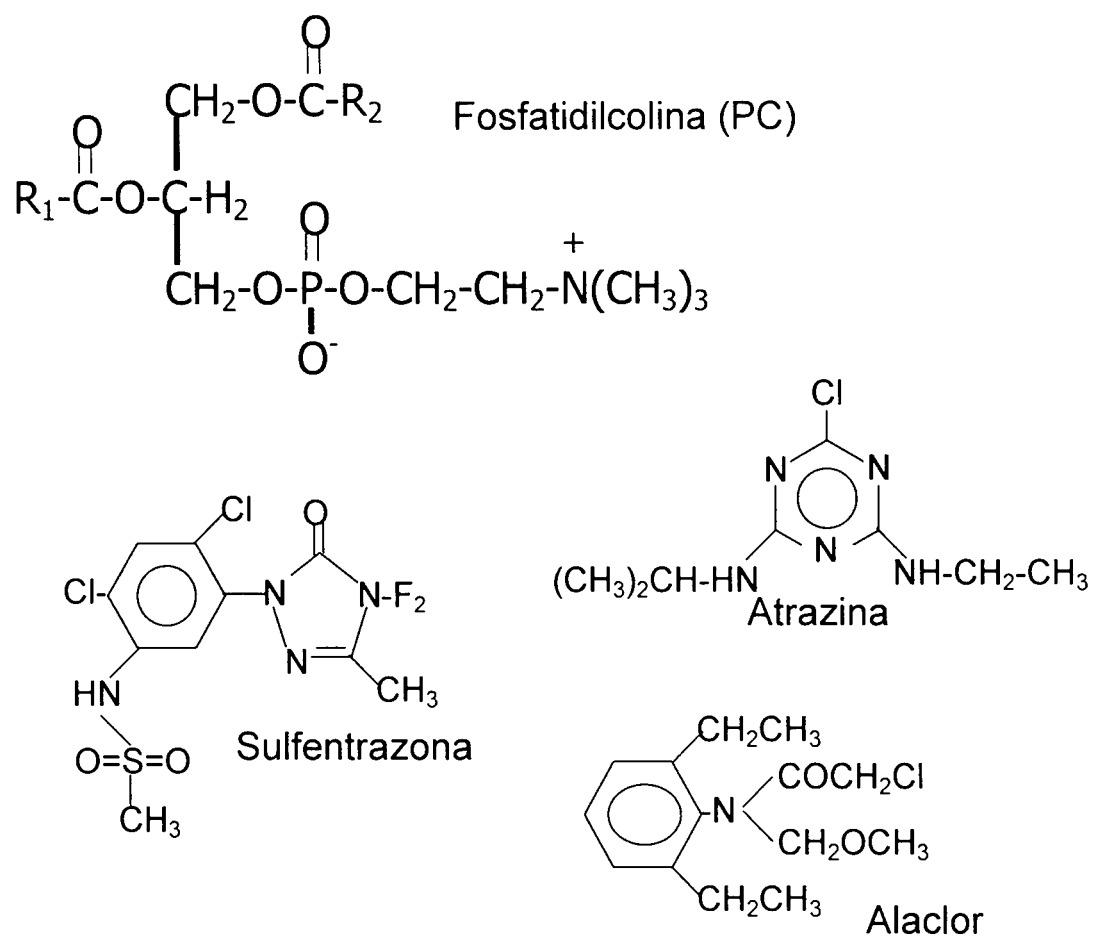


FIG 2

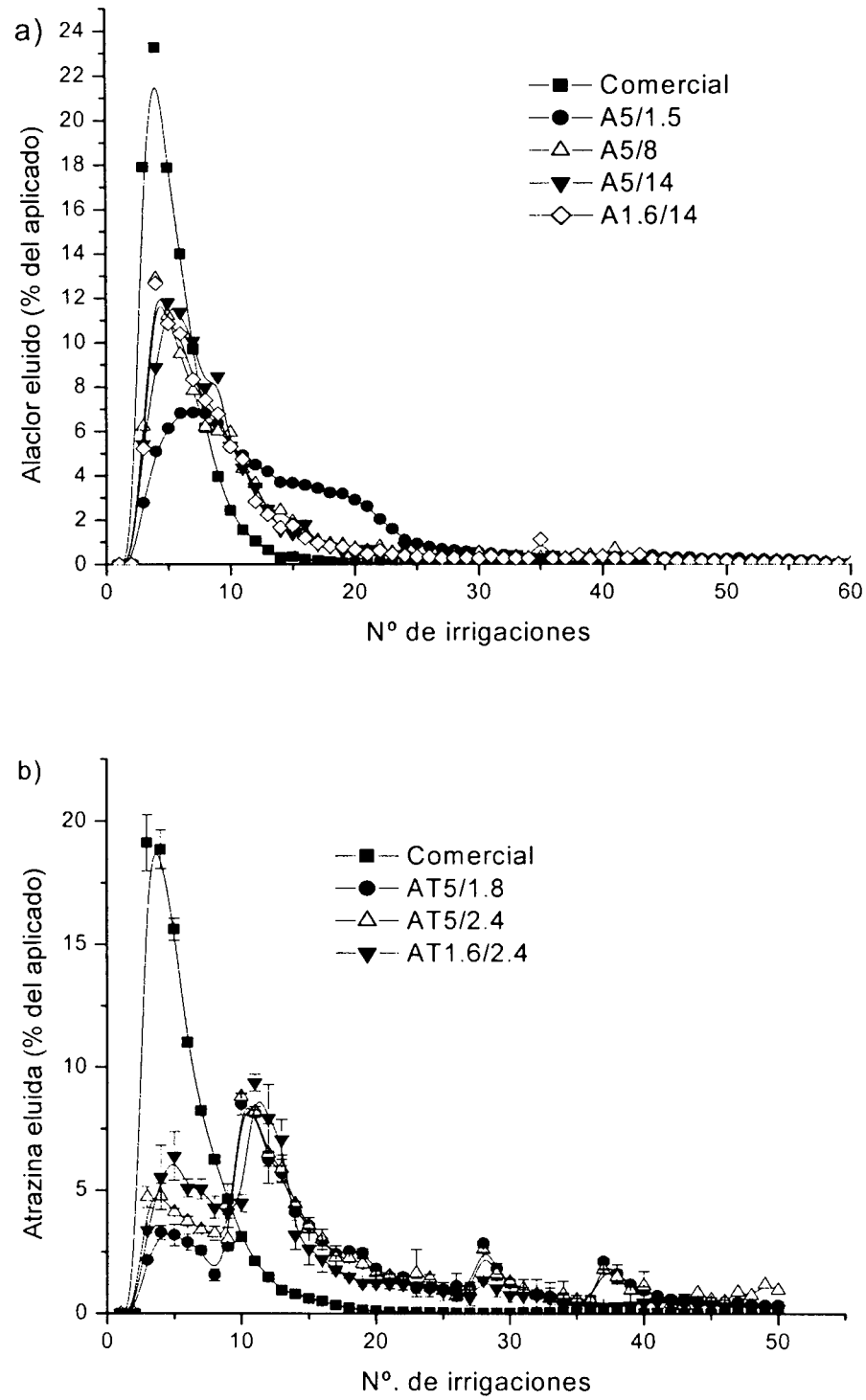


FIG 3B

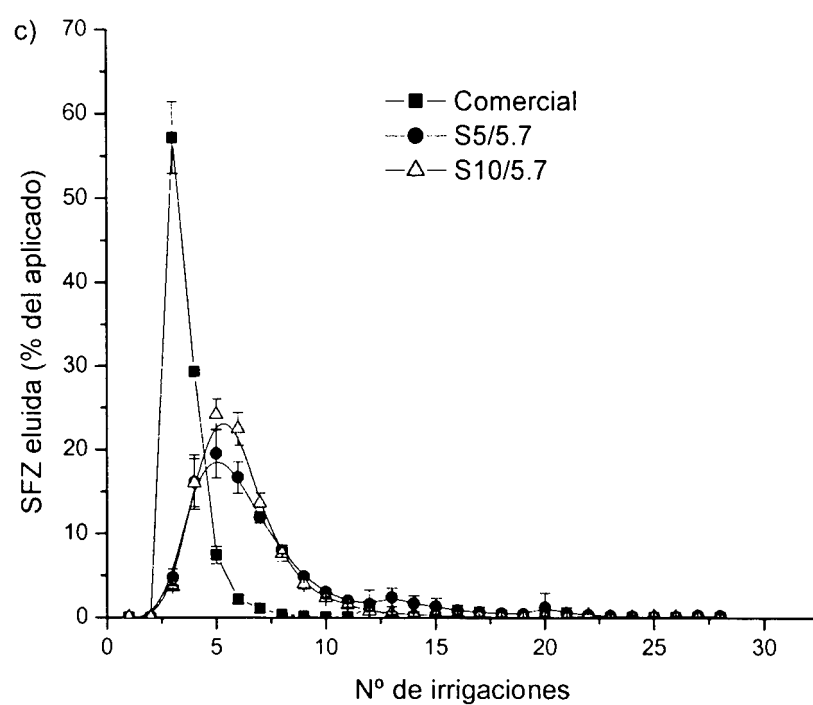


FIG 3C

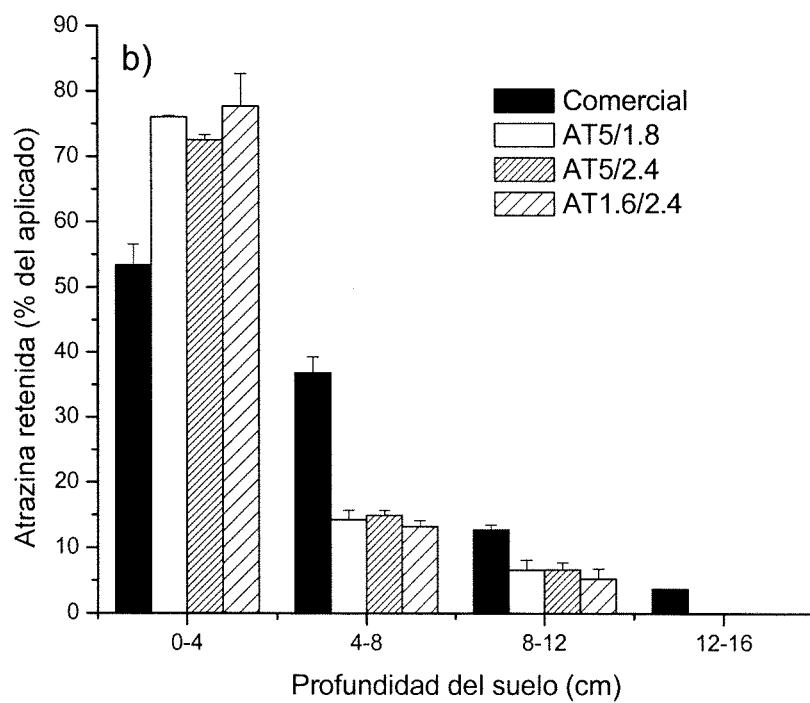
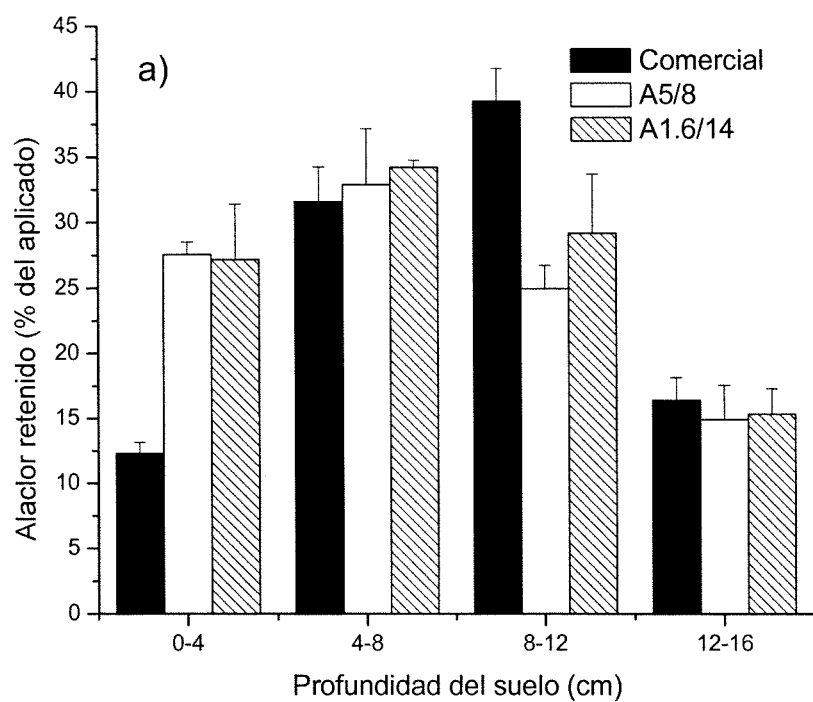


FIG 4

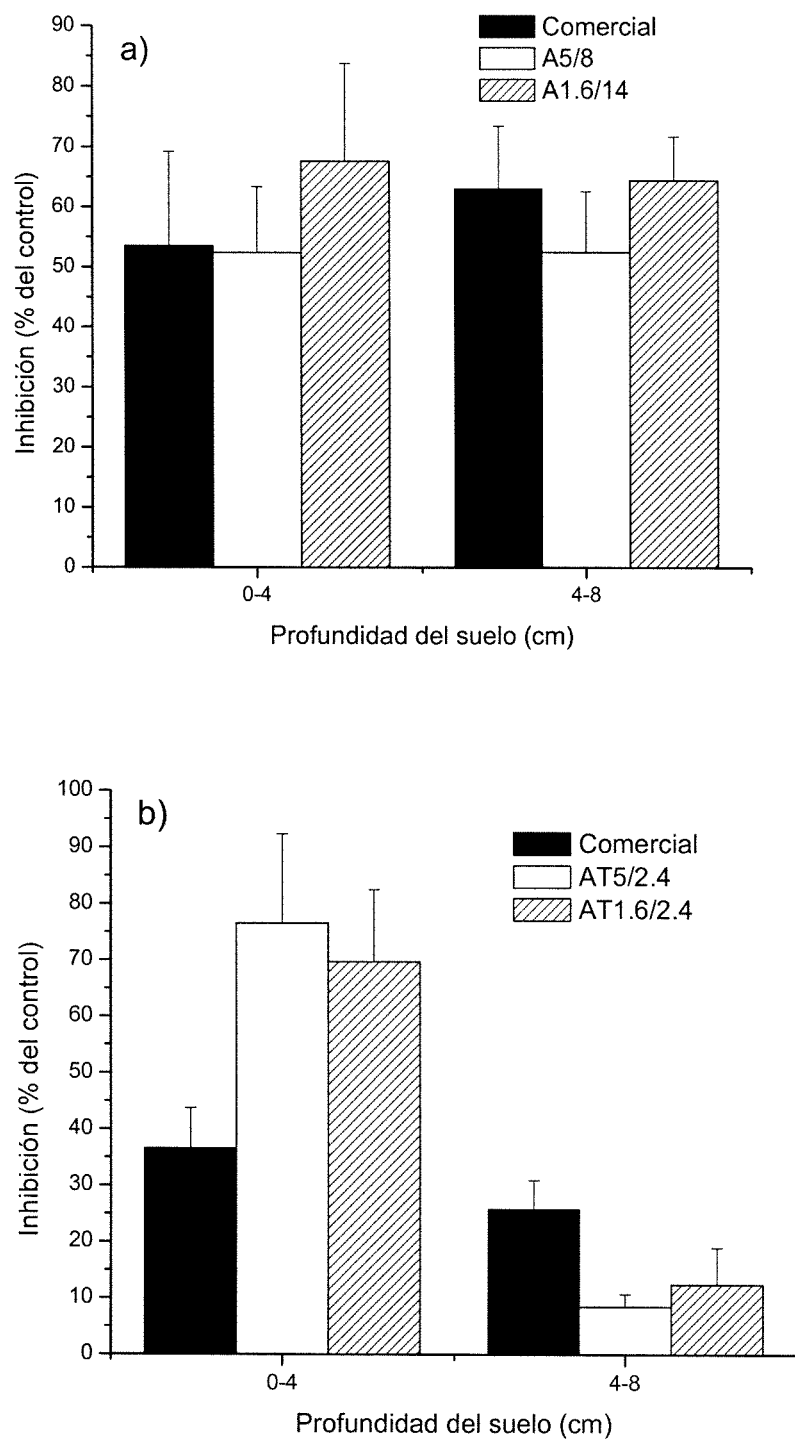


FIG 5

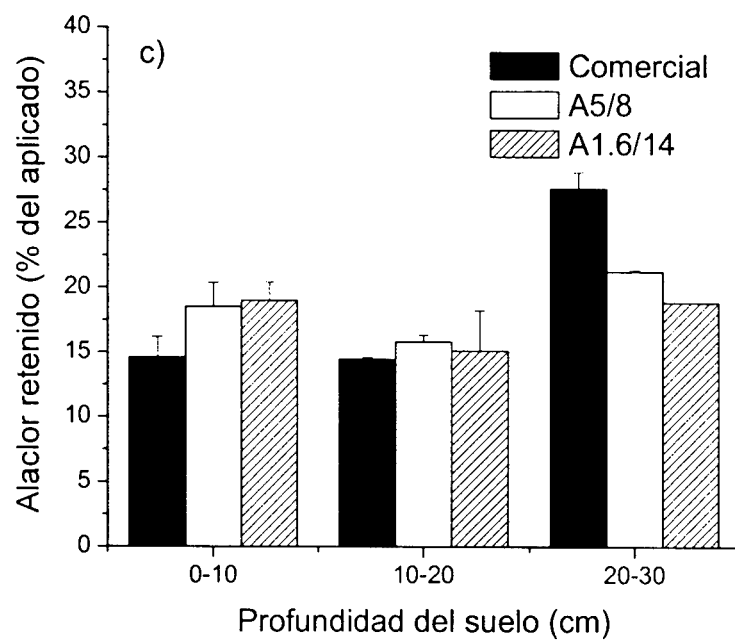
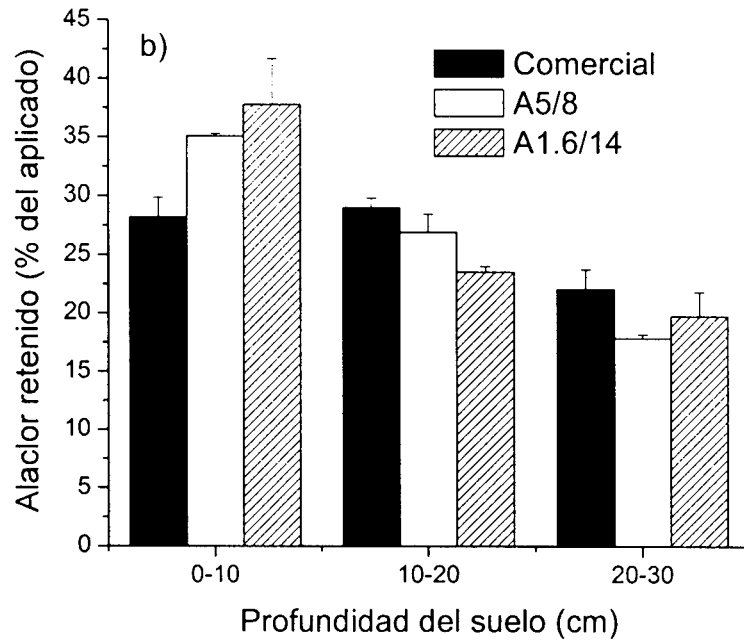


FIG 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 324 809

⑫ Nº de solicitud: 200800380

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 13.02.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **A01N 25/08** (2006.01)
A01N 57/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 02052939 A1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW) 11.07.2002	1-17
A	WO 2007147209 A1 (NUFARM AUSTRALIA LIMITED) 27.12.2007	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.05.2009

Examinador
M. García Poza

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, STN

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.05.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-17	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-17	SÍ
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO02052939	11.07.2002
D02	WO2007147209	27.12.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a una formulación de liberación lenta de plaguicida que comprende un plaguicida unido a vesículas de lípidos neutros, estando dichas vesículas adsorbidas en una arcilla.

El documento D01 divulga una formulación de liberación lenta de herbicidas aniónicos que comprende dichos herbicidas aniónicos incorporados en unas vesículas de lípidos cargados positivamente, estando dichas vesículas adsorbidas por una arcilla. La invención reivindicada difiere de D01 en que mientras la vesícula divulgada en D01 está formada por cationes orgánicos, la vesícula reivindicada está formada por lípidos neutros. Las vesículas formadas por lípidos neutros, además de ser respetuosas con el medioambiente, son capaces de encapsular moléculas de plaguicidas con carga y sin ella, a diferencia de las vesículas cargadas positivamente en las que sólo se pueden incorporar plaguicidas con carga negativa. Así, la invención reivindicada implica un efecto mejorado comparado con el estado de la técnica. Además, no se considera obvio que un experto en la materia obtenga la invención a partir del documento mencionado anteriormente.

El documento D02 divulga una composición herbicida que comprende un herbicida y un fosfolípido soportados por una arcilla. En este documento no hay ningún indicio de que el fosfolípido esté formando vesículas en las que esté incluido el herbicida, ni de que estas vesículas estén adsorbidas por la arcilla, tal y como en la invención reivindicada. Los documentos citados sólo muestran el estado general de la técnica, y no se consideran de particular relevancia. Así, la invención reivindicada se considera que cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1 LP).