

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 699**

51 Int. Cl.:

**C05G 3/00** (2010.01)

**A01N 25/04** (2006.01)

**A01N 25/10** (2006.01)

**C05F 11/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2018 PCT/EP2018/053558**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2018 WO18149825**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2018 E 18706454 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024 EP 3583085**

54 Título: **Método para la preparación de composiciones encapsuladas de sustancias húmicas**

30 Prioridad:

**14.02.2017 ES 201730174**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.10.2024**

73 Titular/es:

**AGRO INNOVATION INTERNATIONAL (50.0%)  
18 avenue Franklin Roosevelt  
35400 Saint-Malo, FR y  
UNIVERSIDAD DE NAVARRA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**URRUTIA SAGARDIA, OSCAR;  
ERRO GARCES, JAVIER;  
FUENTES RAMIREZ, MARTA;  
BAIGORRI EKISOAIN, ROBERTO PEDRO;  
ZAMARREÑO ARREGUI, ÁNGEL MARÍA;  
YVIN, JEAN-CLAUDE y  
GARCIA-MINA FREIRE, JOSE MARIA**

74 Agente/Representante:

**ANGOLOTI BENAVIDES, Joaquín**

ES 2 981 699 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

Método para la preparación de composiciones encapsuladas de sustancias húmicas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para la preparación de un compuesto bioactivo recubierto con sustancia húmica y a partículas de compuesto bioactivo encapsuladas con ácido húmico. La invención tiene su principal aplicación en el campo de la agricultura.

10

**Antecedentes de la invención**

Los compuestos bioactivos tales como agroquímicos, nutraceúticos o fármacos, comúnmente son usados en muchos campos, incluyendo la agricultura, industria alimenticia y medicina.

15

En la agricultura, el uso de composiciones agroquímicas (por ej., fertilizantes) es ampliamente usado para satisfacer las necesidades nutricionales de las plantas y para mejorar los rendimientos de los cultivos. Las composiciones agroquímicas mejoran las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos y, por lo tanto, mejoran el desarrollo de las plantas.

20

Uno de los principales problemas que surge del uso de composiciones agroquímicas es la rápida degradación de los compuestos bioactivos en el suelo. Las composiciones agroquímicas tienden a perder rápidamente sus propiedades debido a la actividad microbiana y procesos físico-químicos como la fijación del suelo u oxidación. Como una consecuencia, la cantidad de compuestos bioactivos disponibles para la planta drásticamente con el tiempo, aumentado el riesgo de deficiencias nutricionales y/o aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades. Para superar estos inconvenientes, los agricultores pueden aumentar las tasas de aplicación de las composiciones agroquímicas o aumentar la cantidad de composiciones agroquímicas. Sin embargo, la aplicación repetida de composiciones agroquímicas y el incremento de la cantidad de composiciones de composiciones agroquímicas aumenta los problemas económicos y medioambientales.

25

Desde un punto de vista económico, proporcionar una cantidad grande de composiciones agroquímicas representa un costo significativo. Desde un punto de vista ambiental, proporcionar una cantidad grande de composiciones agroquímicas podría dañar seriamente el ambiente. El uso excesivo de composiciones agroquímicas da como resultado compuestos bioactivos que se envían a lagos, corrientes, ríos y océanos. Un uso excesivo de composiciones agroquímicas podría también ser tóxico para la planta misma.

30

La industria agroquímica ha desarrollado, por lo tanto, composiciones agroquímicas comprendiendo compuestos bioactivos encapsulados (cuando el ingrediente activo está unido dentro de la macro o supramolécula por fuerzas atractivas débiles) o recubiertos (cuando la superficie molecular del ingrediente activo está recubierta por una membrana, afectando así su dinámica de liberación del medio) con el fin de limitar la degradación de los compuestos bioactivos. Por ejemplo, los polímeros a base de resina y material de poliolefina han sido usados como agentes de recubrimiento (M.E. Trenkel, *Slow-and Controlled-release and stabilized fertilisers (Liberación lenta y controlada y Fertilizantes estabilizados)*, 2010; RW Baker, *Controlled release of biologically active agents (Liberación controlada de agentes biológicamente activos)*, 1987). M. Siyawamwaya et al., *A humic acid-polyquaternium-10 stoichiometric self-assembled fibrilla polyelectrolyte complex: Effect of pH on synthesis, characterization, and drug release (Un complejo polielectrolito estequiométrico con ácido húmico y policuaternio-10 autoensamblado en fibrillas: efecto del pH en la síntesis, la caracterización y la liberación de medicamentos)*, INTERNATIONAL JOURNAL OF POLYMERIC MATERIALS, vol. 65, n.º 11, 23 de julio de 2016, presenta un complejo polielectrolito de ácido húmico y policuaternio-10 para el encapsulado de medicamentos hidrofílicos e hidrofóbicos. Sin embargo, tales agentes de encapsulación o agentes de recubrimiento difícilmente son biodegradables y podrían representar un riesgo para el medio ambiente. Además, la dinámica de liberación de los compuestos bioactivos recubiertos o encapsulados conocidos no es gobernada por la actividad y necesidades de la planta. Desde un punto de vista económico, los agentes de recubrimiento conocidos usualmente son costosos y representan, de esta manera, una inversión significativa.

40

45

50

55

Además, la preparación de un bioactivo recubierto o encapsulado es técnicamente desafiante porque el agente de recubrimiento o agente de encapsulación tiene que proteger eficientemente los compuestos bioactivos de alteración sin dañar el suelo.

60

Por lo tanto, hay una necesidad de proporcionar una composición agroquímica eficiente, barata y amistosa ambientalmente comprendiendo un compuesto bioactivo recubierto o encapsulado.

En este contexto, los inventores han encontrado sorprendentemente que las sustancias húmicas tienen la capacidad de encapsular los compuestos bioactivos. Los inventores han desarrollado, por lo tanto, exitosamente

un método para preparar una composición comprendiendo un compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica.

### Sumario de la invención

5

La presente invención se refiere a un método para preparar una composición comprendiendo un compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica, dicho método comprendiendo los siguientes pasos:

- 10 a) preparar una solución comprendiendo una sustancia húmica y un compuesto bioactivo, dicha solución teniendo un pH mayor o igual a pH 4, preferentemente mayor o igual a pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, preferentemente de pH 8 a pH 10, y
- b) disminuir el pH de la solución a un pH inferior o igual a pH 4, preferentemente a un pH inferior o igual a pH3, preferentemente de pH 1 a pH 2.

### 15 Descripción detallada de la invención

La presente invención resulta de la capacidad de las sustancias húmicas para formar supramoléculas que protegen los compuestos bioactivos de la degradación. El solicitante ha demostrado que en un pH inferior o igual a pH 4 las sustancias húmicas comienzan a flocular mediante el efecto de la acidez y propiedades húmicas en los cambios de superficie de hidrofílico a hidrofóbico. El solicitante ha demostrado que esta propiedad permite la fácil preparación de compuestos bioactivos encapsulados con sustancia húmica. El proceso de encapsulación es accionado tanto por las fuerzas atractivas electrónicas débiles tales como enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals como por procesos termodinámicos favorecidos (efecto hidrofóbico) (Stevenson, F. J., 1994. *Humus Chemistry (Química del Humus)*, Second Edition, Wiley, New York; Tan KH, Humic matter in soil and the environment (Materia húmica en el suelo y el ambiente), 2003).

Las sustancias húmicas (HS: Humic Substances) son biomoléculas tanto con carácter macromolecular como supramolecular (Baigorri R, Fuentes M, Gonzalez-Gaitano G, García-Mina JM. (2007). *Simultaneous presence of diverse molecular patterns in humic substances in solution (Presencia simultánea de diversos patrones moleculares en sustancias húmicas en la solución)*, Journal of Physical Chemistry B. 111(35):10577-82) que constituyen los elementos principales del humus, lo cual representa la materia orgánica natural del suelo (SOM: Organic matter in the soil), en el agua y en depósitos orgánicos geológicos tales como sedimentos de lago, turba, lignitas y esquisto. Ellos son en gran parte responsables del color café de los restos de plantas descompuestos y también contribuyen al color café-negro de la superficie de los suelos. Las HS son, por lo tanto, componentes muy importantes del suelo ya que ellas afectan sus propiedades físicas y químicas y aumentan la fertilidad del suelo. En los sistemas acuáticos, tales como ríos, las HS constituyen aproximadamente 50% de la materia orgánica disuelta y afectan el pH y la alcalinidad.

Las HS son mezclas complejas y heterogéneas de materiales polidispersos formados por reacciones químicas y bioquímicas durante la descomposición y transformación de las plantas y residuos microbianos, los cuales resultan de un proceso conocido como humificación. La lignina de las plantas y sus productos de transformación, así como también los polisacáridos, melanina, cutina, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, partículas finas de residuos de carbonización, son compuestos importantes participando en este proceso de humificación.

45 Estas sustancias, las cuales son de composición heterogénea y compleja, pueden ser divididas en tres fracciones principales, ácidos húmicos (HA o HAs: Humic acids), ácidos fúlvicos (FA o Fas: Fulvic acids) y humina y en sub-fracciones (ácido húmico gris, ácido húmico café, ácido glúcido, ácido úlmico, ácido apocrénico, ácido himatomelánico, etc.) de acuerdo con varios criterios tales como su acidez, su color, su solubilidad, etc.

50 El siguiente esquema es una representación de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias húmicas de acuerdo con Stevenson, F. J., 1994. *Humus Chemistry*, Second Edition, Wiley, New York.

Sustancias húmicas

Ácidos fúlvicos		Ácidos húmicos		Humina
Amarillo pálido	Café amarillento	Café oscuro	Gris-negro	Negro
—————		aumentar en intensidad de color		—————>
—————		aumentar en grado de polimerización		—————>
2000	aumentar en peso molecular		300 000	—————>
45%	aumentar en contenido de carbono		62%	—————>
48%	disminuir en contenido de oxígeno		30%	—————>
1400	disminuir en intercambio de acidez		500	—————>
—————		disminuir en solubilidad		—————>

Las HS contienen grupos aromáticos y poliaromáticos (incluyendo heteroátomos) y dobles enlaces conjugados C=C en residuos alifáticos, grupos ácidos, principalmente grupos fenol y carboxilo, carbonilos y azúcares. Ellos también contienen radicales libres estables. El peso molecular de las HS es entre 2.000 y 300.000 dalton.

5

La distribución de los elementos principales de las HS, obtenida por análisis elemental, es de la siguiente manera: C (35-60%); O (30-50%); H (3-8%); N (0,3-4%); S (0,1-4%). La distribución de los grupos funcionales y dominios estructurales, analizados por <sup>13</sup>C NMR y expresados como porcentaje del carbono total, es de la siguiente manera: alifático insaturado (5-50%); N-alkil metoxi (0,5-15%); carbohidratos (10-50%); aromático (5-50%); carboxílico (5-30%); cetónico (1-15%); fenol (3-10%).

10

Aunque la estructura y las propiedades precisas de un ejemplo dado de HS depende de la fuente del suelo y agua y de las condiciones específicas de extracción, las propiedades promedio de HAs, FAs y humina de diferentes orígenes son, sin embargo, notablemente similares.

15

Las HS pueden ser extraídas de la materia orgánica (turba, leonardita, suelos, abono orgánico (composts) de desecho animal y vegetal, etc.) usando un agente alcalino tal como hidróxido de sodio (NaOH) o hidróxido de potasio (KOH). De esta manera, el extracto orgánico alcalino obtenido puede ser entonces separado por acidificación en HAs (soluble en agua en pH alcalino pero insoluble en pH ácido), FAs (soluble en agua en cualquier pH), y humina (residuo que es insoluble en agua en cualquier pH). De hecho, en contraste con los FAs, los HAs se precipitan al agregar un ácido fuerte (por ejemplo, ajustado a pH 1 con HCl). La humina no puede ser extraída, ni con una base fuerte ni con un ácido fuerte. Los HAs pueden también ser además separados en HAs grises (insolubles en pH neutral y fuerza iónica (ionic strength) sobre 1 M) y HAs café (soluble en pH neutral y fuerza iónica sobre 1 M).

20

25

Las HS acuáticas solamente contienen HAs y FAs y estos compuestos son generalmente removidos del agua al disminuir el pH a 2 y la adsorción de estos compuestos sobre una columna de resina apropiada, por ejemplo, una resina adsorbente de naturaleza polimérica comercializada bajo el nombre Amberlite® XAD. Los HAs y FAs son extraídos de la resina con una base fuerte, luego el pH es disminuido a 1 para precipitar los HAs. La separación sobre una columna de resina (por ejemplo, una resina adsorbente de naturaleza polimérica del tipo XAD) es también usada para separar los FAs del material no húmico extraído de los suelos, tales como amino ácidos, péptidos, azúcares, etc. En pH ácido (3-4), los FAs son absorbidos sobre la resina mientras el material no húmico pasa a través de la columna.

30

Además de estas HS de origen natural, también es posible usar HS sintéticas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, sustancias húmicas oxidadas tales como ácidos oxi-húmicos y oxi-fúlvicos, etc.). Además, las sustancias húmicas pueden resultar de un proceso de síntesis (Hanninen y otros, 1987, *The Science of the Total Environment (La Ciencia del Entorno total)*, 62, 201-210) o de la transformación de sustancias húmicas naturales, especialmente por hemisíntesis. Estas diversas HS pueden ser usadas individualmente o bien como mezclas de diversos tipos de HS.

En el campo de la agricultura, el uso de sustancia húmica tiene muchas ventajas:

- 10 - las sustancias húmicas son con-natural con los ambientes naturales y no tienen ningún riesgo asociado con la toxicidad o contaminación,
- las sustancias húmicas juegan un rol importante en la rizosfera de la planta relacionada con el metabolismo de la planta o la nutrición mineral de la planta. El solicitante ha demostrado que todos estos efectos sobre las plantas resultan de una interacción directa de sustancias húmicas con las células en la superficie de la raíz, siendo necesario una diafonía química entre las supramoléculas húmicas y las raíces. El solicitante ha demostrado ahora que la liberación de compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica tiene lugar cuando la sustancia húmica interactúa con las raíces. Es otra ventaja importante de la presente invención en el campo de la agricultura, ya que la dinámica de liberación divulgada en el arte previo no es gobernada por la actividad de la planta y las necesidades,
- 15 - las sustancias húmicas también tienen el efecto beneficioso en el crecimiento de la planta además de su rol como recubrimiento de compuestos bioactivos. Los procesos tradicionales emplean material de encapsulación o recubrimiento sin ninguna característica aparte de recubrimiento,
- las sustancias húmicas son mucho más baratas que los agentes de recubrimiento usados en los procesos de encapsulamiento o recubrimiento tradicionales.

En algunas realizaciones, la sustancia húmica es seleccionada del grupo compuesto de ácido húmico y ácido fúlvico, preferentemente ácido húmico.

En algunas realizaciones, la sustancia húmica es una supramolécula húmica. Las supramoléculas (también llamadas *supermoleculas*) son sistemas hechos de un número discreto de sub-unidades organizadas interactuando entre sí a través de fuerzas débiles tales como fuerzas intermoleculares, fuerzas electroestáticas o enlace de hidrógeno. Una supramolécula húmica está formada por la asociación química de dos o más moléculas individuales orgánicas naturales las cuales pueden mantenerse juntas a través de enlaces químicos débiles (es decir, enlaces no-covalentes) tales como enlaces de hidrógeno, enlaces de fuerzas de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas.

Las supramoléculas húmicas son bien conocidas por la persona experta y se describen en Piccolo A (2002) *The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science (La estructura supramolecular de sustancias húmicas: un nuevo entendimiento de la química del humus y las implicancias en la ciencia del suelo)*. Adv Agron 75: 57 - 134.

En la presente invención, el término "compuesto bioactivo" se refiere a un compuesto que tiene un efecto en el tejido o célula del organismo vivo. Los compuestos bioactivos pueden afectar las células, tejidos o el organismo completo. Los compuestos bioactivos se encuentran tanto en los productos de la planta como animal o pueden ser producidos sintéticamente. Los compuestos bioactivos pueden tener una influencia sobre la salud de la planta, animal y/o humano y tienen un rol preventivo o curativo. Por ejemplo, un compuesto bioactivo puede ser un fungicida o un anti-microbiano. De acuerdo con la invención, el compuesto bioactivo es un compuesto bioactivo hidrofílico o un compuesto bioactivo hidrofóbico, preferentemente un compuesto bioactivo hidrofóbico.

En una realización preferida de acuerdo con la presente invención, el compuesto bioactivo es un agroquímico. Un "agroquímico" es un químico usado en la agricultura. Podría referirse a (i) pesticidas incluyendo insecticidas, herbicidas, fungicidas y nematicidas o (ii) fertilizantes, hormonas y otros agentes químicos de crecimiento.

En algunas realizaciones, el compuesto activo, es orgánico o sintético. Podría ser seleccionado del grupo compuesto de:

- un metabolito de la planta, tal como aminoácidos, hormonas de la planta, fenoles, aceites esenciales, lípidos, antioxidantes, flavonoles, flavonoides o fitoalexinas;
- un aceite esencial tal como un aceite vegetal esencial tal como, timol, eugenol, carvacrol, cinamaldehído, aceite de ajo y/o aceite de neem;
- un extracto de plantas, tales como extracto de sauce;
- un microorganismo, tal como levaduras y/o bacteria, tales como la bacteria de fijación N (rhizobium, azospirillum), bacillus sp, pseudomonas sp y/o Micorriza-inóculo (esporas);
- una enzima tal como fitasa y/o esterases;

- un fármaco como un fungicida y/o un insecticida;
- un nutracéutico tal como betaglucanos; y/o
- un agroquímico, tal como pesticidas generales.

5 Dependiendo del compuesto bioactivo, la composición preparada por el método de la invención puede ser una composición agroquímica, una composición nutracéutica y/o una composición farmacéutica. Por ejemplo, una composición agroquímica podría ser preferentemente un bioestimulante, un biopesticida, un bioestimulante del crecimiento de la planta, una composición de nutrición mineral de la planta y/o composición de salud de la planta.

10 En una realización preferida, la sustancia activa no es un ión, por ejemplo, la sustancia activa no es un ión metálico.

Método para preparar una composición comprendiendo un compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica

15 La descripción, no de acuerdo con la invención, se refiere a un método para preparar una composición comprendiendo un compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica, dicho método comprendiendo la preparación de una solución comprendiendo una sustancia húmica y un compuesto bioactivo, dicha solución teniendo un pH inferior o igual a pH 4, preferentemente un pH inferior o igual a pH 3, pH 2, preferentemente de pH 1 a pH 2.

La presente invención se refiere a un método para preparar una composición comprendiendo un compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica, dicho método comprendiendo los siguientes pasos:

- 25 a) preparar una solución comprendiendo una sustancia húmica y un compuesto bioactivo, dicha solución teniendo un pH mayor o igual a pH 4, preferentemente mayor o igual a pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, preferentemente de pH 8 a pH 10, y
- 30 b) disminuir el pH de la solución a un pH inferior o igual a pH 4, preferentemente a un pH inferior o igual a Ph 3, pH 2 preferentemente de pH 1 a pH 2.

La solución preparada en el paso a) es preferentemente una solución homogénea. La preparación de la solución del paso a) no requiere ningún esfuerzo particular por parte de la persona experta. La solución puede ser preparada, por ejemplo, y sin limitación, de la siguiente manera:

- 35 - Una cantidad deseada de una sustancia húmica (o una mezcla de diversas sustancias húmicas) es disuelta en agua con una solución de agua básica para obtener una solución de agua de sustancia húmica. Un compuesto bioactivo es luego mezclado en una forma líquida a la solución de agua de sustancia húmica para obtener la solución del paso a).
- 40 - Una cantidad deseada de una sustancia húmica (o una mezcla de diversas sustancias húmicas) es disuelta en agua con una solución de agua básica para obtener una solución de agua de sustancia húmica. Un compuesto bioactivo es luego mezclado en una forma sólida, preferentemente un polvo de un compuesto bioactivo, con la solución de agua de sustancia húmica para obtener la solución del paso a). Preferentemente, más del 80% de las partículas haciendo el polvo del compuesto bioactivo tienen un diámetro menor a 3.000 µm, por ejemplo, menor a 500 µm.
- 45 - Una cantidad deseada de un polvo de una sustancia húmica (o una mezcla de diversas sustancias húmicas) es mezclada a un polvo de un compuesto bioactivo, para obtener un polvo homogéneo. El polvo homogéneo es luego agregado a un volumen apropiado de agua para obtener la solución del paso a). Preferentemente, más del 80% de las partículas haciendo el polvo de sustancia húmica y el polvo de compuesto bioactivo tienen un diámetro menor a 3.000 µm, por ejemplo, menor a 500 µm.
- 50 - Una cantidad deseada de un polvo de una sustancia húmica (o una mezcla de diversas sustancias húmicas) es mezclada a una solución de compuesto bioactivo para obtener la solución del paso a). Preferentemente, más del 80% de las partículas haciendo el polvo de sustancia húmica tienen un diámetro menor a 3.000 µm, por ejemplo, menor a 500 µm.

55 Si es necesario, durante la preparación de la solución del paso a), el pH es aumentado al pH objetivo usando una base inorgánica (por ej., hidróxido de sodio o hidróxido de potasio) y/o una base orgánica (por ej., etanolamina).

60 En algunas realizaciones, la preparación de la solución del paso a) es realizada a temperatura ambiente y a presión atmosférica.

En algunas realizaciones, la proporción de sustancia húmica a compuesto bioactivo es de 1:0,01 a 1:0,2 en peso, preferentemente de 1:0,03 a 1:0,2, más preferentemente de 1:0,05 a 1:0,1.

En algunas realizaciones, el pH es disminuido en el paso b) por la adición de un ácido mineral, preferentemente ácido sulfúrico. El pH es disminuido bajo agitación continua, eventualmente mezclado, durante un periodo de tiempo apropiado para obtener la composición comprendiendo un compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica.

5

Generalmente, la sustancia húmica y el compuesto bioactivo son mezclados usando cualquier tipo de adaptador de agitación para mezclar líquidos con líquidos, polvo con líquidos o polvo con polvo. El tiempo de mezclado depende de las propiedades fisicoquímicas del compuesto bioactivo y la actividad biológica. Por ejemplo, el tiempo de mezclado podría ser de 10 minutos a 60 minutos.

10

En una realización específica, el método, además comprende los siguientes pasos:

c) tratar la solución obtenida en el paso b) con ultrasonido para formar un gel y eventualmente

15

d) mezclar el gel en agua, preferentemente con uno o más agentes dispersantes.

El paso c) puede ser implementado después del paso b) o simultáneamente al paso d).

20

El tratamiento ultrasónico consiste generalmente de la aplicación de 0,5-50 W/cm<sup>3</sup> de ultrasonido del polvo por un periodo de tiempo apropiado, por ejemplo, de 5 minutos a 15 minutos.

25

En algunas realizaciones, el agente dispersante es arcilla y/o surfactante orgánico, por ejemplo, un activador polar tal como glicerol o derivados de glicerol. El uso de arcilla es particularmente ventajoso en el campo de la agricultura. Preferentemente, la concentración de agente dispersante es 0,05% a 3% en peso referido a la composición final.

30

El tiempo de cada uno de los pasos del proceso no está particularmente limitado y podría ser adaptado por la persona experta de acuerdo con las necesidades. Un tiempo apropiado para un paso específico podría ser de uno o más minutos a una o más horas. No hay dificultad para la persona experta en adaptar el tiempo para cada paso.

35

La temperatura del método es preferentemente temperatura ambiente (desde 22 °C a 26 °C). Como tal, el método proporciona ventajosamente consumo de energía relativamente bajo (ninguno). Sin embargo, la persona experta podría adaptar la temperatura a la necesidad.

40

La descripción, no de acuerdo con la invención, también se refiere a un método para preparar una composición comprendiendo un compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica, dicho método comprendiendo los siguientes pasos:

- a) preparar una solución comprendiendo un compuesto húmico, dicha solución teniendo un pH inferior o igual a pH4, preferentemente un pH inferior o igual a pH 3, pH 2, preferentemente de pH 1 a pH 2, y  
b) agregar un compuesto bioactivo a la solución obtenida en el paso a).

45

En este método, no de acuerdo con la invención, la solución del paso a) puede prepararse mezclando una solución de agua (o un polvo) conteniendo la sustancia húmica y una solución ácida. Opcionalmente, la solución ácida es una solución de ácido mineral, preferentemente una solución de ácido sulfúrico. Opcionalmente, el mezclado es una agitación continua.

50

En este método, no de acuerdo con la invención, el compuesto bioactivo puede ser gradualmente agregado sobre la solución obtenida en el paso a) bajo agitación continua durante un periodo de tiempo apropiado para obtener la composición comprendiendo un compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica.

En esta alternativa, el método puede además comprender los siguientes pasos:

55

- c) tratar la solución obtenida en el paso b) con ultrasonido para formar un gel y eventualmente  
d) mezclar el gel en agua, preferentemente con uno o más agentes dispersantes.

El paso c) puede ser implementado después del paso b) o simultáneamente al paso d).

60

El tratamiento ultrasónico consiste generalmente de la aplicación de 0,5-50 W/cm<sup>3</sup> de ultrasonido del polvo por un periodo de tiempo apropiado, por ejemplo, de 5 minutos a 15 minutos.

Opcionalmente, el agente dispersante es arcilla y/o surfactante orgánico, por ejemplo, un activador polar tal como glicerol o derivados de glicerol. El uso de arcilla es particularmente ventajoso en el campo de la agricultura.

Partículas de compuesto activo encapsulado con ácido húmico y composición, no de acuerdo con la invención

5 La presente descripción, no de acuerdo con la invención, también se refiere a partículas de compuesto activo encapsulado con sustancia húmica comprendiendo:

- (i) un núcleo comprendiendo un compuesto bioactivo, y
- (ii) una sustancia húmica encapsulando el núcleo.

10 La presente descripción, no de acuerdo con la invención, también se refiere a partículas de compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica obtenible por el método de la invención comprendiendo:

- (i) un núcleo comprendiendo un compuesto bioactivo, y
- (ii) una sustancia húmica encapsulando el núcleo.

20 Según lo usado aquí, el término "partículas" no está particularmente limitado y pretende incluir las partículas de cualquier forma. Por ejemplo, pero sin limitación, el término pretende incluir dentro de su alcance partículas regulares o irregulares (es decir, no esféricas), incluyendo partículas lamelares.

Según lo detallado arriba, la sustancia húmica es seleccionada del grupo compuesto de ácido húmico y ácido fúlvico, preferentemente ácido húmico.

25 Según lo detallado arriba, el compuesto bioactivo es un compuesto bioactivo hidrofílico o un compuesto bioactivo hidrofóbico, preferentemente un compuesto bioactivo hidrofóbico. En algunas realizaciones, el compuesto bioactivo es seleccionado del grupo compuesto de:

- 30 - un metabolito de la planta, tal como aminoácidos, hormonas de la planta, fenoles, aceites esenciales, lípidos, antioxidantes, flavonoles, flavonoides o fitoalexinas;
- un aceite esencial tal como un aceite vegetal esencial tal como, timol, eugenol, carvacrol, cinamaldehído, aceite de ajo y/o aceite de neem;
- 35 - un extracto de plantas, tales como extracto de sauce;
- un microorganismo, tal como levaduras y/o bacteria, tales como la bacteria de fijación N (rhizobium, azospirillum), bacillus sp, pseudomonas sp y/o Micorriza-inóculo (esporas);
- 40 - una enzima tal como fitasa y/o esterases;
- un fármaco como un fungicida y/o un insecticida;
- un nutracéutico tal como betaglucanos; y/o
- 45 - un agroquímico, tal como pesticidas generales.

50 Según lo detallado arriba, la proporción de sustancia húmica a compuesto bioactivo es de 1:0,01 a 1:0,2 en peso, preferentemente de 1:0,03 a 1:0,2, más preferentemente de 1:0,05 a 1:0,1.

Las partículas bioactivas encapsuladas con ácido húmico pueden tener una distribución de tamaño de partícula de 100 a 100.000 nm, por ejemplo, de 500 a 5.000 nm, por ejemplo, de 1.000 a 3.000 nm. La distribución de tamaño de partícula podría ser determinada usando métodos bien conocidos en el arte, por ejemplo, dispersión dinámica de luz (DLS: Dynamic Light Scattering).

55 La presente descripción, no de acuerdo con la invención, también se refiere a una composición comprendiendo las partículas de compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica de acuerdo con la descripción y un portador apropiado.

60 La composición podría ser (i) una composición agroquímica, preferentemente un bioestimulante, biopesticida, bioestimulante del crecimiento de la planta, nutrición mineral de la planta o salud de la planta, biopesticida, (ii) una composición nutracéutica o (iii) una composición farmacéutica.

Una composición agroquímica podría comprender un portador apropiado tal como un mineral o un dispersante

(surfactante) natural o sintético (orgánico o inorgánico). Una composición agroquímica podría también comprender, por lo menos, un nutriente de la planta. Por lo menos, el nutriente de la planta de las realizaciones aquí podría incluir nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre, magnesio, boro, cobre, hierro, cloruro, manganeso, molibdeno, zinc, un precursor de allí o una combinación de allí. En algunas realizaciones, el nutriente de la planta podría ser boro, ácido bórico, octaborato de sodio tetrahidratado, borato de calcio, borato de magnesio, borosilicato de sodio, tetraborato de sodio decahidratado, borato de sodio, tetraborato de sodio, tetraborato de disodio o una combinación de allí. En algunas realizaciones, el nutriente de la planta podría incluir cal, yeso, superfosfato, sulfato de hierro, quelato de hierro, ferritina, óxido de zinc, sulfato de zinc, quelato de zinc, nitrato de potasio, nitrato de calcio, nitrato de magnesio, fosfato monoamónico, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, fosfato monopotásico, carbonato de calcio, sulfato de nitrato de amonio, tiosulfato de amonio, amoníaco acuoso, cianamida de calcio, crotonilidendiurea, diaciandiamida, isobutilidendiurea, nitrato de sodio, carbonato de potasio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio potásico, metafosfato de potasio, sulfato de potasio, cloruro de calcio, óxido de calcio, caliza calcítica, caliza dolomítica, fosfato de magnesio de amonio, óxido de magnesio, quelatos de cobre, fosfato de amonio cúprico, sulfato de cobre, fritas de cobre, poliflavonoide de cobre, malaquita, azurita, óxido cuproso, óxido cúprico, acetato cúprico, ácido bórico, tetraborato de sodio, tetraborato de sodio decahidratado, frita de boro, borosilicato de sodio, borato de calcio, borato de magnesio, borato de sodio, octaborato de disodio tetrahidratado, tetraborato disódico, sulfato férrico, sulfato ferroso, sulfato de amonio ferroso, fosfato de amonio ferroso, oxalato ferroso, carbonato ferroso, quelato de hierro, lignosulfonato de hierro, poliflavonoide de hierro, fritas de hierro, metoxifenilpropano de hierro, óxido ferroso, polifosfato de amonio de hierro, óxido de manganeso, manganeso metoxifenil propano, fritas de manganeso, cloruro de manganeso, carbonato de manganeso, sulfato de manganeso, quelato de manganeso, fosfato de amonio de manganeso, poliflavonoide de manganeso, molibdato de amonio, molibdato de sodio, frita de molibdeno, trióxido de molibdeno, sulfuro de molibdeno, frita de zinc, carbonato de zinc, fosfato de zinc, fosfato de amonio de zinc, lignosulfonato de zinc, poliflavonoide de zinc o una combinación de allí.

Una composición nutracéutica podría comprender un portador apropiado tal como un mineral o un dispersante (surfactante) natural o sintético (orgánico o inorgánico).

Una composición farmacéutica podría comprender un portador apropiado tal como un portador farmacéuticamente aceptable.

La composición podría tener cualquier forma apropiada, por ejemplo, dependiente de la aplicación particular de la composición. Opcionalmente, las partículas encapsuladas están en una forma sólida de una líquida, por ejemplo, en la forma de un polvo granular, un gel, dispersión o una pasta.

La composición podría ser una suspensión o dispersión en agua, por ejemplo, con un portador tal como un mineral o agente dispersante natural o sintético. Opcionalmente, la composición podría ser un polvo, por ejemplo, absorbido en un portador tal como arcillas, silicatos o polímeros.

La descripción, no de acuerdo con la invención, también proporciona un método para tratar una deficiencia de nutrientes de plantas. Dicho método podría incluir administrar la composición agroquímica de la descripción. La composición agroquímica podría ser administrada en una cantidad de tal modo que es efectiva para tratar la deficiencia de nutrientes de la planta sin causar toxicidad. La composición agroquímica podría ser administrada como un spray, hidroponía, aeroponía, tratamiento de semilla, inmersión de raíz de plántulas, cultivo de tejido, cultivo in vitro, aplicación con agua de riego o una combinación de allí.

### Descripción de las figuras

**Figura 1:** Diagrama mostrando el flujo operacional.

**Figura 2:** Análisis elemental y  $^{13}\text{C}$ -NMR de ácido húmico usado en el Ejemplo 1 y 2.

**Figura 3:** Análisis de dispersión dinámica de luz (DLS) del tamaño de ácido húmico usado en el Ejemplo 1 y 2.

**Figura 4:** Estructura de modelo primario para el ácido húmico en el Ejemplo 1 y 2.

**Figura 5:** Cuadro mostrando la solución comprendiendo el humato potásico y el aceite esencial (EO) (Solución A). Este cuadro muestra la separación de fase entre el humato potásico y EO (gotitas de aceite EO pequeñas flotando sobre la superficie de la solución de humato potásico).

**Figura 6:** Cuadro mostrando la comparación entre el humato potásico y la mezcla de EO antes del recubrimiento, y el hidrogel EO encapsulado con ácido húmico después del recubrimiento.

## EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de una composición de aceite esencial de *Origanum vulgare* encapsulado con ácido húmico

Una solución de agua conteniendo 14% en peso de humato potásico (sal de potasio de ácido húmico) se preparó disolviendo 50 kg de humato potásico sólido en 300 litros de agua bajo agitación continua a temperatura ambiente (22-26 °C) y a presión atmosférica. La solución se agitó durante 2 horas para obtener una solución estable de humato potásico en pH 8,5.

La solución de humato potásico se analizó por su contenido de elemento (figura 2), según lo detallado en la tabla 1 y tabla 2.

Tabla 1: Análisis elemental de ácido húmico contenido en la solución de humato potásico usado en los ejemplos 1 y 2.

Elemento	%C	%H	%N	%S	%O*
Ácido húmico	48,2	2,99	0,98	0,14	47,7
* O es calculado por diferencia					

Tabla 2: <sup>13</sup>C-NMR para ácido húmico contenido en la solución de humato potásico usado en los ejemplos 1 y 2.

Región (% C)	Alquilo C	O-Alquilo C	Aromático C	Fenólico C	Carboxílico C	Carbonílico C
ppm	0-45	45-110	110-160	140-160	160-190	190-230
Ácido húmico	31,4	14,4	38,6	14,7	11,6	3,9

2,5 litros de aceite esencial de *Origanum vulgare* (EO) se agregaron progresivamente sobre la solución de humato potásico bajo agitación continua.

La solución comprendiendo el humato potásico y el EO (Solución A) se agitó luego durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-26 °C). El pH de la solución A fue pH 8,5.

El pH de la solución A fue luego disminuido a un pH entre pH1 y pH2 agregando progresivamente ácido sulfúrico diluido (53°B) bajo agitación continua y tratamiento de ultrasonido en continuo paralelo (2W/cm<sup>3</sup> para 50L/min) durante 3 horas. El pH de la solución se midió regularmente para asegurar que el pH estuviese entre pH 1 y pH 2. La Figura 1 es un diagrama del flujo de la operación.

El proceso lleva a la información de un gel estable de EO encapsulado con ácido húmico, también llamado hidrogel de EO encapsulado con ácido húmico (ver figura 6).

El gel se dispersó luego en agua agregando 100 litros de agua y 5 kg de sepiolita micronizada (Pangel de TOLSA SA) bajo agitación continua usando un rotor de alto cizallamiento durante 1 hora.

Con el fin de evaluar el % de EO que se encapsuló en la molécula húmica, la dispersión fue luego centrifugada y el sobrenadante, conteniendo EO libre, fue tratado con hexano (1:1) con el fin de extraer EO libre del sobrenadante. Después de eso, el EO en el hexano fue analizado por espectroscopía de fluorescencia. Los resultados demostraron que el rendimiento de EO encapsulado el ácido húmico fue 84,7 %.

Ejemplo 2: Preparación de una composición de extracto de sauce encapsulado con ácido húmico

Una solución de agua conteniendo 14% en peso de humato potásico se preparó disolviendo 50 kg de humato potásico sólido en 300 litros de agua bajo agitación continua a temperatura ambiente (22-26 °C) y a presión atmosférica durante 2 horas. La solución se agitó durante 2 horas para obtener una solución estable de humato potásico en pH 8,5.

2,5 kg de extracto de sauce (WE: Willow Extract) se dispersaron en 50 litros de agua bajo agitación continua a temperatura ambiente (22-26 °C) y a presión atmosférica. La dispersión de WE fue agregada progresivamente sobre la solución de humato potásico bajo agitación continua.

La solución comprendiendo el humato potásico y el WE (Solución A) se agitó durante 30 minutos. El pH de la solución A fue pH 8,5.

El pH de la solución A fue luego disminuido a un pH entre pH 1 y pH 2 agregando ácido sulfúrico diluido (53°B) bajo agitación continua convencional y tratamiento de ultrasonido en continuo paralelo (2W/cm<sup>3</sup> para 50L/min) durante 15 min. El pH de la solución se midió regularmente para asegurar que el pH estuviese entre pH 1 y pH 2. La Figura 1 es un diagrama del flujo de la operación.

5 El proceso llevó a la información de un gel comprendiendo WE encapsulado con ácido húmico, también llamado hidrogel de WO encapsulado con ácido húmico.

10 El gel fue luego dispersado en agua agregando 50 litros de agua y 5 kg de sepiolita micronizada bajo agitación continua usando un rotor de alto cizallamiento durante 1 hora.

15 La dispersión fue luego centrifugada y el sobrenadante, conteniendo WE libre, fue removido. El rendimiento de WE (salicina y salicilatos) encapsulado con ácido húmico fue medido con fluorescencia HPLC y se encontró que era de 100%.

## REFERENCIAS

20 Piccolo A (2002) *The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science*. Adv Agron 75: 57-134

Stevenson FJ (1994) *Humus chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, Ed Second. Wiley, Estados Unidos de América.

25 Trenkel ME (2010) *Slow- and controlled- release and stabilized fertilizers*. Asociación Internacional de la Industria de Fertilizantes (IFA: International Fertilizer Industry Association), París.

Hanninen y otros, 1987, *The Science of the Total Environment*, 62, 201-210

30 RW Baker, *Controlled release of biologically active agents*, 1987

Tan KH, *Humic matter in soil and the environment*. 2003

35 Baigorri R, Fuentes M, Gonzalez-Gaitano G, García-Mina JM. (2007) *Simultaneous presence of diverse molecular patterns in humic substances in solution*. Journal of Physical Chemistry B. 111(35):10577-82

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para preparar una composición comprendiendo un compuesto bioactivo encapsulado con sustancia húmica, dicho método comprendiendo los siguientes pasos:
- 10 a) preparar una solución comprendiendo una sustancia húmica y un compuesto bioactivo, dicha solución teniendo un pH mayor o igual a pH 4, preferentemente mayor o igual a pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, preferentemente de pH 8 a pH 10, y
- 10 b) disminuir el pH de la solución a un pH inferior o igual a pH 4, preferentemente a un pH inferior o igual a pH 3, pH 2, preferentemente de pH 1 a pH 2.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición es una composición agroquímica, una composición nutracéutica o una composición farmacéutica.
- 15 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la sustancia húmica es una supramolécula húmica.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la sustancia húmica es seleccionada del grupo compuesto de ácido húmico y ácido fúlvico, preferentemente ácido húmico.
- 20 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto bioactivo es un compuesto bioactivo hidrofóbico, preferentemente seleccionado del grupo compuesto de:
- 25 - un metabolito de la planta, tal como aminoácidos, hormonas de la planta, fenoles, aceites esenciales, lípidos, antioxidantes, flavonoles, flavonoides o fitoalexinas;
- un aceite esencial tal como un aceite vegetal esencial tal como, timol, eugenol, carvacrol, cinamaldehído, aceite de ajo y/o aceite de neem;
- 30 - un extracto de plantas, tales como extracto de sauce;
- un microorganismo, tal como levaduras y/o bacterias, tales como la bacteria de fijación N (rhizobium, azospirillum), bacillus sp, pseudomonas sp y/o Micorriza-inóculo (esporas);
- una enzima tal como fitasa y/o esterases;
- un fármaco como un fungicida y/o un insecticida;
- 35 - un nutracéutico tal como betaglucanos; y/o
- un agroquímico, tal como pesticidas generales.
- 40 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proporción de sustancia húmica a compuesto bioactivo es de 1:0,01 a 1:0,2 en peso, preferentemente de 1:0,03 a 1:0,2, más preferentemente de 1:0,05 a 1:0,1.
- 40 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el pH es disminuido agregando un ácido mineral, preferentemente ácido sulfúrico.
- 45 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el método además comprende los siguientes pasos:
- c) tratar la solución obtenida en el paso b) con ultrasonido para formar un gel y eventualmente
- d) mezclar el gel en agua, preferentemente con uno o más agentes dispersantes.

Figura 1

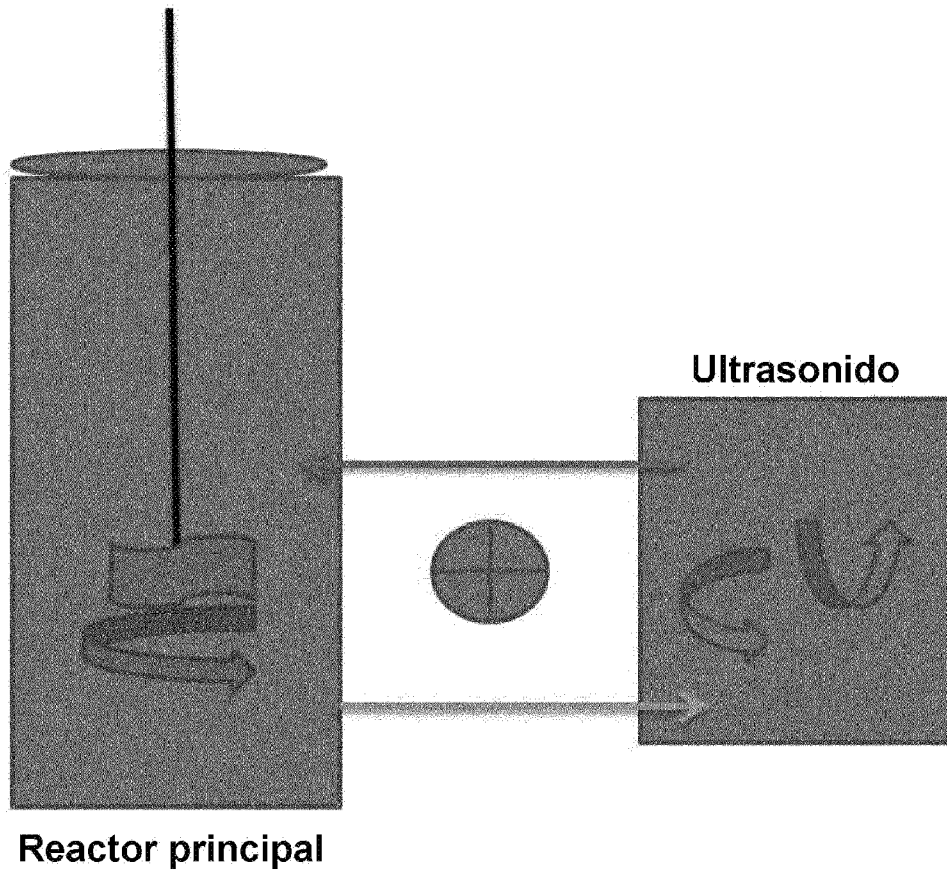


Figura 2

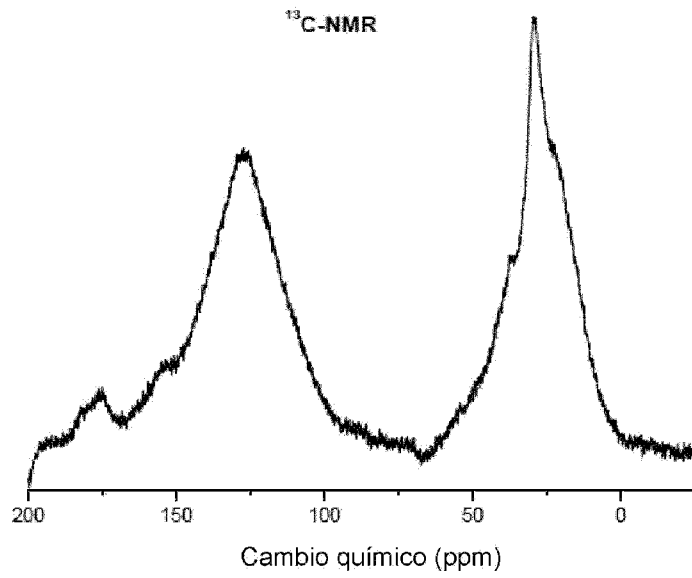


Figura 3

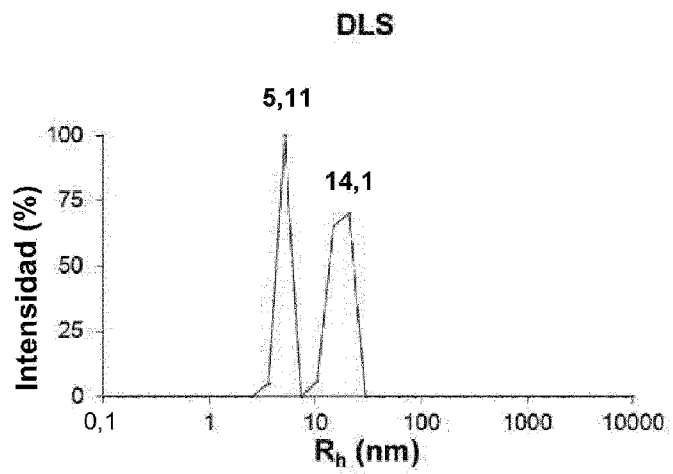
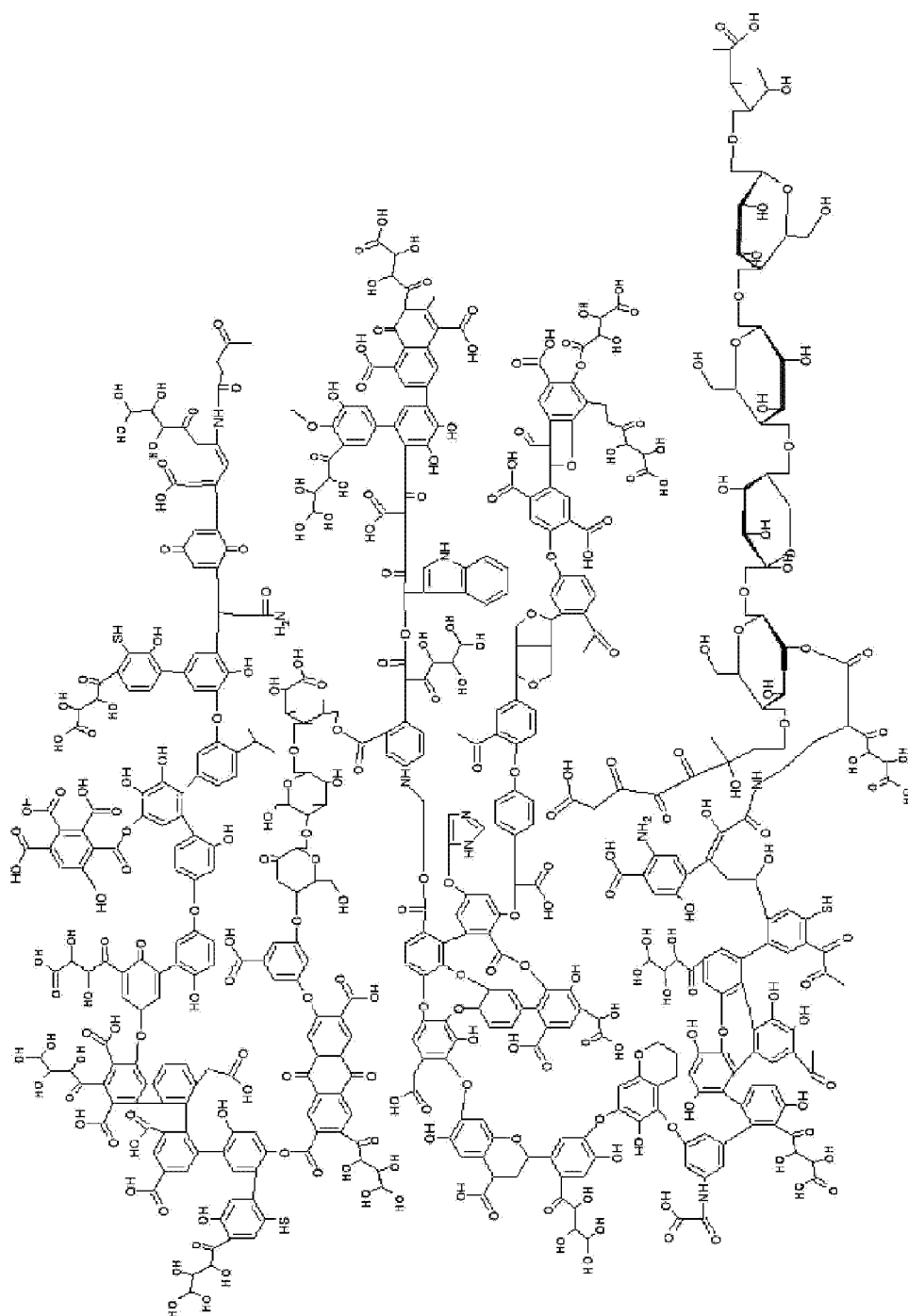
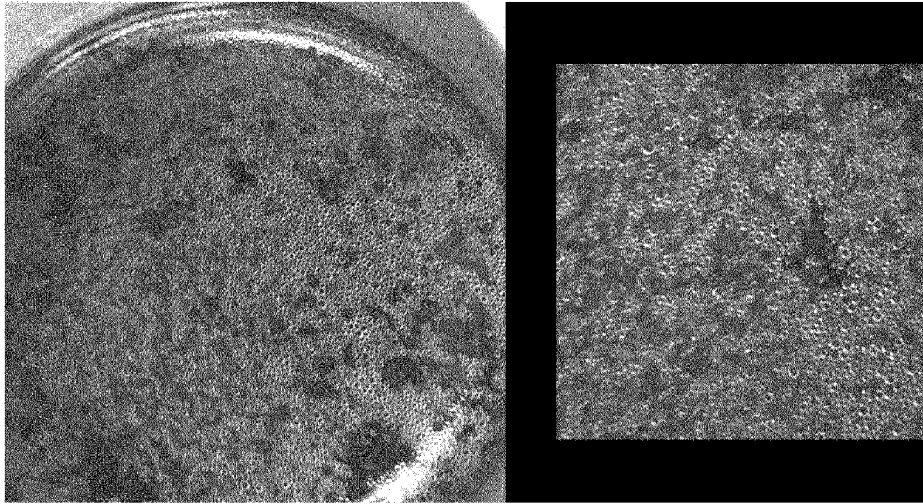


Figura 4



**Figura 5**



**Figura 6**

