

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 415**

51 Int. Cl.:

| | | |
|-------------------|-----------------------------|-----------|
| B01J 13/02 | (2006.01) <i>A01N 31/16</i> | (2006.01) |
| A01N 25/28 | (2006.01) <i>A01N 31/08</i> | (2006.01) |
| A01N 35/06 | (2006.01) <i>A01N 31/02</i> | (2006.01) |
| A01N 35/02 | (2006.01) <i>A01N 25/28</i> | (2006.01) |
| A01N 31/16 | (2006.01) <i>A01N 35/02</i> | (2006.01) |
| A01N 31/08 | (2006.01) <i>A01N 31/16</i> | (2006.01) |
| A01N 31/02 | (2006.01) <i>A01N 31/08</i> | (2006.01) |
| A61K 9/50 | (2006.01) | |
| A01N 35/06 | (2006.01) | |
| A01N 35/02 | (2006.01) | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2005 E 05744354 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1753529**

54 Título: **Composiciones que contienen una partícula hueca de glucano o una partícula de pared celular encapsulando un componente de terpeno, métodos para su fabricación y utilización.**

30 Prioridad:

20.05.2004 US 572892 P
24.01.2005 WO PCT/GB2005/000240

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.12.2013

73 Titular/es:

EDEN RESEARCH PLC (100.0%)
The Hawk Creative Business Park, The Hawkhills Estate, Easingwold, York North Yorkshire YO61 3FE, GB

72 Inventor/es:

FRANKLIN, LANNY y OSTROFF, GARY

74 Agente/Representante:

TRULLOLS DURÁN, María Del Carmen

ES 2 434 415 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).

DESCRIPCION

Composiciones que contienen una partícula hueca de glucano o una partícula de pared celular encapsulando un componente de terpeno, métodos para su fabricación y utilización.

5

La presente invención se refiere a composiciones que contienen terpenos y partículas huecas de glucano o partículas huecas de pared celular, y a los métodos para la preparación de tales composiciones. Las composiciones aumentan la estabilidad y la actividad del terpeno y proporcionan un vehículo adecuado para los terpenos. La invención también se refiere a métodos de utilización de tales composiciones en los ámbitos médico, veterinario y agrícola.

10

Los terpenos son compuestos químicos de presencia muy extendida en la naturaleza, principalmente en plantas, como elementos constituyentes de aceites esenciales. Su componente es el hidrocarburo isopreno (C_5H_8)_n. Entre los ejemplos de terpenos se cuentan el citral, pineno, nerol, b-ionona, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona, terpeniol, anetol, alcanfor, mentol, limoneno, nerolidol, farnesol, fitol, caroteno (vitamina A₁), escualeno, timol, tocotrienol, perillil-alcohol, borneol, mirceno, simeno, careno, terpeneno y linalool.

15

Los terpenos están clasificados como generalmente reconocidos como seguros (GRAS) y vienen utilizándose desde hace muchos años en las industrias de los sabores y los aromas. La DL₅₀ en ratas del citral es de aproximadamente 5 g/kg, lo cual constituye una indicación adicional de la seguridad relativa de estos compuestos. Además, los terpenos tienen un periodo de vida relativamente corto de aproximadamente 28 días una vez expuestos al oxígeno (p. ej. aire). Los terpenos se descomponen formando CO₂ y agua. Esta descomposición de los terpenos demuestra la seguridad y la compatibilidad medioambiental de las composiciones y los métodos de la invención.

20

Se ha demostrado que los terpenos inhiben el crecimiento de células cancerosas, reducen el tamaño de tumores, reducen los niveles de colesterol y tienen un efecto biocida sobre microorganismos *in vitro*. Owawunmi, (Letters in Applied Microbiology, 1993, 9(3): 105-108), demostró que los medios de cultivo con más de 0,01 % de citral reducían la concentración de *E. coli*, y al 0,08 % se observaba un efecto bactericida. La Patente de EE. UU. N.º 5,673,468 describe una formulación de terpeno, basada en aceite de pino, utilizada como desinfectante o limpiador antiséptico. La Patente de EE. UU. N.º 5,849,956 enseña que un terpeno presente en el arroz posee actividad antifúngica. La Patente de EE. UU. N.º 5,939,050 describe un producto de higiene oral antimicrobiano con una combinación de 2 o 3 terpenos que demostraron un efecto sinérgico. Diversas Patentes de EE. UU. (Patente de EE. UU. N.º 5,547,677, 5,549,901, 5,618,840, 5,629,021, 5,662,957, 5,700,679, 5,730,989) enseñan que ciertos tipos de emulsiones de aceite en agua poseen propiedades antimicrobianas, adyuvantes y de liberación. Se ha demostrado que los terpenos son agentes antitumorales nutricionalmente eficaces y no tóxicos, que actúan mediante diversos mecanismos de acción (Crowell et al. Crit. Rev. Oncog., 1994,5(1): 1-22; Crowell et al. Adv. Exp. Med. Biol., 1996, 401: 131-136). Los terpenos geraniol, tocotrienol, perillil-alcohol, b-ionona y d-limoneno inhiben la actividad hepática de la HMG-CoA reductasa, una fase limitadora de la velocidad en la síntesis del colesterol, y reducen modestamente los niveles de colesterol en animales (Elson et al, J. Nutr., 1994, 124: 607-614). El d-limoneno y el geraniol redujeron tumores mamarios (Elegbede et al. Carcinogenesis, 1984, 5(5): 661-664; Elegbede et al., J. Natl. Cancer Inst., 1986, 76(2): 323-325; Karlson et al. Anticancer Drugs, 1996, 7(4): 422-429) e inhibieron el crecimiento de tumores transplantados (Yu et al., J. AgrL Food Chem., 1995, 43: 2144-2147).

25

30

35

40

También se ha observado que los terpenos inhiben el crecimiento *in vitro* de bacterias y hongos (Chaumont et al., Ann. Pharm. Fr., 1992, 50(3): 156-166; Moleyar et al., Int. J. Food Microbiol, 1992, 16(4): 337-342; and Pattnaik et al. Microbios, 1997, 89(358): 39-46) y de algunos parásitos internos y externos (Hooser et al., J. Am. Vet. Med. Assoc., 1986, 189(8): 905-908). Se ha demostrado que el geraniol inhibe el crecimiento de cepas de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, incrementando la tasa de pérdida de potasio y reduciendo la fluidez de la membrana (Bard et al., Lipids, 1998,23(6): 534-538). La b-ionona tiene actividad antifúngica, que fue determinada mediante la inhibición de la germinación de esporas y la inhibición del crecimiento en agar (Mikhlin et al., A. Prikl. Biokhim. Mikrobiol, 1983, 19: 795-803; Salt et al., Adam. Physiol. Molec. Plant Path, 1986, 28: 287-297). El Terpenone (geraniogeraniolacetona) ejerce un efecto antibacteriano sobre *H. pylori* (Ishii, Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis., 1993, 280(1-2): 239-243). Se ha demostrado que Rosanol, un producto comercial con un 1 % de aceite de rosa, inhibe el crecimiento de diversas bacterias (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *E. coli* y *H. pylori*). El geraniol es el componente activo (75%) del aceite de rosa. El aceite de rosa y el geraniol en una concentración de 2 mg/L inhibieron el crecimiento de *H. pylori in vitro*. Se ha demostrado que algunos extractos de medicinas herbales ejercen un efecto inhibitor en *H. pylori*, siendo los más efectivos el decursinol angelato, decursin, magnolol, berberina, ácido cinámico, decursinol y ácido gálico (Bae et al., Biol. Pharm. Bull., 1998, 21 (9) 990-992). Los extractos de anacardo, ácido anacárdico y (E)-2-hexenal han demostrado tener un efecto bactericida contra *H. pylori*.

50

55

Los diterpenos, esto es, trichorabdal A (extraído de *R. Trichocarpa*), han demostrado tener un efecto antibacteriano muy potente contra *H. pylori* (Kadota et al., Zentralbl. Bakteriologie, 1997, 287(1): 63-67).

Soluciones de 11 terpenos diferentes fueron efectivas en la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas en ensayos *in vitro*; se demostraron efectivos niveles de entre 100 ppm y 1000 ppm. Los terpenos fueron diluidos en agua con 1 % de polisorbato 20 (Kim et al., J. Agric. Food Chem., 1995,43: 2839-2845).

Podrían existir diferentes modos de acción de los terpenos contra microorganismos; podrían (1) interferir con la bicapa fosfolipídica de la membrana celular, (2) obstaculizar diversos sistemas enzimáticos (HMG-reductasa) y (3) destruir o desactivar material genético. Se cree que, puesto que los modos de acción de los terpenos son tan básicos, p. ej. bloqueo del colesterol, los agentes infecciosos no podrán desarrollar una resistencia a los terpenos.

Sin embargo, el uso de terpenos reviste una serie de inconvenientes. Entre éstos se cuentan:

- Los terpenos son líquidos, lo cual puede hacerlos difíciles de manipular e inadecuados para determinados fines.
- Los terpenos no son muy miscibles con agua, y generalmente se requiere el uso de detergentes, surfactantes u otros emulgentes para preparar emulsiones acuosas. No obstante, se puede obtener una solución estable mezclando los terpenos en condiciones de alto cizallamiento.
- Por regla general, las formulaciones de terpeno en polvo seco contienen únicamente un bajo porcentaje en peso de terpenos.
- Los terpenos son propensos a la oxidación en sistemas de emulsión acuosa, lo cual dificulta el almacenamiento prolongado.

Existen limitaciones de las técnicas actuales de recubrimiento por pulverización, extrusión, coacervación, encapsulación molecular y secado/enfriamiento por pulverización para proporcionar sistemas de liberación de ingredientes.

Las paredes celulares de la levadura de panadería se obtienen de células de levadura de panadería y se componen de los biopolímeros insolubles β -1,3-glucano, β -1,6-glucano, manano y quitina. Son típicamente microesferas con un diámetro de 2-4 micras con una pared de un grosor de cáscara de tan solo 0,2-0,3 micras rodeando una cavidad abierta. Este material posee una considerable capacidad de retención de líquido, y normalmente es capaz de absorber 5-25 veces su peso en líquido. La cáscara es lo suficientemente porosa como para permitir el paso de cargas útiles con un tamaño de hasta 150 000 dalton a través de la cáscara exterior y su absorción en la cavidad hueca de la partícula esférica. Las paredes celulares de la levadura de panadería poseen varias propiedades únicas, incluida la estabilidad al calor (p. ej. hasta 121 °C), estabilidad al cizallamiento, estabilidad al pH (p. ej. pH 2-12), y a concentraciones elevadas no crean una viscosidad significativa. Además de sus propiedades físicas, esta composición contiene fibras dietéticas naturales y saludables que aportan beneficios cardiovasculares e inmunopotenciación.

Las paredes celulares de la levadura se preparan a partir de células de levadura mediante la extracción y purificación de la fracción particulada insoluble de los componentes solubles de la célula de levadura. Las paredes celulares fúngicas pueden producirse a partir del subproducto insoluble de la fabricación de extracto de levadura. Además, las células de levadura pueden tratarse, sin dañar las paredes celulares de la levadura, con una solución de hidróxido acuoso que digiere la proteína y la porción intracelular de la célula, dejando el componente de la pared de la célula de levadura libre de contaminación significativa por proteína, y presentando sustancialmente la estructura inalterada de pared celular de glucanos ligados por β (1-6) y β (1-3). Una descripción más detallada de las partículas de glucano enteras y del proceso de su preparación se describe en la Patente de EE. UU. Jamas et al. N.º 4,810,646 y en las solicitudes co-pendientes de patentes U.S. Ser. N.º 166,929, U.S. Ser. N.º 297,752 y U.S. Ser. N.º 297,982. La Patente de EE. UU. N.º 6,242,594, asignada a Novogen Research Pty Ltd., describe un método de preparación de partículas de glucano de levadura mediante extracción con álcali, extracción con ácido y posteriormente extracción con un disolvente orgánico y finalmente secado. La Patente de EE. UU. N.º 5,401,727, asignada a AS Biotech-Mackzymal, revela los métodos para la obtención de partículas de glucano de levadura y los métodos para su utilización a fin de favorecer la resistencia en animales acuáticos y como adyuvante para vacunas. La Patente de EE. UU. N.º 5,607,677, asignada a Alpha-Beta Technology Inc., revela el uso de partículas de glucano enteras huecas como paquete de liberación y adyuvante para la liberación de diversos agentes farmacéuticos.

Otros tipos de células de levadura y fúngicas tienen paredes celulares que no contienen glucano. Las paredes celulares de tales células de levadura y fúngicas pueden aislarse mediante técnicas similares a las anteriormente mencionadas, a fin de obtener partículas de pared celular.

Además, las células de muchas plantas, algas, bacterias y otros microorganismos también tienen una pared celular. La estructura y la composición de la pared celular varía entre los microorganismos, pero en general es una

estructura robusta y relativamente inerte. Es posible obtener partículas de paredes celulares obtenidas de tales células mediante técnicas convencionales, tales como las mencionadas anteriormente en relación con la levadura.

Ep 0242135, W096/36433 y GB2162147 revelan la encapsulación de diversos compuestos, incluidos aceites esenciales, en células microbianas intactas. W002/12348 revela partículas de glucano de alta pureza y la absorción de eugenol en su interior.

Ahora hemos descubierto que los terpenos pueden ser absorbidos y encapsulados de forma estable en el interior de partículas de glucano huecas o partículas de pared celular. La encapsulación de terpenos en tales partículas puede conseguirse mediante la incubación de las partículas con el terpeno.

De conformidad con la presente invención, se da a conocer una composición que comprende una partícula de glucano hueca o una partícula de pared celular hueca que encapsula un componente de terpeno, donde la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca tiene un contenido en lípidos del 5 % o superior.

El término «partícula de glucano hueca», en el sentido con el que aquí se usa, incluye cualquier partícula hueca que comprenda el glucano como componente estructural. Así pues, en particular, el término incluye paredes de células de levadura (en formas purificadas o crudas) o partículas de glucano enteras huecas. El término «partícula de pared celular» se refiere a una partícula que comprende la pared de una célula (en forma purificada o cruda), donde el glucano no es un componente estructural. Entre las partículas aptas se incluyen las paredes celulares de células de plantas, algas, hongos o bacterias. Generalmente, las partículas de pared celular conservan la forma de la célula de la que se obtienen, y de este modo, como una partícula de glucano hueca, proporcionan una cavidad central hueca para encapsular el componente de terpeno.

Para la presente invención, es necesario que la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular sea capaz de encapsular de manera estable el componente de terpeno. En general, esto significa que la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular debe ser capaz de mantener su estructura durante la incubación con el componente de terpeno (generalmente, el componente de terpeno se halla a una concentración relativamente elevada), y que el componente de terpeno debe ser capaz de migrar a la partícula. Generalmente, las partículas de glucano huecas y las partículas de pared celular están formadas por materiales relativamente inertes y son porosas, y por consiguiente puede partirse de la premisa de que, en general, las partículas de glucano huecas y las partículas de pared celular podrán encapsular un componente de terpeno.

Las composiciones conforme a la presente invención son efectivas contra diversos agentes infecciosos, incluyendo bacterias, virus, micoplasmas, hongos y/o nematodos.

Las composiciones conforme a la presente invención pueden aportar las siguientes ventajas:

- maximizar la carga útil de terpeno;
- minimizar la carga útil no encapsulada;
- controlar la estabilidad de la carga útil;
- controlar la cinética de liberación de la carga útil;
- creación de una forma sólida de un terpeno líquido para aumentar la masa y la uniformidad;
- simplificar la manipulación y la aplicación de terpenos; y
- enmascarar el olor y el sabor del terpeno.

Partículas de glucano huecas o partículas de pared celular particularmente indicadas son las paredes de células fúngicas, preferentemente paredes de células de levadura. Las paredes de células de levadura son preparaciones de células de levadura que mantienen la estructura tridimensional de la célula de levadura de la cual se obtienen. Por consiguiente, tienen una estructura hueca que permite la encapsulación del componente de terpeno dentro de las paredes de la célula de levadura. Las paredes de levadura pueden obtenerse de manera adecuada a partir de células de levadura de panadería (disponible a través de Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO). También pueden obtenerse partículas de pared celular de levadura con las propiedades deseadas de la firma Biorigin (Sao Paolo, Brasil) con el nombre comercial Nutricell MOS 55. Estas partículas son un extracto de *S. cerevisiae* secado por pulverización.

Las partículas alternativas se conocen con los nombres comerciales SAF-Mannan (SAF Agri, Minneapolis, MN) y Nutrex (Sensient Technologies, Milwaukee, WI). Se trata de partículas de glucano huecas que constituyen el residuo insoluble del proceso de fabricación de extracto de levadura. Durante la producción de extractos de levadura, se eliminan los componentes solubles de las células de levadura parcialmente autolizadas y el residuo insoluble es un material adecuado para la carga con terpeno. Estas partículas de glucano huecas contienen aproximadamente un porcentaje en peso del 25-35 % de beta 1,3-glucano. Un atributo clave de estos materiales reside en el hecho de que contienen un porcentaje en peso de lípidos superior al 10 % y son muy efectivos en la absorción de terpenos. Además, como producto residual constituyen una fuente relativamente barata de partículas de glucano huecas.

Partículas de glucano huecas alternativas con una mayor pureza son las producidas por Nutricepts (Nutricepts Inc., Burnsville, MN) y ASA Biotech. Estas partículas han sido extraídas con álcali, en un proceso que elimina tanto componentes intracelulares adicionales como la capa de mannoпротеína exterior de la pared celular, resultando en una partícula con un porcentaje en peso de glucano del 50-65 %.

- 5 Partículas de glucano huecas de mayor pureza son las partículas WGP de Biopolymer Engineering. Estas partículas se extraen con ácido, eliminando componentes adicionales de la levadura y proporcionando un producto con un porcentaje en peso de glucano del 75-85 %.

10 Partículas de glucano huecas de muy alta pureza son Adjuvax™ de Alpha-beta Technology, Inc. (Worcester, MA) y el glucano microparticulado de Novogen (Stamford, CT). Estas partículas se extraen con disolvente orgánico, lo cual elimina los lípidos residuales y proporciona unas partículas con un contenido en glucano superior al 90 % en peso. Tales partículas no forman parte de la invención reivindicada.

15 Las partículas de glucano o las partículas de pared celular de alta pureza podrían ser necesarias, por ejemplo, allí donde se requiera un control estricto de posibles contaminantes. En estos casos, las partículas de mayor pureza serían preferibles a otros productos menos puros. Las partículas de menor pureza serían preferibles por motivos económicos; asimismo, se ha comprobado que estas partículas son más efectivas en la absorción de terpenos.

La partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular tiene un ligero contenido en lípidos. Un ligero contenido en lípidos puede incrementar la capacidad de la partícula de encapsular el componente de terpeno. El contenido en lípidos de la partícula de glucano hueca o de la partícula de pared celular es del 5 % en peso o superior w/w, más preferentemente del 10 % en peso o superior.

20 Opcionalmente, el componente de terpeno de la presente invención puede estar asociado a un surfactante. El surfactante puede ser no iónico, catiónico o aniónico. Entre los ejemplos de surfactantes apropiados se incluyen el laurilsulfato de sodio, polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 40, polisorbato 60, éster de poliglicerol, monooleato de poliglicerol, monocaprilato de decaglicerol, dicaprilato de propilenglicol, monoestearato de triglicerol, monooleato de sorbitano de polioxietileno, Tween®, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 80, Brig 30 o sus mezclas. El surfactante actúan para mantener el componente de terpeno en una emulsión, y asimismo facilita la encapsulación del componente de terpeno en la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular.

El componente de terpeno de la presente invención puede comprender un único terpeno o una mezcla de terpenos. Las mezclas de terpenos pueden resultar en efectos sinérgicos.

30 El término «terpeno» tal como se utiliza aquí no se refiere únicamente a los terpenos con la fórmula $(C_5H_8)_n$, sino que engloba también derivados del terpeno, tales como aldehídos de terpeno o polímeros de terpeno. Se incluyen terpenos naturales y sintéticos, por ejemplo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos. Además, la referencia a un nombre concreto de un compuesto englobará los diversos isómeros de dicho compuesto. Por ejemplo, el término citral incluye el isómero cis citral-a (o geranial) y el isómero trans citral-b (o neral).

35 Cabe señalar que los terpenos también son conocidos por los nombres del extracto o del aceite esencial que los contiene, p. ej. aceite de citronela (contiene citral).

Los terpenos que están exentos de las regulaciones estadounidenses y que están recogidos en la normativa EPA 40 C.F.R. Parte 152 (incorporada en la presente memoria en su totalidad por referencia) son adecuados para su uso en esta invención.

40 Entre los terpenos particularmente adecuados para el uso en la presente invención se incluyen aquellos seleccionados del grupo consistente en citral, pineno, nerol, b-ionona, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona (por ejemplo L-carvona), terpeniol, anetol, alcanfor, mentol, timol, limoneno, nerolidol, farnesol, fitol, caroteno (vitamina A₁), escualeno, tocotrienol, perillil-alcohol, borneol, mirceno, simeno, careno, terpeneno, y linalool y sus mezclas.

Preferentemente, los terpenos utilizados en la presente invención tienen la estructura general C₁₀H₁₆, dado que este subgrupo es generalmente más efectivo contra los agentes infecciosos.

45 Más preferentemente, el componente de terpeno comprende un terpeno seleccionado del grupo consistente en geraniol, timol, citral, carvona (por ejemplo L-carvona), eugenol y b-ionona.

Convenientemente, el componente de terpeno puede comprender timol, ya que este terpeno ha demostrado ser particularmente efectivo en el tratamiento o la prevención de infecciones fúngicas en plantas.

50 Otro terpeno particularmente adecuado es el citral, que ha demostrado una especial eficacia contra diversos microorganismos.

Una combinación de geraniol, timol y eugenol ha demostrado especial eficacia en el combate contra infecciones en plantas, y por consiguiente es un componente de terpeno particularmente adecuado.

Otras formulaciones de terpeno que han demostrado una elevada eficacia en el tratamiento de infecciones de plantas incluyen (porcentajes en peso):

- 100 % timol;
- 50 % geraniol y 50 % timol;
- 5 - 50 % eugenol y 50 % timol;
- 33 % geraniol, 33 % eugenol y 33 % timol;
- 33 % eugenol, 33 % timol y 33 % citral;
- 25 % geraniol, 25 % eugenol, 25 % timol y 25 % citral;
- 20 % geraniol, 20 % eugenol, 20 % citral, 20 % timol y 20 % L-carvona.

10 Por consiguiente, un componente de terpeno que comprenda cualquiera de las formulaciones anteriormente especificadas es particularmente adecuado para su uso en la presente invención.

En una realización, el componente de terpeno incluye uno o más terpenos que contienen oxígeno. El citral, por ejemplo citral 95, es un terpeno $C_{10}H_{16}$ oxigenado, $C_{10}H_{16}O$ n.º CAS 5392-40-5 (3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-al).
 15 Puede formarse una suspensión estable de citral hasta aproximadamente 2500 ppm. El citral puede transformarse en una solución hasta aproximadamente 500 ppm. Puede elaborarse una suspensión estable de partículas de glucano huecas que incorporen citral con 25 ppt de citral.

La composición de la invención puede comprender terpenos entre el 1 y el 99 % por volumen, surfactante entre el 0 y el 99 % por volumen y partículas de glucano huecas o partículas de pared celular entre el 1 y el 99 %. Más específicamente, la composición puede comprender entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 67 %
 20 de terpenos en peso, aproximadamente un 0,1-10 % de surfactante y aproximadamente un 40-90 % de partículas de glucano huecas o partículas de pared celular.

Convenientemente, la composición de la presente invención comprende entre aproximadamente 500 y aproximadamente 10 000 ppm de partículas de glucano huecas o partículas de pared celular, donde las partículas contienen entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 67 % de componente de terpeno. Preferentemente, la
 25 composición comprende entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 2000 ppm de partículas de glucano huecas o partículas de pared celular, donde las partículas contienen entre aproximadamente un 10 y aproximadamente un 50 % de componente de terpeno.

Las composiciones específicas pueden incluir, p. ej. para bacterias y hongos, partículas de glucano huecas o partículas de pared celular encapsulando terpenos en agua o solución salina estándar al 0,9 % con hasta un 67 %
 30 de L-carvona, hasta un 67 % de eugenol, hasta un 67 % de citral, hasta un 67 % de timol y L-carvona, hasta un 67 % de geraniol o hasta un 67 % de citral y L-carvona y eugenol, y un 1 % de Tween® 80; para moho, partículas de glucano huecas o partículas de pared celular encapsulando terpenos en agua o solución salina estándar al 0,9 % con hasta un 67 % de citral y un 1 % de Tween® 80; o para micoplasma, partículas de glucano huecas o partículas de pared celular encapsulando terpenos en agua o solución salina estándar al 0,9 % con hasta un 67 % de citral,
 35 hasta un 67 % de L-carvona y eugenol, hasta un 67 % de eugenol, hasta un 67 % de geraniol, o hasta un 67 % de geraniol, timol y un 1 % de Tween® 80.

Pueden utilizarse concentraciones de partículas de glucano huecas o partículas de pared celular encapsulando terpenos de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 125, 130, 140, 150, 160, 175, 190, 200, 225, 250, 275,
 40 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1250, 1375, 1425, 1500, 1600, 1750, o 2000 ppm como concentraciones efectivas en las composiciones y los métodos de la presente invención. Pueden obtenerse, y podrían ser útiles en la presente invención, concentraciones aún más elevadas (de hasta 25 ppt, esto es, partes por mil).

La composición de la presente invención puede comprender entre aproximadamente 1 ppm y aproximadamente 25 ppt (25 000 ppm) del componente de terpeno, preferentemente entre 100 y 2000 ppm del componente de terpeno, por ejemplo 250, 500, 1000, 2000 ppm de dicho componente.
 45

Los terpenos, surfactantes y otros componentes de la invención podrían adquirirse ya listos para usar o bien sintetizarse utilizando técnicas generalmente conocidas por los químicos sintéticos.

Por motivos de seguridad y legislativos, es altamente preferible que los terpenos utilizados en la presente invención sean como mínimo terpenos de grado alimentario (tal como están definidos por la FDA de los Estados Unidos o por organismos reguladores nacionales equivalentes fuera de los EE. UU.).
 50

Opcionalmente, la composición puede comprender otros compuestos activos de grado alimentario además del componente de terpeno, como por ejemplo otros agentes antimicrobianos, enzimas o similares.

Opcionalmente, la composición puede comprender otros agentes activos además del componente de terpeno, como por ejemplo un agente antimicrobiano, un agente antifúngico, un agente insecticida, un agente antiinflamatorio, un anestésico o similar. Los agentes adecuados incluyen:

- 5 - Antifúngicos: Hidrolasas de pared celular (siempre y cuando no degraden la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular), inhibidores de la síntesis de la pared celular, antifúngicos estándar.
- Antibacterianos: Antisépticos, hidrolasas de pared celular, inhibidores de la síntesis, antibióticos.
- Insecticidas: Insecticidas naturales, quitinasa.

La composición puede comprender un antioxidante para reducir la oxidación del terpeno. Un ejemplo de uno de estos antioxidantes podría ser el aceite de romero, la vitamina C o la vitamina E.

- 10 La composición de la presente invención puede ser en forma de un polvo seco. La composición puede administrarse en combinación con un vehículo o excipiente aceptable agrícola, alimentaria o farmacéuticamente en forma líquida, sólida o gelatinosa.

Para composiciones sólidas, los vehículos adecuados incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

- 15 Convenientemente, la formulación es en forma de comprimido o de gránulo. Otro vehículo adecuado también podría ser un alimento humano o animal. Además, también podrían utilizarse vehículos vegetales convencionales.

Un gránulo, un comprimido u otra forma sólida de la composición también puede contener preferentemente un agente dispersor que favorezca la dispersión de la composición al sumergirla en un líquido, p. ej. agua. Entre los agentes dispersores adecuados se incluyen goma xantana, maltodextrina, alginatos o similares.

- 20 Pueden prepararse composiciones líquidas, por ejemplo dispersando la composición en agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol o similares, para formar una solución o suspensión. Si se desea, estas composiciones pueden contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores de pH (por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitano, acetato de sodio de trietanolamina u oleato de trietanolamina). Los métodos para la preparación de tales composiciones líquidas son conocidos o serán obvios para los expertos en esta técnica; por ejemplo véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy; Lippincott, Williams & Wilkins; (15 de diciembre de 2000) - incorporado en la presente memoria por referencia. De nuevo, podría prepararse una composición líquida dispersando la composición en un alimento líquido o bebida de tipo humano o animal. Además podría utilizarse un vehículo vegetal líquido adecuado.

- 30 Generalmente, para la administración oral son preferibles comprimidos y gránulos. Los comprimidos podrían contener aglutinantes y lubricantes. Los polvos finos o los gránulos podrían contener agentes diluyentes, dispersantes y/o surfactantes, y pueden presentarse en agua o en un jarabe. Las cápsulas o bolsitas pueden contener la composición en estado seco de forma práctica. Las soluciones o suspensiones no acuosas de la composición también son adecuadas y podrían contener agentes de suspensión. Cuando se considere deseable o necesario, pueden incluirse agentes aromatizantes, conservantes, de suspensión, espesantes o emulsionantes. Por supuesto, sería adecuado utilizar un alimento o bebida como método de administración oral.

- La administración parenteral se caracteriza generalmente por la inyección. Para los inyectables se apreciará que, en general, todos los materiales utilizados en la composición y cualquier vehículo utilizado deben ser de grado farmacéutico. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones líquidas, emulsiones o suspensiones, formas sólidas adecuadas para la disolución, suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Un método alternativo para la administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida, de forma que se mantenga un nivel de dosificación constante. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 3,710,795, incorporada en la presente memoria por referencia. Las preparaciones para administración parenteral también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (como el aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables (tales como el etil-oleato). Entre los vehículos acuosos se incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluida la solución salina y medios tamponados. Otros vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer lactada o aceites fijos. Los vehículos para el uso intravenoso incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

- 55 Para la administración tópica se pueden utilizar líquidos, suspensión, lociones, cremas, geles, pomadas, gotas, supositorios, pulverizadores y polvos. En la medida en que se considere necesario o deseable, pueden utilizarse vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, de polvo u oleosas, espesantes y similares.

Además, la presente invención da a conocer un método para la preparación de una partícula de glucano hueca o de una partícula de pared celular hueca encapsulando un componente de terpeno, comprendiendo dicho método los siguientes pasos:

- 5 a) proveer un componente de terpeno;
- b) proveer una partícula de glucano hueca o una partícula de pared celular hueca;
- c) incubar el componente de terpeno con la partícula de glucano o la partícula de pared celular hueca en condiciones adecuadas para la encapsulación del terpeno; y
- d) recuperar la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca que encapsula el componente de terpeno.

10 Opcionalmente, el método anteriormente descrito puede comprender además el paso de secar las partículas que encapsulan el componente de terpeno. El secado puede lograrse de diversas maneras, entre las cuales se pueden mencionar la liofilización, el secado por lecho fluido, el secado en tambor o el secado por pulverización, todos los cuales son procesos bien conocidos.

15 En el paso a) del método anteriormente descrito, el componente de terpeno se provee convenientemente como suspensión en un disolvente acuoso, y opcionalmente en presencia de un surfactante. Convenientemente, el disolvente es agua. Un surfactante adecuado es Tween-80 (monooleato de sorbitano de polioxietileno), y preferentemente el surfactante está presente en una concentración de aproximadamente el 0,1 al 10 % por volumen de la mezcla de reacción total, más preferentemente alrededor del 1 %. Alternativamente, el componente de terpeno puede proveerse como una solución verdadera en un disolvente, p. ej. agua. Puede obtenerse una solución verdadera de terpeno en agua mezclando el terpeno en agua en condiciones de alto cizallamiento hasta obtener una solución verdadera. La publicación N.º WO 03/020024 proporciona más detalles acerca de la formación de soluciones verdaderas de terpenos en agua.

20 En el paso b) del método anteriormente descrito, la partícula de glucano o partícula de pared celular hueca se provee convenientemente como suspensión en agua o en otro líquido adecuado. Convenientemente, la suspensión comprende aproximadamente de 1 a 1000 mg de partículas por ml, preferiblemente entre 200 y 400 mg/ml. Alternativamente, las partículas pueden proveerse como polvo seco y añadirse a la suspensión de terpeno-surfactante.

25 Alternativamente, las partículas se proveen en líquido suficiente para hidratar mínimamente las partículas, pero no en exceso significativo. El término «volumen hidrodinámico» (VH) se utiliza para describir el volumen de líquido requerido para hidratar mínimamente las partículas. Por lo tanto, convenientemente se proveen las partículas con un volumen que abarca desde el VH y un volumen de 1,5 veces el VH (1,5 VH). Esto permite que el paso de secado subsiguiente sea más eficiente. Asimismo, en caso de que se utilice un bajo volumen de líquido (esto es, en torno al VH hasta 1,5 VH), también es posible extruir el producto acabado en forma de gránulo o de filamento, lo cual es conveniente para el secado por lecho fluido.

30 Se ha comprobado que el componente de terpeno puede ser encapsulado por la partícula de glucano o la partícula de pared celular hueca a temperatura ambiental. No obstante, la tasa de encapsulación se incrementa a 37 °C, pero debería mantenerse la temperatura por debajo del punto de ebullición o de la temperatura de desnaturalización de cualquier componente de la composición. Por consiguiente, las condiciones adecuadas para el paso c) del método anteriormente descrito son de presión atmosférica a una temperatura de 20 a 37 °C. La optimización de las condiciones para una reacción de encapsulación en particular será una cuestión de experimentación rutinaria.

35 La presente invención da a conocer además un método no terapéutico de matar un microorganismo, comprendiendo dicho método el paso de;

- 40 a) poner dicho microorganismo en contacto con una composición que comprenda una partícula de glucano hueca o una partícula de pared celular hueca encapsulando un componente de terpeno tal como se define en las reivindicaciones anexas.

Las composiciones adecuadas son las descritas anteriormente con mayor detalle.

Se da a conocer, pero no forma parte de la presente invención, un método para prevenir o tratar una infección en un paciente, comprendiendo dicho método el paso de;

- 45 a) administrar a dicho paciente, en una dosis efectiva terapéuticamente, una composición que comprenda una partícula de glucano hueca o una partícula de pared celular hueca encapsulando un componente de terpeno.

Las composiciones adecuadas son las descritas anteriormente con mayor detalle.

La infección del paciente puede haber sido provocada por cualquier agente infeccioso. Ejemplos de estos agentes infecciosos incluyen, sin limitarse a ellos, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycoplasma iowae*, *Penicillium sp.*, y *Mycoplasma pneumoniae*.

5 Para la administración interna, la composición puede administrarse por vía oral, vaginal, rectal, por inhalación o por rutas parenterales, p. ej. por las rutas intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intrarrectal, intraarterial, intralinfática, intravenosa, intratecal e intratraqueal. Más arriba se comentan formulaciones adecuadas de la composición para estas rutas.

Para el tratamiento externo, la composición puede aplicarse tópicamente, por ejemplo como crema o pomada, o como polvo seco para el tratamiento de una herida.

10 La cantidad de terpeno administrada en el método anteriormente descrito debería ser claramente suficiente para lograr el resultado deseado, esto es, la prevención y/o el tratamiento de la infección, pero no debería alcanzar un nivel que produzca efectos tóxicos graves en el paciente.

15 La cantidad de composición administrada dependerá, por supuesto, de la forma de administración, del paciente tratado, esto es, su peso, edad, estado y sexo, de la extensión de la enfermedad en el sujeto y del criterio del facultativo que prescriba el tratamiento. La dosis, el régimen de dosificación y la ruta de administración pueden variar. Un experto en la técnica podría determinar rápidamente una cantidad antiinfecciosa para una aplicación determinada, basándose en el conocimiento general de la técnica y en los procedimientos descritos en los ejemplos más adelante. Cabe señalar que el término «paciente» tal como aquí se utiliza se refiere a cualquier individuo, ya sea humano o animal, al que se administre el tratamiento. Por consiguiente, el paciente puede ser un animal doméstico (p. ej. gato, perro, etc.), ganado (p. ej., vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), animales de laboratorio (p. ej. ratón, conejo, rata, cobaya, etc.), aves y peces. Convenientemente, el sujeto es un mamífero y especialmente un primate, por ejemplo un humano.

20 En otra realización, la presente invención da a conocer un método para el tratamiento o la prevención de la infección de una planta, comprendiendo dicho método el paso de;

25 a) administrar en una dosis efectiva terapéuticamente una composición que comprenda una partícula de glucano hueca o una partícula de pared celular hueca encapsulando un componente de terpeno, tal como se define en las reivindicaciones anexas, a la planta o al suelo en las proximidades de la planta.

Las composiciones adecuadas son las descritas anteriormente con mayor detalle.

30 Se ha demostrado que los terpenos eliminan diversos patógenos de plantas (véase WO 03/020024) y, tal como se describe en la solicitud co-pendiente WO2005/070213, también mata eficazmente los nematodos, los cuales son importantes parásitos de las plantas. Sin embargo, los terpenos por sí solos en suspensión o solución son algo inestables y se degradan rápidamente en el entorno del suelo, perdiendo así eficacia.

35 La incorporación de un componente de terpeno en una partícula de glucano o partícula de pared celular hueca puede reducir la tasa de liberación de terpeno y de degradación, prolongando así la duración de la acción del terpeno en el suelo.

Convenientemente, la infección de una planta que debe tratarse o prevenirse conforme al método anteriormente descrito es una infección por nematodos.

40 Otras infecciones de plantas que pueden tratarse o prevenirse incluyen infecciones fúngicas de plantas, especialmente aquellas que afectan a la superficie de la planta. Tales infecciones incluyen de mildiu algodonoso, oídio o podredumbre de *Botrytis*; estas infecciones afectan particularmente a la vid.

En una realización, la infección de la planta podría ser causada por uno o varios de los siguientes:

Aspergillus fumigatus, *Sclerotinia homeocarpa*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum graminicola* o *Penicillium sp.*

Una ventaja de un tratamiento de plantas basado en terpeno reside en el hecho de que puede aplicarse poco antes de la cosecha.

45 Muchos tratamientos convencionales requieren que transcurra un periodo prolongado antes de volver a acceder a la zona tratada (generalmente 3 semanas). Esto significa que un brote de una enfermedad de la planta poco tiempo antes de la cosecha no puede tratarse mediante tratamientos convencionales, ya que entonces no sería posible recoger la cosecha en el momento deseado. Las composiciones de la presente invención pueden aplicarse convenientemente en cualquier momento hasta la cosecha, por ejemplo 21 días antes de la cosecha, 14 días antes de la cosecha, 7 días antes de la cosecha o incluso 3 días o menos antes de la cosecha.

50 Los terpenos encapsulados han demostrado una eficacia particular en el tratamiento del mildiu algodonoso, el oídio o la podredumbre de *Botrytis* en uvas, y por consiguiente la presente invención da a conocer un métodos para el tratamiento o la prevención de estas enfermedades.

La prevención de infecciones de plantas puede lograrse tratando regularmente las plantas con los terpenos encapsulados como medida profiláctica.

Convenientemente, la composición de la presente invención se aplica mediante rociado. Esto es particularmente adecuado para tratar una enfermedad de planta que afecte a la superficie de una planta. Para el rociado puede utilizarse una preparación que contenga 2 g/l de la composición en agua. Son particularmente efectivas concentraciones de entre 2 y 4 g/l, y si fuera necesario pueden emplearse concentraciones superiores a 4 g/l. Obviamente, es importante que la concentración de la composición utilizada sea suficiente para matar o inhibir el agente causante de la enfermedad, pero no tan elevada como para dañar la planta tratada.

Al rociar plantas, una cantidad de 500 l/ha o superior es adecuada para cubrir las plantas. A fin de asegurar una buena cobertura, preferentemente se aplica una cantidad de 900 l/ha o superior, más preferentemente de 1200 l/ha o superior. Para el tratamiento de vides se ha demostrado convenientemente efectiva una cantidad de 1200 l/ha.

Alternativamente, la composición de la presente invención puede aplicarse mediante irrigación. Esto es particularmente adecuado para el tratamiento de nematodos o de otros patógenos o parásitos y telúricos.

En otra realización, la presente invención también da a conocer una composición que comprende una partícula de glucano hueca o una partícula de pared celular hueca encapsulando un componente de terpeno para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección en un paciente o una planta. Las composiciones adecuadas son las descritas anteriormente con mayor detalle.

En otra realización, la presente invención da a conocer el uso de una composición que comprende una partícula de glucano hueca o una partícula de pared celular hueca encapsulando un componente de terpeno en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones causadas por un microorganismo. Las composiciones adecuadas son las descritas anteriormente con mayor detalle.

A continuación se describe con mayor detalle la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos y figuras, sin limitarse a ellos, en los que:

La figura 1 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura vacías;

La figura 2 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura encapsulando L-carvona;

La figura 3 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura encapsulando citral;

La figura 4 representa una micrografía de emulsión de terpeno;

La figura 5 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura en volumen hidrodinámico (VH) de agua;

La figura 6 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura encapsulando terpeno en 5 veces el volumen hidrodinámico (VH) de agua;

La figura 7 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura encapsulando terpeno en VH de agua;

La figura 8 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura encapsulando terpeno en VH más un 5 % de agua;

La figura 9 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura encapsulando terpeno en VH más un 10 % de agua;

La figura 10 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura encapsulando terpeno en VH más un 20 % de agua;

La figura 11 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura encapsulando terpeno en VH más un 30 % de agua;

La figura 12 representa una micrografía de luz de paredes celulares de levadura encapsulando terpeno en VH más un 40 % de agua;

La figura 13 representa una micrografía de luz que muestra la dispersión de partículas de glucano huecas secadas encapsulando un componente de terpeno sin goma xantana.

La figura 14 representa una micrografía de luz como en la figura 13, en la que se incluyen 0,07 g de goma xantana al 1 %.

La figura 15 representa una micrografía de luz como en la figura 13, en la que se incluyen 0,14 g de goma xantana al 1 %.

La figura 16 representa una micrografía de luz como en la figura 13, en la que se incluyen 0,28 g de goma xantana al 1 %.

La figura 17 representa una micrografía de luz como en la figura 13, en la que se incluyen 0,55 g de goma xantana al 1 %.

La figura 18 representa una micrografía de luz como en la figura 13, en la que se incluyen 1,1 g de goma xantana al 1 %.

La figura 19 representa una micrografía de luz como en la figura 13, en la que se incluyen 2,2 g de goma xantana al 1 %.

La figura 20 representa una micrografía de luz como en la figura 13, en la que se incluyen 4,4 g de goma xantana al 1 %.

5 La figura 21 muestra una representación esquemática de las áreas de tratamiento en los emplazamientos 18 y 20.

La figura 22 muestra una representación esquemática de las áreas de tratamiento en los emplazamientos 18 y 20.

La figura 23 muestra una representación esquemática de las áreas de tratamiento en el emplazamiento 7.

10 La figura. 24 muestra un gráfico que recoge la comparación entre formulaciones de terpeno encapsuladas frente a las no encapsuladas.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para facilitar a los expertos en la técnica la producción o la puesta en práctica de la presente invención. Tienen carácter puramente ejemplar y no pretenden limitar el alcance de la invención. A no ser que se indique otra cosa, las partes son partes por volumen o partes por peso, según se indique, la temperatura es en grados Celsius (°C) o es temperatura ambiental, y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica. Existen numerosas variaciones y combinaciones de las composiciones y condiciones para producirlas o utilizarlas, p. ej. concentraciones de componente, disolventes deseados, mezclas de disolventes, temperaturas, presiones y otros rangos y condiciones que pueden utilizarse para optimizar los resultados obtenidos mediante las composiciones y los métodos descritos. Para su optimización se requerirá únicamente una experimentación razonable y rutinaria.

15
20

Ejemplo 1 - Demostración de la carga de terpeno en partículas de levadura de panadería y partículas de glucano de levadura purificadas

Se llevó a cabo el siguiente protocolo para demostrar que los terpenos se cargarían en el interior de paredes celulares de levadura y de otras partículas de glucano huecas.

25 Se prepararon emulsiones de citral y de L-carvona, mezclando 150 µl del terpeno con 100 µl de Tween al 10 % en agua y 250 µl de agua.

Partículas de levadura de panadería (PL) o partículas de glucano de levadura Levacan™ (PGL), adquiribles a Savory Systems International, Inc., Branchburg, NJ, fueron mezcladas con agua para formar una suspensión de 250 mg/ml.

30 Se mezclaron entre sí 500 µl de la suspensión de PL o PGL y 250 µl de la emulsión de terpeno y se incubaron durante la noche bajo agitación constante. Se utilizaron como control 500 µl de suspensión de PL o PGL y 500 µl de agua. A continuación se lavaron las partículas con agua hasta que quedaron libres de la emulsión externa. A continuación se congelaron y liofilizaron las preparaciones de partículas hasta secarlas.

35 Posteriormente se rehidrataron las partículas y se examinaron bajo el microscopio óptico. Los resultados se muestran en las figs. 1 a la 4.

La figura 1 muestra estructuras esféricas con un área oscura en su centro, se trata de partículas de glucano huecas vacías. Las figuras 2 y 3 muestran estructuras esféricas con una apariencia hinchada y un interior ligeramente coloreado, se trata de partículas con un terpeno encapsulado en la cavidad central, citral en la figura 2 y L-carvona en la figura 3. En las figuras 2 y 3 pueden apreciarse también pequeñas masas de terpeno libre, p. ej. en la parte superior de la figura 2, justo a la izquierda del centro. La figura 4 muestra la emulsión de terpeno como pequeñas masas de terpeno suspendidas en agua.

40

Ejemplo 2 - Determinación de los niveles de carga máximos de citral y L-carvona en partículas de pared celular de levadura de panadería (PL)

Se implementó el siguiente protocolo para determinar las cantidades máximas de terpenos que se cargarían en PL.

- 45
- Se prepararon las emulsiones de L-carvona y citral sonicando 4,5 g del terpeno con 0,3 ml de agua.
 - La solución de Tween-80 al 10 % se preparó sonicando 4,5 g de Tween-80 en 40,5 ml de agua.
 - Se preparó la suspensión PL mezclando PL con agua para obtener una suspensión de 20 mg/ml.
 - Las reacciones de encapsulación se establecieron tal como se describe en la tabla 1.

50 La emulsión de citral o L-carvona y agua se mezcló con PL y surfactante Tween 80 durante la noche a temperatura ambiental. Se centrifugaron las muestras a 14 000 x g durante 10 minutos, y se evaluó la aparición de terpeno libre flotando en la capa acuosa. Los resultados se muestran en la columna del lado derecho con el encabezamiento «terpeno libre» de la Tabla 1.

La expresión «terpeno libre» se refiere a la presencia visible de terpeno en la mezcla de reacción centrifugada. La ausencia de terpeno libre indica la absorción completa del terpeno por las partículas. El volumen más elevado de terpeno absorbido por las partículas, tal como se pone de manifiesto por la ausencia de terpeno libre, se registró como el volumen máximo de emulsión de terpeno absorbida.

5

Tabla 1

| Tubo | 20 mg/ml PL | Emulsión de terpeno | Vol. | Tween-80 al 10 % | Terpeno libre |
|------|-------------|---------------------|------|------------------|---------------|
| | µl | | µl | µl | |
| 1 | 500 | - | - | 500 | - |
| 2 | 500 | L-carvona | 0,5 | 500 | - |
| 3 | 500 | L-carvona | 1,65 | 500 | - |
| 4 | 500 | L-carvona | 5 | 495 | - |
| 5 | 500 | L-carvona | 16,5 | 483,5 | - |
| 6 | 500 | L-carvona | 50 | 450 | + |
| 7 | 500 | L-carvona | 165 | 335 | + |
| 8 | 500 | L-carvona | 500 | - | + |
| 9 | 500 | Citral | 0,5 | 500 | - |
| 10 | 500 | Citral | 1,65 | 500 | - |
| 11 | 500 | Citral | 5 | 495 | - |
| 12 | 500 | Citral | 16,5 | 483,5 | +/- |
| 13 | 500 | Citral | 50 | 450 | + |
| 14 | 500 | Citral | 165 | 335 | + |
| 15 | 500 | Citral | 500 | - | + |

Como puede constatarse en los resultados, PL es capaz de absorber y encapsular como mínimo 16,5 µl de emulsión de terpeno L-carvona o como mínimo 5 µl de emulsión de citral por cada 10 mg de PL.

10 **Ejemplo 3 - Demostración de la mejora de la carga de terpeno mediante surfactante y determinación de la proporción óptima de Tween-80:terpeno**

[Se implementó el siguiente protocolo para demostrar que la presencia con surfactante mejora la carga de terpeno, y para determinar el nivel mínimo de surfactante Tween-80 requerido para la reacción de carga de terpeno en la PL.

- Se prepararon las emulsiones de L-carvona y citral sonicando 4,5 g del terpeno con 0,3 ml de agua.
- La solución de Tween-80 al 10 % se preparó sonicando 4,5 g de Tween-80 en 40,5 ml de agua.
- 15 - Se preparó la suspensión PL de panadería mezclando PL con agua para obtener una suspensión de 250 mg/ml.

Se establecieron las reacciones de carga tal como se muestra más adelante en la tabla 2.

20 La emulsión de citral o L-carvona y agua se mezcló con PL con 0 - 10 en volumen de surfactante Tween 80 durante la noche a temperatura ambiental. Se centrifugaron las muestras a 14 000 x g durante 10 minutos, y se evaluó la aparición de terpeno libre flotando en la capa acuosa. Los resultados se muestran en la columna del lado derecho con el encabezamiento «terpeno libre» de la Tabla 2.

25 La expresión «terpeno libre» se refiere a la presencia visible de terpeno en la mezcla de reacción centrifugada. La ausencia de terpeno libre indica la absorción y la encapsulación completas del terpeno por la PL. El volumen más elevado de terpeno absorbido por la PL, tal como se pone de manifiesto por la ausencia de terpeno libre, se registró como el volumen máximo de emulsión de terpeno absorbida.

Tabla 2

| Tubo | 20 mg/ml PL | Emulsión de terpeno | Vol. | Tween-80 al 10 % | Agua | Terpeno libre |
|------|-------------|---------------------|------|------------------|------|---------------|
| | µl | | µl | µl | µl | |
| 1 | 500 | - | - | - | 500 | - |

| | | | | | | |
|---------------|-----|-----------|-----|------------|-----|------|
| 2 | 500 | L-carvona | 150 | 0 | 350 | esc. |
| 3 | 500 | L-carvona | 150 | 5 | 345 | esc. |
| 4 | 500 | L-carvona | 150 | 10 | 340 | esc. |
| 5 | 500 | L-carvona | 150 | 33 | 317 | esc. |
| 6 | 500 | L-carvona | 150 | 100 | 250 | - |
| 7 | 500 | L-carvona | 150 | 200 | 150 | - |
| 8 | 500 | L-carvona | 150 | 350 | - | - |
| 9 | 500 | L-carvona | 400 | 0 | 100 | ++ |
| 10 | 500 | L-carvona | 400 | 5 | 95 | ++ |
| 11 | 500 | L-carvona | 400 | 10 | 90 | ++ |
| 12 | 500 | L-carvona | 400 | 33 | 77 | ++ |
| 13 | 500 | L-carvona | 400 | 100 | - | + |
| 14 | 500 | L-carvona | 400 | 20 µl 100% | 30 | + |
| 15 | 500 | Citral | 113 | 0 | 387 | + |
| 16 | 500 | Citral | 113 | 5 | 382 | -+ |
| 17 | 500 | Citral | 113 | 10 | 377 | + |
| 18 | 500 | Citral | 113 | 33 | 354 | esc. |
| 19 | 500 | Citral | 113 | 100 | 287 | esc. |
| 20 | 500 | Citral | 113 | 200 | 187 | - |
| 21 | 500 | Citral | 113 | 350 | 37 | - |
| 22 | 500 | Citral | 250 | 0 | 250 | ++ |
| 23 | 500 | Citral | 250 | 5 | 245 | ++ |
| 24 | 500 | Citral | 250 | 10 | 240 | ++ |
| 25 | 500 | Citral | 250 | 33 | 217 | + |
| 26 | 500 | Citral | 250 | 100 | 150 | + |
| 27 | 500 | Citral | 250 | 20 µl 100% | 230 | + |
| esc. = escaso | | | | | | |

Tal como se desprende de los resultados, una concentración de Tween-80 del 1 % (esto es, 100 µl de Tween-80 al 10 % en 1000 µl de mezcla de reacción) es suficiente para posibilitar la absorción completa del terpeno en la reacción anteriormente descrita. Una concentración de Tween-80 del 2 % no produce mejora alguna en los resultados, mientras que con una concentración del 0,33 % se observó terpeno libre. Esto indica que:

- Los terpenos son absorbidos en las partículas PL en ausencia de un surfactante, pero la presencia de surfactante incrementa significativamente la absorción de terpeno.
- Una concentración de Tween-80 de aproximadamente el 1 % es óptima para la carga de la PL, dado que asegura una carga adecuada al tiempo que maximiza la carga útil de terpeno de las partículas PL.

10 **Ejemplo 4- Determinación de la carga máxima de terpeno y de la encapsulación con niveles elevados de partículas de pared celular de levadura de panadería (PL)**

Se implementó el siguiente protocolo para determinar las cantidades máximas de terpenos que se cargarían en las PL a niveles elevados de PL.

- 15 - Se prepararon las emulsiones de L-carvona y citral sonicando 4,5 g del terpeno con 3 ml de Tween al 1%.
- La solución de Tween-80 al 5% se preparó sonicando 0,5 g de Tween-80 en 9,5 ml de agua.
- Se preparó la suspensión PL mezclando PL con agua para obtener una suspensión de 250 mg/ml.
- Las reacciones de encapsulación se establecieron tal como se muestra en la Tabla 3.

20 La emulsión de citral o L-carvona y agua se mezcló con PL y surfactante Tween 80 durante la noche a temperatura ambiental. Se centrifugaron las muestras a 14 000 x g durante 10 minutos, y se evaluó la aparición de terpeno libre flotando en la capa acuosa. Los resultados se muestran en la columna del lado derecho con el encabezamiento «terpeno libre» de la Tabla 3.

La expresión «terpeno libre» se refiere a la presencia visible de terpeno en la mezcla de reacción centrifugada. La ausencia de terpeno libre indica la absorción completa del terpeno por las PL. El volumen más elevado de terpeno

absorbido por la PL, tal como se pone de manifiesto por la ausencia de terpeno libre, se registró como el volumen máximo de emulsión de terpeno absorbida.

Tabla 3

| Tubo | 250 mg/ml PL | Emulsión de terpeno | Vol. | Tween-80 al 1 % | Terpeno libre |
|------|--------------|---------------------|-------|-----------------|---------------|
| | µl | | µl | µl | |
| 1 | 500 | - | - | 500 | - |
| 2 | 500 | L-carvona | 15 | 485 | - |
| 3 | 500 | L-carvona | 37,5 | 462,5 | - |
| 4 | 500 | L-carvona | 75 | 425 | - |
| 5 | 500 | L-carvona | 112,5 | 387,5 | - |
| 6 | 500 | L-carvona | 150 | 350 | esc. + |
| 7 | 500 | L-carvona | 225 | 275 | + |
| 8 | 500 | L-carvona | 450 | 50 | + |
| 9 | 500 | Citral | 15 | 485 | - |
| 10 | 500 | Citral | 37,5 | 462,5 | - |
| 11 | 500 | Citral | 75 | 425 | - |
| 12 | 500 | Citral | 112,5 | 387,5 | esc. + |
| 13 | 500 | Citral | 150 | 350 | + |
| 14 | 500 | Citral | 225 | 275 | + |
| 15 | 500 | Citral | 450 | 50 | + |

- 5 Tal como se desprende de los resultados de la Tabla 2, la PL es capaz de absorber y encapsular terpenos a una concentración elevada de PL. PL absorbió y encapsuló como mínimo 112,5 µl de emulsión de terpeno L-carvona o como mínimo 75 µl de emulsión de citral por cada 125 mg de PL. Esto demuestra que la reacción de encapsulación de terpeno es independiente de la concentración de PL dentro de los rangos ensayados.

Ejemplo 5 - Análisis de partículas disponibles comercialmente para determinar la absorción de terpeno

- 10 Se implementó el siguiente protocolo para analizar las propiedades de carga de diferentes tipos de partículas. Las partículas estudiadas fueron Partículas de pared celular de levadura de panadería (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO), paredes Nutrex™ (Sensient Technologies, Milwaukee, WI), SAF-Mannan™ (SAF Agri, Minneapolis, MN), NutriceptWalls™ (Nutraceuticals Inc., Burnsville, MN), Levacan™ (Savory Systems International, Inc., Branchburg, NJ) y WGP™ (Alpha-beta Technology, Inc. Worcester, MA).
- 15 Se prepararon las emulsiones de L-carvona y citral sonicando 7 g de terpeno + 3 ml de Tween-80 al 3,3 %. La Tabla 4 a continuación compara la pureza con el número de partículas de levadura por mg y la relación peso/volumen de sólidos compactados.

Tabla 4

| Partícula de levadura | % de pureza Beta 1,3-glucano | N.º de partículas/mg | Mg de partículas/ml |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Panadería | 11,2 | 4 x10 ⁷ | 250 |
| Nutrex | 24,5 | 1,7 x10 ⁸ | 58,8 |
| SAF Mannan | 33,4 | 2,4 x10 ⁸ | 41,7 |
| Nutraceuticals | 55,7 | 5,2 x10 ⁸ | 37 |
| Levacan | 74,6 | 1x10 ⁸ | 19,2 |
| WGP | 82,1 | 3,5 x 10 ⁸ | 10 |

- 20 De la Tabla 4 se desprende que el número de partículas por mg es inversamente proporcional a la pureza. Así, el número de partículas por mg de WGP es casi 10 veces mayor que el de las PL de panadería.

Las suspensiones PL se prepararon de la siguiente manera:

- La suspensión de partículas de pared celular de levadura de panadería (PL) se preparó mezclando 250 mg de LP/ml de Tween 80 al 1 %.

- La suspensión de Nutrex se preparó mezclando 163 mg de Nutrex PGL/ml de Tween 80 al 1 %.
- La suspensión de SAF Mannan se preparó mezclando 234 mg de Biospringer PGL/ml de Tween 80 al 1 %.
- La suspensión de Nutricepts se preparó mezclando 99 mg de Nutricepts PGL/ml de Tween 80 al 1 %.
- La suspensión de Levacan se preparó mezclando 217 mg de Lev PGL/ml de Tween 80 al 1 %.
- 5 - La suspensión de WPG se preparó mezclando 121 mg de WPG PGL/ml de Tween 80 al 1 %.

El volumen compactado de las partículas anteriormente mencionadas es idéntico, lo cual significa que se ensayaron números iguales de partículas.

Se establecieron las reacciones de carga tal como se muestra en la Tabla 5 y se dejaron incubando durante la noche. Se centrifugaron las muestras a 14 000 x g durante 10 minutos, y se evaluó la aparición de terpeno libre flotando en la capa acuosa y el color de los terpenos encapsulados en el gránulo. Los resultados se muestran en las dos columnas del lado derecho de la Tabla 5. El volumen más elevado de terpeno absorbido por las partículas, tal como se pone de manifiesto por la ausencia de terpeno libre, se registró como el volumen máximo de emulsión de terpeno absorbida.

Tabla 5

| Tubo | Partícula | conc. mg/ml | µl | Emulsión de terpeno | Vol. µl | µl Tween 80 al 1 % | Terpeno libre | Color |
|------|------------|-------------|-----|---------------------|---------|--------------------|---------------|-------|
| 1 | Panadería | 250 | 500 | L-carvone | 125 | 375 | - | B |
| 2 | Nutrex | 163 | 500 | L-carvona | 125 | 375 | - | B |
| 3 | SAF Mannan | 234 | 500 | L-carvona | 125 | 375 | - | B |
| 4 | Nutricepts | 99 | 500 | L-carvona | 125 | 375 | + | B |
| 5 | Levacan | 217 | 500 | L-carvona | 125 | 375 | + | B |
| 6 | WGP | 121 | 500 | L-carvona | 125 | 375 | + | B |
| 7 | Panadería | 250 | 500 | Citral | 100 | 375 | - | A |
| 8 | Nutrex | 163 | 500 | Citral | 100 | 375 | - | A |
| 9 | SAF Mannan | 234 | 500 | Citral | 100 | 375 | - | B |
| 10 | Nutricepts | 99 | 500 | Citral | 100 | 375 | + | A |
| 11 | Levacan | 217 | 500 | Citral | 100 | 375 | + | int |
| 12 | WGP | 121 | 500 | Citral | 100 | 375 | + | int |
| 13 | - | - | - | L-carvona | 125 | 875 | + | - |
| 14 | - | - | - | Citral | 100 | 900 | + | A |

B = blanco; A = amarillo; esc. = escaso; int = intermedio

15 A partir de los resultados se llegó a las siguientes conclusiones:

- Las partículas purificadas con un bajo contenido en lípidos fueron menos efectivas al absorber terpenos.
- Las partículas menos puras fueron más efectivas al absorber terpenos.
- No se formó producto amarillo de degradación de citral cuando se encapsuló en SAF-Mannan™.
- 20 - Sobre la base de la carga cualitativa al nivel de terpeno individual ensayado, SAF Mannan™ parece alcanzar el mejor resultado, seguido de Nutrex™ en segundo lugar y la levadura de panadería en tercero.

Ejemplo 6 - Cinética de la carga de terpeno en varios tipos de partículas y diferentes temperaturas de incubación.

Se adoptó el siguiente protocolo para comparar la cinética de carga de diversos tipos de partículas de levadura.

25 Se prepararon las emulsiones de L-carvona y citral sonicando 7 g de terpeno con 3 ml de Tween-80 al 3,3 %.

La solución de Tween-80 al 1 % se preparó sonicando 1 ml de Tween-80 al 10 % en 10 ml de agua.

- La PL de panadería se preparó mezclando 5 g de PL de panadería en 20 ml de Tween-80 al 1 %.
- Se preparó la suspensión de Nutrex™ PGL mezclando 2 g de Nutrex™ PGL en 20 ml de Tween-80 al 1 %.
- 30 - Se preparó la suspensión de SAF Mannan™ mezclando 2 g de SAF Mannan™ en 20 ml de Tween-80 al 1 %.

Se establecieron las reacciones de carga tal como se muestra en la Tabla 6.

Se incubaron las reacciones durante 1,3,6,9 y 24 horas a temperatura ambiental o 37 °C. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras a 14 000 x g durante 10 minutos y se evaluó la aparición de terpeno libre flotando en la capa acuosa. Los resultados se muestran en las dos columnas del lado derecho de la Tabla 6. El volumen más

elevado de terpeno absorbido por las partículas, tal como se pone de manifiesto por la ausencia de terpeno libre, se registró como el volumen máximo de emulsión de terpeno absorbida.

El color del gránulo encapsulado se evaluó al cabo de 24 horas.

Tabla 6

| Tubo | T oC | Partícula | conc. mg/ml | µl | Emulsión de terpeno | Vol. µl | Tween-80 al 1% | Terpeno libre (h) | | | | | Color |
|------|------|-----------|-------------|------|---------------------|---------|----------------|-------------------|---|---|---|----|-------|
| | | | | | | | | 1 | 3 | 6 | 9 | 24 | |
| 1 | Ta | Panadería | 250 | 3500 | L-carvona | 788 | 2712 | + | - | - | - | - | B |
| 2 | 37 | Panadería | 250 | 3500 | L-carvona | 788 | 2712 | + | - | - | - | - | B |
| 3 | Ta | Nutrex | 100 | 3500 | L-carvona | 1050 | 2450 | + | - | - | - | - | B |
| 4 | 37 | Nutrex | 100 | 3500 | L-carvona | 1050 | 2450 | + | - | - | - | - | B |
| 5 | Ta | SAF | 100 | 3500 | L-carvona | 1050 | 2450 | <+ | - | - | - | - | B |
| 6 | 37 | SAF | 100 | 3500 | L-carvona | 1050 | 2450 | <+ | - | - | - | - | B |
| 7 | Ta | Panadería | 250 | 3500 | Citral | 525 | 2975 | + | - | - | - | - | A |
| 8 | 37 | Panadería | 250 | 3500 | Citral | 525 | 2975 | + | - | - | - | - | MA |
| 9 | Ta | Nutrex | 100 | 3500 | Citral | 788 | 2712 | + | - | - | - | - | A |
| 10 | 37 | Nutrex | 100 | 3500 | Citral | 788 | 2712 | + | - | - | - | - | VY |
| 11 | Ta | SAF | 100 | 3500 | Citral | 788 | 2712 | + | - | - | - | - | B |
| 12 | 37 | SAF | 100 | 3500 | Citral | 788 | 2712 | + | - | - | - | - | B |

Blanco, W; Amarillo, Y; Muy Amarillo, MA; Temperatura ambiental, Ta

5

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 6 y de otras observaciones, puede llegarse a las siguientes conclusiones:

- La reacción de carga del terpeno tarda entre 1 y 3 horas.
- La carga de terpeno tiene lugar más rápidamente a 37 °C que a temperatura ambiental.
- SAF Mannan™ parecen ser las partículas preferibles por dos motivos:
 - Absorción más rápida y más completa de ambos terpenos.
 - El citral permanece estable una vez cargado, tal como se pone de manifiesto por la ausencia de color amarillo, característico de la degradación del citral, al cabo de 24 horas a 37 °C.

15 **Ejemplo 7 - Análisis de una serie de terpenos individuales y combinaciones de terpenos para determinar la carga de partículas**

Se adoptó el siguiente protocolo para comparar la eficiencia de carga de la PL de panadería con la de SAF Mannan™.

Las emulsiones de terpeno se prepararon de la siguiente manera:

- 20 - 25 L-carvona - 4,5 g de L-carvona en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.
- Citral - 4,5 g de citral en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.
- Mezcla de timol/L-carvona (T/L)- 2,25 g de timol y 2,25 g de L-carvona en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.
- Eugenol - 4,5 g de eugenol en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.
- Geraniol - 4,5 g de geraniol en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.
- 25 - Mezcla de citral/L-carvona/eugenol (C/L/E) - 1,5 g de citral, 1,5 g de L-carvona, 1,5 g de eugenol en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.

Para estos experimentos se utilizaron emulsiones compuestas por una proporción de terpeno: agua: surfactante de 0,75:0,3:0,05.

30 Se mezclaron volúmenes crecientes de emulsión de terpeno con 250 mg/ml de PL de panadería o 250 mg/ml de SAF Mannan™ durante la noche a temperatura ambiental, tal como se muestra en las Tablas 7 y 8. Se centrifugaron las muestras a 14 000 x g durante 10 minutos, y se evaluó la aparición de terpeno libre flotando en la capa acuosa. El volumen más elevado de emulsión de terpeno absorbido por las PL de panadería o SAF Mannan™, tal como se pone de manifiesto por la ausencia de terpeno libre, se registró como el volumen máximo de emulsión de terpeno absorbido. Se registró el color de los terpenos encapsulados en el gránulo. Los resultados de las Tablas 7 y 8 demuestran que todos los terpenos individuales y las combinaciones de terpenos se cargaron eficientemente tanto

35 en las partículas de PL de panadería como en las partículas SAF Mannan.

Tabla 7 - Evaluación de la carga de diferentes terpenos y mezclas de terpenos en PL de panadería.

| Tubo | Panadería (µl) | Emulsión de terpeno | Vol. µl | Tween-80 al 1 % (µl) | Terpeno libre | Color |
|------|----------------|---------------------|---------|----------------------|---------------|-------|
| 1 | 500 | - | - | 500 | - | B |
| 2 | 500 | L-carvona | 15 | 485 | - | B |
| 3 | 500 | L-carvona | 37,5 | 462,5 | - | B |
| 4 | 500 | L-carvona | 7 | 425 | +/- | B |
| 5 | 500 | L-carvona | 112,5 | 387,5 | +/- | B |
| 6 | 500 | L-carvona | 150 | 350 | + | B |
| 7 | 500 | L-carvona | 225 | 275 | + | B |
| 8 | 500 | L-carvona | 450 | 50 | ++ | B |
| 9 | 500 | Citral | 15 | 485 | - | A |
| 10 | 500 | Citral | 37,5 | 462,5 | - | A |
| 11 | 500 | Citral | 75 | 425 | - | A |
| 12 | 500 | Citral | 112,5 | 387,5 | +/- | A |
| 13 | 500 | Citral | 150 | 350 | + | A |
| 14 | 500 | Citral | 225 | 275 | + | A |
| 15 | 500 | Citral | 450 | 50 | + | A |
| 16 | 500 | T/L | 15 | 485 | - | B |
| 17 | 500 | T/L | 37,5 | 462,5 | - | B |
| 18 | 500 | T/L | 75 | 425 | - | B |
| 19 | 500 | T/L | 112,5 | 387,5 | +/- | B |
| 20 | 500 | T/L | 150 | 350 | + | B |
| 21 | 500 | T/L | 225 | 275 | + | B |
| 22 | 500 | T/L | 450 | 50 | + | B |
| 23 | 500 | Eugenol | 15 | 485 | - | B |
| 24 | 500 | Eugenol | 37,5 | 462,5 | - | B |
| 25 | 500 | Eugenol | 75 | 425 | - | B |
| 26 | 500 | Eugenol | 112,5 | 387,5 | +/- | B |
| 27 | 500 | Eugenol | 150 | 350 | + | B |
| 28 | 500 | Eugenol | 225 | 275 | + | B |
| 29 | 500 | Eugenol | 450 | 50 | + | B |
| 30 | 500 | Geraniol | 15 | 485 | - | B |
| 31 | 500 | Geraniol | 37,5 | 462,5 | - | B |
| 32 | 500 | Geraniol | 75 | 425 | - | B |
| 33 | 500 | Geraniol | 112,5 | 387,5 | + | B |
| 34 | 500 | Geraniol | 150 | 350 | + | B |
| 35 | 500 | Geraniol | 225 | 275 | + | B |
| 36 | 500 | Geraniol | 450 | 50 | + | B |
| 37 | 500 | C/L/E | 15 | 485 | - | A |
| 38 | 500 | C/L/E | 37,5 | 462,5 | - | A |
| 39 | 500 | C/L/E | 75 | 425 | - | A |
| 40 | 500 | C/L/E | 112,5 | 387,5 | +/- | A |
| 41 | 500 | C/L/E | 150 | 350 | + | A |
| 42 | 500 | C/L/E | 225 | 275 | + | A |
| 43 | 500 | C/L/E | 450 | 50 | + | A |

Tabla 8 -. Evaluación de la carga de diferentes terpenos y mezclas de terpenos en SAF Mannan.

| Tubo | SAF (µl) | Emulsión de | Vol. | Tween-80 al 1 % | Terpeno libre | Color |
|------|----------|-------------|------|-----------------|---------------|-------|
|------|----------|-------------|------|-----------------|---------------|-------|

ES 2 434 415 T3

| | | terpeno | | (μ l) | | |
|----|-----|-----------|---------|------------|---------------|---|
| 1 | 500 | - | - | 500 | - | B |
| 2 | 500 | L-carvona | 15 | 485 | - | B |
| 3 | 500 | L-carvona | 37,5 | 462,5 | - | B |
| 4 | 500 | L-carvona | 75 | 425 | - | B |
| 5 | 500 | L-carvona | 112,5 | 387,5 | - | B |
| 6 | 500 | L-carvona | 150 | 350 | +/- | B |
| 7 | 500 | L-carvona | 225 | 275 | +/- | B |
| 8 | 500 | L-carvona | 450 | 50 | + | B |
| 9 | 500 | Citral | 15 | 485 | - | B |
| 10 | 500 | Citral | 37,5 | 462,5 | - | B |
| 11 | 500 | Citral | 75 | 425 | - | B |
| 12 | 500 | Citral | 112,5 | 387,5 | - | B |
| 13 | 500 | Citral | 150 | 350 | +/- Invertida | B |
| 14 | 500 | Citral | 225 | 275 | + Invertida | B |
| 15 | 500 | Citral | 450 | 50 | + Invertida | B |
| 16 | 500 | T/L | 15 | 485 | - | B |
| 17 | 500 | T/L | 37,5 | 462,5 | - | B |
| 18 | 500 | T/L | 75 | 425 | - | B |
| 19 | 500 | T/L | 112,5 | 387,5 | - | B |
| 20 | 500 | T/L | 150 | 350 | +/- | B |
| 21 | 500 | T/L | 225 275 | + | B | |
| 22 | 500 | T/L | 450 50 | + | B | |
| 23 | 500 | Eugenol | 15 | 485 | - | B |
| 24 | 500 | Eugenol | 37,5 | 462,5 | - | B |
| 25 | 500 | Eugenol | 75 | 425 | - | B |
| 26 | 500 | Eugenol | 112,5 | 387,5 | +/- | B |
| 27 | 500 | Eugenol | 150 | 350 | + | B |
| 28 | 500 | Eugenol | 225 | 275 | + | B |
| 29 | 500 | Eugenol | 450 | 50 | + | B |
| 30 | 500 | Geraniol | 15 | 485 | - | B |
| 31 | 500 | Geraniol | 37,5 | 462,5 | - | B |
| 32 | 500 | Geraniol | 75 | 425 | - | B |
| 33 | 500 | Geraniol | 112,5 | 387,5 | - | B |
| 34 | 500 | Geraniol | 150 | 350 | - | B |
| 35 | 500 | Geraniol | 225 | 275 | - Invertida | B |
| 36 | 500 | Geraniol | 450 | 50 | + Invertida | B |
| 37 | 500 | C/L/E | 15 | 485 | - | B |
| 38 | 500 | C/L/E | 37,5 | 462,5 | - | B |
| 39 | 500 | C/L/E | 75 | 425 | - | B |
| 40 | 500 | C/L/E | 112,5 | 387,5 | - | B |
| 41 | 500 | C/L/E | 150 | 350 | - | B |
| 42 | 500 | C/L/E | 225 | 275 | +/- | B |
| 43 | 500 | C/L/E | 450 | 50 | + | B |

Invertida = Fase invertida - sólidos flotando en la superficie - sin aceite libre; B = blanco; A = amarillo.

A partir de los resultados se realizaron las siguientes observaciones:

- Todos los terpenos parecieron cargarse en PL de panadería y en SAF Mannan.
- SAF Mannan posee una capacidad de carga de terpeno superior a la de PL de panadería.

- Las mezclas de terpenos de dos y tres componentes también parecen cargar eficientemente.
- El terpeno eugenol parece tener una mayor densidad que las partículas y que el agua, puesto que se encontró asociado al gránulo.
- Para el SAF Mannan, los niveles de carga más elevados y las partículas más ligeras resultaron en partículas cargadas flotando en la superficie de la capa acuosa en los casos del citral y el geraniol.
- El citral fue protegido de la oxidación por el SAF Mannan, pero no por la PL de panadería.

Se determinó la carga máxima aproximada para cada tipo de partícula, y se muestra en las Tablas 9 y 10 a continuación. El porcentaje cargado representa una relación entre la cantidad de terpeno cargada y la cantidad de partículas presentes (peso por peso).

Tabla 9 - Carga máxima de terpeno en PL de panadería.

| Terpeno | Vol. cargado μ 1 | % cargado p/p |
|----------------------------------|----------------------|---------------|
| L-carvona | 37,5 | 33,3 |
| Citral | 75 | 67% |
| Timol/L-carvona 1:1 | 75 | 67% |
| Eugenol | 75 | 67% |
| Geraniol | 75 | 67% |
| Citral/L-carvona/Eugenol (1:1:1) | 75 | 67% |

Tabla 10 - Carga máxima de terpeno en SAF Mannan.

| Terpeno | Vol. cargado μ 1 | % cargado p/p |
|----------------------------------|----------------------|---------------|
| L-carvona | 112,5 | 100% |
| Citral | 150 | 133% |
| Timol/L-carvona 1:1 | 112,5 | 100% |
| Eugenol | 112,5 | 100% |
| Geraniol | 150 | 133% |
| Citral/L-carvona/Eugenol (1:1:1) | 150 | 133% |

Ejemplo 8 - Evaluación de la estabilidad del terpeno en emulsiones acuosas y formulaciones de terpenos encapsulados

Se evaluó la estabilidad del terpeno mediante la observación de formulaciones de citral para determinar la formación de un producto de oxidación de color amarillo. Tal como se indica en columna de la derecha en las Tablas 5-8, las emulsiones de citral y el citral encapsulado en PL de panadería adquirieron con el paso del tiempo un color amarillo de intensidad progresivamente creciente. Sin embargo, la encapsulación de citral en SAF Mannan TM incrementó la estabilidad del citral, tal como se pone de manifiesto por la reducción o la ausencia de color amarillo con el paso del tiempo.

Ejemplo 9 - Carga de terpenos en una cantidad mínima de agua

Se implementó el siguiente protocolo para evaluar la posibilidad de que la carga y la encapsulación de terpenos en PL pudiera llevarse a cabo con un nivel muy elevado de sólidos de partículas de levadura (PL), a fin de posibilitar la extrusión directa de la formulación cargada en un secador de lecho fluido. La cantidad mínima de agua para hidratar completamente las partículas de SAF Mannan TM se determinó en 3,53 g de agua por g de sólidos. Esto define el volumen hidrodinámico (VH) o la capacidad de absorción de agua de las partículas.

A este nivel de agua, las partículas hidratadas poseen la consistencia de una masa firme tixotrópica, esto es, de comportamiento pseudoplástico como la mayonesa. La adición de agua hasta un 40 % por encima del VH resulta en una pasta espesa dispersable. La reacción estándar que se ha utilizado en los anteriores ejemplos se desarrolló con una cantidad de agua de 3 X VH.

Se llevaron a cabo una serie de reacciones de carga de terpeno (L-carvona) manteniendo constante la proporción de partículas:terpeno:Tween (1: 0,44:0,04) y variando la cantidad de agua en el sistema desde VH (3,53 g) hasta VH + 40 % de agua (4,92 g). Los controles fueron el sistema de carga estándar que utiliza 3 X VH de agua, reacciones solo con partículas y reacciones solo con terpeno. Tras la incubación durante la noche, se evaluaron microscópicamente muestras de las mezclas para detectar la presencia de terpeno libre y evidencias de absorción de terpeno por las partículas y para determinar las características de flujo de material mediante la evaluación del flujo en tubos invertidos durante 15 minutos. Además, se determinó la presencia de aceite libre mediante hidratación

de la mezcla de reacción con 5 X VH, agitación en vórtex para obtener una dispersión completa de las partículas y centrifugación para sedimentar el terpeno encapsulado en las partículas. Los resultados se muestran en Tabla 11 y en las figuras 7 a la 12. Las figuras 7 a la 12 muestran los resultados de carga de los siguientes tubos:

- Figura 7 - Tubo 3
- Figura 8 - Tubo 5
- Figura 9 Tubo 6
- Figura 10 - Tubo 8
- Figura 11 - Tubo 10
- Figura 12 - Tubo 11

Tabla 11

| Tubo | SAFG | Emulsión de terpeno | Peso (g) | Agua (g) | Terpeno libre | Flujo |
|------|------|---------------------|----------|----------|---------------|-------|
| 1 | - | L-carvona | 4,64 | 4,5 | + | + |
| 2 | 1 | - | - | 8,0 | - | + |
| 3 | 1 | L-carvona | 4,64 | 4,5 | - | + |
| 4 | 1 | L-carvona | 4,64 | - | - | - |
| 5 | 1 | L-carvona | 4,64 | 0,17 | - | - |
| 6 | 1 | L-carvona | 4,64 | 0,35 | - | - |
| 7 | 1 | L-carvona | 4,64 | 0,52 | - | esc. |
| 8 | 1 | L-carvona | 4,64 | 0,7 | - | Mod |
| 9 | 1 | L-carvona | 4,64 | 0,87 | - | Alto |
| 10 | 1 | L-carvona | 4,64 | 1,05 | - | Alto |
| 11 | 1 | L-carvona | 4,64 | 1,39 | - | Alto |

Los resultados mostrados en la Tabla 11 y en las figuras 7 a la 12 demuestran que la carga y la encapsulación de terpeno en las partículas tuvo lugar en todas las proporciones de agua evaluadas. Sorprendentemente, tuvo lugar una carga equivalente incluso cuando la reacción de carga se desarrolló en una reacción con la consistencia de una masa firme utilizando la cantidad mínima de agua para hidratar las partículas. La ausencia de terpeno libre se observó microscópicamente (figuras 7 a la 12) y en el nivel bajo en los sobrenadantes, tal como evidenció una reducción pronunciada de la turbidez del sobrenadante en comparación con el control con solo terpeno.

Estos resultados amplían nuestra comprensión de las condiciones para cargar terpenos en partículas de glucano huecas. La flexibilidad que proporciona el uso de un volumen mínimo de agua para hidratar las partículas durante el proceso de carga permitirá la carga de los terpenos en condiciones en las que la mezcla de reacción tenga una consistencia de masa, utilizando mezcladoras de masa de superficie barrida de grado alimentario estándar. La consistencia de la mezcla final cargada con terpenos con alto contenido en sólidos es adecuada para la extrusión directa para formar filamentos para el secado en lecho fluido.

Las instalaciones adecuadas para la producción a gran escala mediante este método requerirían:

- Homogeneizador Gaulin o equivalente, para producir una emulsión de terpenos estable.
- Tanque mezclador de masa de superficie barrida.
- Extrusor.
- Secador de lecho fluido.

Ejemplo 10 - Evaluación de un agente hidrocoloide intersticial para favorecer la dispersión en partículas de glucano huecas secas encapsulando una dispersión de componente de terpeno al rehidratarlas.

Se adoptó el siguiente protocolo para evaluar el efecto de un hidrocoloide intersticial para aumentar la dispersión de formulaciones de terpeno encapsulado en partículas de glucano huecas secas al hidratarlas.

- Partículas SAF Mannan™
- Tween 80 al 0,1 %
- 15
- L-carvona
- 1 % p/v goma xantana en Tween 80 al 0,1 %

Se evaluó el efecto del aumento de los niveles de goma xantana en dispersión en agua de L-carvona encapsulada en partículas de glucano huecas secas, mediante la carga de L-carvona en SAF Mannan incubando 1,1 g de una

emulsión de L-carvona (proporción L-carvona:agua:surfactante de 0,75:0,3:0,05) con 1 g de SAF Mannan y 4,4 g de Tween 80 al 0,1 % con un contenido de 0 - 1 % de goma xantana, tal como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12

| Tubo | SAF g | Emulsión de L-carvona (g) | Tween-80 al 0,1 % (g) | 1 % xantana (g) | Observaciones visuales |
|------|-------|---------------------------|-----------------------|-----------------|------------------------------|
| 1 | 1 | 1,1 | 4,4 | 0 | Grumos grandes no uniformes |
| 2 | 1 | 1,1 | 4,33 | 0,07 | Suspensión uniforme |
| 3 | 1 | 1,1 | 4,26 | 0,14 | Suspensión uniforme |
| 4 | 1 | 1,1 | 4,12 | 0,28 | Suspensión uniforme |
| 5 | 1 | 1,1 | 3,85 | 0,55 | Suspensión uniforme |
| 6 | 1 | 1,1 | 3,3 | 1,1 | Suspensión uniforme más fina |
| 7 | 1 | 1,1 | 2,2 | 2,2 | Suspensión uniforme más fina |
| 8 | 1 | 1,1 | 0 | 4,4 | Suspensión uniforme más fina |

5 Los resultados mostrados en la Tabla 12 y en las figura 13 a la 20 demuestran que la inclusión de un hidrocoloide de elevado peso molecular durante el secado del terpeno encapsulado en partículas favorece la hidratación y la dispersión de las micropartículas para obtener una suspensión uniforme. Otros ejemplos de tales agentes hidrocoloides son la maltodextrina, los alginatos o similares.

10 También puede ser ventajoso incluir un revestimiento del gránulo para aumentar la estabilidad de los terpenos cargados, y para conseguir una liberación sostenida del terpeno.

Ejemplo 11 - Evaluación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las emulsiones de terpenos, terpenos encapsulados en PL de panadería y SAF Mannan frescas y terpenos encapsulados en PL de panadería y SAF Mannan liofilizadas contra S. aureus

15 Los resultados de un protocolo implementado para comparar la CIM de las formulaciones de terpenos encapsulados en partículas de glucano huecas frescas frente a las liofilizadas se muestran a continuación en la Tabla 13. También se ensayó una emulsión de terpenos simple, y se muestran los resultados para la comparación.

Tabla 13 CIM pg/ml de terpeno

| Terpeno | Emulsión | Panadería | | SAF Mannan | |
|--------------------------|----------|-----------|-------------|------------|-------------|
| | | Fresco | Liofilizado | Fresco | Liofilizado |
| L-carvona | 3,75 | 0,1 | >0,04 | 0,01 | >0,02 |
| Cítral | 0,94 | 0,01 | 0,05 | 0,01 | >0,03 |
| L-carvona/timol | 0,23 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,05 |
| Eugenol | 0,12 | 0,03 | 0,05 | 0,01 | 0,05 |
| Geraniol | 0,47 | 0,03 | 0,06 | 0,02 | >0,03 |
| L-carvone/Cítral/Eugenol | 0,23 | 0,03 | 0,06 | 0,02 | 0,05 |

Las conclusiones extraídas de los resultados anteriormente mostrados fueron:

- 20 - La carga de terpeno en partículas de glucano huecas parece potenciar la CIM del terpeno. Generalmente, las emulsiones de terpeno frescas son - 4 - 375 veces menos potentes que las formulaciones encapsuladas.
- Los terpenos cargados en SAF Mannan™ obtienen resultados ligeramente mejores que los cargados en PL de panadería.
- 25 - Las composiciones de terpeno cargado frescas obtienen resultados ligeramente mejores que los de las composiciones liofilizadas (podría producirse cierto grado de volatilización de terpenos de las composiciones secas durante la liofilización).
- Los terpenos en emulsiones acuosas permanecen estables durante al menos 3 semanas.

Ejemplo 12- Eficacia de los terpenos encapsulados a escala de planta piloto contra S. aureus.

Se llevaron a cabo ensayos antimicrobianos con terpenos y mezclas encapsuladas producidas a escala de planta piloto contra *S. aureus*. Las sustancias que contenían muestras de terpeno encapsulado tanto frescas como liofilizadas demostraron una potente actividad antimicrobiana. Los resultados se recogen en la Tabla 14 a continuación.

- 5 Se encapsularon los terpenos en SAF-Mannan™ a una escala de 2,5 kg. Una mezcla de tres terpenos (geraniol, 275 g; eugenol, 385 g; y timol, 440 g se disolvió y homogeneizó con 100 g de Tween-80 y 8 l de agua. Se añadió SAF Mannan™ (2,5 kg) para formar una suspensión homogénea. Se hizo pasar la suspensión a través de un homogeneizador Gaulin para reducir el tamaño de las partículas, y se incubó el homogeneizado durante la noche a temperatura ambiental. Se tomó una muestra del terpeno encapsulado y se almacenó a temperatura ambiental.
- 10 A continuación se congeló en bandejas y se liofilizó el resto del terpeno encapsulado. Se molió el polvo de terpeno encapsulado liofilizado y se almacenó a temperatura ambiental.

Tabla 14

| Material | CIM (ppm) |
|--|-----------|
| Ensayos con <i>Staphylococcus aureus</i> | |
| Control de cáscara hueca PGL | >2500 |
| Planta piloto - Fresco | 100 |
| Planta piloto - Liofilizado | 100 |

A escala de planta piloto, las muestras frescas y liofilizadas demostraron la misma potencia sobre una base peso/peso de terpeno.

- 15 Tomando como base los resultados de preparación a gran escala, la dosis efectiva prevista de la formulación liofilizada contra *S. aureus* es de 200 ppm (la formulación contiene ~50 % de terpeno p/p) o de 0,2 g/l de agua.

Ejemplo 13 - Eficacia los terpenos encapsulados contra micobacterias

Las emulsiones de terpeno se prepararon de la siguiente manera:

- 20
- Citral - 4,5 g de citral en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.
 - L-carvona/eugenol - 2,25 g de L-carvona y 2,25 g de eugenol en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.
 - Eugenol - 4,5 g de eugenol en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.
 - Geraniol - 4,5 g de geraniol en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.
 - Mezcla de geraniol/timol - 2,25 g de geraniol y 2,25 g de timol en 1,5 ml de Tween-80 al 3,3 %.
 - Emulsión de control 6 ml de Tween-80 al 1 %.

- 25 Se mezcló SAF-Mannan™ (2,5 g) con 3 ml de cada emulsión y 7 ml de Tween-80 al 1 % y se incubó durante la noche para encapsular los terpenos y las mezclas de terpenos. Se congelaron y liofilizaron la formulaciones de terpenos encapsulados, y se molieron los polvos hasta obtener un polvo fino. Se ensayaron las suspensiones de terpenos encapsulados (25 mg/ml) y las emulsiones de terpenos no encapsulados para determinar su actividad antibacteriana contra micobacterias. Los resultados se recogen en la Tabla 15

- 30

Tabla 15

| Material | CIM (ppm) |
|--------------------------------|-----------|
| Ensayos <i>micobacterianos</i> | |
| PGL citral lio | 250 |
| PGL L-carvona/eugenol lio | 500 |
| PGL eugenol lio | 500 |
| PGL geraniol lio | 125 |
| PGL geraniol/timol lio | 62,5 |
| Emulsión de control | >1000 |
| Emulsión de citral | 35 |
| Emulsión de L-carvona/eugenol | 53 |
| Emulsión de eugenol | 105 |
| Emulsión de geraniol | 70 |
| Emulsión de geraniol/timol | 53 |
| lio = (liofilizada) | |

Ejemplo 14 - Actividad nematocida de los terpenos encapsulados

Se prepararon preparaciones de paredes celulares de levadura encapsulando citral, conforme a los procedimientos anteriormente descritos. Las partículas de glucano huecas contenían un 17,5 % de citral, y las partículas estaban presentes en las preparaciones de ensayo en una concentración de 1000 ppm. Esto significa que los terpenos estuvieron presentes efectivamente en una concentración de 175 ppm.

Se añadió 1,0 ml de las preparaciones de ensayo a entre 0,1 y 0,15 ml de agua que contenía nematodos de nódulos radiculares. Se añadió 1,0 ml de agua a los nematodos como control.

Se realizaron las observaciones de la manera anteriormente descrita y se evaluó la tasa de destrucción (esto es, el porcentaje de nematodos muertos) al cabo de 24 y 48 horas. Los resultados mostrados a continuación en la Tabla 16 son un promedio de 2 series de resultados.

Tabla 16 - Actividad nematocida de la solución de terpenos encapsulados (17,5 % de citral a una concentración de 1000 ppm)

| Tiempo | Tasa de destrucción | |
|--------|---------------------|---------|
| | Ensayo | Control |
| 24 h | 45 | 17 |
| 48 h | 56 | 21 |

Los resultados demuestran que las partículas de glucano huecas encapsulando terpenos son efectivas matando nematodos de nódulos radiculares a una concentración de partículas de 1000 ppm, lo cual equivale a una concentración de citral de tan solo 175 ppm.

Por lo tanto, las partículas de glucano huecas encapsulando terpenos parecen ser tan efectivas como nematocidas como los terpenos en solución o con surfactante. Se mantiene la actividad nematocida aunque el terpeno esté encapsulado en el interior de la partícula. Cabe esperar que concentraciones más elevadas de terpenos dentro de las partículas de glucano huecas, o bien concentraciones más elevadas de las partículas, resultarían en una tasa de destrucción aún más elevada, como es el caso de los terpenos en solución o con surfactante.

Ejemplo 15 - Propiedades fungicidas de los terpenos encapsulados y no encapsulados

Se implementaron los siguientes protocolos para evaluar las propiedades fungicidas de diversas combinaciones de terpenos, y para comparar la eficacia de las composiciones encapsuladas y no encapsuladas.

Evaluación de las propiedades fungicidas de diferentes formulaciones de terpenos

Se utilizó un ensayo por placa de microtitulación para evaluar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de una serie de compuestos de terpenos contra diferentes organismos patógenos. El ensayo utilizado para cada organismo se describe con detalle más adelante, pero sus principales características generales son las siguientes.

El ensayo utiliza dos periodos de incubación para distinguir entre actividades estáticas (inhibición de la proliferación) y biocidas (destrucción). El primer periodo de incubación posibilita la evaluación de la inhibición del crecimiento, pero no puede distinguir entre la simple prevención del crecimiento y la destrucción de las células. El propósito del segundo periodo de incubación es proporcionar el tiempo y los nutrientes suficientes para la proliferación de cualquier célula durmiente o inhibida que sobreviva a la exposición al terpeno. Todas las células inhibidas por los efectos fungistáticos deberían responder y proliferar durante el segundo periodo de incubación, mientras que las células que fueron destruidas por la exposición a los terpenos no proliferarán en el nuevo medio.

Se llevaron a cabo los experimentos de cribado iniciales utilizando un total de 31 formulaciones de terpenos distintas (Tabla 17). Se repitieron estos experimentos utilizando un subgrupo de formulaciones de terpenos fuertemente activas (Tabla 18).

También se ensayó una combinación de los terpenos geraniol, eugenol y timol en una proporción de 2:1:2 encapsulada en el interior de partículas de glucano; esta muestra es designada como PL-GET. También se ensayó una combinación no encapsulada de geraniol, eugenol y timol en la misma proporción, para su comparación con la forma encapsulada.

Ensayo CIM utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

Se añadieron *S. cerevisiae* (5×10^5 células/ml en medio de cultivo YPD) a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos en partes alícuotas de 100 μ L. Como mínimo un pocillo por placa fue designado como control con solo células, y no se añadió terpeno a tales pocillos. Se añadieron partes alícuotas (100 μ L) de diferentes formulaciones de terpenos a la primera fila de los demás pocillos, y se realizaron diluciones dobles seriadas transfiriendo 100 μ L de una fila a la siguiente un total de 7 veces. Finalmente, se descartaron 100 μ L de la

última fila, a fin de garantizar que todos los pocillos contuvieran el mismo volumen. Las placas de microtitulación se incubaron estáticamente durante la noche a 30 °C.

Después de la incubación, se evaluaron las placas para determinar la inhibición de la proliferación (evidenciada por la falta de turbidez). La inhibición de la proliferación ($\geq 75\%$) se confirmó visualmente mediante microscopía.

- 5 Una vez se hubo determinado la CIM para cada formulación, se centrifugaron las placas de microtitulación y el medio gastado se retiró de los pocillos no turbios. Se volvieron a suspender las células en medio nuevo (100 μ L) y se reincubaron las placas durante la noche a 30 °C. La evaluación de la inhibición de la proliferación se llevó a cabo de la misma manera que anteriormente.

Ensayo CIM utilizando un inóculo mixto

- 10 Se diluyeron seriadamente las diferentes formulaciones de terpenos en la placa de microtitulación de 96 pozos, tal como se ha descrito para *S. cerevisiae*. A continuación se añadió agar YPD fundido a los pocillos, junto con 5 μ l de inóculo mezclado (preparado a partir de hojas de parra mohosas hasta obtener una concentración de 5×10^4 células/mL). Se incubaron estáticamente las placas durante 24 horas a temperatura ambiental y se evaluó visualmente mediante microscopía la proliferación de las esporas.

- 15 Debido al uso de un medio sólido, no se pudo llevar a cabo el segundo periodo de incubación en medios nuevos.

Ensayo CIM utilizando *Colletotrichum graminicola*

- 20 Se diluyeron seriadamente las diferentes formulaciones de terpenos en la placa de microtitulación de 96 pozos, tal como se ha descrito para *S. cerevisiae*. Se añadió *C. graminicola* (300 esporas/pocillo) a los terpenos diluidos y se incubaron estáticamente las placas durante 48 horas a temperatura ambiental. La germinación y la proliferación de las esporas se evaluaron visualmente mediante microscopía.

Una vez se hubo determinado la CIM para cada formulación, se centrifugaron las placas de microtitulación y el medio gastado se retiró de los pocillos con proliferación inhibida. Se volvieron a suspender las esporas en medio nuevo (100 μ L) y se reincubaron las placas durante la noche a temperatura ambiental. La evaluación de la inhibición de la proliferación se llevó a cabo de la misma manera que anteriormente.

- 25 **Tabla 17** - Valores CIM y CIM fungicida obtenidos a partir del cribado inicial de 31 formulaciones de terpenos

| | Formulación de terpenos ^a | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | | Microbios mezclados | | <i>Colletotrichum graminicola</i> | |
|----|--------------------------------------|---------------------------------|-------------|---------------------|-------------|-----------------------------------|-------------|
| | | CIM | CIM biocida | CIM | CIM biocida | CIM | CIM biocida |
| 1 | Geraniol (G) | 500 | 500 | 250 | NE | 63 | 63 |
| 2 | Eugenol (E) | 500 | 500 | 125 | NE | 25 | 125 |
| 3 | Timol (T) | 250 | 250 | 63 | NE | 63 | 500 |
| 4 | Citral (C) | 250 | 250 | 63 | NE | 125 | 63 |
| 5 | L-carvona (L) | 250 | 500 | 63 | NE | 125 | 125 |
| 6 | GE | 1000 | 2000 | 125 | NE | 63 | 250 |
| 7 | GT | 500 | 500 | 250 | NE | 125 | 63 |
| 8 | GC | 500 | 500 | 125 | NE | 125 | 250 |
| 9 | GL | 500 | 500 | 125 | NE | 125 | 125 |
| 10 | ET | 500 | 500 | 125 | NE | 125 | 125 |
| 11 | EC | 250 | 1000 | 31 | NE | 125 | 125 |
| 12 | EL | 500 | 1000 | 125 | NE | 125 | 125 |
| 13 | TC | 500 | 500 | 16 | NE | 63 | 63 |
| 14 | TL | 500 | 1000 | 63 | NE | 63 | 63 |
| 15 | CL | 500 | 500 | ≤ 8 | NE | 63 | 63 |
| 16 | GET | 500 | 500 | 23 | NE | 94 | 94 |
| 17 | GEC | 250 | 500 | 94 | NE | 94 | 94 |
| 18 | GEL | 500 | 1000 | 188 | NE | 188 | 188 |
| 19 | GTC | 500 | 500 | 47 | NE | 188 | 188 |
| 20 | GTL | 500 | 1000 | 94 | NE | 94 | 94 |
| 21 | GCL | 250 | 500 | 94 | NE | 47 | 47 |
| 22 | ETC | 125 | 250 | 188 | NE | 94 | 94 |
| 23 | ETL | 500 | 1000 | ≤ 12 | NE | 94 | 94 |

ES 2 434 415 T3

| | | | | | | | |
|----|--|------|------|-----|----|-----|-----|
| 24 | ECL | 500 | 1000 | ≤12 | NE | 188 | 188 |
| 25 | TCL | 500 | 1000 | 23 | NE | 94 | 375 |
| 26 | GETC | 500 | 1000 | 125 | NE | 250 | 500 |
| 27 | ETCL | 500 | 1000 | 63 | NE | 125 | 125 |
| 28 | GTCL | 500 | 1000 | 125 | NE | 250 | 250 |
| 29 | GECL | 500 | 1000 | ≤16 | NE | 500 | 500 |
| 30 | GETL | 1000 | 1000 | 125 | NE | 500 | 250 |
| 31 | GECTL | 1000 | 1000 | 78 | NE | 625 | 625 |
| | | | | | | | |
| | GET (proporción 2:1:2, p/p/p) | NE | NE | 98 | NE | 78 | 156 |
| | PL-GET (proporción G:E:T de 2:1:2, p/p) ^b | 98 | 391 | 98 | NE | 20 | 20 |

NE, no ensayado; PL-GET, formulación GET encapsulada en levadura.
^a Las combinaciones de terpenos se mezclaron en una proporción 1:1 (p/p) a no ser que se indique otra cosa.
^b CIMs calculadas según el contenido en terpenos.

Tabla 18 - Ensayo repetido para determinar los valores CIM y CIM fungicida

| Formulación de terpenos ^a (por n.º) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | | Microbios mezclados aislados a partir de hojas de parra mohosas ^b | | <i>Colletotrichum graminicola</i> | |
|--|---------------------------------|-------------|--|-------------|-----------------------------------|-------------|
| | CIM | CIM biocida | CIM | CIM biocida | CIM | CIM biocida |
| T (3) | NE | NE | 63 | NE | NE | NE |
| L (5) | NE | NE | 250 | NE | NE | NE |
| GE (6) | NE | NE | NE | NE | 125 | 500 |
| EC (11) | 125 | 250 | NE | NE | NE | NE |
| TC (13) | NE | NE | 250 | NE | 63 | 250 |
| TL (14) | NE | NE | 500 | NE | 250 | 500 |
| CL(15) | NE | NE | 500 | NE | 125 | 500 |
| GET (16) | NE | NE | 375 | NE | 188 | 375 |
| GEC (17) | 250 | 500 | NE | NE | NE | NE |
| GCI (21) | 250 | 500 | NE | NE | 375 | 750 |
| ETC (22) | 125 | 250 | NE | NE | 94 | 188 |
| ETL (23) | NE | NE | 375 | NE | 188 | 750 |
| ECL (24) | NE | NE | 750 | NE | NE | NE |
| TCL (25) | NE | NE | 750 | NE | 94 | 375 |
| ETCL (27) | NE | NE | 500 | NE | 63 | 500 |
| GECL (29) | NE | NE | 1000 | NE | NE | NE |
| PL-GET (proporción G:E:T de 2:1:2, p/p) ^c | 98 | 195 | NE | NE | 39 | 156 |

NE, no ensayado; PL-GET, formulación GET encapsulada en levadura.
 NOTA: Se ensayaron las muestras por duplicado. En caso de que se obtuvieran valores distintos entre muestras duplicadas, se ha presentado el valor más elevado. Ninguna muestra duplicada difirió en más de una dilución doble.
^a Las combinaciones de terpenos se mezclaron en una proporción 1:1 (p/p) a no ser que se indique otra cosa.
^b 1×10^4 células/ml de suspensión original.
^c CIMs calculadas según el contenido en terpenos.

Inóculo mixto

- 5 La utilización de un inóculo mixto plantea una serie de problemas. La variabilidad del contenido de esporas entre preparaciones resulta en una escasa reproducibilidad del ensayo, y la proliferación de organismos contaminantes

dificulta la evaluación de la germinación de esporas. Las especies de levadura unicelulares son especialmente problemáticas en cuanto al enmascaramiento de la proliferación de esporas. Pese a que no pudieron obtenerse datos precisos de este ensayo, se observó un efecto inhibitorio de los terpenos.

5 La identificación de las esporas resultó más fácil durante la evaluación del ensayo repetido que durante el ensayo de cribado inicial, ya que se utilizó un mayor número de esporas (aproximadamente 50/pocillo frente a aproximadamente 10/pocillo). Por consiguiente, los datos obtenidos durante el ensayo repetido podrían proporcionar una estimación más fiable de la CIM.

Colletotrichum graminicola

10 Los valores CIM generalmente más elevados obtenidos en el ensayo repetido en comparación con el ensayo de cribado inicial podrían deberse a:

- el uso de soluciones de terpenos con una antigüedad de una semana
- el uso de esporas recién preparadas, las cuales tenían una mayor viabilidad que las utilizadas en el ensayo de cribado inicial y por consiguiente podrían ser más difíciles de matar.

15 **Comparación entre formulaciones de terpenos como emulsiones libres y las mismas formulaciones de terpenos encapsuladas en partículas de glucano huecas: Ensayos CIM con *Saccharomyces cerevisiae***

Se añadió medio de cultivo YPD (100 µL) a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añadieron partes alícuotas de diferentes formulaciones de terpenos a la primera fila, resultando en un volumen total de 200 µL en esta fila. Un pocillo fue designado como control con solo células, y no se añadió terpeno a tales pocillos. Se realizaron diluciones dobles seriadas transfiriendo 100 µL de una fila a la siguiente un total de 7 veces. 20 Finalmente, se descartaron 100 µL de la última fila, a fin de garantizar que todos los pocillos contuvieran el mismo volumen. A continuación se añadieron *S. cerevisiae* (5×10^5 células/mL en medio de cultivo YPD) a cada pocillo en partes alícuotas de 100 µL, y se midió la absorbancia a 620 nm (A_{620}) para cada pocillo utilizando un lector de placas de microtitulación. Las placas de microtitulación se incubaron estáticamente durante la noche a 30 °C.

25 Después de la incubación, se midió de nuevo la A_{620} y se evaluaron las placas para determinar la inhibición de la proliferación ($\geq 75\%$). La inhibición de la proliferación se confirmó visualmente mediante microscopía.

Para las emulsiones de terpenos libres, una vez se hubo determinado la CIM para cada formulación, se centrifugaron las placas de microtitulación y el medio gastado se retiró de los pocillos con proliferación inhibida. Se volvieron a suspender las células en medio nuevo (100 µL) y se reincubaron las placas durante la noche a 30 °C. La evaluación de la inhibición de la proliferación se llevó a cabo de la misma manera que anteriormente.

30 Los resultados CIM y CIM fungicida se recogen en la Tabla 19.

Resultados

Tabla 19 - Valores CIM y CIM fungicida obtenidos a partir del cribado de 31 formulaciones de terpenos contra *Saccharomyces cerevisiae*

| Formulación de terpenos ^a (N.º de referencia) | Formulaciones encapsuladas en levadura ^{b, c} | | Emulsiones de terpeno libre | |
|--|--|-------------|-----------------------------|-------------|
| | CIM | CIM biocida | CIM | CIM biocida |
| G (1) | 111 | NE | 250 | 250 |
| E (2) | 131 | NE | 125 | 250 |
| T (3) | 115 | NE | 125 | 250 |
| C (4) | 118 | NE | 125 | 250 |
| L (5) | 254 | NE | 250 | 500 |
| GE (6) | 118 | NE | 250 | 500 |
| GT (7) | 108 | NE | 125 | 250 |
| GC (8) | 113 | NE | 125 | 250 |
| GL (9) | 117 | NE | 250 | 500 |
| ET (10) | 131 | NE | 125 | 250 |
| EC (11) | 126 | NE | 125 | 250 |
| EI (12) | 129 | NE | 125 | 250 |
| TC (13) | 59 | NE | 63 | 63 |
| TI (14) | 124 | NE | 63 | 125 |

ES 2 434 415 T3

| | | | | |
|--|------------------|----|------------------|------------------|
| CL (15) | 124 | NE | 125 | 125 |
| GET (16) | 119 | NE | 63 | 125 |
| GEC (17) | 119 | NE | 125 | 250 |
| GEL (18) | 121 | NE | 125 | 125 |
| GTC (19) | 115 | NE | 125 | 125 |
| GTL (20) | 119 | NE | 125 | 125 |
| GCL (21) | 234 | NE | 125 | 125 |
| ETC (22) | 124 | NE | 125 | 125 |
| ETL (23) | 123 | NE | 125 | 125 |
| ECL (24) | 63 | NE | 63 | 125 |
| TCL (25) | 61 | NE | 125 | 500 |
| GETC (26) | 61 | NE | 63 | 250 |
| ETCL (27) | 120 | NE | 63 | 125 |
| GTCL (28) | 124 | NE | 125 | 125 |
| GECL (29) | 125 | NE | 125 | 125 |
| GETL (30) | 122 | NE | 125 | 250 |
| GECTL (31) | 120 | NE | 125 | 250 |
| | | | | |
| GET (proporción 2:1:2, p/p/p) | 125 ^d | NE | 125 | 250 |
| PL-GET (proporción G:E:T de 2:1:2, p/p) | 125 | NE | 125 ^c | 250 ^c |
| PL-ETC (proporción E:T:C de 1:1:1, p/p) | 125 | NE | 125 ^c | 250 ^c |
| NT, no ensayado; PL-GET, formulación GET encapsulada en levadura; LP-ETC, formulación ETC encapsulada en levadura. | | | | |
| ^a Las combinaciones de terpenos se mezclaron en una proporción 1:1 (p/p) a no ser que se indique otra cosa. | | | | |
| ^b Formulaciones encapsuladas en levadura a no ser que se indique otra cosa. | | | | |
| ^c CIM calculada según el contenido en terpenos. | | | | |
| ^d Formulación de emulsión no encapsulada. | | | | |

- 5 Tanto para las emulsiones de terpeno como para los terpenos encapsulados en levadura, las CIMs fueron habitualmente ≤ 125 ppm, con las formulaciones más activas inhibiendo el crecimiento a ~ 60 ppm. Los valores CIM obtenidos de las emulsiones de terpeno fueron similares a los obtenidos para sus respectivas formulaciones encapsuladas en levadura. Cuando se obtuvieron valores distintos, éstos difirieron tan solo en aproximadamente una dilución doble.
- Muchas de las emulsiones de terpeno libre fueron fungicidas a la CIM inhibidora del crecimiento, con la mayoría mostrando actividad fungicida a una concentración dos veces mayor.
- 10 Estos resultados demuestran que los terpenos encapsulados en partículas de glucano son al menos tan efectivos matando hongos que las formas no encapsuladas. Además, las composiciones encapsuladas utilizadas podrían haber tenido una potencia reducida debido al hecho de haber sido almacenadas durante 45 días a 4 °C y de tener un contenido de terpenos subóptimo de ~ 4 % p/p.
- 15 El ensayo para determinar la actividad fungicida incluye un paso de centrifugación, que trata de separar las células microbianas de cualquier terpeno residual en el medio de cultivo, produciendo un gránulo de células en el fondo del pocillo. A continuación se vuelve a suspender este gránulo en medio nuevo y se incuba por segunda vez en ausencia de terpeno. Sin embargo, el paso de centrifugación no puede discriminar entre células microbianas y partículas de levadura, y por consiguiente, al utilizar terpenos encapsulados en levadura, el gránulo de células también contendrá partículas de levadura cargadas con terpeno. Como resultado, tanto las partículas de levadura como las células microbianas se vuelven a suspender en el medio nuevo.
- 20 No se considera que esta cuestión de metodología afecte a los resultados obtenidos en los experimentos descritos anteriormente, por los siguientes motivos.
- En experimentos previos se han utilizado emulsiones de terpeno en lugar de partículas de levadura cargadas con terpeno, y se ha observado claramente actividad fungicida.

- Los terpenos encapsulados se liberan por difusión, y se alcanza rápidamente un equilibrio entre la concentración de terpenos encapsulados y la concentración de terpenos liberados en el medio circundante. Por lo tanto, después de la centrifugación y la resuspensión en medio nuevo, es probable que la concentración de terpeno liberado en el medio de cultivo se sitúe claramente por debajo de la requerida para la actividad inhibitoria del crecimiento.
- No se produjo crecimiento cuando el contenido del pocillo con CIM fungicida se sembró en medio de cultivo de agar sólido.
- Sembrado en medio de cultivo sólido, la difusión del terpeno residual por el gran volumen de la placa de agar resulta en una concentración de terpeno local demasiado baja para causar la inhibición del crecimiento. Por consiguiente, la falta de crecimiento a partir del contenido de la CIM fungicida debe deberse a la actividad fungicida inicial. En contraste, cuando se obtuvo una CIM inferior a la CIM fungicida y se sembró en medio de cultivo de agar sólido el contenido del pocillo CIM, se observó crecimiento, indicando un efecto fungistático.

Ejemplo 16 - Preparación de composiciones de terpeno encapsuladas para ensayos de campo

El propósito del siguiente protocolo era encapsular una composición de terpeno en partículas de glucano huecas para ensayos de campo posteriores.

Materiales:

Timol (suministrado por Alpha-Gamma Corporation) Eugenol (suministrado por Alpha-Gamma Corporation) Geraniol (suministrado por Alpha-Gamma Corporation) Tween-80 al 1 % (suministrado por Alpha-Gamma Corporation) Partículas de pared celular de levadura Goma xantana.

Las partículas de pared celular de levadura se obtuvieron de Biorigin (Sao Paolo, Brasil) con el nombre comercial Nutricell MOS 55, y fueron elaboradas por Açucareira Quatá S.A, Usina Quatá, Quatá - Sao Paolo - Brasil - Código Postal 19780 000. Las partículas son un extracto de pared celular secado por pulverización de *S. cerevisiae* y son un polvo fluido de color beige claro a tostado.

Protocolo: El siguiente protocolo era adecuado para 1 kg de partículas, pero puede aumentarse fácilmente su escala para la producción masiva.

1. Preparar mezcla de terpeno: mezclar 375 gramos de Geraniol + 525 gramos de Eugenol + 600 gramos de Timol y agitar en un matraz de cristal.
2. Preparar 6,2 l de Tween 80 al 1 % mezclando 62 gramos de Tween 80 en 6,2 l de agua en un cubo blanco de 2 galones. Mezclar para obtener una solución.
3. Añadir 6,2 gramos de goma xantana a la solución de Tween y agitar para disolver.
4. Preparar emulsión de terpeno mezclando 1,5 kg de mezcla de terpeno + 6,2 l de Tween 80 al 1%/goma xantana al 0,1 % en el cubo blanco utilizando un mezclador Polytron.
5. Añadir 1000 gramos de partículas de pared celular de levadura - mezclar utilizando un mezclador de pintura hasta obtener una suspensión uniforme.
6. Añadir la emulsión de terpeno del paso 4 a las partículas de pared celular de levadura mientras se mezcla hasta obtener una consistencia fina similar a la mayonesa.
7. Verter la mezcla de terpeno en tarros e incubar durante la noche.

Resultados: Se obtuvo en forma de pasta geraniol, eugenol y timol encapsulado en partículas de glucano huecas. Se convirtió fácilmente la pasta en un polvo seco mediante técnicas de secado por pulverización convencionales. La pasta es la composición "líquida" a la que se hace referencia en los siguientes protocolos, y el "polvo" es la forma secada por pulverización.

Ejemplo 17 - Ensayos de campo de composición de terpeno encapsulada sobre mildiu algodonoso

En las vides, el mildiu algodonoso es causado por el hongo *Plasmopara viticola*, que infecta viñedos de todo el mundo y puede causar pérdidas devastadoras para los cultivadores de uva en términos de rendimiento de la cosecha y calidad del vino. El hongo ataca las frutas y todas las partes verdes de la vid, provocando el marchitamiento de las hojas y pudriendo las flores y las bayas. La enfermedad se manifiesta como puntos irregulares de color amarillo pálido o amarillo verdoso en la superficie superior de las hojas, con crecimiento fúngico algodonoso denso, de color gris blanquecino, cubriendo la parte inferior de las lesiones en las hojas. Las bayas también pueden estar cubiertas por el crecimiento algodonoso y, dependiendo del momento de la infección, podría volverse marrón y blando o podría no ablandarse en absoluto. El mildiu algodonoso se propaga mediante la dispersión de esporas por el viento y la lluvia, y requiere condiciones de humedad para la infección. Es

particularmente problemático en entornos muy húmedos. Se recomiendan medidas preventivas para la gestión de la enfermedad, con aplicaciones precoces de fungicidas seguidas de aplicaciones repetidas a intervalos apropiados. Se ha desarrollado resistencia a algunos tratamientos, y pese a que el desarrollo de resistencia puede minimizarse rotando el uso de diferentes fungicidas, continúa siendo un problema.

- 5 El propósito de este ensayo era investigar la eficacia de la formulación de terpeno encapsulada del Ejemplo 16 (PGL-GET) suministrado como formulación líquida o en polvo (secada por pulverización), para la prevención del mildiu algodonoso en las uvas.

Cuatro bloques adyacentes, cada uno de ellos cubriendo 0,1 ha, fueron identificados en el emplazamiento 20 en el viñedo Kir-Yianni.

- 10 Kir-Yianni es un viñedo de 35 ha a una elevación de 300 m. Limita con un robledal mixto al norte y al oeste, y se alza sobre plantaciones de árboles frutales al sur y al este.

Los cuatro bloques habían sido tratados con múltiples productos antes de la aplicación de la formulación del terpeno. El 26 de junio de 2004, dos de los cuatro bloques fueron rociados con la formulación del terpeno en polvo en una dosis de 0,5 g/l o de 2 g/l (véase la ilustración esquemática en la figura 21). Un tercer bloque fue tratado con una mezcla de Burdeos convencional y azufre humectante, y el bloque restante se dejó sin tratar. Durante la semana siguiente se controlaron las vides de cada bloque en busca de signos de mildiu algodonoso.

- 15

Cuatro bloques adyacentes, cada uno de ellos cubriendo 0,1 ha, fueron identificados en el emplazamiento 18 en el viñedo Kir-Yianni. Los cuatro bloques habían sido tratados con múltiples productos antes de la aplicación de la formulación de terpeno. El 26 de junio de 2004, dos de los cuatro bloques fueron rociados con la formulación líquida de terpeno en una dosis de 1 g/l o de 4 g/l (Figura 21) (nota: 1 g de la formulación de terpeno líquido tiene un volumen de 1 ml). De los dos bloques restantes, uno se dejó sin tratar y el otro se roció con Mikal®, un tratamiento convencional para el mildiu algodonoso, el 28 de junio de 2004. Durante la semana siguiente se controlaron las vides de cada bloque en busca de signos de mildiu algodonoso.

- 20

En ambos emplazamientos, se aplicó el producto de terpeno a razón de 1200 l/ha.

- 25 Se registraron las siguientes fases de crecimiento de las uvas:

- desborre de la yema, 26 de marzo de 2004
- floración, 1 de junio de 2004
- principio de la maduración, 6 de agosto de 2004

Las aplicaciones del estudio tuvieron lugar antes del principio de la maduración.

- 30 La campaña de 2004 fue excepcionalmente tardía y sumamente húmeda. La presión de la enfermedad mildiu algodonoso fue extremadamente alta, los niveles de *Botrytis* fueron elevados y la incidencia de oídio fue moderada. Tanto la formulación en polvo como 35 formulaciones PGL-GET se almacenaron a temperatura ambiental. No se utilizaron condiciones de almacenamiento especiales.

Detalles de los productos comparadores

- 35 Ensayo de formulación en polvo: Mezcla de Burdeos, fabricada por Manica Spa, Italia, envasada en Grecia por Moscholios Chemicals SA; azufre humectante

Ensayo de formulación líquida: mikal® (fosetyl-al 50 %, folpet 25 %), fabricado por Bayer CropScience, distribuido en Grecia por Bayer Hellas SA. Los productos comparadores se aplicaron de la siguiente manera: Una aplicación antes del desborre de la yema en una dosis de 15 g/l, seguida de dos aplicaciones más al año en una dosis de 6,5 g/l. Para las tres aplicaciones se utilizó una tasa de aspersión de 1000 l/ha.

- 40

Ensayo de formulación en polvo: La mezcla de Burdeos (2 g/l) y el azufre humectante (2,2 g/l) fueron aplicados el 26 de junio de 2004.

Ensayo de formulación líquida: El Mikal (3,2 g/l) fue aplicado el 28 de junio de 2004.

- 45 Se examinaron visualmente las vides en busca de síntomas de mildiu algodonoso. La aparición de la enfermedad fue marcada por un promedio de dos manchas oleosas por hoja. Se consideró que los tratamientos que previnieron la aparición de más manchas proporcionaban una protección efectiva contra el mildiu algodonoso.

Resultados

Formulación PGL-GET en polvo (secada por pulverización)

El tratamiento convencional con mezcla de Burdeos proporcionó una buena protección contra el mildiu algodonoso.

- 50 En las vides de control se observaron síntomas leves de mildiu algodonoso. La concentración de producto de terpeno de 0,5 g/l no proporcionó protección, y la concentración de producto de terpeno de 2 g/l proporcionó una

protección tan solo ligeramente mejor que el control. Nota: la presión de la enfermedad en este emplazamiento fue muy baja debido al reciente tratamiento con pesticida.

Se encontraron dificultades para disolver la formulación en polvo puesto que era muy fina, resultando en dispersión en el aire. Esto podría haber afectado negativamente a la eficacia del producto.

5 **Formulación PGL-GET líquida**

Administrado en una dosis de 4 g/l, el producto de terpeno proporcionó una protección excelente contra el mildiu algodonoso en follaje expuesto. La dosis de 1 g/l no proporcionó protección. En el bloque de control se observaron síntomas severos de mildiu algodonoso.

La formulación líquida fue fácil de usar y tenía un olor agradable.

10 **Debate**

El mildiu algodonoso puede provocar pérdidas devastadoras para los cultivadores de uva, debido a su efecto en el rendimiento de la cosecha y la calidad del vino. El tratamiento de la enfermedad se enfoca a la prevención, puesto que una vez establecida, la infección puede propagarse rápidamente. En el emplazamiento rociado con la formulación en polvo, PGL-GET no demostró eficacia en la dosis baja (0,5 g/l), y la dosis de 2 g/l fue menos efectiva que el tratamiento convencional. En este emplazamiento, las recientes aplicaciones de pesticida resultaron en una baja presión de la enfermedad, lo cual podría haber limitado la eficacia aparente del tratamiento con terpeno. No obstante, se consideró que una dosis inferior a 2 g/l del producto de terpeno era insuficiente.

En el emplazamiento rociado con la formulación líquida, el mayor nivel de dosificación de 4 g/l proporcionó una protección excelente del follaje expuesto. El crecimiento vegetativo excesivo en este emplazamiento resultó en un tratamiento más efectivo de las ramas exteriores más jóvenes en comparación con las ramas más antiguas en el follaje interno. Es conveniente la cobertura foliar completa por el producto de terpeno, ya que el tratamiento no es sistémico. Se estima que un incremento de aproximadamente el 30 % con respecto al volumen utilizado para tratamientos sistémicos convencionales alcanzaría una buena cobertura utilizando el tratamiento con terpeno.

Conclusiones:

25 La aplicación foliar de la formulación líquida de PGL-GET fue altamente efectiva en el control del mildiu algodonoso a una concentración de 4 g/l. Las concentraciones bajas de 0,5 g/l en polvo y de 1 g/l líquida no fueron efectivas.

Ejemplo 18 - Ensayos de campo de composición de terpeno encapsulada sobre oídio

El oídio de la vid es causado por el hongo *Uncinula necator*, y provoca una disminución del crecimiento de la vid, de la calidad de la fruta y de la resistencia invernal de las vides. En las uvas de vinificación, un nivel de infección de tan solo el 3 % de las bayas puede afectar a la calidad del vino. La enfermedad se caracteriza por pequeñas manchas de proliferación fúngica de color gris blanquecino que aumentan de tamaño hasta formar un recubrimiento blanco pulverulento sobre las hojas. El crecimiento fúngico también puede afectar a las bayas, las cuales pueden abrirse. En contraste con el mildiu algodonoso, que requiere condiciones de calor húmedo, el oídio puede constituir un problema en temporadas de cultivo más secas, ya que prefiere zonas de sombra con condiciones meteorológicas húmedas pero no lluviosas. Se recomiendan medidas preventivas para la gestión del oídio, con aplicaciones precoces de fungicidas seguidas de aplicaciones repetidas a intervalos apropiados.

Este estudio pretendía investigar la eficacia de la aplicación de la composición PGL-GET para la prevención del oídio en vides.

40 Tres bloques adyacentes, cada uno de ellos cubriendo 0,1 ha, fueron identificados en el emplazamiento 18 en el viñedo Kir-Yianni. El 19 de julio de 2004 se roció uno de los tres bloques con la formulación de PGL-GET líquida en una dosis de 2 ml/l y se dejó otro bloque sin tratar. Se roció el bloque restante con el tratamiento convencional de Equesion (2,5 g/l), Alliete (0,9 g/l) y Punch (0,075 ml/l) (véase la Figura 22). Durante la semana siguiente se controlaron las vides de cada bloque en busca de signos de oídio.

45 Otros tres bloques adyacentes, cada uno de ellos cubriendo 0,1 ha, fueron identificados en el emplazamiento 20 en el viñedo Kir-Yianni. El 20 de julio de 2004 se roció uno de los tres bloques con la formulación de PGL-GET líquida en una dosis de 2 ml/l y se dejaron sin tratar los dos bloques restantes (véase la Figura 22). Durante la semana siguiente se controlaron las vides de cada bloque en busca de signos de oídio.

En ambos emplazamientos, los bloques habían sido tratados previamente con múltiples productos, incluida una aplicación previa de producto de terpeno.

50 Todos los tratamientos con terpeno fueron aplicados a razón de 1200 l/ha para garantizar la cobertura completa.

Se registraron las siguientes fases de crecimiento de las uvas:

- desborre de la yema, 26 de marzo de 2004

- floración, 1 de junio de 2004
- principio de la maduración, 6 de agosto de 2004

Las aplicaciones del estudio tuvieron lugar antes del principio de la maduración.

5 La campaña de 2004 fue excepcionalmente tardía y sumamente húmeda. La presión de la enfermedad mildiu algodonoso fue extremadamente alta, los niveles de Botrytis fueron elevados y la incidencia de oídio fue moderada.

Detalles de los productos comparadores

No se utilizó ningún producto comparador en el emplazamiento 20. El tratamiento comparador utilizado en el emplazamiento 18 se detalla a continuación.

Punch® (flusilazole 40%), DuPont.

10 El 19 de julio de 2004 se aplicó Punch en una dosis de 0,075 ml/l como tratamiento preventivo del oídio, conforme a las instrucciones del fabricante.

Detalles de los productos adicionales

No se utilizaron productos adicionales en el emplazamiento 20. Los productos adicionales utilizados en el emplazamiento 18 se detallan a continuación.

15 Sistema Equesion (famoxadone 22,5 % y cymoxanil 30 %) Alliete (fosetyl-al 80 %)

El 19 de julio de 2004 se aplicaron Equesion (2,5 g/l) y Alliete (0,9 g/l) como tratamientos preventivos del mildiu algodonoso. Se determinó la dosis conforme a las instrucciones del fabricante.

El producto comparador y los productos adicionales representan tratamientos convencionales en el programa de gestión de plagas integrado.

20 Se examinaron visualmente las vides en busca de síntomas de oídio.

Resultados:

Emplazamiento 18

25 Aproximadamente el 20 % de los pedúnculos y tallos en el bloque de control eran negros, indicando una infección moderada por oídio. Tanto en el bloque con tratamiento convencional como en el bloque tratado con terpeno, todos los tallos y racimos eran verdes, indicando que se había proporcionado una protección adecuada.

Emplazamiento 20

En ninguno de los bloques se observaron evidencias de infección por oídio.

Observaciones adicionales

30 Al final de la temporada de cultivo, los bloques de los emplazamientos 18 y 20 presentaban en general menos estrés debido a enfermedad que el resto del viñedo.

35 Las infecciones por oídio causan pérdidas considerables a los cultivadores debido a la disminución del crecimiento de la vid, de la calidad de la fruta y de la resistencia invernal de las vides. Además, la calidad del vino puede verse afectada por un nivel de infección de tan solo el 3 % de las bayas. La gestión de la enfermedad se enfoca a la prevención, puesto que una vez establecida, la infección puede propagarse rápidamente. En este estudio, la aplicación del producto de terpeno PGL-GET en el emplazamiento 18 previno eficazmente la infección por oídio, y el nivel de control demostrado por el producto de terpeno fue comparable al proporcionado por el tratamiento convencional. Sin embargo, los resultados del emplazamiento 20 son inconcluyentes, debido a la ausencia de infección por oídio. Es probable que esta ausencia de infección se deba a la aplicación extensiva de pesticidas antes del estudio, lo cual resultó en una baja presión de la enfermedad.

40 El menor nivel de estrés debido a la enfermedad en los emplazamientos 18 y 20 sugiere que el tratamiento previo con terpeno aplicado en estos emplazamientos podría haber sido beneficioso para el control de la infección a largo plazo.

Conclusiones:

45 PGL-GET previno eficazmente la infección por oídio, con un nivel de control comparable al proporcionado por el tratamiento convencional.

Ejemplo 18 - Ensayos de campo adicionales de composición de terpeno encapsulada sobre oídio

El estudio pretendía investigar más a fondo la eficacia de PGL-GET para el tratamiento del oídio en uvas de mesa Crimson Seedless.

50 Durante la aplicación de cisteína el 1 de julio de 2004, inadvertidamente se dejó sin tratar una parcela de 0,1 ha en el viñedo Tsigaras (aproximadamente 80 km al sur del viñedo Kir-Yianni). Posteriormente, las vides de esta parcela

presentaron síntomas severos de oídio en las hojas, los tallos y las uvas. El 12 de julio de 2004, la parcela no tratada se roció con 3 ml/l de formulación PGL-GET líquida a razón de 1200 l/ha, y se roció el resto del viñedo con el producto comparador Rogana. Al cabo de 24 horas se examinaron las vides para evaluar los síntomas de oídio.

Las vides estaban emparradas en un sistema en forma de lira alta.

5 **Detalles del producto comparador**

Rogana (fenbuconazol 5%, binocap 16%), fabricado por BASF (BASF Agro Hellas SA, Atenas, Grecia)

El 12 de julio de 2004, se aplicó Rogana al viñedo Tsigaras como tratamiento del oídio. Se determinó la dosis conforme a las instrucciones del fabricante.

Se examinaron visualmente las vides en busca de síntomas de oídio.

10 **Resultados**

Antes de la aplicación de PGL-GET eran visibles síntomas severos de oídio. Tan solo 24 horas tras la aplicación de PGL-GET, la floración blanca del oídio se volvió negra, indicando una actividad antifúngica efectiva. Dado que en ese punto se había detenido efectivamente la enfermedad, no se aplicaron tratamientos adicionales. PGL-GET demostró una eficacia comparable a la del tratamiento convencional.

15 **Debate:**

En este estudio, una infección por oídio establecida se trató de forma rápida y efectiva utilizando PGL-GET.

Tan solo 24 horas tras la aplicación, la infección por oídio previamente severa fue detenida mediante la aplicación del producto de terpeno, con una eficacia comparable a la del tratamiento convencional.

Los datos preliminares obtenidos de este estudio sugieren que PGL-GET podría ser eficaz para el tratamiento de infecciones fúngicas establecidas, además de demostrar capacidad preventiva.

Ejemplo 19 - Ensayos de campo adicionales de composición de terpeno encapsulada sobre oídio

Antecedentes y fundamentos

En el ensayo actual, se investigó el uso de PGL-GET como parte de un programa experimental de un viñedo de Tasmania (Frogmore Creek Vineyard, Hathaway Trading Pty Ltd, Box 187, Richmond TAS 7025, Australia) para controlar el oídio utilizando productos orgánicos. El propósito de este estudio era investigar la eficacia a corto plazo de la aplicación de PGL-GET en el control orgánico del oídio en vides de Chardonnay.

En este ensayo, las vides (variedad Chardonnay) fueron tratadas con el producto de terpeno PGL-GET o se dejaron sin tratar (control) el 7 de febrero de 2005. Pese a que había sido contenida mediante tratamientos orgánicos previos, la severidad del oídio antes del ensayo se situaba en un nivel considerado inaceptable comercialmente y fue equivalente en las 6 parcelas con tratamiento activo y las 6 parcelas de control. La fase de cultivo era aproximadamente E-L 33-34 (antes del inicio de la maduración).

Se roció PGL-GET (4 ml/l (formulación líquida) sobre 6 parcelas de Chardonnay que habían sido tratadas previamente con leche. Seis parcelas de Chardonnay sirvieron como controles no tratados, pero habían sido tratadas previamente con aceite/lactosuero. Cada parcela contenía generalmente 7 vides.

Los detalles de la composición del PGL-GET utilizado en este protocolo se proporcionan en la Tabla 20.

Tabla 20 - Formulación del lote utilizado en el presente estudio

| Detalles de la mezcla de materias primas | Peso en libras | % en peso |
|---|-----------------------|------------------|
| Geraniol | 323,52 | 6,88 |
| Eugenol | 161,76 | 3,44 |
| Timol | 323,52 | 6,88 |
| Partículas de levadura | 722,13 | 15,35 |
| Xantana | 3,17 | 0,07 |
| Polisorbato | 3,17 | 0,07 |
| Agua | 3166,62 | 67,32 |
| TOTAL | 4703,89 | 100,00 |

La severidad del oídio se evaluó 3 días antes del tratamiento con terpeno y de nuevo 3 días después del tratamiento. En cada parcela se seleccionaron al azar 20 racimos de uvas (10 racimos por lado del panel) y se estimó la severidad de la enfermedad como el área porcentual de los racimos cubierta por colonias de oídio activas.

No fue posible ninguna evaluación adicional, puesto que posteriormente el cultivador roció toda el área con azufre y un adyuvante de pulverización basado en aceite vegetal (Synertrol Horti Oil).

Número/área de plantas a tratar

5 Producto ensayado: PGL-GET (4 ml/l a aplicar en 6 parcelas de Chardonnay (total de aproximadamente 42 vides), que habían sido tratadas previamente con leche.

Control: No se aplicó ningún tratamiento a 6 parcelas de Chardonnay (total de aproximadamente 42 vides) a fin de utilizarlas como controles, pero habían sido tratadas previamente con aceite/lactosuero.

Métodos de cultivo

10 *Vides de Vitis vinifera* (Chardonnay) en el Bloque B2: posicionamiento vertical de los brotes con sarmientos arqueados.

Disposición de cultivo

Espaciamiento: Distancia de 2,5 m entre hileras y de 1,25 m entre vides (dentro de la hilera), con 3200 vides por hectárea. La orientación de las hileras era de norte a sur.

Densidad foliar

15 Se utilizó el método de point-quadrat para caracterizar la densidad del follaje de las vides de Chardonnay con anterioridad al ensayo (Tabla 21). Las mediciones se realizaron el 13 de enero de 2005, seleccionando secciones representativas del follaje dentro de las parcelas de Chardonnay que habían sido tratadas previamente con azufre o bien se habían dejado sin tratar. Se realizaron diez mediciones de cada tratamiento previo en cada una de las 6 parcelas (esto es, un total de 60 mediciones para las parcelas tratadas con azufre y 60 mediciones para las parcelas de control no tratadas). Además se midieron la longitud y el número de los nudos en 3 brotes verticales (por parcela).

Tabla 21 - Densidad foliar de las vides de Chardonnay con anterioridad al ensayo

| Tratamiento previo | Claros (%) | Número de capas de hojas (NCH) | Hojas interiores (%) | Racimos interiores (%) | Número promedio de nudos | Longitud promedio de los brotes (cm) |
|--------------------|------------|--------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| No tratado | 12 | 1,5 | 22 | 26 | 21 | 110 |
| Azufre | 5 | 2,0 | 27 | 40 | 21 | 104 |
| Valores óptimos | 20-40 % | ≤1,0-1,5 | <10 % | <40 % | NA | NA |
| NA, no aplicable. | | | | | | |

Estado general

25 El tratamiento previo de estas parcelas con materiales experimentales inhibió el oídio en comparación con el control no tratado. Sin embargo, el nivel de oídio se consideraba comercialmente inaceptable, pese a que era equivalente tanto en las parcelas tratadas con leche como en las tratadas con aceite/lactosuero.

Método de aplicación, dosis y régimen

30 Tratamiento con PGL-GET (se aplicaron 4 ml/l el 7 de febrero de 2005 con una pistola conectada a una devanadora y una bomba montada en la plataforma de un vehículo de servicio. Se impulsó el chorro de fumigación con una presión de bomba de 1500-1600 kPa (200-230 psi), que proporcionó un caudal aproximado de 63 ml/segundo. Se utilizó el volumen de fumigación estándar para tratamientos convencionales (aproximadamente 900 l/ha).

35 La severidad del oídio, estimada como la superficie (%) de los racimos cubierta por colonias de oídio activas, fue evaluada para 20 racimos seleccionados al azar dentro de cada parcela (10 racimos por lado del panel). La severidad de la enfermedad se evaluó el 4 de febrero de 2005, 3 días antes de la aplicación del tratamiento con PGL-GET, y de nuevo el 10 de febrero de 2005, 3 días después de la aplicación del terpeno.

Se transformaron los datos utilizando la transformación arcoseno para obtener separaciones promedio.

Resultados

40 Antes del tratamiento, la severidad promedio del oídio en racimos de uvas Chardonnay en las 6 parcelas a tratar con terpeno (20,4 %) era similar a la observada en las 6 parcelas de control (23,2 %; Tabla 22). El análisis estadístico basado en la transformación arcoseno de estos datos reveló que no existían diferencias significativas en cuanto a la severidad de la enfermedad antes del tratamiento 15 (Tabla 23).

Sin embargo, tres días después del tratamiento, la severidad promedio del oídio era del 23,8 % en los racimos tratados con PGL-GET frente al 37,8 % en los controles (Tabla 22). La transformación arcoseno de estos datos reveló una diferencia estadísticamente significativa en favor de los racimos de uvas tratados con terpeno, los cuales presentaban una menor superficie cubierta por colonias de oídio activas ($p = 0,058$; Tabla 23).

5 **Tabla 22** - Severidad promedio del oídio (%) en racimos de Chardonnay antes y después del tratamiento con PGL-GET

| Tratamiento aplicado el 7 de febrero de 2005 | Severidad promedio | |
|--|-------------------------|--------------------------|
| | El 4 de febrero de 2005 | El 10 de febrero de 2005 |
| PGL-GET | 20,4 | 23,8 |
| Ninguno | 23,2 | 37,8 |

Tabla 23 - Separación estadística de los tratamientos tras la transformación arcoseno de los datos

| Tratamiento aplicado el 7 de febrero de 2005 | Severidad promedio (SEM) | |
|--|---|---|
| | El 4 de febrero de 2005 | El 10 de febrero de 2005 |
| PGL-GET | 0,2063 (0,03857) | 0,2411 (0,04303) |
| Ninguno | 0,2401 (0,08534) | 0,3954 (0,07852) |
| | $t = 0,36$ $df = 10$ $p = 0,726$ Prueba bilateral: diferencia no significativa | $t = 1,72$ $df = 10$ $P = 0,058$ Prueba unilateral: no tratado > tratado |

10 **Debate:**

La infección de vides por oídio puede provocar pérdidas considerables a los cultivadores debido a sus efectos perjudiciales sobre el crecimiento y la resistencia de las vides, así como sobre la calidad de la fruta y del vino. En viñedos gestionados orgánicamente, los cultivadores están buscando alternativas a los tratamientos tales como el azufre elemental.

15 Este estudio investigó la eficacia de las formulaciones de terpeno encapsuladas (4 ml/l como formulación líquida en el control del oídio en un viñedo orgánico en Tasmania, Australia. Si bien se habían utilizado otros tratamientos experimentales tan solo 3 semanas antes de la aplicación del terpeno, el nivel de infección por oídio continuaba considerándose comercialmente inaceptable. Tres días después del tratamiento de las vides de Chardonnay con PGL-GET, la severidad del oídio en las uvas tratadas era significativamente menor que en los controles no tratados.

20 Si bien la severidad de la infección en los controles no tratados empeoró durante los 6 días entre las evaluaciones pretratamiento y postratamiento, permaneció constante en las vides tratadas. Por consiguiente, el PGL-GET pareció haber ralentizado el ritmo de propagación de la enfermedad en los racimos que presentaban colonias establecidas de oídio esporulante antes del tratamiento. Presumiblemente se inhibió la expansión de las colonias, si bien las colonias existentes continuaron esporulando hasta cierto punto. No fue posible una evaluación a más largo plazo de la eficacia, dado que el cultivador fumigó posteriormente con azufre toda el área del ensayo.

25 Estos resultados prometedores demuestran la eficacia del PGL-GET en el control del oídio en vides.

Ejemplo 20 - Ensayos de campo de composición de terpeno encapsulada sobre Botrytis

30 La podredumbre de Botrytis en uvas es causada por el *Botrytis cinerea*, un hongo común que puede provocar graves pérdidas en el rendimiento de la cosecha. Las bayas son el foco predominante de la infección, si bien la enfermedad también puede afectar a las flores y las hojas. Inicialmente, las bayas infectadas aparecen blandas y acuosas, y podrían quedar cubiertas por proliferación fúngica gris en condiciones de humedad elevada. Con el paso del tiempo, las bayas infectadas se resecan y caen. La podredumbre de Botrytis prefiere condiciones húmedas con escasa circulación de aire, y las bayas abiertas o dañadas son especialmente vulnerables a la propagación de la infección. Las estrategias de gestión de la podredumbre de Botrytis incluyen el favorecimiento de una buena circulación de

35 aire, la prevención de lesiones y la aplicación de fungicidas en los momentos adecuados durante la temporada de cultivo. El propósito de este estudio era investigar la eficacia de PGL-GET en el tratamiento de la infección por botrytis en uvas.

La aparición de botrytis en el viñedo Kir-Yianni a mediados de octubre de 2004 (3 semanas después de una aplicación de Teldor® no podía tratarse con productos agroquímicos convencionales debido a que las restricciones asociadas en cuanto al tiempo de reentrada impedirían la vendimia planificada. Por consiguiente, se identificaron dos parcelas adyacentes de 0,1 ha en el emplazamiento 7 del viñedo y, el 12 de octubre de 2004 se trató una de estas parcelas con 4 ml/l de formulación líquida de PGL-GET, mientras que se dejó sin tratar la otra parcela (véase la Figura 23). Se recogió la cosecha 3 días después, y se determinó la proporción de bayas infectadas para cada parcela (porcentaje en peso del total de la cosecha). A continuación se mezclaron en el tanque de fermentación las bayas no infectadas de las parcelas tanto tratada como no tratada.

El emplazamiento 7 había sido tratado con múltiples productos antes de la aplicación de la formulación de terpeno, pero continuaba presentando infección por botrytis.

Se administró a las vides una única aplicación de 4 ml/l de formulación líquida de PGL-GET a razón de 1200 l/ha.

Se registraron las siguientes fases de crecimiento de las uvas:

- desborre de la yema, 26 de marzo de 2004
- floración, 1 de junio de 2004
- principio de la maduración, 6 de agosto de 2004
- vendimia, 15 de octubre de 2004

Las aplicaciones del estudio tuvieron lugar 3 días antes de la vendimia.

La campaña de 2004 fue excepcionalmente tardía y sumamente húmeda. La presión de enfermedad por mildiu algodonoso era extremadamente elevada, la presión por oídio era moderada y los niveles de botrytis eran elevados. Se aplicó PGL-GET en ese momento para evaluar su eficacia potencial contra una infección por botrytis que no podría haberse tratado de otra manera debido a las restricciones de tiempo de pesticida antes de la vendimia.

La evaluación visual del emplazamiento antes de la aplicación del producto de terpeno reveló evidencias de infección por botrytis. Después de la vendimia, se expusieron las bayas sobre una cinta transportadora y las bayas infectadas se separaron manualmente de las bayas no infectadas antes del prensado. La proporción de bayas infectadas se calculó como porcentaje del rendimiento total (en peso) para cada parcela.

Resultados

La evaluación visual del emplazamiento antes de la aplicación de PGL-GET reveló evidencias de infección por botrytis. Después de la vendimia (3 días después de la aplicación de PGL-GET), las proporciones de bayas infectadas fueron del 13 % y del 23 % en las parcelas tratadas y no tratadas, respectivamente. Las áreas ensayadas no fueron suficientes para evaluar la significación estadística; sin embargo, el tratamiento con PGL-GET frenó claramente el avance de la enfermedad.

La fermentación no se vio afectada por la mezcla de bayas no infectadas procedentes de las parcelas no tratadas y tratadas con terpeno.

Debate

Los tratamientos convencionales de la botrytis deben detenerse 3 semanas antes de la vendimia, dejando tiempo para que se produzcan daños considerables para la producción y la calidad de la cosecha. El desarrollo de un tratamiento que podría utilizarse hasta el momento de la vendimia, o que podría continuarse hasta un momento más cercano a la vendimia que los tratamientos existentes, podría resultar en mejoras significativas en el rendimiento de la cosecha y en la calidad del vino, y constituirían un beneficio considerable para los cultivadores. En este estudio, el tratamiento con el producto de terpeno PGL-GET frenó visiblemente el avance de una infección por botrytis establecida tan solo 3 días antes de la vendimia, resultando en una menor proporción de bayas infectadas en la parcela tratada con terpeno que en la parcela no tratada. Además, pese al uso de PGL-GET próximo a la vendimia, la fermentación no se vio afectada por la combinación de uvas tratadas y no tratadas.

Estos resultados sugieren que PGL-GET es eficaz en la reducción del impacto de infecciones por botrytis establecidas y puede utilizarse hasta poco antes de la vendimia sin efectos perjudiciales sobre la posterior fermentación.

Ejemplo 21 - Evaluación de terpenos encapsulados para el tratamiento de mildiu algodonoso establecido y posterior evaluación de la calidad de la uva

Se realizó un ensayo de PGL-GET el 25/08/04, mediante la aplicación de la composición a razón de 1000 g por cada 250 litros.

Se fumigó un viñedo de Cabernet Sauvignon que estaba infectado al 100 % y sufría una pérdida sustancial de hojas debido a mildiu algodonoso. Todas las hojas que quedaban estaban infectadas por manchas de mildiu algodonoso, tal como ponía de manifiesto la mancha amarilla en la parte superior de la hoja y la proliferación vellosa en la parte

inferior de la hoja: el síntoma clásico del mildiu algodonoso. Muchas de las hojas estaban casi completamente amarillas, indicando una infección sustancial. Esta pérdida de hojas y la infección en general retrasa la maduración de las uvas y, en muchos casos, las uvas nunca llegan a madurar por completo para fines vinícolas.

5 La observación de racimos totalmente inmaduros (esto es, bayas duras de color verde oscuro con un diámetro de 1 cm y forma oval) ocasionalmente en las vides indicaba que las vides ya estaban probablemente infectadas antes del inicio de la maduración, y probablemente en el momento de la floración o incluso antes. No se había realizado ninguna aplicación precoz de cobre (Burdeos o sulfato de cobre básico). Este viñedo estaba fuertemente infectado en la anterior vendimia, hasta el punto de que no se obtuvo cosecha de Cabernet Sauvignon. La pérdida de hojas el año anterior fue del 100 % pese al tratamiento con bicarbonato de potasio en un intento de matar por contacto el mildiu algodonoso, seguido de la aplicación de Stilbourin para la protección sistémica a más largo plazo.

10 El 19/09/04 se recolectaron y prensaron las uvas tratadas en este ensayo, y se realizaron las siguientes observaciones sobre el mosto (Tabla 24):

Tabla 24

| | Control | Tratado | Deseable |
|------|----------------|----------------|-----------------|
| pH | 3,28 | 3,30 | 3.3-3.5 |
| TA | 0,92 | 0,85 | 0,7-0,75 |
| Brix | 17,4 | 18,7 | 20-22 |

15 Estos resultados indican que las uvas procedentes de las vides tratadas están más maduras que las de las vides no tratadas. La observación de las uvas propiamente dichas reveló que las uvas no tratadas presentaban en promedio un color más pálido, algunas con una coloración rosácea/púrpura/verde transparente, indicativa de que las uvas apenas habían superado el inicio de la maduración, mientras que las uvas tratadas presentaban en promedio un color púrpura oscuro y eran opacas, rasgos típicos de las uvas completa o casi completamente maduras.

20 La cata de estas uvas reveló que las uvas tratadas tenían un sabor más pleno y afrutado, típico del Cabernet Sauvignon maduro, mientras que las uvas no tratadas carecían del sabor pleno y afrutado. Las uvas no tratadas tenían un sabor ácido de manzana verde, probablemente indicativo de una elevada proporción de ácido málico/tartárico inadecuada para la producción de un buen vino.

25 Estas uvas fueron prensadas y despalilladas como preparación para la producción de vino a partir de estas uvas, a fin de demostrar la diferencia entre las uvas y la aptitud de las uvas tratadas para la producción de vino. Al cultivador de las uvas le preocupaba que este tratamiento pudiera afectar al sabor del vino, pese a que a sugerencia mía probó uvas tratadas el día después de la aplicación de PGL-GET y no notó ningún sabor o aroma persistente.

30 La diferencia entre las uvas tratadas y las no tratadas se demuestra también en el color del mosto. El zumo de las uvas no tratadas presentaba un color verdoso pálido/incolore (parecido a un mosto de vino blanco), mientras que el mosto de las uvas tratadas poseía el color rosáceo característico de las uvas Cabernet Sauvignon maduras inmediatamente después del prensado.

Estos resultados indican que el PGL-GET es eficaz en el tratamiento de viñedos al final del verano, ya que mata y detiene la reinfección por mildiu algodonoso, por lo menos a corto plazo.

35 Sería conveniente una investigación ulterior de la eficacia a largo plazo de PGL-GET en el control del mildiu algodonoso, pero los resultados presentados demuestran que el PGL-GET es un tratamiento útil.

El mildiu algodonoso tardío puede arruinar completamente una cosecha, y actualmente no existen tratamientos efectivos que puedan aplicarse hasta poco antes de la vendimia y que mantengan su capacidad de proporcionar protección. La gran ventaja del PGL-GET es la capacidad de proporcionar una destrucción rápida y mantener esta eficacia durante un periodo más largo que otros fungicidas de contacto.

40 Existen en este mercado diversos antifúngicos que han acreditado su eficacia contra el mildiu algodonoso, pero todos ellos requieren que transcurra cierto tiempo después de su aplicación antes de que pueda recogerse la cosecha. Algunos tratamientos (como los productos que contienen azufre) no pueden utilizarse si la temperatura asciende por encima de 85 °F. La fitotoxicidad de los fungicidas que contienen cobre también es significativa, dependiendo de la variedad de uva. Los fungicidas de contacto no tienen un efecto a largo plazo, y por consiguiente a menudo es necesaria una segunda aplicación de un fungicida con una actividad más prolongada, pero esto podría estar restringido por la legislación pertinente (p. ej. PHI o REI).

45 Muchos tratamientos convencionales del mildiu algodonoso tienen una reentrada restringida (REI y/o PHI), lo cual significa que el cultivador no puede aplicar el tratamiento por temor a aplicar productos como Mancozeb, que tiene un PHI de 66 días, en cuyo caso el cultivador no podría recolectar sus uvas en su punto de maduración óptimo.

El mildiu algodonoso está implicado como la causa primaria de los numerosos vinos de escasa calidad que se están produciendo al este del Mississippi. El PGL-GET podría permitir a las uvas afectadas madurar correctamente y ser recolectadas en su punto de maduración óptimo en este sector en rápida expansión.

5 El PGL-GET ofrece la ventaja de que debería ser aprobado por los diversos comités "orgánicos" (muchos de ellos autoproclamados), declarando este producto apto para el uso en uvas cultivadas conforme a directrices "orgánicas". Esto abre otro nicho en un segmento de mercado en rápido crecimiento en los Estados Unidos y en todo el mundo.

Ejemplo 22 - Evaluación in vitro de las propiedades fungicidas de los terpenos encapsulados y no encapsulados

10 Se llevaron a cabo otras pruebas para evaluar las 31 preparaciones de terpeno no encapsuladas descritas en el Ejemplo 15 y las preparaciones 16 y 22 encapsuladas en partículas de glucano.

15 Para llevar a cabo estos ensayos, se introdujeron 20 000 esporas en caldo de dextrosa de patata en proporción 1/3 (CDP) y se añadieron las cantidades suficientes de las formulaciones de terpenos seleccionadas para alcanzar concentraciones de entre 10 y 1000 ppm. Estos materiales de ensayo se introdujeron en tubos de Eppendorf con esporas de *Botrytis cinerea* (B.c.) separados y cerrados de forma estéril, se incubaron durante 24 horas, a continuación se recuperaron las esporas mediante centrifugación y se descartaron las soluciones de terpeno. Las esporas/biomasa se enjuagaron con agua estéril, se centrifugaron de nuevo y a continuación se introdujeron de nuevo en 300 µl de CPD en proporción 1/3 y se transfirieron a placas de 96 pocillos. Se midió a lo largo del tiempo la densidad óptica de las esporas supervivientes creciendo para formar micelios. La actividad fungicida se define como la destrucción total de 20 000 esporas al cabo de 24 horas de exposición al terpeno, tal como se pone de manifiesto por la ausencia de crecimiento micelial.

20 Los resultados sugieren que ciertas formulaciones no fueron fungicidas a un nivel estadísticamente significativo en las condiciones de ensayo actuales (resultados no mostrados). Dichas formulaciones fueron:

1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30. Véase el Ejemplo 15 (Tabla 17) para detalles sobre las composiciones.

25 La concentración inhibitoria mínima para los compuestos más efectivos se indica en la Tabla 26.

Tabla 25

| Material | Concentración inhibitoria mínima (ppm) | Material | Concentración inhibitoria mínima (ppm) |
|----------|--|----------|--|
| 3 | <1000; >750 | 7 | <1000; >750 |
| 10 | <1000; >500* | 13 | <1000; >750 |
| 16 | <1000; >750 | 22 | <750; >500 |
| 26 | <1000; >750 | 31 | <1000; >750 |

En diferentes ensayos, la concentración más baja que no arrojó crecimiento fue de 500 o de 750 ppm.

Ensayo comparativo de compuestos en agua y encapsulados en partículas de glucano huecas.

30 Se prepararon muestras de las formulaciones 16 (geraniol, eugenol y timol) y 22 (eugenol, timol y citral) encapsuladas en partículas de glucano huecas, conforme a las técnicas anteriormente descritas. A continuación se evaluaron las propiedades fungicidas de las formulaciones encapsuladas y no encapsuladas, aplicando el protocolo anteriormente descrito para las formulaciones no encapsuladas.

Los resultados fueron muy diferentes con las formulaciones de terpeno encapsuladas en comparación con los terpenos suspendidos en agua, tal como se muestra en la figura 24.

35 La concentración efectiva mínima se muestra más abajo en la Tabla 26.

Tabla 26

| Material | CIM en suspensión | CIM en partículas de levadura |
|----------|-------------------|-------------------------------|
| 16 | <1000, >750 | <100, >250 |
| 22 | <750, >500 | <500, >250 |

40 Por consiguiente, los resultados obtenidos con los materiales 16 y 22 son muy diferentes dependiendo de si se encuentran en suspensión acuosa o se ensayan encapsulados en partículas de glucano. (Nota: como se menciona más adelante, se observó cierta variabilidad en los resultados con los terpenos suspendidos en agua, y el

experimento anteriormente descrito constituye un ejemplo de ello). Los valores **CIM** son promedios de varios ensayos. Es importante señalar que los resultados con formulaciones de terpeno encapsuladas no sufren los problemas de variabilidad asociados a las suspensiones acuosas de terpeno. Se han realizado cinco ensayos separados de terpenos suspendidos en agua y tres con las partículas de levadura.

- 5 Las formulaciones de terpeno encapsuladas están listas para mezclar con agua, y proporcionan una liberación lenta de la formulación de terpeno al medio acuoso. Esto resulta en un tiempo de exposición más largo de las esporas a los terpenos.

Surgieron problemas al controlar las formulaciones de terpeno no encapsuladas en suspensión en los medios de ensayo, lo cual podría haber afectado a los resultados a este respecto.

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una partícula de glucano hueca o una partícula de pared celular hueca que encapsula un componente de terpeno, donde la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca tiene un contenido en lípidos del 5 % en peso o superior.
2. Una composición según la reivindicación 1, donde la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca es una pared celular fúngica.
3. Una composición según la reivindicación 2, donde la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca es una pared celular de levadura.
4. Una composición según la reivindicación 3, donde la pared celular de levadura procede de una célula de levadura de panadería.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca es un producto residual insoluble de un proceso de producción de extracto de levadura.
6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca ha sido extraída con álcali.
7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca ha sido extraída con ácido.
8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el contenido en lípidos es del 10 % en peso o superior.
9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el componente de terpeno comprende uno o varios de los terpenos seleccionados de entre el grupo consistente en citral, pineno, nerol, b-ionona, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona (por ejemplo L-carvona), terpeniol, anetol, alcanfor, mentol, timol, limoneno, nerolidol, farnesol, fitol, caroteno (vitamina A₁), escualeno, tocotrienol, perillil-alcohol, borneol, mirceno, simeno, careno, terpeneno y linalool o sus mezclas.
10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el componente de terpeno comprende un terpeno con la estructura general C₁₀H₁₆.
11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el componente de terpeno comprende uno o varios de los terpenos seleccionados de entre el grupo consistente en geraniol, timol, citral, carvona (por ejemplo L-carvona), eugenol, b-ionona o sus mezclas.
12. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el componente de terpeno comprende una mezcla de geraniol, timol y eugenol.
13. Una composición según la reivindicación 11, donde el componente de terpeno comprende 100 % timol.
14. Una composición según la reivindicación 11, donde el componente de terpeno comprende 50 % geraniol y 50 % timol p/p.
15. Una composición según la reivindicación 11, donde el componente de terpeno comprende 50 % eugenol y 50 % timol p/p.
16. Una composición según la reivindicación 11, donde el componente de terpeno comprende 33% geraniol, 33 % eugenol y 33% timol p/p.
17. Una composición según la reivindicación 11, donde el componente de terpeno comprende 33% eugenol, 33 % timol y 33 % citral p/p.
18. Una composición según la reivindicación 11, donde el componente de terpeno comprende 25 % geraniol, 25 % eugenol, 25 % timol y 25 % citral p/p.

19. Una composición según la reivindicación 11, donde el componente de terpeno comprende 20% geraniol, 20% eugenol, 20% timol, 20% citral y 20 % L-carvona p/p.
20. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el componente de terpeno está asociado a un surfactante.
- 5 21. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el surfactante se ha seleccionado del grupo consistente en laurilsulfato de sodio, polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 40, polisorbato 60, éster de poliglicerol, monooleato de poliglicerol, monocaprilato de decaglicerol, dicaprilato de propilenglicol, monoestearato de triglicerol, monooleato de sorbitano de polioxietileno, monolaurato de sorbitano, monopalmitato de sorbitano, monoestearato de sorbitano, monooleato de sorbitano, polioxietileno (4)
- 10 lauril éter o una mezcla de dos o más de éstos.
22. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende entre el 1 y el 99 % de terpenos por volumen, entre el 0 y el 99 % de surfactante por volumen y entre el 1 y el 99 % de partículas de glucano huecas o partículas de pared celular huecas.
23. Una composición según la reivindicación 22, que comprende entre el 10 y el 67% de terpenos p/p, entre el 0,1 y el 10% de surfactante p/p y entre el 40 y el 90% de partículas de glucano huecas o partículas de pared celular huecas.
- 15 24. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los terpenos utilizados son de grado alimentario.
25. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un compuesto activo adicional de grado alimentario.
- 20 26. Una composición según la reivindicación 25, donde el compuesto activo adicional de grado alimentario es un agente o enzima antimicrobiano.
27. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un agente antimicrobiano, un agente antifúngico, un agente insecticida, un agente antiinflamatorio o un anestésico.
- 25 28. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un antioxidante.
29. Una composición según la reivindicación 28, donde el antioxidante es aceite de romero, vitamina C o vitamina E.
30. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en forma de polvo seco.
31. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 30, en forma de gránulo, comprimido u otra forma sólida.
- 30 32. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un agente dispersor que favorece la dispersión de la composición al introducirla en un líquido.
33. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en combinación con un vehículo o excipiente aceptable agrícola, alimentaria o farmacéuticamente en forma líquida, sólida o gelatinosa.
- 35 34. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, suspendida o disuelta en un líquido.
35. Una composición según la reivindicación 34, donde el líquido es agua.
36. Una composición según las reivindicaciones 34 o 35, que comprende entre 500 y 10 000 ppm de partículas de glucano huecas o partículas de pared celular huecas, donde las partículas contienen entre un 1 y un 67 % de componente de terpeno.
- 40 37. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones de la 34 a la 36, que comprende entre 1 ppm y 25 ppt del componente de terpeno.
38. Una composición según la reivindicación 37, que comprende entre 100 y 1000 ppm del componente de terpeno.
39. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye un agente humectante, un agente emulsionante o un agente amortiguador de pH.

40. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, dispersada en un alimento líquido o bebida humano o animal.
41. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en una forma adecuada para la administración oral.
- 5 42. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 38, en una forma adecuada para la administración parenteral.
43. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 38, en una forma adecuada para la administración tópica.
44. Un método para la preparación de una partícula de glucano hueca o de una partícula de pared celular hueca
10 encapsulando un componente de terpeno según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 43, comprendiendo dicho método los siguientes pasos:
- a) proveer un componente de terpeno;
- b) proveer una partícula de glucano hueca o una partícula de pared celular hueca;
- c) incubar el componente de terpeno con la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca
15 en condiciones adecuadas para la encapsulación del terpeno; y
- d) recuperar la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca que encapsula el componente de terpeno.
45. Un método según la reivindicación 44, que comprende además el paso de secar la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca que encapsula el componente de terpeno.
- 20 46. Un método según la reivindicación 45, donde dicho secado se consiga mediante liofilización, secado por lecho fluido, secado en tambor o el secado por pulverización.
47. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 44 a la 46, donde en el paso a) el componente de terpeno se provee como suspensión en un disolvente acuoso.
48. Un método según la reivindicación 47, donde el componente de terpeno se provee en asociación con un
25 surfactante.
49. Un método según la reivindicación 48, donde el surfactante es monooleato de sorbitano de polioxietileno en una concentración del 0,1 al 10 % por volumen de la mezcla de reacción total.
50. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 44 a la 49, donde en el paso b) la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca se provee como suspensión en agua o en otro líquido
30 adecuado.
51. Un método según la reivindicación 50, donde la suspensión comprende de 1 a 1000 mg de partículas de glucano huecas o partícula de pared celular huecas por ml.
52. Un método según la reivindicación 50, donde las partículas están dispersas en un volumen de líquido que va desde el volumen hidrodinámico (VH) hasta 1,5 VH.
- 35 53. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 44 a la 49, donde en el paso b) la partícula de glucano hueca o la partícula de pared celular hueca se provee como polvo seco.
54. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 44 a la 53, donde en el paso c) la reacción se desarrolla a presión atmosférica a una temperatura de 20 a 37 °C.
55. Un método no terapéutico de matar un microorganismo, comprendiendo dicho método el paso de;
40 – poner dicho microorganismo en contacto con una composición según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 43.
56. Un método para el tratamiento o la prevención de la infección de una planta, comprendiendo dicho método el paso de;

- administrar a la planta o al suelo en las proximidades de la planta, en una dosis efectiva terapéuticamente, una composición según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 43.
- 57. Un método según la reivindicación 56, donde la infección de la planta es causada por un nematodo.
- 58. Un método según la reivindicación 56, donde la infección de una planta es causada por un hongo.
- 5 59. Un método según la reivindicación 58, donde el hongo es mildiu algodonoso, oídio o podredumbre de *Botrytis*.
- 60. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 56 a la 59, donde la planta es una vid.
- 61. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 56 a la 60, donde la composición se administra 21 días o menos antes de recolectar una cosecha de la planta.
- 62. Un método según la reivindicación 61, donde la composición se administra 14 días o menos antes de la cosecha.
- 10 63. Un método según la reivindicación 62, donde la composición se administra 7 días o menos antes de la cosecha.
- 64. Un método según la reivindicación 63, donde la composición se administra 3 días o menos antes de la cosecha.
- 65. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 56 a la 64, donde la composición se administra mediante pulverización.
- 15 66. Un método según la reivindicación 65, donde la composición se pulveriza a razón de 500 l/ha o superior.
- 67. Un método según la reivindicación 66, donde la composición se pulveriza a razón de 900 l/ha o superior.
- 68. Un método según la reivindicación 67, donde la composición se pulveriza a razón de 1200 l/ha o superior.
- 69. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 54 a la 64, donde la composición se administra mediante irrigación.
- 20 70. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 43, para el uso en la prevención o el tratamiento de una infección en un paciente o una planta.
- 71. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 43 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección en un paciente.
- 72. El uso de la reivindicación 71, donde la infección es causada por *Aspergillus fumigatus*, *Sclerotinia homeocarpa*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum graminicola* o *Penicillium sp.*
- 25

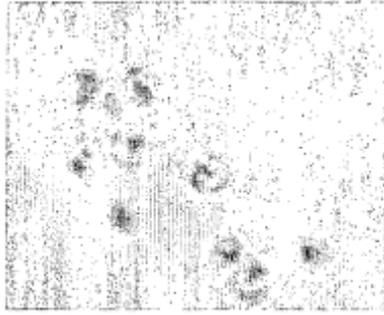


Fig. 1

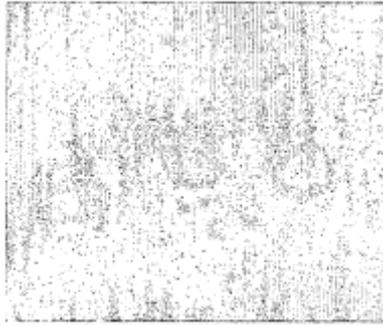


Fig. 2

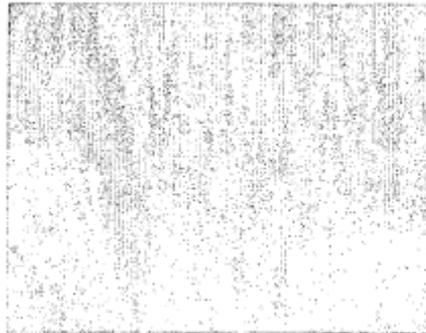


Fig. 3

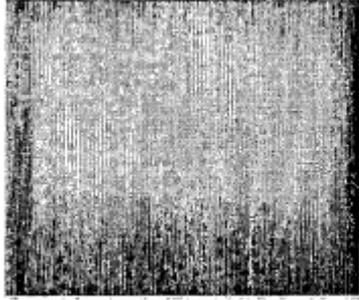


Fig. 4

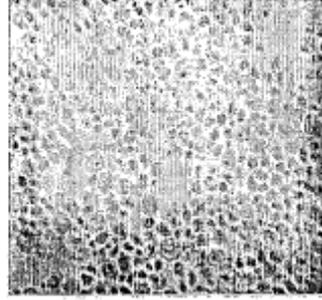


Fig. 5

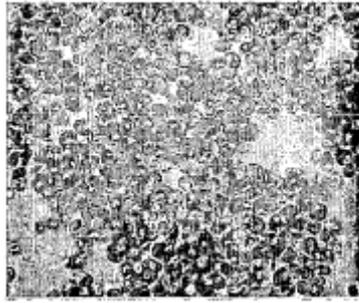


Fig. 6

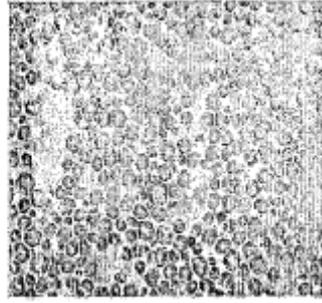


Fig. 7

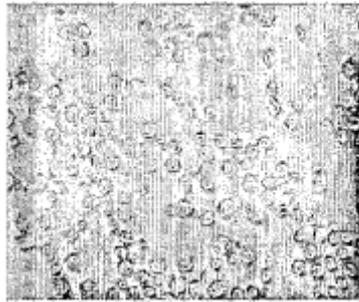


Fig. 8

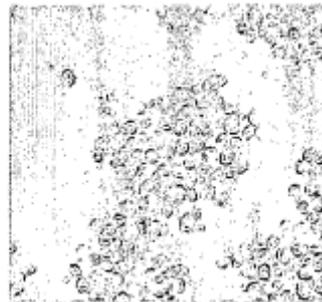


Fig. 9

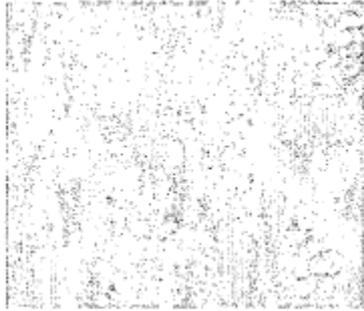


Fig. 10

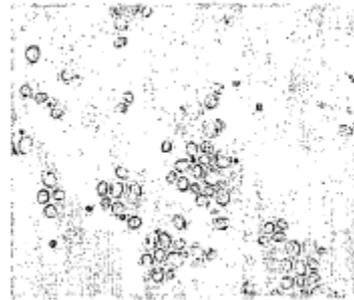


Fig. 11



Fig. 12

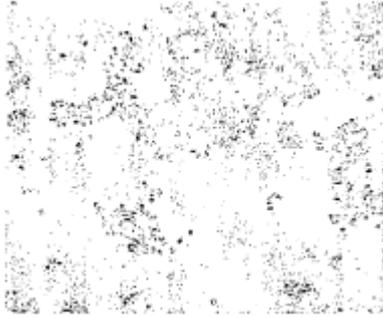


Fig. 13

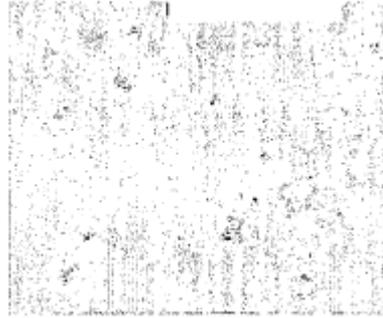


Fig. 14

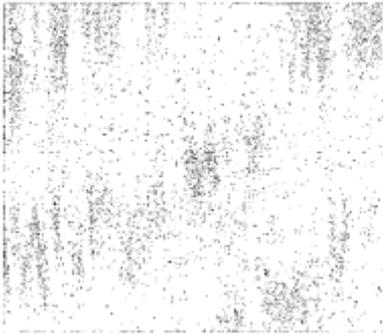


Fig. 15

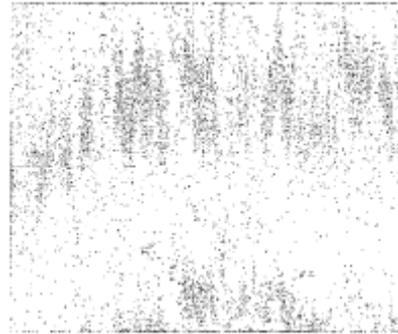


Fig. 16

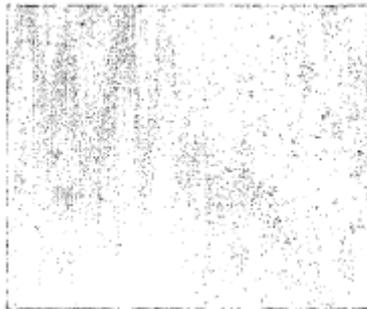


Fig. 17

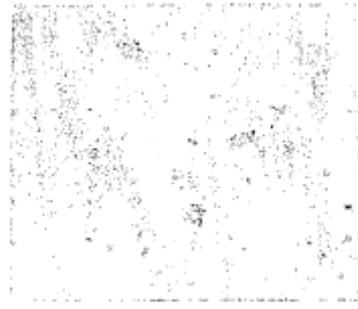


Fig. 18

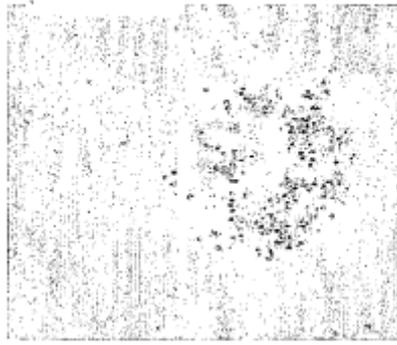


Fig. 19

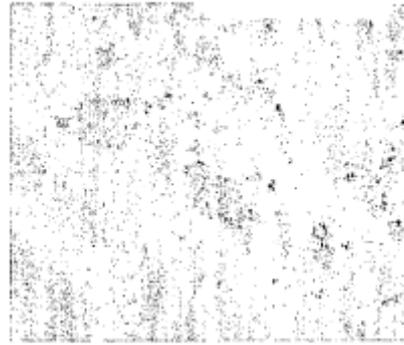


Fig. 20

| emplazamiento 18 |
|-----------------------------------|
| Tratamiento convencional |
| PGL-GET formulación líquida 1 g/l |
| Sin tratamiento |
| PGL-GET formulación líquida 4 g/l |

Fig 21

| emplazamiento 20 |
|--------------------------------------|
| Tratamiento convencional |
| PGL-GET formulación en polvo 0,5 g/l |
| Sin tratamiento |
| PGL-GET formulación en polvo 2 g/l |

| emplazamiento 18 | | emplazamiento 20 |
|------------------------------------|--|-------------------------------------|
| Tratamiento convencional | | Sin tratamiento |
| Sin tratamiento | | PGL-GET formulación en polvo 2 ml/l |
| PGL-GET formulación líquida 2 ml/l | | Sin tratamiento |

Fig 22

| emplazamiento 20 |
|------------------------------------|
| PGL-GET formulación líquida 4 ml/l |
| Sin tratamiento |

Fig 23

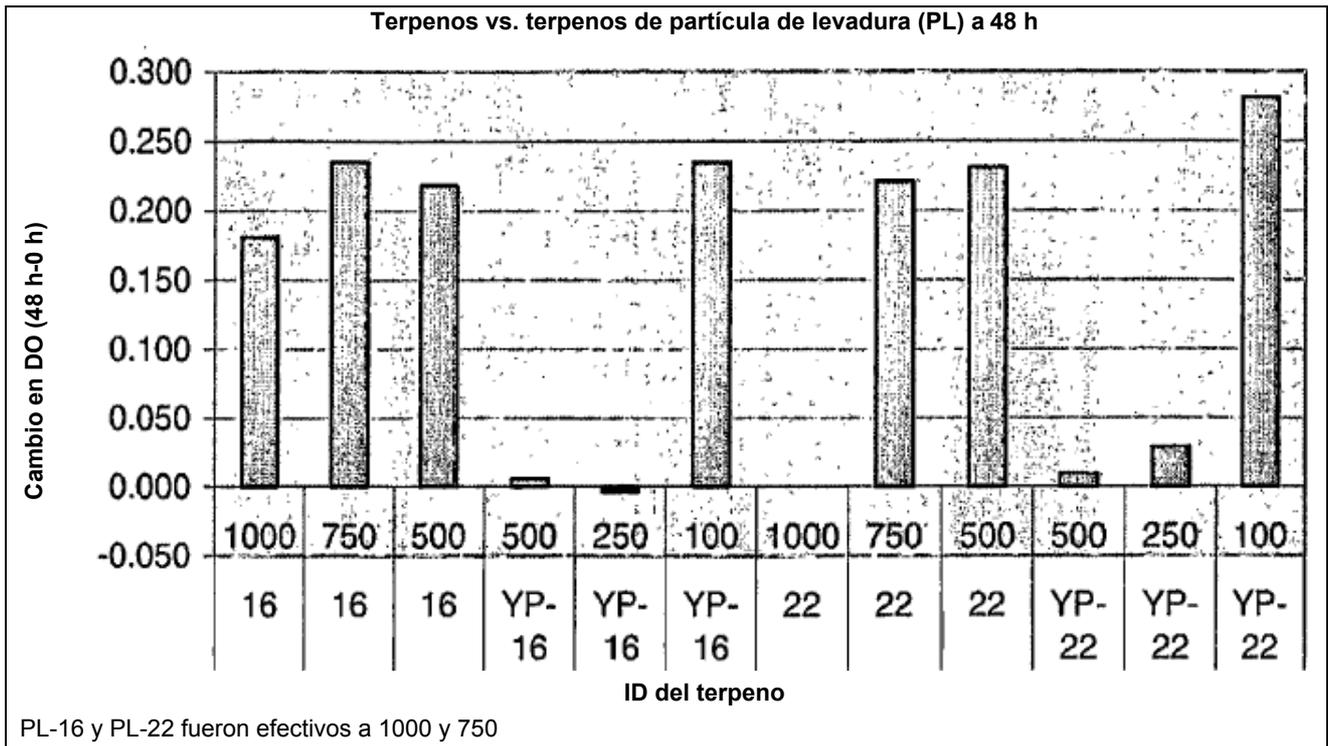


Fig. 24

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se incluye tan solo para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha procurado el máximo esmero en la compilación de las referencias, no puede excluirse la posibilidad de errores u omisiones, y la OEP declina cualquier responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5673468 A [0004]
- US 5849956 A [0004]
- US 5939050 A [0004]
- US 5547677 A [0004]
- US 5549901 A [0004]
- US 5618840 A [0004]
- US 5629021 A [0004]
- US 5662957 A [0004]
- US 5700679 A [0004]
- US 5730989 A [0004]
- US 4810646 A, Jamas [0012]
- US 166929 A [0012]
- US 297752 A [0012]
- US 297982 A [0012]
- US 6242594 B [0012]
- US 5401727 A [0012]
- US 5607677 A [0012]
- EP 0242135 A [0015]
- WO 9636433 A [0015]
- GB 2162147 A [0015]
- WO 0212348 A [0015]
- US 3710795 A [0058]
- WO 03020024 A [0062] [0077]
- WO 2005070213 A [0077]

Literatura distinta de las patentes citada en la descripción

- **OWAWUNMI.** *Letters in Applied Microbiology*, 1993, vol. 9 (3),105-108 [0004]
- **CROWELL et al.** *Crit. Rev. Oncog.*, 1994, vol. 5 (1), 1-22 [0004]
- **CROWELL et al.** *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1996, vol. 401,131-136 [0004]
- **ELSON et al.** *J. Nutr.*, 1994, vol. 124, 607-614 [0004]
- **ELEGBEDE et al.** *Carcinogenesis*, 1984, vol. 5 (5), 661-664 [0004]
- **ELEGBEDE et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, vol. 76 (2), 323-325 [0004]
- **KARLSON et al.** *Anticancer Drugs*, 1996, vol. 7 (4), 422-429 [0004]
- **YU et al.** *J. Agri. Food Chem.*, 1995, vol. 43, 2144-2147 [0004]
- **CHAUMONT et al.** *Ann. Pharm. Fr.*, 1992, vol. 50 (3),156-166 [0005]
- **MOLEYAR et al.** *Int. J. Food Microbiol*, 1992, vol. 16 (4),337-342 [0005]
- **PATTNAIK et al.** *Microbios*, 1997, vol. 89 (358), 39-46 [0005]
- **HOOSER et al.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1986, vol. 189 (8), 905-908 [0005]
- **BARD et al.** *Lipids*, 1998, vol. 23 (6), 534-538 [0005]
- **MIKHLIN et al.** *A. Prikl. Biokhim. Mikrobiol*, 1983, vol. 19, 795-803 [0005]
- **SALT et al.** *Adam. Physiol. Molec. Plant Path*, 1986, vol. 28, 287-297 [0005]
- **ISHII.** *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.*, 1993, vol. 280 (1-2), 239-243 [0005]
- **BAE et al.** *Biol. Pharm. Bull.*, 1998, vol. 21 (9), 990-992 [0005]
- **KADOT A et al.** *Zentralbl. Bakteriol*, 1997, vol. 287 (1), 63-67 [0006]
- **KIM et al.** *J. Agric. Food Chem.*, 1995, vol. 43, 2839-2845 [0007]
- **Remington:** *The Science and Practice of Pharmacy.* Lippincott, Williams & Wilkins, 15 diciembre de 2000 [0056]