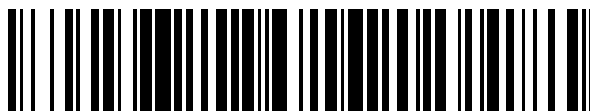


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 142**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/22** (2006.01)

**C09D 5/16** (2006.01)

**A01P 15/00** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

**A01N 43/80** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09764286 .2**

96 Fecha de presentación: **18.09.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2343975**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2011**

54 Título: **Composiciones antiincrustantes de espinosina, procedimientos de uso de las mismas y artículos protegidos de la adhesión de organismos bioincrustantes**

30 Prioridad:

**22.09.2008 US 99053 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**05.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**05.12.2012**

73 Titular/es:

**ENTARCO SA (50.0%)  
Eleftherias & Melpomenis 15th Klm. Highway  
Athens-Lamia  
145 64 Kifissia, GR y  
KRITIKOU, CHRISTINE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KRITIKOU, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

ES 2 392 142 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

Composiciones antiincrustantes de espinosina, procedimientos de uso de las mismas y artículos protegidos de la adhesión de organismos bioincrustantes.

5

Este solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente de Estados Unidos N° 61/099.053, presentada el 22 de septiembre de 2008.

La presente invención se refiere a composiciones de revestimiento de espinosina que imparten propiedades antiincrustantes en el agua marina o el agua dulce. Las composiciones de revestimiento prestan protección superficial a las superficies revestidas con las mismas contra la adhesión de diversos organismos bioincrustantes. Estas composiciones se usan ventajosamente en formulaciones de pinturas, barnices, imprimaciones y selladores.

10

Los biocidas se usan comúnmente en una diversidad de material de revestimiento que tienen diversas aplicaciones.

15

En las pinturas marinas, por ejemplo, los biocidas protegen las estructuras que están bajo el agua de la adhesión de una amplia variedad de organismos bioincrustantes, tales como algas, percebes, gusanos de barco y otras especies acuáticas molestas. En los lagos y ríos, los biocidas se usan para proteger las estructuras que están bajo el agua de los organismos de agua dulce, tales como los mejillones cebra. Se ha descubierto que los microorganismos, sus productos bio-orgánicos viscoso y la materia orgánica absorbida constituyen un lodo tenaz que se forma sobre las superficies de las estructuras sumergidas. Los organismos iniciales en esta secuencia incrustante son bacterias seguidos de una progresión biótica de diatomeas, hidroides, algas, briozoos, protozoos y finalmente macroincrustantes. Los macroincrustantes tienden a ser rugófilos, es decir, se asientan sobre superficie ásperas en preferencia a las superficies lisas.

20

25

El caso de una nave está constantemente sumergido en el agua durante varios años y la acumulación de estos mismos organismos marinos puede conducir a una resistencia hidrodinámica significativa sobre la nave. Esta resistencia sobre una nave impide su paso a través del agua dando como resultado un aumento del uso de combustible, causando mayores costes operativos y medioambientales mayores. Se ha estimado que costaría a la industria Se ha estimado que le costaría a la industria naviera 3 billones de dólares anualmente adicionales en combustible si los cascos de los barcos se dejaran sin tratar. Los costes adicionales se producen cuando la nave se coloca en el varadero. Estos incluyen el coste de limpieza del casco y el tiempo de inactividad, que se estima en 2,7 millones de dólares anualmente. Además, los costes ambientales no sólo resultan de un aumento del consumo de combustibles fósiles (un recurso no renovable) sino también de mayores cantidades de dióxido de carbono (un gas de efecto invernadero) y otros contaminantes atmosféricos (óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, hidrocarburos no quemados, ozono etc.). Rouhi, A. Maureen; The Squeeze on Tributyltins. Chem. Eng. News. 27 de abril de 1998, 41-42.

30

35

El problema de la incrustación no se limita a los barcos, sino que se extiende también no obstante a otras estructuras que están bajo el agua. Las boyas pueden desplazarse debido al peso excesivo de los organismos incrustantes. La incrustación de rejillas de admisión de los sistemas de suministro de agua municipal pueden producir una reducción de los caudales y una aceleración de la corrosión. Las estructuras de hormigón u hormigón armado, por ejemplo, las presas, también se ven afectadas por organismos bioincrustantes.

40

45

Un biocida antiincrustante ideal debería ser eficaz, mostrar actividad de amplio espectro y debería ser estable en el producto formulado final. Además, el biocida ideal debería tener las siguientes características medioambientales: i) rápida degradación en el entorno, ii) rápida división en el entorno, dando como resultado una biodisponibilidad limitada para los organismos no objetivo, iii) mínima toxicidad para los organismos no objetivo en las concentraciones presentes en entorno, iv) mínima bioacumulación de compuestos toxicológicamente significativos.

50

55

La protección del medio ambiente es un tema importante, considerando que el volumen de pinturas antiincrustantes usadas en todo el mundo es muy alta. De acuerdo con GEFSEC PROJECT ID 2932 (Alternatives to DDT usage in the production of antifouling paint), China, por ejemplo, se consumen anualmente aproximadamente 65.000 MT de pintura antiincrustante. Debido a la preocupación por el medio ambiente, se ha prohibido la aplicación de pinturas a base de triorganoestaño. Las pinturas a base de tributilestaño (TBT) poseen un riesgo sustancial de toxicidad y pueden tener un impacto crónico sobre especies, hábitats y ecosistemas. Óxido cuproso y óxido de cinc, son otros antiincrustantes usados en el mercado, funcionan liberando metales pesados, es decir, cobre y cinc, y lamentablemente el cobre se presenta como una toxina perjudicial, especialmente en el entorno marino. Por lo tanto, biocidas más seguros deben seleccionarse tan pronto como sea posible antes de que se descubran nuevos problemas ambientales graves. Los fabricantes de dichos productos se enfrentan con la posibilidad de cambiar las

formulaciones existentes para incluir agentes alternativos que son, a la vez, eficaces en la prevención de la adhesión y crecimiento de organismos bioincrustantes y medioambientalmente benignos. Otros criterios que deben tenerse en cuenta en el desarrollo de sustitutos aceptables para biocidas ecológicamente nocivos incluyen la compatibilidad química con otros componentes la composición de revestimiento, compatibilidad física con la película seca y un sustrato al que se aplica el revestimiento, la seguridad de aquellos que manipulan o usan los propios agentes sustitutos o los materiales de revestimiento que los contienen, y el coste de su producción.

Dependiendo de la estructura marina o de agua dulce particular que se va a proteger, las composiciones de la presente invención pueden aplicarse directamente a la estructura como un revestimiento.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona una composición de revestimiento marina o de agua dulce que comprende al menos una espinosina o un derivado o sal del mismo y un vehículo, en la que dicha composición es eficaz en la prevención de la adhesión para organismos acuáticos a los que se aplica dicha composición.

La espinosina o un derivado o sal del mismo está presente en la composición en una cantidad eficaz para inhibir la adhesión de organismos bioincrustantes sobre una superficie a la que se aplica la composición como un revestimiento.

La composición de revestimiento antiincrustante de acuerdo con la invención puede comprender un agente formador de película.

También se proporcionan de acuerdo con la invención, procedimientos de uso de las composiciones antiincrustantes y materiales de revestimiento que incluyen al menos una espinosina. Un procedimiento de este tipo implica proteger una superficie expuesta a un entorno acuoso de organismos incrustantes presentes en el entorno acuoso aplicando a dicha superficie una composición de revestimiento que incluya al menos una espinosina. Como otro aspecto de esta invención, se proporcionan artículos que tienen un revestimiento de la composición descrita en este documento sobre al menos una porción de la estructura de los mismos, que proporciona protección contra la exposición a los efectos nocivos de los organismos bioincrustantes.

La composición de revestimiento que se ha descrito anteriormente satisface uno o más de los criterios que se han indicado anteriormente para un producto de revestimiento medioambientalmente aceptable, y en una realización satisface todos los criterios que se han indicado anteriormente, en la que proporciona una protección eficaz contra la adhesión y el crecimiento de organismos bioincrustantes, mientras que no produce efectos ecológicamente perjudiciales conocidos. Aunque las espinosinas y el espinosad en particular pueden ser tóxicos en una amplia gama de organismos acuáticos, el riesgo ambiental de las espinosinas es mínimo, ya que únicamente los organismos en contacto con el casco del barco están expuestos a niveles tóxicos. El espinosad es estable como parte del revestimiento sobre un barco, pero incluso si se libera (lixiviado) lentamente del casco del barco, rápidamente se degrada a compuestos que son básicamente no tóxicos. Dow Agrosiences LLC, productor principal de espinosinas, se presentó por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos, con el Presidential Green Chemistry Challenge Award en el pasado para espinosad y en 2008 también para espinetoram, ya que ambos productos se adhieren a los principios de la química verde y es importante encontrar soluciones que también contribuyan a la preservación de nuestro planeta. Como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2008/0188427, se ha descubierto que las espinosinas, y el espinosad en particular, resultan eficaces en el control de plagas de ectoparásitos en peces criados en acuicultura, dando como resultado una producción de peces mejorada, proporcionando de esta manera el perfil ventajoso de espinosinas, incluso cuando se usan en un entorno acuático.

Se ha descubierto que las espinosinas, y más específicamente espinosad, son agentes antiincrustantes particularmente eficaces, como se describirá en detalle más adelante en este documento.

Las espinosinas son productos de fermentación conocidos obtenidos a partir de la bacteria de origen natural *Saccharopolispora spinosa*. La familia de compuestos obtenidos a partir de esta bacteria se conocen generalmente como espinosinas y se han denominado como los factores o componentes A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, Y, y similares, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5.362.634, y 6.821.526 y las solicitudes publicadas WO 93/09126 y WO 94/20518. Los compuestos de espinosina consisten en un sistema de anillos 5,6,5-tricíclico, condensado a una lactona macrocíclica de 12 miembros, un azúcar neutro (ramnosa), y un azúcar amino (forosamina) (véase, Kirst y col. "Unique Fermentation-derived Tetracyclic macrolides, Tetrahedron Letters, A83543A-D, 32: 4839-4842, (1991)). Como se usa en este documento, el término "espinosina" se refiere a una clase de compuestos que se basan en los productos de fermentación de la bacteria de origen

natural, *Saccharopolispora spinosa* (especies y subespecies) o una forma biológicamente modificada de esta bacteria o combinaciones de los mismos. Los compuestos de espinosina naturales pueden producirse mediante la fermentación de cultivos depositados como NRRL 18719, 18537, 18538, 18539, 18743, 18395 y 18823 de la colección de cultivos madre del Midwest Area Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, Departamento de Agricultura de Estados Unidos, 1815 North University Street, Peoria, Ill. 61604. También se describen compuestos de espinosina en las pat. de Estados Unidos N° 5.496.931, 5.670.364, 5.591.606, 5.571.901, 5.202.242, 5.767.253, 5.840.861, 5.670.486 y 5.631.155. Como se usa en este documento, el término "espinosina" pretende incluir factores naturales y derivados semi-sintéticos de los factores producidos naturalmente. Se ha hecho un gran número de modificaciones químicas a estos compuestos de espinosina, a menudo denominados espinosoides y se desvelan en la pat. de Estados Unidos N° 6.001.981. El término "espinosina" también incluye los compuestos biológicamente activos novedosos como se describe en la patente de Estados Unidos N° 2006/0040877 producidos mediante procedimientos de uso de ADN de policétido sintasa híbrido para cambiar los productos preparados por cepas productoras de espinosina. Finalmente, el término "espinosina" incluye nuevos derivados de espinosina producidos usando el ADN clonado de *Saccharopolispora spinosa* como se describe en la patente de Estados Unidos N° 7.015.001. Pueden proporcionarse diferentes patrones de control mediante intermedios biosintéticos de las espinosinas o mediante sus derivados producidos *in vivo*, o mediante derivados resultantes de su modificación química *in vitro*. Se considera que dichos intermedios biosintéticos de las espinosinas pertenecen a la clase de "espinosinas" como se describe en este documento para su uso en la presente invención.

Las espinosinas y derivados de las mismas también pueden existir en forma de sales. Las sales se preparan poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir una sal. A modo de ejemplo no limitante, las espinosinas pueden formar sales con ácidos clorhídricos, bromhídricos, sulfúricos, fosfóricos, acéticos, benzoicos, cítricos, malónicos, salicílicos, málicos, fumáricos, oxálicos, succínicos, tartáricos, lácticos, glucónicos, ascórbicos, maleicos, aspárticos, bencenosulfónicos, metanosulfónicos, etanosulfónicos, hidroximatanosulfónicos y hidroxietanosulfónicos. Además, a modo de ejemplo no limitante, una función de ácido puede formar sales que incluyen las obtenidas a partir de metales alcalinos o alcalinotérreos y aquellas obtenidas a partir de amoniaco y aminas. Los ejemplos de cationes incluyen cationes de sodio, potasio, magnesio y aminio.

El término espinosina también incluye todos los isómeros de los compuestos, incluyendo estereoisómeros individuales, es decir, diastereómeros y enantiómeros geométricos, así como mezclas racémicas, mezclas ópticamente activas, y combinaciones de los mismos.

Además el término "espinosina", como se usa en este documento, se refiere a espinosinas producidas por cualquier cepa fúngica capaz de producir espinosina, es decir, cepas fúngicas pertenecientes al género *Aspergillus*, como se menciona en la solicitud de patente WO/ 2009/054003.

El espinosad es un insecticida producido por Dow AgroSciences (Indianápolis, Ind.) que consiste principalmente en espinosina A aproximadamente al 85% y espinosina D aproximadamente al 15%. El espinosad es un ingrediente activo de varias formulaciones insecticidas disponibles en el mercado en Dow AgroSciences LLC, incluyendo, por ejemplo, los comercializados con los nombres comerciales TRACER®, SUCCESS®, SPINTOR®, LASER® y ENTRUST®. El producto TRACER®, por ejemplo, consiste en aproximadamente el 44% a aproximadamente el 48% de Espinosad (p/v), mientras que ENTRUST® es un polvo sólido de color blanco a blanquecino que contiene aproximadamente el 80% de Espinosad.

El espinosad también está disponible en el mercado por la empresa Sigma-Aldrich con fines de I+D, como un estándar analítico, a una pureza de aproximadamente el 98% y consiste principalmente en espinosina A aproximadamente al 70% y espinosina D al 30%.

El espinetoram es una espinosina semi-sintética, disponible en el mercado en Dow AgroSciences LLC en varias formulaciones insecticidas, incluyendo, por ejemplo, las comercializadas con los nombres comerciales DELEGATE® y RADIANT®. El espinetoram es el nombre común de una mezcla de (2R, 3 $\alpha$ R, 5 $\alpha$  R, 5  $\beta$  S, 9S, 13S, 14R, 16  $\alpha$  S, 16  $\beta$  R)-2-(6-desoxi-3-O-etil-2,4-di-O-metil- $\alpha$ -L-mannopiranosiloxi)-13-[(2R,5S,6R)-5-(dimetilamino)tetrahidro-6-metilpiran-2-iloxi]-9-etil-2,3,3 $\alpha$ ,4,5,5 $\alpha$ 5 $\beta$ ,6,9,10,11,12,13,14,16 $\alpha$ ,6 $\beta$ -hexadecahidro-14-metil-1H-as-indaceno[3,2-d]oxaciclado decina-7,15-diona al 50-90%, y (2R,3  $\alpha$  R,5  $\alpha$  S,5  $\beta$  S,9S, 13S, 14R, 16 $\alpha$ S, 16 $\beta$ S)-2-(6-desoxi-3-O-etil-2,4-di-O-metil- $\alpha$ -L-mannopirano siloxi)-13-[(2R,5S,6R)-5-(dimetilamino)tetrahidro-6-metilpiran-2-iloxi]-9-etil-2,3,3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6,9,10,11,12,13,14,16 $\alpha$ ,16 $\beta$ -tetradecahidro-4,14-dimetil-1H-as-indaceno[3,2-d]oxaciclado-decina-7,15-diona al 50-10%. La síntesis de los componentes de espinetoram se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.001.981. Los insecticidas de macrólidos relacionados con las espinosinas también se han aislado de *Saccharopolispora pogona*. LW107129 (NRRL30141 y mutantes del mismo). Estos compuestos se desvelan en la

pat. de Estados Unidos N° 6.800.614. Estos compuestos se caracterizan por la presencia de grupos funcionales reactivos que realizan modificaciones adicionales posibles en lugares en los que dichas modificaciones no eran viables en las espinosinas que se han divulgado previamente. Se desvelan derivados naturales y semi-sintéticos de las butenil espinosinas en la pat. de Estados Unidos N° 6.919.464. El término "butenil-espinosina", también denominado pogonina, como se usa en este documento, pretende incluir factores naturales y derivados semi-sintéticos de los factores producidos naturalmente o combinaciones de los mismos, y se considera que pertenecen a la misma clase de "espinosinas", como se describe en este documento para su uso en la presente invención.

Se ha demostrado que el espinosad es altamente eficaz en el control de ciertos ácaros e insectos, incluyendo, pero sin limitación, especies de los órdenes de *Lepidoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Thysanoptera*, y algunos *Coleoptera*. Además, se ha demostrado que las formulaciones que comprenden Espinosad son altamente eficaces al usarlas en agricultura, horticultura, invernaderos, campos de golf, jardines, casas, y similares.

El espinosad actúa como un veneno en el estómago y al contacto. Generalmente, el efecto inmediato de la ingestión es el cese de la alimentación seguido 24 horas más tarde por parálisis y muerte. Este compuesto es una neurotoxina con un modo de acción novedoso que involucra al receptor nicotínico de acetilcolina y los receptores GABA.

Aunque hasta ahora se ha sabido que las espinosinas son eficaces al ingerirse por insectos y ácaros causando así una rápida excitación del sistema nervioso, su uso como un agente antiincrustante no se había investigado y/o propuesto hasta el momento. Además, como se indica en la patente de Estados Unidos N° 7.285.653 "spinosyns exhibit a strongly insecticidal but no antibacterial activity".

El presente inventor ha descubierto que la espinosina, y más específicamente el espinosad, muestra propiedades antibacterianas significativas contra algunas bacterias asociadas con una incrustación común, *Balanus amphitrite*, y que pertenecen a las especies *Vibrio sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Aeromonas sp.* estas bacterias se obtienen a partir de una microflora bacteriana asociada a los percebes. Estos aislados se caracterizan por ensayos morfológicos y bioquímicos sólo a nivel de género.

Además, el presente inventor ha descubierto que la espinosina, y el espinosad en particular, muestra una excelente actividad antiincrustante en el asentamiento de cípridos de percebe sobre superficies con una concentración eficaz EC<sub>50</sub> de  $7 \times 10^{-8}$  mg/ml en ausencia de cualquier mortalidad contra cípridos. Además, el presente inventor ha creado algunas composiciones de revestimiento que se ha descubierto que son muy eficaces cuando se usan como un revestimiento antiincrustante marino o de agua dulce.

Como se usa en este documento, los términos "eficaz", "eficaz en el control de" y "eficaz para controlar" o "control" se usan de forma intercambiable y se refieren a la capacidad de la composición que contiene el compuesto activo de reducir el grado de adherencia de al menos una especie de organismos, durante un determinado periodo de tiempo, en comparación con una composición que no contiene el compuesto activo.

Como se usa en este documento, la expresión "agente antiincrustante", es un agente que se usa para controlar el crecimiento y asentamiento de organismos incrustantes (microbios y otras formas mayores de especies vegetales y animales) sobre embarcaciones, equipos de acuicultura u otras estructuras que se usan en el agua.

Como se usa en este documento, la expresión "organismos bioincrustantes" se refiere a cualquier y todos los organismos que participan en la secuencia incrustante tanto en entornos de agua salada como de agua dulce, incluyendo, sin limitación, bacterias, diatomeas, hidroides, algas, briozoos, protozoos, ascidias, gusanos tubícolas, almejas asiáticas, mejillones cebra y percebes. Generalmente, los percebes, gusanos tubícolas, algas, algas marinas y briozoos de color marrón y rojo son los organismos que provocan la mayor preocupación en agua salada o salobre. Los mejillones cebra son los organismos que causan más problemas de incrustación en el agua dulce de áreas templadas o subtropicales.

Los percebes pertenecen al filo *Arthropoda*, subfilo *Crustacea*, orden *Sessilia*, familia *Balanidae*, género *Balanus*. Son exclusivamente marinos y, a diferencia de otros crustáceos, son todos sésiles. Hay más de 600 especies en todo el mundo, y muchos son animales de colores, por ejemplo, rojo, naranja, púrpura, rosa y a rayas. La mayoría son de unos pocos centímetros de diámetro, siendo algunos considerablemente más grandes. La mayoría se encuentran en la zona intermareal. Los que viven en comunidades de agua poco profunda son balanoides o comensales incrustantes típicos.

Se ha informado de veintidós especies de percebes en el Océano Índico. Ejemplos no limitantes son *Balanus*

*amphitrite*, *Balanus uariegatus*, *Megabalanus antillensis*, *Chthamalus malayensis*, *Chthamalus withersi* y *Lepas anatifera*. Todas estas especies tienen amplios rangos geográficos. Todas las especies *Chthamalus*, especie *Lepas*, y *Balanus amphitrite* prefieren aguas de salinidad casi normales.

- 5 Las algas marinas varían de tamaño, desde organismos unicelulares de unos milímetros de diámetro, a plantas altamente organizadas que alcanzan una longitud de 30 metros. Todas las algas capaces de realizar actividad fotosintética contienen el pigmento clorofila, que se encuentran en inclusiones celulares denominados cloroplastos. Una sola célula algácea puede contener uno o más cloroplastos. Las microalgas (diatomeas) son los componentes importantes de las películas que se forman sobre la superficie de una estructura marina ya que llena de  
10 incrustaciones y puede tener una función en la ecología de estas películas.

Las diatomeas pertenecen a la clase *Bacillariophyceae*. Una característica principal de muchas diatomeas bentónicas es su capacidad de permanecer adheridas de forma permanente a las superficies. Esto es importante tanto ecológica como económicamente, ya que las diatomeas constituyen al menos una parte de los organismos que  
15 se incrustan en estructuras marinas. Por ejemplo, es importante controlar las diatomeas de los siguientes géneros (*Dunaliella*, *Nitzschia*, *Skeletonema*, *Chaetoceros*) y especies (es decir, *Dunaliella tertiolecta*, *Skeletonema costatum*).

De acuerdo con una realización, la al menos una espinosina puede añadirse a un material de construcción para la  
20 producción de artículos marinos. La al menos una espinosina puede mezclarse con un vehículo y/o puede incorporarse directamente en los materiales de construcción, por ejemplo, cemento, plástico, polímero, caucho, material elastomérico o fibra de vidrio, para la protección de objetos sometidos a bioincrustación. Las estructuras, tales como pilares de madera y redes de pesca, pueden estar protegidas incorporando directamente las composiciones de la invención en la estructura. Por ejemplo, una composición de la invención, que comprende  
25 adicionalmente un vehículo, puede aplicarse a la madera que se usa para los pilares por medio de un tratamiento a presión o impregnación al vacío. Estas composiciones también pueden incorporarse en una fibra de la red de pesca durante su fabricación.

Los revestimientos marinos que contienen las composiciones de la invención pueden aplicarse a una estructura a  
30 proteger mediante un número cualquiera de medios convencionales, tales como, por ejemplo, pulverización, por rodillo, cepillado, impregnación y inmersión. Las redes de pesca, por ejemplo, pueden estar protegidas sumergiendo las redes de pesca en una composición que comprende las composiciones de la invención y un vehículo, o pulverizando las redes de pesca con la composición. Pueden usarse espinosinas tanto con disolventes acuosos como orgánicos, como se apreciará bien en la técnica.

35 De acuerdo con otra realización, las espinosinas pueden incluirse en una composición de pintura convencional como el único agente antiincrustante, o añadido junto con otros microbicidas, agentes antiincrustantes, fungicidas, herbicidas, insecticidas, antibióticos, antiincrustantes no tóxicos, y productos o extractos naturales para producir un efecto aditivo o sinérgico en la adhesión de organismos bioincrustantes. Los microbicidas adecuados que pueden  
40 añadirse junto con la espinosina de la presente invención incluyen, pero sin limitación: 5-cloro-2-metil-3-isotiazolona; 2-metil-3-isotiazolona; 2-n-octil-3-isotiazolona; 4,5-dicloro-2-n-octil-3-isotiazolona; carbamato de 3-yodo-2-propinil butilo; 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano; metileno-bis-tiocianato; 2-tiocianometiltiobenzotiazol; tetracloroisoftalonitrilo; 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano; 2-bromo-2-nitopropanodiol; 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida; N,N'-dimetilhidroxil-5,5'-dimetilhidantoína; bromoclorodimetilhidantoína; 1,2-bencisotiazolin-3-ona; 4,5-trimetileno-2-metil-3-isotiazolona; 5-  
45 cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol y 3,4,4'-triclorocarbanilida. Los agentes antiincrustantes marinos adecuados que pueden añadirse junto con la espinosina de la presente invención incluyen, pero sin limitación: etilenobisditiocarbamato de manganeso; dimetil ditiocarbamato de cinc; 2-metil-4-t-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina; 2,4,5,6-tetracloroisoftalonitrilo; N,N-dimetil diclorofenilo urea; etilenobisditiocarbamato de cinc; tiocianato de cobre; 4,5-dicloro-2-n-octil-3-isotiazolona; N-(fluorodichlorometiltio)-ftalimida; N,N-dimetil-N'-fenil-N'-  
50 fluorodichlorometiltio-sulfamida; 2-piridinatiol-1-óxido de cinc; disulfuro de tetrametiltiuram; 2,4,6-triclorofenilmaleimida; 2,3,5,6-tetracloro-4-(metil-sulfonil)-piridina; carbamato de 3-yodo-2-propinil butilo; diyodometil p-tolil sulfona; etilenobisditiocarbamato de bis dimetil ditiocarbamoil cinc; dicloruro de fenil(bispiridil)bismuto; 2-(4-tiazolil)-bencimidazol; piridina trifenil borano; fenilamidas; compuestos de halopropargilo; o 2-haloalcoxiaril-3-isotiazolonas. Las 2-haloalcoxiaril-3-isotiazolonas adecuadas incluyen, pero sin limitación, 2-(4-trifluorometoxifenil)-3-isotiazolona,  
55 2-(4-trifluorometoxifenil)-5-cloro-3-isotiazolona y 2-(4-trifluorometoxifenil)-4,5-dicloro-3-isotiazolona, antiincrustantes organometálicos, tales como tributil estaño o trifenil estaño, o antiincrustantes inorgánicos, tales como por ejemplo, óxido de cinc, cobre, óxido de cobre u óxido de dicobre y dióxido de azufre. Los fungicidas agrícolas adecuados que pueden añadirse junto con la espinosina de la presente invención incluyen, pero sin limitación: ditiocarbamato y derivados, tales como ferbam, ziram, maneb, mancozeb, zineb, propineb, metam, tiram, el complejo de zineb y

disulfuro de polietilen tiuram, dazomet, y mezclas de estos con sales de cobre; derivados de nitrofenol, tales como dinocap, binapacril y isopropil carbonato de 2-sec-butil-4,6-dinitrofenilo; estructuras heterocíclicas, tales como captan folpet, gliodina, ditianon, tioquinox, benomilo, tiabendazol, vinolozolin, iprodiona, procimidona, triadimenol, triadimefon, bitertanol, fluoroimida, triarimol, cicloheximida, etirimol, dodemorf, dimetomorf, tifluzamida y

5 quinometionato; fungicidas halogenados diversos, tales como: cloranilo, diclona, cloroneb, tricamba, dicloran y policloronitrobencenos; antibióticos fungicidas, tales como: griseofulvina, kasugamicina y estreptomycin; fungicidas diversos, tales como: difenil sulfona, dodina, metoxilo, 1-tiociano-2,4-dinitrobenceno, 1-feniltiosemicarbazida, tiofanato-metilo y cimoxanilo; así como acilalaninas, tales como, furalaxilo, ciprofuram, ofurace, benalaxilo y oxadixilo; fluazinam, flumetover, derivados de fenilbenzamida, tales como los desvelados en el documento EP

10 578586 A1, derivados aminoacídicos, tales como derivados de valina desvelados en el documento EP 550788 A1, metoxiacrilatos, tales como (E)-2-(2-(6-(2-cianofenoxi)pirimidin-4-iloxi)fenil)-3-metoxiacrilato de metilo; S-metil éster del ácido benzo(1,2,3)tiadiazol-7-carbotioico: propamocarb; imazalil; carbendazim; miclobutanil; fenbuconazol; tridemorf; pirazofos; fenarimol; fencpiclonilo; y pirimetanilo. Los herbicidas adecuados que pueden añadirse junto con la espinosina de la presente invención incluyen, pero sin limitación: derivados de ácido carboxílico, incluyendo ácido

15 benzoico y sus sales; ácidos carboxílicos sustituidos con fenoxi y fenilo y sus sales; y ácido tricloroacético y sus sales; derivados de ácido carbámico, incluyendo N,N-di(n-propil)tiolcarbamato de etilo y pronamida; ureas sustituidas, triazinas sustituidas, derivados de difenil éter, tales como oxifluorfen y fluoroglicofen, anilidas, tales como herbicidas de propanilo, oxifenoxi, uracilos, nitrilos, y otros herbicidas orgánicos, tales como ditiopi y tiazopir. Los insecticidas adecuados que pueden añadirse junto con la espinosina de la presente invención incluyen, pero sin

20 limitación: abamectina, bifentrina; ciflutrina; cihexatina; cipermetrina; cifenotrina; clotianidina, deltametrina; endosulfan; -óxido; fenoxicarb; fensulfotión; fenvalerato; flucicloxuron; flufenoxuron; fluvalinato; furatiocarb; imidactoprid, isazofos; isofenfos; isoxation; metiocarb; metomilo; mexacarbato; nicotina; permetrina y resmetrina. Los ejemplos no limitantes de agentes antiincrustantes no tóxicos y naturales incluyen decalactona, alantolactona, ácido zostérico y capsaicina. Un ejemplo típico de un antibiótico adecuado es tetraciclina, que es un antiincrustante

25 registrado. Las composiciones antiincrustantes que se desvelan en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2008/0095737, también pueden combinarse con el al menos un agente antiincrustante de espinosina de la presente invención.

El componente del vehículo combinado con al menos una espinosina puede ser un componente formar de película,

30 un material termoplástico, fibra de vidrio, un componente elastomérico, caucho vulcanizado o un componente cementoso. El componente del vehículo puede ser cualquier componente o combinación de componentes que incorpore el agente antiincrustante o se aplique fácilmente a la superficie que se va a proteger y se adhiera a la superficie que se va a proteger cuando la superficie se sumerge. Los compuestos cementosos se usan para proteger ciertos tipos de estructuras bajo el agua, como son los materiales elastoméricos y el caucho vulcanizado.

35 Diferentes componentes tendrán diferentes propiedades deseadas dependiendo del material que comprenda sumergida, los requisitos de operación de la superficie, la configuración de la superficie, y el compuesto antiincrustante. Después de proporcionar una superficie con un revestimiento protector de acuerdo con esta invención, la espinosina que está presente en el revestimiento entra en contacto con organismos bioincrustantes, evitando de este modo su adhesión. Los revestimientos marinos comprenden un agente formador de película y un

40 disolvente, y opcionalmente otros ingredientes. El disolvente puede ser un disolvente orgánico o agua. Las composiciones de la invención son aptas para su uso en revestimientos marinos tanto a base de disolvente como de agua. Puede utilizarse cualquier agente formador de película convencional en el revestimiento antiincrustante marino que incorpora las composiciones de la invención. Los componentes formadores de película pueden incluir soluciones de resina polimérica. Los ejemplos no limitantes de resinas poliméricas incluyen resinas de poliéster insaturado

45 formadas a partir de (a) ácidos y anhídridos insaturados, tales como anhídrido maleico, ácido fumárico y ácido itacónico; (b) ácidos y anhídridos saturados, tales como anhídrido ftálico, anhídrido isoftálico, anhídrido tereftálico, anhídrido tetrahidroftálico, anhídridos tetrahalo-ftálicos, ácido clorendico, ácido adípico y ácido sebáico; (c) glicoles, tales como etilenglicol, 1,2 propilenglicol, dibromoneopentilglicol, Dianol 33® y Dianol 22®; y (d) monómeros de vinilo, tales como estireno, vinil tolueno, cloroestireno, bromoestireno, metilmetacrilato y etilenglicol dimetacrilato.

50 Otras resinas adecuadas incluyen, pero sin limitación, resinas a base de éster vinílico, acetato de vinilo y cloruro de vinilo, sistemas copoliméricos de cloruro de vinilo-acetato de vinilo como dispersiones acuosas o sistemas a base de disolvente, mezclas de rosina natural y copolímeros de cloruro de vinilo-acetato de vinilo, resinas acrílicas en sistemas a base de disolventes o acuosos, resinas a base de uretano, resinas copoliméricas autopulimentantes, resinas ablativas, resinas de lixiviación, componentes elastoméricos, cauchos vulcanizados, cauchos de butadieno-

55 estireno, cauchos de butadieno-acrilonitrilo, cauchos de butadieno-estireno-acrilonitrilo, aceites secantes, tales como aceite de linaza, asfalto, epóxidos, siloxanos como por ejemplo polidimetilsiloxano, silanos como alquil y aril alcoxi silanos, siliconas y tecnologías basadas en silicona como fluorosiliconas, acrilatos de silicona, elastómeros de látex con silicona, y combinaciones de los mismos.

La composición de revestimiento de la invención puede incluir componentes, además de las espinosinas y un componente formador de película, para conferir una o más propiedades deseadas, tales como un aumento o disminución de la dureza, resistencia, aumento o disminución de la rigidez, arrastre reducido, un aumento o disminución de la permeabilidad, o una mejor resistencia al agua. La selección de un componente particular o grupo de componentes para impartir tales propiedades está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Los revestimientos marinos de la presente invención pueden contener opcionalmente uno o más de los siguientes: pigmentos inorgánicos, pigmentos orgánicos o colorantes, resinas naturales, tales como rosina, cargas, extensores, agentes expansores, agentes humectantes, coalescentes, plastificantes, dispersantes, agentes tensioactivos, conservantes, modificadores reológicos o promotores de la adhesión, filtros UV, y combinaciones de los mismos.

El ingrediente activo principal para su uso en la presente invención comprende al menos una espinosina de la clase de espinosinas que se ha descrito anteriormente. El porcentaje de espinosina en la composición de revestimiento necesaria para la protección eficaz contra organismos bioincrustantes puede variar sustancialmente dependiendo de la naturaleza de la estructura marina o de agua dulce a la que se aplica la composición de revestimiento, el servicio para el que se use la estructura, el pH del agua y otras condiciones ambientales a las que se expone la estructura, dependiendo de la propia espinosina, la naturaleza química del formador de película, así como otros aditivos presentes en la composición que pueden influir en la eficacia de la espinosina. El límite superior de actividad también puede estar motivado por las características de coste y toxicidad que serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica. Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad de espinosina puede reducirse en el caso de que esté presente un segundo ingrediente activo, siempre y cuando la composición combinada sea activa como antiincrustante.

De acuerdo con una realización, la espinosina está presente en la composición en una cantidad en el intervalo del 0,001% al 90% p/p. De acuerdo con otra realización, la espinosina está presente en una cantidad en el intervalo del 0,1% al 10% p/p.

Las espinosinas pueden incluirse en una formulación de pintura durante los procesos de fabricación de la pintura, o añadirse a la pintura en el momento de uso. Las espinosinas pueden mezclarse simplemente en los componentes formadores de película o pueden unirse covalentemente a la resina, conocido como "revestimiento ablativo o autopulimentante" que se libera únicamente después de que la unión hidroliza en agua de mar. La hidrólisis controlada permite una velocidad de liberación lenta creando al mismo tiempo un sitio hidrófilo en la resina. Después, se expone una nueva capa de espinosina cuando la capa hidrolizada se lava. Se menciona un ejemplo no limitante de composiciones antiincrustantes autopulimentantes en la solicitud de patente de Estados Unidos 200510096407. El agente antiincrustante espinosina, puede incluirse en la composición de revestimiento marina pura como un sólido particulado, en forma de particulado encapsulado, por ejemplo, en la que las partículas quelantes individual se incrustan en una matriz de bentonita o sílice, en nanopartículas, o en forma de una suspensión en un medio líquido. Además, pueden usarse espinosinas en diversas composiciones de liberación controlada, como por ejemplo las mencionadas en la patente de Estados Unidos 6.610.282, la patente de Estados Unidos 6.149.927, y la patente de Estados Unidos 6.676.954. En una composición de liberación controlada puede incorporarse espinosina con materiales de liberación lenta que permiten la liberación controlada de los compuestos en la matriz del revestimiento, prolongando de esta manera la eficacia del revestimiento y reduciendo la cantidad de compuestos necesarios para producir el efecto antiincrustante. La encapsulación en tales materiales de liberación lenta también puede proteger a las espinosinas del medio químico perjudicial del revestimiento y reducirá su degradación al mismo tiempo que quedan atrapadas en la resina, si es susceptible a la degradación. Pueden usarse otros procedimientos tradicionales para la encapsulación. Por ejemplo, las partículas del agente antiincrustante pueden microrevestirse, por ejemplo, cuando las partículas están revestidas con polímeros especialmente diseñados en un reactor de lecho fluidizado. El espesor del material de revestimiento puede monitorizarse y controlarse por las condiciones operativas dinámicas, tales como el flujo de aire, el flujo de alimentación, la temperatura, el tamaño de la boquilla, un sustrato y similares. Otro procedimiento posible es la inclusión molecular, en la que un agente antiincrustante hidrófobo se encapsula en la "estructura hidrófoba" de una molécula huésped, tal como betaciclodextrina. Otro procedimiento de encapsulación es secado por pulverización y coacervación de los agentes antiincrustantes; este procedimiento encapsula el agente antiincrustante en una matriz vítrea ya definida hecha de carbohidratos y polímeros.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna con respecto al mecanismo de acción, se cree que las espinosinas presentes en la composición antiincrustante de esta invención funcionan produciendo un entorno hostil en la superficie de un sustrato revestido o impregnado, que repele o afecta a los organismos bioincrustantes, evitando de este modo su adhesión y crecimiento sobre la superficie revestida. Sin embargo, el efecto inhibitor sobre los microorganismos puede producirse mediante inhalación, respiración, digestión o imbibición del agente activo por los



microorganismos.

También está dentro del alcance de esta invención cualquier artículo que incorpore o tenga una superficie revestida con una composición que contiene al menos una espinosina o un derivado o sal, o una combinación de los mismos.

- 5 Los artículos impregnados y/o revestidos de la invención pueden comprender cualquier material que esté en contacto con agua dulce, salada, estuarina, salobre u otras masas de agua a los que los organismos bioincrustantes son propensos a atacar, tales como metal, madera, hormigón, plástico, compuesto y piedra. Los ejemplos representativos de artículos que pueden beneficiarse de un revestimiento que inhibe la adhesión y el crecimiento de dichos organismos incluyen barcos y buques, por ejemplo sus cascos, hélices, timones, quillas, orzas de deriva,
- 10 aletas, álabes, instalaciones de atraque, como muelles y pilares, superficies de cubierta, boyas, muelles, embarcaderos, redes de pesca, superficies de sistemas de refrigeración industriales, toma de agua de refrigeración, o tuberías de evacuación, instalaciones de desalinización, balizas náuticas, balizas flotantes, rompeaguas flotantes, muelles, conductos, tuberías, depósitos, tuberías de agua en centrales eléctricas, plantas industriales en la orilla del mar, estructuras de conservación de pescado, construcciones acuáticas, instalaciones portuarias, puentes,
- 15 campanas, plomadas, ruedas, grúas, dragas, bombas, válvulas, alambres, cables, cuerdas, escaleras, pontones, transpondedores, antenas, barcazas, periscopios, esnórqueles, trípodes, barriles de armas, tubos de lanzamiento, minas, equipo de aparejo de alta mar, rejillas de admisión para sistemas de distribución de agua y formaciones decorativas o funcionales de cemento o piedra.
- 20 A diferencia de los ejemplos, o cuando se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, y así sucesivamente, que se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones se apreciará que se modifican en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique otra cosa, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que
- 25 se tratan de obtener por la presente divulgación. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes en el ámbito de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse a la luz de un número significativo de dígitos y enfoques de redondeo habituales.

- A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que describen el amplio alcance de la invención son
- 30 aproximaciones, a menos se indique otra cosa, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se indican con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene de forma inherente ciertos errores necesariamente resultantes de la desviación estándar observada en sus respectivas medidas de prueba.

- Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención en más detalle. Estos ejemplos pretenden
- 35 ilustrar simplemente realizaciones específicas de las composiciones, procedimientos y artículos de la invención, y no deben interpretarse en ningún modo como limitantes de la invención. Estos ejemplos proporcionan los resultados de los ensayos realizados para determinar la eficacia de ciertas espinosinas en la inhibición del asentamiento de organismos bioincrustantes.

- 40 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una representación gráfica del crecimiento de *Dunaliella tertiolecta* controlado a través de la fase logarítmica y de latencia en presencia de diversas concentraciones de espinosad.

- 45 La figura 2 muestra una fotografía de una prueba de inmersión estática de 40 semanas para el Panel N° 2 que compara el ID del Panel AA y BB de la Tabla 4 (cara A = AA, cara B = BB).

La figura 3 muestra una fotografía de una prueba de inmersión estática de 40 semanas para el Panel N° 5 que compara el ID del Panel CC y DD de la Tabla 4 (cara A = CC, cara B = DD).

50

## Ejemplos

### Ejemplos 1

- 55 Ensayo antimicrobiano contra bacterias marinas asociadas con *Balanus amphitrite*

Se ensayó el efecto del espinosad como compuesto bacteriostático contra cuatro especies bacterianas usando técnicas de difusión en agar convencionales, como se describe por Avelin y col., J. Chem. Ecol., 19(10), 2155-67 (1993). Las bacterias usadas en el ensayo fueron las que se indican a continuación: *Aeromonas sp* (Ae.);

*Alcaligenes sp* (Al.); *Flavobacterium sp* (F); y *Vibrio sp* (V.);

La técnica de difusión en agar sigue el procedimiento original de Acar (1980). En una placa de Petri esterilizada se transfirió 1 ml de cultivo de caldo de nutrientes de 12 horas, que comprendía el 3,7% de caldo marino en agua 5 destilada, de cada especie bacteriana marina junto con 20 ml de medio de agar antibiótico.

Se cargaron discos de papel esterilizados Whatman N° 1 (6,25 mm de diámetro) con la solución de ensayo (Tracer al 2,4% p/p en agua destilada) a concentraciones calculadas en espinosad puro que variaban de  $10^{-1}$  mg/10  $\mu$ l a  $10^{-4}$  mg/10  $\mu$ l. Se cargaron discos de control únicamente con el vehículo. Después de 24 horas de exposición a la 10 solución de ensayo, la zona de inhibición, es decir, el área alrededor del disco que carece de crecimiento bacteriano marino se midió determinando la distancia desde el borde del disco al borde el área que no mostraba crecimiento bacteriano (mm). Los datos mostrados en la Tabla 1 que se muestra a continuación demuestran que la solución de espinosad tiene un efecto inhibitor frente a estas bacterias marinas, incluso diluyéndola varias veces:

15

Tabla 1

Bacteria	Control	Concentración			
		10 <sup>-1</sup> mg/10 $\mu$ l (10000 ppm de espinosad)	10 <sup>-2</sup> mg/10 $\mu$ l (1000 ppm de espinosad)	10 <sup>-3</sup> mg/10 $\mu$ l (100 ppm de espinosad)	10 <sup>-4</sup> mg/10 $\mu$ l (10 ppm de espinosad)
Ae <sub>1</sub>	-	7,5	7	7	5,5
Ae <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
Al <sub>1</sub>	-	8	6	6	6
Al <sub>2</sub>	-	7	6,5	5,5	5,5
F <sub>1</sub>	-	7,5	6	6	6
F <sub>2</sub>	-	7,5	6	6	6
V <sub>1</sub>	-	8	5,5	5,5	5,5
V <sub>2</sub>	-	8	7	6	6

## Ejemplo 2

### Ensayo de asentamiento de cípridos de percebe y determinación EC<sub>50</sub>

20

El percebe, *Balanus amphitrite Darwin*, es el organismo incrustante duro más frecuente que se encuentra en todos los ecosistemas marinos, particularmente puertos visitados para el transporte comercial. Los procedimientos usados en esta evaluación se han descrito en detalle en varias publicaciones (Rittschof D, Clare AS, Gerhart DJ, Avelin Mary, Bonavetura J(1991) Barnacle in vitro assays for biologically active substances: toxicity and settlement assays 25 usando mass cultured *Balanus amphitrite amphitrite Darwin*. Biofouling 6: 115-122).

Los percebes adultos se cultivan en el laboratorio y se deja que engendren de forma natural. Las larvas se cosechan y crecen en sistemas de cultivo artificiales hasta que alcanzan la etapa cíprida, momento en el que las larvas son capaces de adherirse a superficies. Una vez adheridas, los cípridos se transforman en un percebe de cabeza de 30 alfiler, quedando de esta manera adheridos permanentemente a la superficie.

La solución de muestra ensayada fue una solución al 23,2% p/p de Tracer en agua destilada (equivalente al 10% p/p en espinosad puro o 100 mg de espinosad/ml). La muestra se agitó antes de preparar diluciones seriadas.

35 Los datos se resumen en las Tablas 2 y 3 que se muestran a continuación junto con los cálculos para EC<sub>50</sub>. En la concentración más alta utilizada (0,1 mg de espinosad/ml), los cípridos estuvieron letárgicos durante unas pocas horas después de la exposición a la solución de ensayo. Sin embargo, los cípridos se recuperaron rápidamente y no se observó mortalidad a esta dosis. De hecho, no se observó mortalidad en ninguna de las concentraciones ensayadas. No hubo asentamiento de cípridos de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  mg/ml. Posteriormente, hubo adhesión dependiente de 40 la dosis de  $10^{-5}$  y a concentraciones inferiores, alcanzando únicamente valores de control a  $10^{-5}$  mg/ml. El cálculo de EC<sub>50</sub> mediante un análisis de probit muestra un EC<sub>50</sub> de  $7 \times 10^{-8}$  mg/ml. Los resultados muestran que el espinosad es un inhibitor no tóxico eficaz del asentamiento de cípridos de percebes.

Notas adicionales para los datos que se indican a continuación: 1. Asentados se refiere al número total de lavas 45 cípridas que se han asentado y adherido sobre la superficie de la placa de Petri. 2. No asentados se refiere al

número total de cípridas que permanecen nadando en el agua del mar y no se asientan sobre la superficie. 3. Los datos se expresan como el porcentaje de cípridas que se asentaron sobre la superficie. 4. Los datos se resumen, y la media, la desviación típica (DT) y el error estándar de la media (SE) se calcularon para las muestras. 5. Los ensayos se realizaron en réplicas de tres placas por grupo de estudio; conteniendo cada placa cualquier parte de 75 a 100 cípridas.

**Asentamiento de percebes:**

**Tabla 2**

Concentración	Asentados	No asentados	Metamorfosados pero no asentados	Total	% de asentamiento
<b>1</b>	<b>Control</b>				
<b>a</b>	71	22	0	93	76
<b>b</b>	68	25	0	93	73
<b>c</b>	65	12	0	77	84
<b>Total</b>	<b>204</b>	<b>59</b>	<b>0</b>	<b>263</b>	<b>media 78</b>
				<b>DT</b>	<b>5,82</b>
				<b>SE</b>	<b>2,60</b>
<b>2</b>	<b>0,1 de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	0	89	0	89	0
<b>b</b>	0	87	0	87	0
<b>c</b>	0	90	0	90	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>275</b>	<b>0</b>	<b>266</b>	<b>0</b>
				<b>DT</b>	<b>0,00</b>
				<b>SE</b>	<b>0,00</b>
<b>3</b>	<b>10<sup>-2</sup> mg de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	0	86	0	86	0
<b>b</b>	0	77	0	77	0
<b>c</b>	0	94	0	94	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>257</b>	<b>0</b>	<b>257</b>	<b>0</b>
				<b>DT</b>	<b>0,00</b>
				<b>SE</b>	<b>0,00</b>
<b>4</b>	<b>10<sup>-3</sup> mg de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	0	92	0	92	0
<b>b</b>	0	87	0	87	0
<b>c</b>	0	81	0	81	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>260</b>	<b>0</b>	<b>260</b>	<b>0</b>
				<b>DT</b>	<b>0,00</b>

ES 2 392 142 T3

Concentración	Asentados	No asentados	Metamorfoseados pero no asentados	Total	% de asentamiento
				SE	0,00
<b>5</b>	<b>10<sup>-4</sup> mg de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	0	90	0	90	0
<b>b</b>	0	72	0	72	0
<b>c</b>	0	89	0	89	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>251</b>	<b>0</b>	<b>251</b>	<b>0</b>
				DT	0,00
				SE	0,00
<b>6</b>	<b>10<sup>-5</sup> mg de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	7	90	1	98	7
<b>b</b>	7	69	3	79	9
<b>c</b>	10	71	2	83	12
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>230</b>	<b>6</b>	<b>260</b>	<b>9</b>
				DT	2,49
				SE	1,11
<b>7</b>	<b>10<sup>-6</sup> mg de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	9	90	2	101	9
<b>b</b>	20	69	1	90	22
<b>c</b>	27	63	6	96	28
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>222</b>	<b>9</b>	<b>287</b>	<b>20</b>
				DT	9,84
				SE	4,40
<b>8</b>	<b>10<sup>-7</sup> mg de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	28	57	4	89	31
<b>b</b>	29	53	4	86	34
<b>c</b>	32	41	3	76	42
<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>151</b>	<b>11</b>	<b>251</b>	<b>35</b>
				DT	5,61
				SE	2,51
<b>9</b>	<b>10<sup>-8</sup> mg de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	41	31	7	79	52

ES 2 392 142 T3

Concentración	Asentados	No asentados	Metamorfoseados pero no asentados	Total	% de asentamiento
<b>b</b>	56	37	6	99	57
<b>c</b>	40	33	7	80	50
<b>Total</b>	<b>137</b>	<b>101</b>	<b>20</b>	<b>258</b>	<b>53</b>
				<b>DT</b>	<b>3,38</b>
				<b>SE</b>	<b>1,51</b>
<b>10</b>	<b>10<sup>-9</sup> mg de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	61	33	3	97	63
<b>b</b>	60	37	1	98	61
<b>c</b>	72	30	1	103	70
<b>Total</b>	<b>193</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>298</b>	<b>65</b>
				<b>DT</b>	<b>4,61</b>
				<b>SE</b>	<b>2,06</b>
<b>11</b>	<b>10<sup>-10</sup> mg de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	75	22	0	97	77
<b>b</b>	73	20	1	94	78
<b>c</b>	66	26	1	93	71
<b>Total</b>	<b>214</b>	<b>68</b>	<b>2</b>	<b>284</b>	<b>75</b>
				<b>DT</b>	<b>3,77</b>
				<b>SE</b>	<b>1,69</b>
<b>12</b>	<b>10<sup>-11</sup> mg de espinosad/ml</b>				
<b>a</b>	76	22	1	99	77
<b>b</b>	77	18	3	98	79
<b>c</b>	71	23	4	98	72
<b>Total</b>	<b>224</b>	<b>63</b>	<b>8</b>	<b>295</b>	<b>76</b>
				<b>DT</b>	<b>3,15</b>
				<b>SE</b>	<b>1,41</b>

CÁLCULOS DE EC<sub>50</sub>

Tabla 3

**ANÁLISIS DE PROBIT:****Asentamiento de percebes****DATOS DE ENTRADA**

<b>DOSIS</b>	<b>Nº ENSAYADOS</b>	<b>Nº DE RESPUESTAS</b>
0,000001	287	231
0,0000001	251	162
1E - 08	258	111
1E - 09	298	105
1E - 10	284	70
1E - 11	295	71
PROPORCIÓN DE CONTROLES DE RESPUESTA = 22		
DESNIVEL	= 0,5839765	
INTERCEPCIÓN	= 9,172569	
DESNIVEL DE VARIANZA	= 2,301465E-03	
ED <sub>50</sub> LOG.		= -7,145098
INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%		= -6,95896-7,326811
ED <sub>50</sub> LOG. DE VARIANZA		= 8,517865E-03
CHI 2 = 2,198044	DF = 4	
INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%	= 1,099107E-07-	4,711828E-08
ED <sub>50</sub> = 7,159825E-08		
ED <sub>50</sub> = 0,00000007 mg/ml (7 x 10 <sup>-8</sup> mg/ml)		

**Ejemplo 3****5 Inhibición de organismos incrustantes usando una composición de pintura que contiene espinosad**

Se pintaron dos paneles cuadrados de PVC de 15 x 15 cm como se indica a continuación: una cara con una composición que contiene Tracer al 11,43% p/p (espinosad puro al 5%) y pintura acrílica convencional de color blanco al 88,57% p/p (sin conservantes u otros agentes antiincrustantes) y la otra cara únicamente con la pintura (pintura de control). Los paneles revestidos se sumergieron en un entorno marino con incrustantes, en Olympic marine en Sounion, Grecia, a una distancia de aproximadamente 60 cm de la superficie del agua para determinar el grado de resistencia proporcionada los revestimientos de ensayo contra la incrustación. Los paneles se expusieron al agua de mar durante 10 semanas. Al final del periodo de exposición, los paneles se inspeccionaron para comprobar si había incrustación.

15 Se apreció incrustación en la cara de la pintura de control.

La cara tratada con la composición con espinosad al 5%, no tenía adhesiones de incrustantes apreciables.

**20 Ejemplo 4****Inhibición del crecimiento en las microalgas incrustantes, *Dunaliella tertiolecta*, mediante una emulsión de Espinosad**

Se usó una emulsión en agua que contenía Tracer® al 23,2% p/p = espinosad al 10% en el inicio de este ensayo. La *Dunaliella tertiolecta* se mantuvo en cultivos madre en tubos de ensayo de 20 ml como cultivos de siembra y se mantuvo en un ciclo de transferencia de siete días. Las micro-algas marinas se inocularon en matraces cónicos de 250 ml que contenían 100 ml de agua de mar filtrada y esterilizada en medio de crecimiento F/2-Guillard-1975. La emulsión de espinosad al 10% inicial (con el código Entarco 820510%) se disolvió adicionalmente en agua destilada

y se añadió a diversas concentraciones a cada cultivo algáceo para concentraciones finales que variaban de  $10^{-2}$  mg de espinosad/ml a  $10^{-9}$  mg de espinosad/ml. Los controles consistían en cultivo algáceo sin la solución de ensayo. Cada grupo de ensayo consistía en 3 matraces.

- 5 El cultivo típico pasa por cuatro fases. La fase de latencia se caracteriza por una pequeña o ninguna multiplicación de las células. La fase logarítmica, o fase exponencial, es cuando hay un rápido aumento en la velocidad de la división celular. Durante la siguiente fase, denominada fase estacionaria, el número de células vivas permanece constante y no hay crecimiento adicional. En la fase de declive, las células comienzan el proceso de muerte o senescencia. El crecimiento de las células algáceas en cada matraz se contó cada día mediante un hemocitómetro.
- 10 Se determinó el crecimiento y declive del cultivo en su totalidad en presencia o ausencia de espinosad (Targett, 1988 Allelochemistry in marine organisms: Chemical fouling and antifouling strategies).

Condiciones ambientales del cultivo en los matraces:

<p><b>Iluminación</b>  <b>Ciclo:</b> 12 horas de luz/12 horas de oscuridad  <b>Tipo:</b> Tubos fluorescentes: 2-F20T12 Westinghouse blanco frío  <b>Intensidad:</b> 133-299 uE in/seclm<sup>2</sup>  <b>Temperatura:</b> 20 °C</p>
<p><b>Agua</b>  <b>Tipo:</b> Curada, esterilizada  <b>Salinidad:</b> 30 ppt  <b>Volumen total:</b> 250 ml  <b>Tamaño del matraz:</b> Matraz Erlenmeyer de vidrio Pyrex de 1 l</p>
<p><b>Concentración</b>  <b>Densidad de siembra:</b> 2,5-5,0 x 10<sup>4</sup> células por ml  <b>Nutrientes:</b> 1 ml de nutrientes madre por litro de agua de mar  <b>Tiempo para florecer:</b> 6-7 días  <b>Densidad floral:</b> 1-3 x 10<sup>6</sup> células por ml</p>

- 15 Los datos expuestos en la figura 1 muestran que el espinosad tiene propiedades de inhibición de microalgas significativas que son dependientes de la dosis.

**Ejemplo 5**

20 **PRUEBA DE INMERSIÓN ESTÁTICA DE 40 SEMANAS**

- Se revistieron paneles de ensayo de unas dimensiones aproximadas de 7,6 x 20,4 cm y se etiquetaron como se indica a continuación: La cara AA se revistió con una formulación de pintura que consistía en pintura acrílica convencional de color blanco al 77,3% p/p (sin conservantes u otros agentes antiincrustantes) y un producto Tracer® al 22,7% p/p (contenido de la formulación en espinosad al 10%). La cara BB se revistió únicamente con el vehículo (la pintura sin espinosad) como un panel de control. La cara CC se revistió con una formulación de pintura que consistía en pintura acrílica convencional de color blanco al 88,6% p/p (sin conservantes u otros agentes antiincrustantes) y un producto Tracer® al 11,4% p/p (contenido de la formulación en espinosad al 5%). La cara DD no se revistió con ningún material. No había revestimiento sobre la superficie etiquetada de ninguno de los paneles. Los paneles se pusieron en los soportes de una plataforma flotante y quedaron sumergidos continuamente en Tuticorin Bay, India, durante un periodo de 40 semanas. Los paneles se examinaron durante unos minutos cada mes y se sumergieron de nuevo inmediatamente después de fotografiarlos. Los datos obtenidos se exponen en la tabla 4 que se indica a continuación y se representan por las figuras 2 y 3. Estos datos demuestran claramente que las composiciones de revestimiento que contienen espinosinas, y espinosad en particular, son muy eficaces durante mucho tiempo en la prevención de la adhesión de organismos incrustantes, especialmente incrustantes duros como percebes, sobre las superficies de estructuras bajo el agua a las que se aplica la composición. Al final de este ensayo también se adjuntan en la presente fotografías de algunos de los paneles.

Tabla 4: Prueba de inmersión estática de 40 semanas

PANEL N°	ID DE PANEL	CARA	NÚMERO DE PERCEBES INDIVIDUALES	% DE SUPERFICIE CUBIERTA POR PERCEBES	NÚMERO DE PERCES SOBRE LA SUPERFICIE ETIQUETADA	DIÁMETRO MÁXIMO EN MM	N° DE OSTRAS	GUSANOS TUBÍCULAS
1	AA	a	13	-	40	10	-	-
	BB	b	+++	80	21	18	5	5
2	AA	a	16	-	33	8	1	-
	BB	b	+++	85	30	18	2	6
3	AA	a	6	-	40	18	-	-
	BB	b	+++	70	32	18	1	6
4	CC	a	-	-	27	9	-	3
	DD	b	+++	60	20	18	-	1
5	CC	a	4	-	30	10	-	-
	DD	b	+++	60	23	18	1	2
6	CC	a	-	-	24	6	-	-
	DD	b	+++	60	33	18	-	-

Nota 1: cuando los percebes son demasiados para contarlos (símbolo: ++++), se hace referencia al % de la superficie del panel cubierto por ellos, en la siguiente columna.

Nota 2: el área etiquetada no tiene revestimiento, por lo tanto, los percebes puede adherirse a esta área.



## REIVINDICACIONES

1. Una composición de revestimiento antiincrustante marina o de agua dulce que comprende al menos una espinosina o un derivado o sal de la misma y un vehículo, en la que dicha composición es eficaz para prevenir la adhesión de organismos acuáticos a artículos a los que se aplica dicha composición.
2. La composición de revestimiento antiincrustante marina o de agua dulce de la reivindicación 1, en la que dicho vehículo se selecciona entre un agente formador de película, un material cementoso, un material termoplástico, fibra de vidrio, un material elastomérico y caucho vulcanizado.
3. La composición de revestimiento antiincrustante marina o de agua dulce de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un ingrediente activo adicional seleccionado entre biocidas antiincrustantes, microbicidas, antiincrustantes de origen natural, sales metálicas antiincrustantes, bactericidas, fungicidas, algicidas, insecticidas y antibióticos, incluyendo formas libres o encapsuladas de los anteriores o mezclas de los mismos.
4. La composición de revestimiento antiincrustante marina o de agua dulce de la reivindicación 3, en la que el al menos un biocida antiincrustante es:
- a) una isotiazolona; o
- b) se selecciona entre etilenobisditiocarbamato de manganeso; dimetil ditiocarbamato de cinc; 2-metil-4-t-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina; 2,4,5,6-tetracloroisofaltonitrilo; N,N-dimetil diclorofenilo urea; etilenobisditiocarbamato de cinc; tiocianato de cobre; 4,5-dicloro-2-n-octil-3-isotiazolona; N-(fluorodichlorometiltio)-ftalimida; N,N-dimetil-N'-fenil-N'-fluorodichlorometiltio-sulfamida; 2-piridinatiol-1-óxido de cinc; disulfuro de tetrametiltiuram; 2,4,6-triclorofenilmaleimida; 2,3,5,6-tetracloro-4-(metilsulfonil)-piridina; carbamato de 3-yodo-2-propinil butilo; diyodometil p-tolil sulfona; etilenobisditiocarbamato de bis dimetil ditiocarbamoil cinc; dicloruro de fenil(bispiridil)bismuto; 2-(4-tiazolil)-bencimidazol; piridina trifenil borano; fenilamidas; compuestos de halopropargilo; 2-haloalcoxiaril-3-isotiazolonas, tales como 2-(4-trifluorometoxifenil)-3-isotiazolona, 2-(4-trifluorometoxifenil)-5-cloro-3-isotiazolona y 2-(4-trifluorometoxifenil)-4,5-dicloro-3-isotiazolona, antiincrustantes organometálicos, tales como tributil estaño o trifenil estaño, y antiincrustantes inorgánicos, tales como óxido de cinc, cobre, óxido de cobre u óxido de dicobre, y dióxido de azufre.
5. La composición de revestimiento antiincrustante marina o de agua dulce de la reivindicación 1, en la que la espinosina está presente en un porcentaje de:
- a) del 0,001% al 90%; o
- b) del 0,1% al 10%.
6. La composición de revestimiento antiincrustante marina o de agua dulce de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un aditivo seleccionado entre pigmentos, diluyentes orgánicos, cargas, extensores, agentes expansores, agentes humectantes, agentes anticongelación, promotores de la adhesión, estabilizadores UV, aplanadores, conservantes y combinaciones de los mismos.
7. La composición de revestimiento antiincrustante marina o de agua dulce de la reivindicación 1, en la que la composición es una composición de liberación controlada.
8. Un procedimiento para proteger un artículo sumergido en agua marina o agua dulce de organismos incrustantes que comprende aplicar a dicho artículo una composición de acuerdo con la reivindicación 1.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dichos organismos incrustantes marinos o de agua dulce se seleccionan entre percebes, mejillones cebra, algas, diatomeas, bacterias, hidroides, briozoos, esponjas, tunicados, moluscos, ascidias, gusanos tubícolas y almejas asiáticas.
10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la composición que comprende al menos una espinosina comprende adicionalmente un ingrediente activo antiincrustante adicional seleccionado entre biocidas antiincrustantes, microbicidas, antiincrustantes de origen natural, sales metálicas antiincrustantes, bactericidas, fungicidas, algicidas, insecticidas y antibióticos, incluyendo formas libres o encapsuladas de los anteriores o mezclas de los mismos.
11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la composición de revestimiento comprende un

aglutinante polimérico formador de película.

12. La composición de revestimiento antiincrustante marina o de agua dulce de la reivindicación 1, o el procedimiento de la reivindicación 11, en la que dicha composición de revestimiento es una pintura, un barniz, una imprimación o un sellador.
13. Un producto que comprende una estructura marina o de agua dulce sumergible protegida contra organismos incrustantes, en la que dicha protección se proporciona mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8.
14. El producto de la reivindicación 13, en el que dicha protección se proporciona mediante una composición de revestimiento que se ha aplicado sobre dicha estructura, comprendiendo dicha composición de revestimiento un aglutinante polimérico formador de película.
15. El producto de la reivindicación 13, en el que dicha estructura es un barco, un buque, un equipo de acuicultura, una plataforma petrolífera, una cubierta, una red de pesca, un pilar, un muelle y componentes para los mismos.
16. Un procedimiento para la fabricación de un producto o componente sumergible, seleccionado entre al menos uno de un barco, un buque, un equipo de acuicultura, una plataforma petrolífera, una cubierta, una red de pesca, un pilar, un muelle y componentes para los mismos, que comprende incorporar en dicho producto o componente una composición antiincrustante que comprende al menos una espinosina o un derivado o sal de la misma.
17. La composición de revestimiento antiincrustante marina o de agua dulce de la reivindicación 1, o el procedimiento de las reivindicaciones 8 ó 16, en la que la al menos una espinosina se selecciona entre espinosad, espinetoram y butenil espinosina.
18. Un producto que comprende una estructura marina o de agua dulce sumergible protegida contra organismos incrustantes en la que dicha protección se proporciona mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16.
19. Un procedimiento de inhibición del desarrollo de bacterias del género *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y *Aeromonas* en un entorno acuático poniendo en contacto las bacterias con una composición que comprende al menos una espinosina seleccionada entre espinosad, espinetoram y butenil espinosina.
20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el entorno acuático es una estructura de piscicultura.

Figura 1

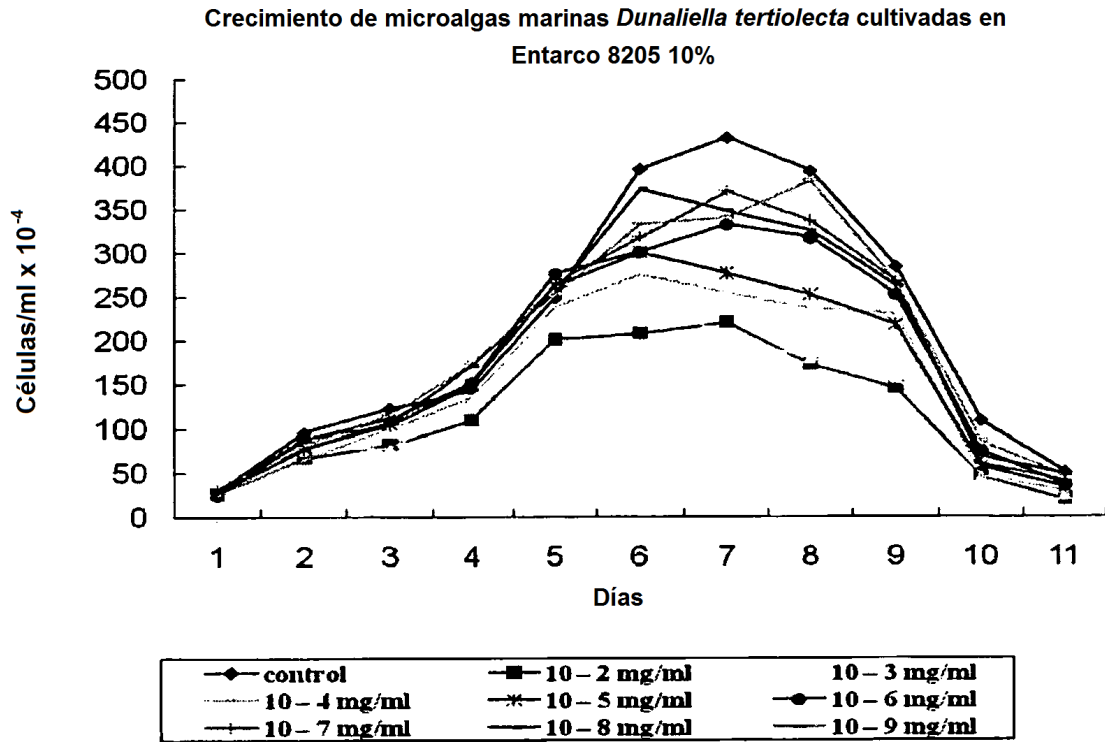


Figura 1. El crecimiento de *Dunaliella tertiolecta* se controló a través de la fase logarítmica y de latencia en presencia de diversas concentraciones de espinosad.

Figura 2

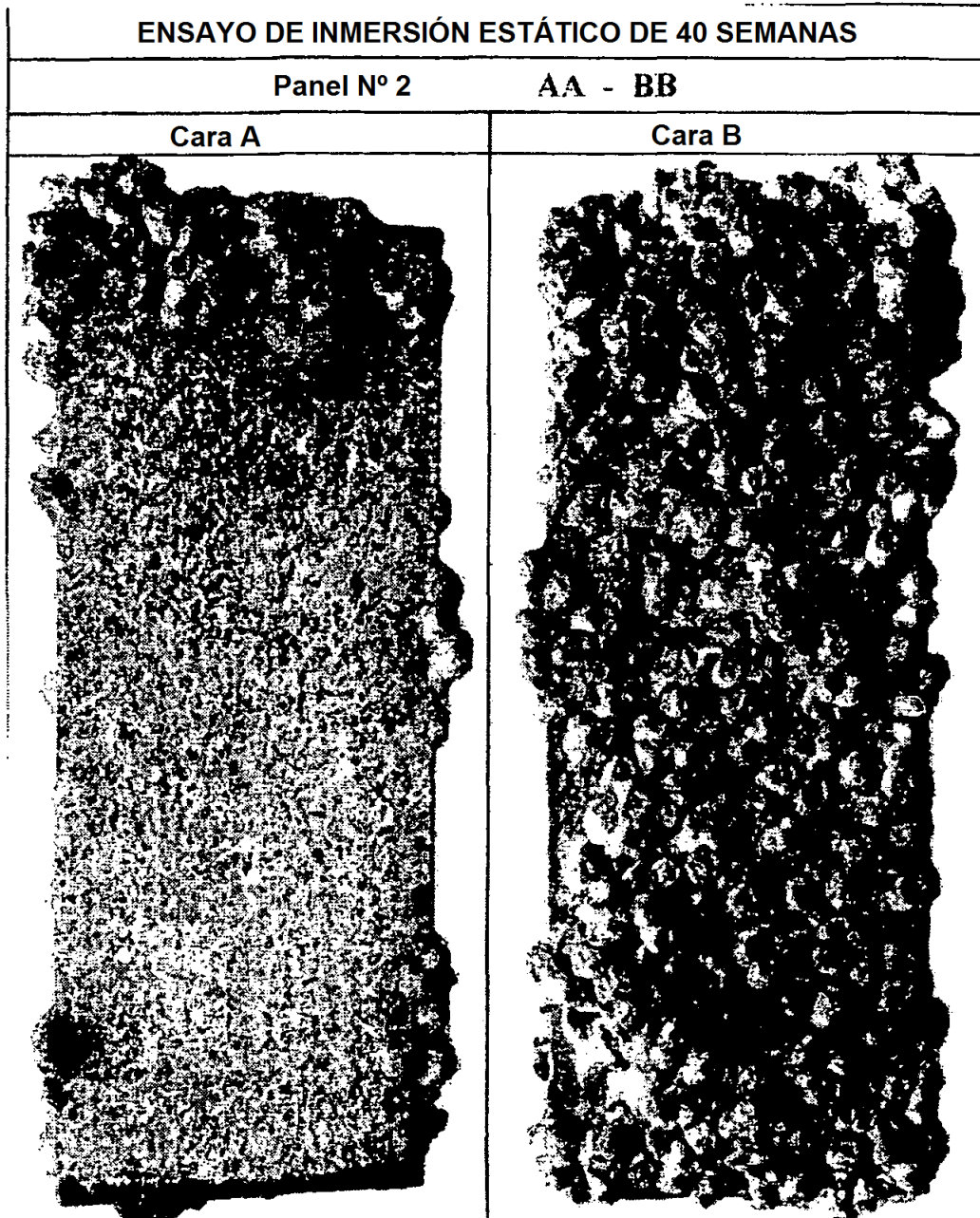


Figura 3

