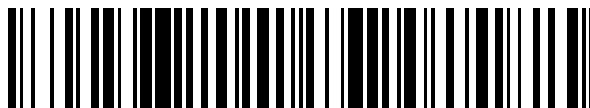


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 363**

21 Número de solicitud: 201330836

51 Int. Cl.:

C05B 9/00 (2006.01)

C07F 9/22 (2006.01)

A01N 57/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.02.2015

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA (100.0%)
Campus de Arrosadía s/n - OTRI, Edificio de
Rectorado
31006 Pamplona (Navarra) ES

72 Inventor/es:

APARICIO TEJO, Pedro María;
IRIGOIEN IRIARTE, José Ignacio;
ARIZ ARNEDO, Idoia;
CRUCHAGA MOSO, Saioa;
LASA LARREA, Berta y
MURO ERREGUERENA, Julio

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **Inhibidores de la ureasa capaces de disminuir el contenido de nitratos en hortalizas**

57 Resumen:

Inhibidores de la ureasa capaces de disminuir el contenido de nitratos en hortalizas.

La presente invención describe el uso de al menos un inhibidor de la ureasa para la disminución de la concentración de nitratos en especies hortícolas cultivables. Los inhibidores de la ureasa pueden aplicarse a dichos cultivos, bien vía foliar o sobre el suelo de los mismos, cuando los cultivos ya están desarrollados y próximos a su recolección en estadio fenológico 45 ó superior de acuerdo con la escala BBCH. El inhibidor de la ureasa preferido utilizado en la presente invención es el N-(n-butil) tiofósforo triamida (NBPT), siendo preferida su forma oxidada.

DESCRIPCIÓN**INHIBIDORES DE LA UREASA CAPACES DE DISMINUIR EL CONTENIDO DE
NITRATOS EN HORTALIZAS****CAMPO DE LA INVENCION**

5

La invención versa sobre el uso de inhibidores de la enzima ureasa útiles en la disminución de la concentración de nitratos en los alimentos de origen vegetal, específicamente en los alimentos provenientes de cultivos de hortalizas. Dichos inhibidores de la ureasa, deben aplicarse, específicamente, cuando los cultivos ya están desarrollados y próximos a su recolección, concretamente en estados fenológicos 45 o superiores de acuerdo con la clasificación de la escala internacional BBCH (Bleiholder et al., 1989. Gesunde Pflanzen. Volumen 41. Pags. 381-384).

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

El desarrollo tecnológico ha sido el soporte de la capacidad de la agricultura para responder a los cambios originados por el crecimiento de la población mundial. La aplicación masiva e incontrolada de potentes técnicas de mecanización, aplicación de fertilizantes, plaguicidas, etc., ha dado lugar a la obtención de productividades nunca imaginadas, pero que a su vez llevan asociadas importantes alteraciones del medio ambiente.

20

El nitrógeno representa uno de los nutrientes principales cuya disponibilidad continua es esencial para el crecimiento vegetal, para la calidad de los productos cosechados, y para el nivel de rendimiento de plantas de cultivo. En este caso, el abastecimiento óptimo de las plantas depende generalmente de una pluralidad de factores de influencia, como clima, suelo, disponibilidad de nutrientes, entre otros. En los sistemas agrícolas, se hace pues necesario, para mantener la fertilidad de los suelos, el aporte de nitrógeno continuo para equilibrar las pérdidas que se producen mediante los procesos de desnitrificación, volatilización, lixiviación, así como por la recolección de la cosecha. En la actualidad, el reto para la agricultura es aplicar el tipo de fertilizante nitrogenado adecuado, a la dosis óptima y en el momento idóneo con el fin de optimizar el rendimiento de los cultivos y evitar, al mismo tiempo, la aplicación excesiva de fertilizante nitrogenado, evitando así el consiguiente impacto medioambiental y de salud, relacionado principalmente con el uso agroalimentario de dichos cultivos que presentan elevados niveles de nitratos en sus tejidos.

25

30

35

En este sentido, el uso de fertilizantes nitrogenados para incrementar el rendimiento de los cultivos presenta una serie de desventajas relacionadas con la salud como son el exceso de nitrógeno en los productos de los cultivos, especialmente las altas concentraciones de nitratos que presentan los alimentos de origen vegetal, especialmente las hortalizas de hoja, aunque otros órganos vegetales pueden también acumular importantes cantidades de nitrato en sus tejidos, como por ejemplo bulbos, tubérculos, etc.

Existe una creciente preocupación por la cantidad de nitrato y nitrito ingerida con los alimentos debido a sus posibles efectos nocivos para la salud humana. El nitrato ingerido puede ser transformado en nitrito cuando el pH del jugo gástrico es elevado, caso frecuente en lactantes, originando la patología denominada metahemoglobinemia o enfermedad o síndrome de los “bebés azules”. Por ello, para preservar la salud de los ciudadanos de los países miembros de la Unión Europea (UE) ante los posibles riesgos sanitarios derivados del consumo de hortalizas con una elevada acumulación en nitrato, la Comisión Europea publicó el 31 de enero de 1997 el Reglamento 194/97. Esta normativa ha sido modificada por el Reglamento CE 466/2001 publicado el 16 de marzo de 2001 en el que se establecen los límites máximos de nitrato que pueden presentar hortalizas de hoja (lechugas, espinacas, etc.) cultivadas y comercializadas en la UE, que a su vez fue modificado por el Reglamento 1881/2006 y más recientemente por el Reglamento 1258/2011.

Para evitar el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados, debido a los inconvenientes arriba indicados, pero conservando el rendimiento de los cultivos, se ha probado la aplicación conjunta de los fertilizantes nitrogenados junto con inhibidores de la enzima ureasa, capaces de inhibir selectivamente la hidrólisis de la urea (Montemurro et al., 1998. *Journal of Plant Nutrition*. Volumen 21. Pags. 245-252; Smolen and Sady, 2009. *Scientia Horticulturae*, Volumen 119. Pags. 219-231) o con inhibidores de la nitrificación (Smolen and Sady, 2009; *Scientia Horticulturae*. Volumen 119. Pags. 219-231; Irigoien et al., 2006. *The Journal of Agricultural Science*. Volumen 144. Pags. 555-562).

Los inhibidores de la nitrificación (INs) son sustancias que retrasan la oxidación biológica del amonio a nitrito. El objetivo de utilizar inhibidores de la nitrificación es el control de la pérdida de nitratos por lixiviación o la producción de óxido nitroso por desnitrificación de la capa superficial del suelo, manteniendo el nitrógeno en forma de amonio más tiempo y por lo tanto aumentar la eficiencia del uso de nitrógeno. Además, los inhibidores de nitrificación -retrasando la conversión de amonio a nitrato- evitan indeseables niveles altos de nitrato en las plantas usadas para la nutrición humana y animal. La inhibición de la nitrificación, sin

- embargo, no impedirá la entrada de nitrógeno en la planta por aplicación directa de fertilizantes nitrogenados y por la escorrentía. Los inconvenientes principales al uso de este tipo de compuestos son, en primer lugar, el incremento del coste de la aplicación del fertilizante que no siempre garantiza su compensación con incrementos en la producción, ya que de momento los beneficios ambientales no se encuentran valorados económicamente, y en segundo lugar, que se aplica un producto de síntesis química al medio ambiente que puede ser acumulado por los cultivos. En el estado de la técnica se utilizan diferentes inhibidores de la nitrificación en combinación con los fertilizantes nitrogenados, para reducir al máximo posible tanto la pérdida de nitrógeno por lixiviación como la presencia de nitratos en las hortalizas o frutos de dichos cultivos, sin reducir de forma significativa los rendimientos de los mismos. La reducción del aporte de nitrógeno en el suelo se puede sustituir por una aplicación foliar, bien de urea o de otros compuestos nitrogenados.
- Los principales inhibidores de la nitrificación utilizados en agricultura son: Nitrapirina, comercializada en USA, dicianidamida (DCD), comercializada en Europa, 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP), triazol, 3 Metilpirazol (3-MP)- y 2-amino-4-cloro-6-metil pirimidina-(AM). Algunos otros compuestos tienen un uso restringido en ciertas regiones.
- Por otro lado, los inhibidores de la ureasa (IUs) son sustancias que inhiben la acción hidrolítica de la urea por la enzima ureasa. Los inhibidores de ureasa previenen o suprimen durante un cierto período de tiempo la transformación de la N-amida de la urea a hidróxido de amonio y amonio a través de la acción hidrolítica de la enzima ureasa. Al reducir la velocidad a la que se hidroliza la urea en el suelo, las pérdidas por volatilización de amoníaco en el aire (así como otras pérdidas como la lixiviación de nitrato) se reducen o se evitan. Por lo tanto, la eficiencia de la urea y de fertilizantes de nitrógeno que contienen urea, por ejemplo en forma de urea-formaldehído, crotonyldiurea, isobutildiurea etc., se aumenta y cualquier impacto ambiental adverso de su uso se reduce. Los inconvenientes principales al uso de este tipo de compuestos son en primer lugar, el incremento del coste de la aplicación del fertilizante que no siempre garantiza su compensación con incrementos en la producción, ya que de momento los beneficios ambientales no se encuentran valorados económicamente y en segundo lugar que se aplica un producto de síntesis química al medio ambiente que puede ser acumulado por los cultivos. Watson and Miller encontraron que aplicar urea conjuntamente con N-(n-butil) tiofosforo triamida (NBPT) a dosis de hasta 0,5% peso, producía un ennegrecimiento temporal y reversible de los ápices foliares de ryegrass acompañado de una reducción de la actividad ureasa de las plantas.

Este efecto era efímero en el tiempo (desaparecía en 10 días) y el beneficio en la producción derivado del mejor aprovechamiento del abonado compensaba en términos de producción de biomasa la necrosis de los ápices foliares (Watson and Miller, 1996. Plant and Soil. Volumen 184. Pags. 33-45). Esta ligera fitotoxicidad en los casos del NBPT y del fenilfosforodiamida se atribuye a la acumulación de urea en los tejidos de trigo y sorgo (Krogmeier, McCarty, Bremmer, 1989. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Volumen 86. Pags. 1110-1112). La reacción es reversible y depende del tiempo que perdura la inhibición de la actividad ureasa por parte del inhibidor utilizado en cada caso.

Numerosos compuestos químicos han sido evaluados como inhibidores de la ureasa y pueden ser clasificados de acuerdo a sus estructuras y a cómo se da la interacción con la enzima (Watson, 2000. Proceedings 454 of The International Fertiliser Society, York, UK, pag. 40). Dichos inhibidores pueden actuar sobre el centro activo de la enzima o también sobre algún grupo funcional clave en la molécula que podría cambiar la conformación del sitio activo impidiendo con ello la hidrólisis de la urea. Se han propuesto 4 clases principales:

- i) reactivos que interaccionan con grupos sulfhidrilo;
- ii) hidroxamatos;
- iii) productos químicos de protección de cultivos agrícolas y
- iv) análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados.

Muchas sustancias han sido evaluadas como potenciales inhibidores de la ureasa, pero pocas han demostrado ser realmente efectivas. Entre los distintos compuestos probados están los análogos estructurales de la urea, fosforoamidas, y tiofosforoamidas, y también las hidroquinonas y benzoquinonas. Hasta el momento el N-(n-butil) tiofósforo triamida (NBPT) ha demostrado ser el más efectivo en el control de la hidrólisis de la urea (Bremner, Chai, 1986. Communications in Soil Science and Plant Analysis. Volumen 17. Pags. 337-351; Beyrouty, Nelson, Sommers, 1988. Soil Science. Volumen 145. Pags. 345-352), siendo su forma oxidada, NBPTO, la que presenta mayor capacidad de inhibición de la ureasa (Creason et al., 1990. Soil Biology & Biochemistry. Volumen 22. Pags. 209-211; McCarty et al., 1990. Fertilizer Research Volumen 24. Pags. 135-139; Phongpan et al., 1995. Fertilizer Research. Volumen 41. Pags. 59-66).

El NBPT ha sido ensayado en numerosas especies, principalmente maíz y pratenses y otros cereales (Bremner, 1995. Fertilizer Research. Volumen 42. Pags. 321-329; Watson et al., 1998. Grass and Forage Science. Volumen 53. Pags. 137-145; Grant et al., 1999. Canadian Journal of Plant Science. Volumen 79. Pags. 491-496), y ha demostrado ser efectivo reduciendo la volatilización de amoníaco aplicándolo a muy bajas concentraciones, del orden del 0,01 % (Bremner, Krogmeier, 1988. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Volumen 85. Pags. 4601-4604; Watson et al., 1994. Biology & Biochemistry. Volumen 26. Pags. 1165-1171). De hecho es el primer inhibidor de la ureasa que ha llegado a ser comercializado, bajo el nombre de Agrotain®, pero siempre se aplica de forma conjunta con un compuesto nitrogenado (urea u otro fertilizante nitrogenado) y siempre con la finalidad de reducir la volatilización de la urea o amoníaco.

Como se ha mencionado previamente, los inhibidores de la ureasa se aplican siempre con los fertilizantes nitrogenados basados en urea, sobre el suelo de los cultivos con anterioridad a la siembra y siempre en cultivos de tipo extensivo, típicamente en cereales, con el fin exclusivo de reducir la volatilización de amoníaco. En este sentido, no es conocido en el estado de la técnica el uso de inhibidores de la ureasa en los cultivos hortícolas, ni en los cultivos de hortalizas de hoja, como por ejemplo, lechuga o espinaca, o de otras modalidades de hortalizas, como por ejemplo, zanahoria, tomate, pimiento, etc., ya que la urea no es un fertilizante de uso habitual en estos cultivos y por tanto no es de interés el uso de inhibidores de urea, cuyo fin es el evitar la volatilización de amonio. El problema con las hortalizas es la acumulación de nitrógeno por encima de los límites sanitarios permitidos. Una forma de evitar dicha acumulación excesiva de nitratos es reducir el aporte de estos elementos reduciendo la cantidad de fertilizantes añadidos. Sin embargo, dicha solución técnica no es eficaz al condicionar a la baja el crecimiento de las hortalizas. Otra solución podría ser aplicar en hortalizas, al mismo tiempo, los fertilizantes nitrogenados con un inhibidor de la ureasa como se viene haciendo en cereales, sin embargo, esa solución no reduce los niveles de nitrógeno a los límites permisibles en hortalizas y causa, como se ha comentado, ennegrecimiento de las hojas.

Además, desde la aplicación de la normativa de la UE en relación a los contenidos máximos de nitratos en las hortalizas de hoja (Reglamento UE N° 1258/2011), se han realizado múltiples investigaciones sobre los factores que intervienen en la presencia de nitratos en dichas hortalizas y sobre las medidas que han de adoptarse para reducir tanto como sea

posible la presencia de nitratos en las mismas. Pese a los avances conseguidos en las buenas prácticas agrícolas para reducir la presencia de nitratos en las hortalizas de hoja y a pesar de una aplicación estricta de estas buenas prácticas agrícolas, en determinadas regiones de la Unión Europea no es posible conseguir permanentemente un contenido de nitratos en las hortalizas de hoja, como por ejemplo, lechugas y espinacas frescas, inferior a los límites máximos actuales establecidos para cada especie y producto alimentario, según se indica, como hemos mencionado anteriormente en el Reglamento UE N° 1258/2011. Ello se debe a que el clima, y en particular, las condiciones de luminosidad, constituyen los principales factores determinantes de la presencia de nitratos en dichas hortalizas de hoja. El productor no puede gestionar ni cambiar estas condiciones climáticas. Para solventar dichos problemas, la presente invención describe el uso de, al menos, un inhibidor de la ureasa para la disminución de la concentración de nitrato en los cultivos de hortalizas, preferentemente en hortalizas de hoja. Específicamente, la invención describe la aplicación de, al menos, un inhibidor de la ureasa en cultivos hortícolas no extensivos cuando dichos cultivos ya están desarrollados y próximos a su recolección, concretamente, en estados fenológicos 45 o superiores de acuerdo con la clasificación de la escala internacional BBCH (Bleiholder et al., 1989. Gesunde Pflanzen. Volumen 41. Pags. 381-384).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

La presente invención describe el uso de, al menos, un inhibidor de la ureasa útil en la disminución de la concentración de nitratos en los cultivos hortícolas no extensivos, siendo aplicado dicho inhibidor, indistintamente bien vía foliar o vía suelo, cuando los cultivos se encuentran en estadios fenológicos 45 o superiores de la escala internacional BBCH (Bleiholder et al., 1989. Gesunde Pflanzen Volumen 41. Pags. 381-384). La disminución de la concentración de nitratos obtenida en los cultivos sometidos al tratamiento, con al menos un inhibidor de la ureasa de la invención, respecto al grupo control no tratado, varían entre un 30-60%.

A efectos de la presente invención la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) es una enzima que cataliza la hidrólisis de urea a dióxido de carbono y amoníaco. La reacción ocurre de la siguiente manera: $(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$

A efectos de la presente invención, se define el término inhibidores de ureasa (IU) como sustancias que inhiben la acción hidrolítica de la urea mediante la enzima ureasa. Los inhibidores de la ureasa se clasifican de acuerdo a sus estructuras y a cómo se da la interacción con la enzima, pudiendo actuar sobre el centro activo de la enzima o también sobre algún grupo funcional clave en la molécula que podría cambiar la conformación del sitio activo impidiendo con ello la hidrólisis de la urea. A efectos de la presente invención, se pueden utilizar los cuatro tipos principales de inhibidores que se conocen en el estado de la técnica:

- i) reactivos que interaccionan con grupos sulfhidrilo, entre los que se encuentran cualquiera de los siguientes: p-hidroxi-mercuribenzoato, n-etilmaleimida, iodoacetamida, etc.
- ii) hidroxamatos;
- iii) productos químicos de protección de cultivos agrícolas, que son compuestos muy inespecíficos, entre los que se encuentran los fungicidas y herbicidas, entre otros, y
- iv) análogos estructurales de la urea, entre los que se encuentran las fosforoamidas, tiofosforoamidas, hidroquinonas y benzoquinonas y compuestos relacionados, entre los que se encuentran la hidroxiiurea, tiourea, fenilurea, metilurea, entre otros.

A efectos de la presente invención, los inhibidores de la ureasa además, para poder ser utilizados en cultivos deben cumplir los siguientes requisitos: no ser tóxicos ni para el cultivo ni para el medioambiente, permanecer estables, ser efectivos a bajas concentraciones, ser compatibles con la urea y ser viables económicamente. Como se ha mencionado anteriormente, entre los distintos compuestos que pueden ser utilizados como inhibidores de la ureasa y que, por lo tanto, pueden utilizarse en la presente invención, destacan los análogos estructurales de la urea, fosforoamidas, y tiofosforoamidas y también, las hidroquinonas y benzoquinonas. La capacidad inhibitoria en el tiempo de la actividad ureasa del suelo de tres fosforamidas, como por ejemplo, NBPT, TPT y PP, es muy diferente. El efecto inhibitorio del NBPT en suelo es superior al de los otros inhibidores perdurando hasta 28 días tras su aplicación al suelo. Este periodo aumenta con la dosis de inhibidor aplicado y se reduce con la temperatura del suelo (Bremner, McCarty, Higuchi, 1991. Communications in Soil Science and Plant Analysis. Volume 22. Pags. 1519-1526). Estos aspectos han de ser tenidos en cuenta de cara al manejo de los distintos inhibidores. Según

los estudios llevados a cabo para analizar la toxicidad de los inhibidores de la ureasa, éstos han puesto de manifiesto que dicha toxicidad es muy pequeña.

A efectos de la presente invención, el inhibidor de la ureasa preferido es el NBTP, siendo su forma oxidada, NBPTO, la que presenta mayor capacidad de inhibición de la ureasa.

A efectos de la presente invención el término “cultivos hortícolas” u “hortalizas” se refiere a cultivos de hortalizas, como por ejemplo hortalizas de plantas bulbosas, preferentemente, allium-cebolla (*Allium cepa*), puerro (*Allium porrum*), ajo (*Allium sativum*), chalote (*Allium ascalonicum*), etc., hortalizas de raíz y tubérculo, como por ejemplo, zanahoria (*Daucus carota*), escorzonera (*Scorzonera hispánica*), achicoria (*Cichorium intybus*), rábano (*Raphanus sativus*), rabanillo, pastinaca (*Dasyatis pastinaca*), nabo gallego (*Brassica napus*), colinabo (*Brassica napus* var. *napobrassica*), apio nabo (*Apium graveolens*), col rápano (*Brassica napus* var. *rapifera*), etc., verduras que forman cabeza, como por ejemplo, col repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata*), col de Milán, col de China (*Brassica campestris* var. *pekinensis*), lechuga arrepollada (*Lactuca sativa*), endivia (*Cichorium endivia*), escarola (*Cichorium endivia* var. *crispa*), etc., verduras que no forman cabeza, como por ejemplo, lechuga de campo (*Lactuca sativa*), espinaca (*Spinacia oleracea*), col enana (*Brassica oleracea* var. *acephala*), etc., y otras hortalizas como por ejemplo, col de Bruselas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) y rúcula (*Eruca sativa*).

A efectos de la presente invención, el término “aplicación foliar” se refiere a la aplicación del inhibidor de la ureasa sobre la parte aérea de los cultivos pulverizando una solución acuosa del inhibidor a la concentración recomendada. Para facilitar la incorporación del inhibidor de la ureasa a través de la superficie de las hojas es recomendable incluir en la solución acuosa del inhibidor, un surfactante. A efectos de la presente invención se puede utilizar cualquier surfactante conocido en el estado de la técnica para aplicación foliar sobre cultivos. A continuación, en la Tabla 1, se mencionan un listado de surfactantes que pueden ser utilizados en la presente invención, sin pretender limitar el uso de otros surfactantes conocidos en el estado de la técnica para el mismo fin. Las concentraciones utilizadas de surfactante son las que recomienda por cada fabricante.

Tabla 1. Surfactantes que pueden utilizarse en la presente invención.

PRODUCTO	INGREDIENTE ACTIVO
BEANOIL	Aceite de Soja 60%. Ideal para los Herbicidas y Fungicidas.
FM.-160	Mezcla concentrada de agentes espumantes, 100%
FOME-KIL	Agente antiespumante 100%.
HAF-PYNT	Biodegradables tensioactivos no iónicos (80%). Sin Nonifenoles.
HUM-AC 820	Humectante / adyuvante / surfactante. 80%.
MES-100	Mezcla de aceites de semillas y Spray adyuvante no iónicos. Ideal para Herbicidas.
MIX	Tensioactivos de ésteres de fosfato. Ayudante mezclas todo tipo de pesticidas, fertilizantes, surfactantes.
PAS-800	Penetrante - Acidificante - Surfactante. No iónicos. 80%
PEPTOIL	Aceite petróleo de parafina. Contiene agentes antiespumante
PINENE II	Poliméricos Terpenos. Alarga la vida a los plaguicidas, protegiéndolo y actúa como sticker en la planta.
PRIMARY	Aceite petróleo de parafina. 60%
SIL-FACT	Mezcla de Organosilicona Surfactante y etoxilatos de alcohol.
MES 100	Mezcla patentada de no Organosilicona de tensioactivo no iónico, etoxilatos de alcohol metílico y de aceite de semilla
SURF-AC 820	Surfactante no iónico 80%. Distribución uniforme del producto + mojante.
SURF-AC 910	Surfactante no iónico 90%. Distribución uniforme del producto + mojante.
VEGETOIL	Aceite Vegetal Plus Emulsionante 93%. Ideal para Insecticidas.
LUQMULLANT	Alcohol isotridecílico etoxilado (tensioactivo no iónico). Coadyuvante en tratamientos fitosanitarios sobre todas las especies vegetales.

- 5 El surfactante preferido usado en la presente invención ha sido el Luqmullant (Luqsa, Lleida), a la concentración recomendada por el fabricante.

A efectos de la presente invención, el término “aplicación vía suelo” o “aplicación sobre el suelo de los cultivos” se refiere a la aplicación del inhibidor de la ureasa sobre el suelo de los cultivos, preferentemente hortícolas, cuando las hortalizas se encuentran en estadios fenológicos 45 o superiores de la escala internacional BBCH (Bleholder et al., 1989. Gesunde Pflanzen. Volumen 41. Pags. 381-384). Dicha aplicación se lleva a cabo

preferentemente, diluyendo el inhibidor de la ureasa en el agua de riego de los cultivos a la concentración idónea.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a un método para disminuir la concentración de nitratos en los cultivos hortícolas no extensivos caracterizado por la administración de al menos un inhibidor de la ureasa (EC 3.5.1.5) a dichos cultivos cuando se encuentran en estadios fenológicos 45 o superiores de la escala fenológica internacional BBCH (Bleholder et al., 1989. Gesunde Pflanzen. Volumen 41. Pags. 381-384).

En una realización preferida del método de la invención, la aplicación del inhibidor puede realizarse bien vía foliar o sobre el suelo de los cultivos.

A efectos de la presente invención el término “fertilizante nitrogenado” se refiere a aquéllos fertilizantes que comprenden nitrógeno en cualquiera de sus diferentes formas. Los fertilizantes nitrogenados pueden ser simples, entre los que se encuentran la urea, nitrato amónico, nitrosulfato amónico, nitrato cálcico, nitrato amónico cálcico, sulfato amónico, cianamida, N32,...etc.; o compuestos, entre los que se encuentran el nitrato potásico, fosfato amónico, 9-18-27, 12-12-12 (Porcentajes de cada elemento: nitrógeno, fósforo y potasio (NPK) en este orden, en la composición de los fertilizantes complejos) y cualquier otro complejo conocido en el estado de la técnica.

A efectos de la presente invención el término “abono o fertilizante orgánico” se refiere a cualquier producto de origen natural que presenta cantidades significativas de nitrógeno en forma orgánica. Entre los productos orgánicos que pueden ser usados en la presente invención destacan los residuos ganaderos (estiércoles, purines, gallinazas, etc.), restos de cultivos (champiñón, abonos verdes, etc), residuos industriales y urbanos (lodos o fangos de depuración de aguas, fracción orgánica de residuos municipales, residuos de industrias agroalimentarias y otras industrias), todos ellos tanto en bruto como tratados mediante compostaje, digestión anaerobia, desecado, deshidratado, centrifugado, estabilizado químicamente o similares. También se consideran materiales de minas como el guano y la dolomita.

La presente invención describe además, una composición que comprende, al menos, un inhibidor de la ureasa, sin presencia de ningún compuesto nitrogenado adicional, capaz de disminuir la concentración de nitratos en las plantas tratadas con dicha composición, así como los diferentes usos de la misma.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado a los habitualmente entendidos por una persona experta en el campo de la invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden ser usados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes, no tienen carácter limitativo y por lo tanto no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Por el contrario, la palabra "consiste" y sus variantes, sí que presentan carácter limitativo, refiriéndose exclusivamente a las características técnicas, aditivos, componentes o pasos que la acompañan. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Descripción de las Figuras

Figura 1. Imagen del ensayo de lechugas crecidas en maceta en el momento de la recolección.

Figura 2. Contenido de nitrato (NO_3^-) (ppm) expresado sobre peso seco, en lechugas control y tratadas con NBPT (2.5 mg/maceta), aplicado en el suelo, cuando dichos cultivos se encuentran en estadios fenológicos 45 o superiores de la escala fenológica internacional BBCH y crecidas en maceta. $n=4$; * $p<0.05$ vs plantas control.

Figura 3. Contenido de nitrato (NO_3^-) (ppm) expresado sobre peso fresco, en lechugas control y tratadas con NBPT (2.5 mg/maceta), aplicado en el suelo, cuando dichos cultivos se encuentran en estadios fenológicos 45 o superiores de la escala fenológica internacional BBCH y crecidas en maceta. $n=4$; * $p<0.05$ vs plantas control.

Figura 4. Contenido de nitrato (NO_3^-) (ppm) expresado sobre peso seco, en lechugas crecidas en suelo no tratadas y tratadas con NBPT aplicado foliarmente cuando dichos cultivos se encuentran en estadios fenológicos 45 o superiores de la escala fenológica internacional BBCH. $n=12$; * $p<0.05$ vs plantas control.

Figura 5. Contenido de nitrato (NO_3^-) (ppm) expresado sobre peso fresco, en lechugas crecidas en suelo no tratadas y tratadas con NBPT aplicado foliarmente cuando dichos cultivos se encuentran en estadios fenológicos 45 o superiores de la escala fenológica internacional BBCH. $n=12$; * $p<0.05$ vs plantas control.

Figura 6. Imagen del ensayo de lechugas crecidas en suelo en el momento de la recolección.

Descripción detallada de la invención

5

El primer objeto de la presente invención se refiere a un método para la reducción de la concentración de nitratos en especies hortícolas cultivables caracterizado por la administración, durante su cultivo, de al menos un inhibidor de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) sobre dichos cultivos cuando éstos se encuentran en estado fenológico ≥ 45 según la Escala Internacional BBCH, respecto a cultivos hortícolas no tratados con al menos un inhibidor de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5).

En una realización preferida, el método de la invención se caracteriza por que los inhibidores de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) son análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados, seleccionándose preferentemente de entre cualquiera de los siguientes: fosforoamidas, tiofosforoamidas, preferentemente el N-(n-butil) tiofósforo triamida (NBPT), hidroquinonas y benzoquinonas.

En otra realización más preferida, el método de la invención se caracteriza por que el inhibidor preferido de la ureasa utilizado en la presente invención pertenece al grupo de las tiofosforoamidas y es el NBPT y en una realización más preferida aún, el NBPT se utiliza en su estado oxidado (NBPTO).

En otra realización preferida del método descrito en la invención, la concentración de inhibidor de la enzima ureasa utilizado, preferentemente NBPT, varía de entre 100-400 g de inhibidor por hectárea de cultivo.

En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza por que los cultivos hortícolas se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: hortalizas de plantas bulbosas, preferentemente, *Allium cepa*, *Allium porrum*, *Allium sativum* y *Allium ascalonicum*; las hortalizas de raíz y tubérculo se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Daucus carota*, *Scorzonera hispánica*, *Cichorium intybus*, *Raphanus sativus*, rabanillo, *Dasyatis pastinaca*, *Brassica napus*, *Brassica napus* var. napobrassica, *Apium graveolens*, *Brassica napus* var. rapifera, *Brassica oleracea* var. gongylodes; las verduras que forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Brassica oleracea* var. capitata, *Brassica oleracea* var. sabauda, *Brassica campestris* var. pekinensis, *Lactuca sativa*, *Cichorium endivia* y *Cichorium endivia* var. crispa; las verduras que no forman

cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Lactuca sativa*, *Spinacia oleracea*, *Brassica oleracea* var. *acephala*, además de *Brassica oleracea* var. *gemmifera*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Brassica oleracea* var. *italica* y *Eruca sativa*.

- 5 En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza por que el inhibidor de la ureasa utilizado, se aplica a los cultivos hortícolas vía foliar o vía suelo. Cuando la aplicación se realiza vía foliar, el inhibidor de la ureasa se aplica conjuntamente con un surfactante, a la concentración recomendada por el fabricante del mismo, que puede seleccionarse de entre cualquiera de los siguientes:

PRODUCTO	INGREDIENTE ACTIVO
BEANOIL	Aceite de Soja 60%. Ideal para los Herbicidas y Fungicidas.
FM.-160	Mezcla concentrada de agentes espumantes, 100%
FOME-KIL	Agente antiespumante 100%.
HAF-PYNT	Biodegradables tensoactivos no iónicos (80%). Sin Nonifenoles.
HUM-AC 820	Humectante / adyuvante / surfactante. 80%.
MES-100	Mezcla de aceites de semillas y Spray adyuvante no iónicos. Ideal para Herbicidas.
MIX	Tensioactivos de ésteres de fosfato. Ayudante mezclas todo tipo de pesticidas, fertilizantes, surfactantes.
PAS-800	Penetrante - Acidificante - Surfactante. No iónicos. 80%
PEPTOIL	Aceite petróleo de parafina. Contiene agentes antiespumante
PINENE II	Poliméricos Terpenos. Alarga la vida a los plaguicidas, protegiéndolo y actúa como sticker en la planta.
PRIMARY	Aceite petróleo de parafina. 60%
SIL-FACT	Mezcla de Organosilicona Surfactante y etoxilatos de alcohol.
MES 100	Mezcla patentada de no Organosilicona de tensioactivo no iónico, etoxilatos de alcohol metílico y de aceite de semilla
SURF-AC 820	Surfactante no iónico 80%. Distribución uniforme del producto + mojante.
SURF-AC 910	Surfactante no iónico 90%. Distribución uniforme del producto + mojante.
VEGETOIL	Aceite Vegetal Plus Emulsionante 93%. Ideal para Insecticidas.
LUQMULLANT	Alcohol isotridecílico etoxilado (tensioactivo no iónico). Coadyuvante en tratamientos fitosanitarios sobre todas las especies vegetales.

En una realización más preferida aún, el surfactante preferido es Luqmulant (Luqsa, Lleida), a la concentración recomendada por el fabricante.

Además, dicha aplicación del inhibidor de la ureasa junto con el surfactante se realiza mediante pulverización. Por otro lado, cuando la aplicación del inhibidor de la ureasa se realiza vía suelo, dicha aplicación se lleva a cabo diluyendo el inhibidor en el agua de riego.

En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza por que en los cultivos hortícolas se puede aplicar además, previamente a la adición del inhibidor de la ureasa, un fertilizante nitrogenado o un fertilizante orgánico, el cual se aplicaría previamente al inhibidor de la ureasa, como en el caso del fertilizante inorgánico.

En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza por que la disminución en la concentración de nitratos en los cultivos hortícolas tratados con un inhibidor de la enzima ureasa varía entre un 30-60% respecto a los cultivos hortícolas no tratados con el inhibidor de la enzima.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere al uso de al menos un inhibidor de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) para la reducción de la concentración de nitratos en especies hortícolas cultivables caracterizado por que dicho inhibidor se administra sobre dichos cultivos cuando éstos se encuentran en estado fenológico ≥ 45 según la Escala Internacional BBCH (Bleiholder et al., 1989. Gesunde Pflanzen. Volumen 41. Pags. 381-384).

En una realización preferida, el uso del inhibidor de la ureasa descrito en la presente invención se caracteriza por qué los inhibidores de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) son análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados, preferentemente, los análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: fosforoamidas, tiofosforoamidas, hidroquinonas y benzoquinonas. En una realización más preferida, el compuesto preferido pertenece al grupo de las tiofosforoamidas y es el NBPT, siendo más preferido aún, en su forma oxidada, NBPTO.

En otra realización preferida, el uso del inhibidor de la ureasa descrito en la presente invención se caracteriza por qué la concentración de inhibidor de la enzima ureasa utilizado varía de entre 100-400 g de inhibidor por hectárea de cultivo.

En otra realización preferida, el uso del inhibidor de la ureasa descrito en la presente invención se caracteriza por que las especies hortícolas se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: hortalizas de plantas bulbosas, hortalizas de raíz y tubérculo, verduras que forman cabeza y verduras que no forman cabeza. Preferentemente, las hortalizas de plantas bulbosas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Allium cepa*, *Allium porrum*, *Allium sativum* y *Allium ascalonicum*; las hortalizas de raíz y tubérculo se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Daucus carota*, *Scorzonera hispánica*, *Cichorium intybus*, *Raphanus sativus*, rabanillo, *Dasyatis pastinaca*, *Brassica napus*, *Brassica napus* var. napobrassica, *Apium graveolens*, *Brassica napus* var. rapifera, *Brassica oleracea* var. Gongylodes; las verduras que forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Brassica oleracea* var. capitata, *Brassica oleracea* var. sabauda, *Brassica campestris* var. Pekinensis, *Lactuca sativa*, *Cichorium endivia* y *Cichorium endivia* var. crispa; las verduras que no forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Lactuca sativa*, *Spinacia oleracea*, *Brassica oleracea* var. acephala, además de *Brassica oleracea* var. gemmifera, *Brassica oleracea* var. botrytis, *Brassica oleracea* var. italica y *Eruca sativa*.

En otra realización preferida, el uso del inhibidor de la ureasa descrito en la presente invención se caracteriza por qué el inhibidor de la ureasa se aplica a los cultivos hortícolas vía foliar o vía suelo. Cuando la aplicación es vía foliar, el inhibidor de la ureasa se administra conjuntamente con un surfactante, preferentemente mediante pulverización. Los surfactantes que pueden utilizarse son los mismos que los que se han descrito previamente a lo largo de la presente invención y a las concentraciones recomendadas por cada fabricante. Cuando la aplicación es vía suelo el inhibidor de la ureasa se aplica disuelto en el agua de riego.

En otra realización preferida, el uso del inhibidor de la ureasa descrito en la presente invención se caracteriza por que en los cultivos hortícolas se puede aplicar además, previamente a la adición del inhibidor de la ureasa, un fertilizante nitrogenado o un fertilizante orgánico.

En otra realización preferida, el uso del inhibidor de la ureasa descrito en la presente invención se caracteriza por que la disminución en la concentración de nitratos en los cultivos hortícolas tratados con un inhibidor de la enzima ureasa varía entre un 30-60% respecto a los cultivos hortícolas no tratados con un inhibidor de la enzima ureasa.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a una composición para el cultivo de plantas que comprende al menos un inhibidor de la ureasa (EC 3.5.1.5), sin presencia de ningún compuesto nitrogenado adicional.

- 5 En una realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que el inhibidor de ureasa se encuentra disuelto en una solución acuosa, preferentemente agua de riego.

- 10 En otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que además comprende un surfactante, siendo dicho surfactante seleccionado de entre los descritos a lo largo de la presente invención.

- 15 En otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que los inhibidores de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) son análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados, preferentemente, los análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: fosforoamidas, tiofosforoamidas, hidroquinonas y benzoquinonas. En una realización más preferida, la composición de la invención se caracteriza por que el inhibidor de la enzima ureasa es un compuesto que pertenece al grupo de las tiofosforoamidas, siendo preferido el
20 compuesto NBPT.

- En otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que las plantas se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: hortalizas de plantas bulbosas, hortalizas de raíz y tubérculo, verduras que forman cabeza y verduras que no forman
25 cabeza. Preferentemente, las hortalizas de plantas bulbosas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Allium cepa*, *Allium porrum*, *Allium sativum* y *Allium ascalonicum*; las hortalizas de raíz y tubérculo se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Daucus carota*, *Scorzonera hispánica*, *Cichorium intybus*, *Raphanus sativus*, rabanillo, *Dasyatis pastinaca*, *Brassica napus*, *Brassica napus* var. *napobrassica*, *Apium*
30 *graveolens*, *Brassica napus* var. *rapifera*, *Brassica oleracea* var. *Gongylodes*; las verduras que forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica oleracea* var. *sabauda*, *Brassica campestris* var. *Pekinensis*, *Lactuca sativa*, *Cichorium endivia* y *Cichorium endivia* var. *crispa*; las verduras que no forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Lactuca sativa*, *Spinacia*
35 *oleracea*, *Brassica oleracea* var. *acephala*, además de *Brassica oleracea* var. *gemmifera*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Brassica oleracea* var. *italica* y *Eruca sativa*.

En otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que se aplica a las plantas vía foliar o vía suelo. Cuando la aplicación es vía foliar, ésta se realiza preferentemente mediante pulverización. Cuando la aplicación es vía suelo, ésta se realiza, preferentemente, junto con el agua de riego.

5

En otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que la disminución en la concentración de nitratos en las plantas tratadas con dicha composición, varía entre un 30-60% respecto a las plantas no tratadas.

- 10 Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere al uso de la composición descrita previamente para disminuir la concentración de nitratos en plantas, siendo dicha disminución de un 30-60% respecto a las plantas no tratadas.

En una realización preferida, el uso de la composición de la invención se caracteriza por que las plantas se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: hortalizas de plantas bulbosas, hortalizas de raíz y tubérculo, verduras que forman cabeza y verduras que no forman cabeza. Preferentemente, las hortalizas de plantas bulbosas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Allium cepa*, *Allium porrum*, *Allium sativum* y *Allium ascalonicum*; las hortalizas de raíz y tubérculo se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Daucus carota*, *Scorzonera hispánica*, *Cichorium intybus*, *Raphanus sativus*, rabanillo, *Dasyatis pastinaca*, *Brassica napus*, *Brassica napus* var. *napobrassica*, *Apium graveolens*, *Brassica napus* var. *rapifera*, *Brassica oleracea* var. *Gongylodes*; las verduras que forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica oleracea* var. *sabauda*, *Brassica campestris* var. *Pekinensis*, *Lactuca sativa*, *Cichorium endivia* y *Cichorium endivia* var. *crispa*; las verduras que no forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Lactuca sativa*, *Spinacia oleracea*, *Brassica oleracea* var. *acephala*, además de *Brassica oleracea* var. *gemmifera*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Brassica oleracea* var. *italica* y *Eruca sativa*.

- 30 En otra realización preferida, el uso de la composición de la invención se caracteriza por que se aplica a las plantas vía foliar o vía suelo. Cuando la aplicación es vía foliar, ésta se realiza mediante pulverización y cuando la aplicación es vía suelo, ésta se aplica disuelta en el agua de riego.

- 35 Los ejemplos que se describen a continuación tienen como objetivo ilustrar la presente invención, pero sin limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1.

Para analizar cómo afecta la aplicación de NBPT, y su consiguiente inhibición de la ureasa endógena de las plantas, al metabolismo del nitrógeno cuando dichas plantas reciben amonio o nitrato como única fuente de nitrógeno se han llevado a cabo ensayos en plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) cultivadas en condiciones de hidroponía pura. Para este estudio, se utilizaron semillas de guisante (*Pisum sativum* L.), de la variedad comercial Snap-pea, que se esterilizaron para evitar la formación de nódulos en las raíces mediante el método descrito en Labhili et al., 1995. Plant Science. Volumen 112. Pags. 219–230.

Las semillas de guisante se germinaron en bandejas con una base de vermiculita: perlita en una proporción 2:1, en cámara de luces a una temperatura de 25°C durante el día y de 18 °C durante la noche, con una humedad relativa del 80 % aproximadamente, 16 horas de luz y una intensidad lumínica de 375 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Trascurridos 15 días se traspasaron a condiciones de cultivo hidropónico puro. Los cultivos hidropónicos o hidroponía se definen como una técnica de cultivo de plantas en la que no se utiliza el suelo, sino un medio inerte, al cual se añade una solución de nutrientes que contiene todos los elementos esenciales vitales por la planta para su normal desarrollo. Puesto que muchos de estos métodos hidropónicos emplean algún tipo de medio de cultivo se les denomina a menudo “cultivo sin suelo”, mientras que el cultivo solamente en agua sería el verdadero cultivo hidropónico puro. Los cultivos hidropónicos tienen como objetivo principal eliminar o disminuir los factores limitantes del crecimiento vegetal asociados a las características del suelo, sustituyéndolo por otros soportes de cultivo y aplicando técnicas de fertilización alternativas.

Los cultivos hidropónicos consistían en seis tanques de 8 litros de capacidad en los que se colocaron ocho plantas por tanque (estimación de 1L por planta). La composición de la solución nutritiva empleada para el crecimiento del cultivo está basada en la descrita por Rigaud, Puppo, 1975. Journal of General Microbiology. Volumen 88. Pags. 223–228, y está libre de nitrógeno. La composición nutritiva “base” utilizada se detalla en la **Tabla 2**. Los grupos de tratamiento se establecieron en función de la fuente nitrogenada suministrada, nitrato NO_3^- (en forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) o amonio NH_4^+ (en forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y de la presencia o no de inhibidor de la ureasa, específicamente el NBPT (Apollo Scientific Ltd. UK) en la solución nutritiva. La concentración de NBPT utilizada en la solución nutritiva del grupo tratado con dicho inhibidor es de 100 μM . El compuesto que proporcionaba la fuente

nitrogenada, es decir el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (para NO_3^-) o el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (para NH_4^+), se adicionó en una cantidad adecuada para lograr que la concentración final de nitrógeno en el tanque fuese de 1,5 mM. La solución madre (solución acuosa) del inhibidor de la ureasa, NBPT, se realizó en agua unos días antes de su uso para favorecer su oxidación, ya que este inhibidor en su forma oxidada presenta una mayor eficacia.

Tabla 2. Contenido en macronutrientes y micronutrientes de las soluciones nutritivas utilizadas.

Macronutrientes	g L ⁻¹	Micronutrientes	mg L ⁻¹
K_2HPO_4	0,2	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1
KCl	0,2	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,12	H_3BO_3	1
$\text{Na}_2\text{Fe EDTA}$	0,025	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,08
CaCO_3	0,5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,03
		$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05
		$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,03
		KI	0,01

Las plantas se mantuvieron en cultivo hidropónico durante 3 semanas, reemplazando la solución nutritiva cada semana por una nueva de idéntica composición. El tratamiento con NBPT únicamente fue aplicado durante los últimos 9 días de crecimiento. Las plantas alcanzaron un estado de desarrollo de tres pisos. Tras este periodo se tomaron muestras de material vegetal, de cada planta se recogieron varias muestras de aproximadamente 0,2 g de cada una de ellas, tanto de las hojas, como de las raíces, que se congelaron inmediatamente en N_2 líquido y posteriormente fueron almacenadas a una temperatura de -80°C hasta la realización de los análisis correspondientes.

Como se puede observar en la **Tabla 3**, el tratamiento de los cultivos con NBPT (100µM) durante los últimos 9 días de crecimiento no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas (biomasa). Para la obtención de los resultados mostrados en la Tabla 3 se realizó el test de la Varianza (ANOVA) de dos vías y los niveles de significación que dan

diferencia significativa son: al 90% (*), al 95% (**), al 99% (***), ns: no significativo. El número de muestras analizado varió de 7 a 8.

Tabla 3. Biomasa total (expresado como gramos peso seco) de plantas de guisante cultivadas en hidroponía pura con nitrato o amonio y no tratadas (control) o tratadas con 100µM de NBPT durante los últimos 9 días de crecimiento.

		Biomasa Total (Peso seco g)
Nitrato	control	0.47
	NBPT	0.46
Amonio	control	0.37
	NBPT	0.34
N		**
I		ns
N*I		ns

N: efecto de la fuente de nitrógeno sobre los parámetros analizados; I: efecto de la aplicación de NBPT en el contenido de los parámetros mostrados; N*I: efecto de la interacción entre la fuente de nitrógeno y la aplicación o no de NBPT.

A continuación se analizó el efecto de los tratamientos nitrogenados y del NBPT sobre diferentes parámetros del metabolismo de las propias plantas. Como se puede observar en las **Tablas 4 y 5**, los resultados obtenidos de las muestras analizadas para cada uno de los tratamientos nitrogenados ponen de manifiesto que las plantas cultivadas en presencia de nitrato o de amonio muestran, en términos del metabolismo del nitrógeno, diferente respuesta metabólica a la aplicación de NBPT. Además, otros parámetros relacionados con el metabolismo del carbono y su interacción con el del nitrógeno, así como la composición aminoacídica, se ven afectados de forma diferente por la aplicación del NBPT, en función de si la planta es cultivada con nitrato o con amonio. Estos resultados sugieren principalmente un distinto grado de activación del catabolismo del aminoácido arginina en las plantas crecidas en presencia de nitrato frente a las crecidas en presencia de amonio. El test estadístico utilizado para el análisis de los resultados obtenidos y mostrados en la Tablas 2 y 3 ha sido el test de la Varianza (ANOVA) de dos vías y los niveles de significación son: 90% (*), 95% (**) y 99% (***).

Además, en la **Tabla 4** se pone de manifiesto que en las plantas cultivadas en presencia de nitrato (1,5 mM) y de NBPT (100 µM) presentan una menor acumulación de nitrato (expresado en µmol de NO₃⁻ g⁻¹ de peso seco) medido en las hojas (99.3±15.3), específicamente un 50% menos que las plantas cultivadas en presencia de nitrato (1,5 mM) pero sin NBPT (plantas control) (200.9±3.9), diferencia estadísticamente significativa, sin alterar el contenido proteico y el porcentaje de nitrógeno total de los tejidos, parámetros valorados nutricionalmente.

Tabla 4. Contenidos de urea, amonio, nitrato, huella isotópica de nitrógeno (δ¹⁵N), proteína soluble y aminoácidos en hojas de plantas de guisante cultivadas en hidroponía pura con nitrato o amonio y no tratadas (control) o tratadas con 100µM de NBPT. Los contenidos se expresan en base al peso seco (µmol g⁻¹ peso seco).

		Hojas						
		Urea (µmol/g)	Amonio (µmol/g)	Nitrato (µmol/g)	δ ¹⁵ N (‰)	Proteína (µmol/g)	Aminoácidos (µmol/g)	Nitrógeno (%)
Nitrato	control	2.6	6.0	200.9	3.1	238	254	5.8
	NBPT	4.5	13.9	99.3	1.2	229	293	6.1
Amonio	control	10.4	9.9	1.2	-9.5	224	288	6.6
	NBPT	14.0	17.9	1.4	-9.0	258	267	6.2
N		***	***	***	***	ns	ns	***
I		***	***	***	***	ns	ns	ns
N*I		ns	ns	***	***	*	ns	***

El parámetro de huella isotópica de nitrógeno, δ¹⁵N sirve como otro indicador diferente del contenido de nitrato no asimilado (“no convertido” en nitrógeno orgánico) en hojas (véase Werner, Schmidt, 2002. Phytochemistry Volumen 61. Pags 465-484). N: efecto de la fuente del nitrógeno en el contenido de los parámetros mostrados. I: efecto de la aplicación de NBPT en el contenido de los parámetros mostrados. N*I: efecto de la interacción entre la fuente de nitrógeno y la aplicación o no de NBPT. ns: no significativo.

Tabla 5. Contenidos de urea, amonio, nitrato, proteína soluble y aminoácidos en raíces de plantas de guisante cultivadas en hidroponía pura con nitrato o amonio y no tratadas (control) o tratadas con 100µM de NBPT. Los contenidos se expresan en base al peso seco (µmol g⁻¹ peso seco).

5

		Raíces				
		Urea (µmol/g)	Amonio (µmol/g)	Nitrato (µmol/g)	Proteína (µmol/g)	Aminoácidos (µmol/g)
Nitrato	control	9.6	5.3	724.1	68	44
	NBPT	11.8	6.1	762.9	76	57
Amonio	control	12.3	68.0	2.6	70	128
	NBPT	21.1	32.0	3.8	76	121
N		***	***	***	ns	***
I		***	***	ns	***	ns
N*I		**	***	ns	ns	**

N: efecto de la fuente del nitrógeno en el contenido de los parámetros mostrados. I: efecto de la aplicación de NBPT en el contenido de los parámetros mostrados. N*I: efecto de la interacción entre la fuente de nitrógeno y la aplicación o no de NBPT. ns: no significativo.

10

Ejemplo 2.

Dado que la acumulación de nitrato tiene especialmente interés en las hortalizas de hoja y éstas se cultivan principalmente en suelo, se realizó un ensayo en el que se evaluó el efecto de la inhibición de la ureasa, mediante el uso del inhibidor NBPT, que se aplicó vía suelo, a un cultivo de lechugas tipo Batavia desarrollado en macetas de un litro en un túnel invernadero ubicado en Tafalla (España). Para ello, en mayo de 2012 se realizaron semilleros de la variedad Nagore en bandejas alveoladas. Tres semanas más tarde las plantas fueron trasplantadas a macetas de un litro con turba profesional enriquecida y con pH corregido a 6.5.

El grupo de lechugas control fue fertilizado con nitrato potásico, aplicando a cada una de las macetas 5 mL de una solución 0,1 M de nitrato potásico. El grupo de lechugas tratado con el inhibidor de la ureasa NBPT, además de suministrarle la misma dosis de nitrato potásico que al grupo control, también se le administró 5 ml de una solución acuosa de NBPT que

presenta una concentración equivalente a la aplicación de una dosis de 2,5 mg de NBPT por maceta. Dichos tratamientos se aplicaron a los cultivos transcurridas dos semanas desde el trasplante, cuando las lechugas alcanzaron el 50% de su tamaño final o cuando se encontraban en estado fenológico igual o mayor a 45 según la escala internacional BBCH (Bleiholder et al., 1989. Gesunde Pflanzen. Volumen 41. Págs. 381-384).

Los cultivos (**Figura 1**) fueron regados por microaspersión cuando la humedad de las macetas descendía de 1/4 de la capacidad de contenedor. A los 15 días de la aplicación de cada tratamiento se procedió a la recolección de las plantas que fueron pesadas y a la determinación de su contenido en nitrato en la parte aérea (**Tabla 6 y Figuras 2 y 3**).

Tabla 6. Peso fresco y peso seco de lechugas control y tratadas con NBPT (2.5 mg/maceta), aplicado en el suelo, y crecidas en maceta. Niveles de significación que dan diferencia significativa: al 90% (*), al 95% (**), al 99% (***).

	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Control	148 ± 7 a	7.8 ± 0.13 a
NBPT	155 ± 3 a	8.2 ± 0.13 b*

La mayor diferencia entre las lechugas del grupo control frente a las lechugas tratadas con NBPT aplicado vía suelo fue la importante reducción en el contenido de nitratos de las lechugas que habían sido tratados con el inhibidor de la ureasa, NBPT vía suelo, que vieron reducido su contenido en nitrato en la parte aérea, es decir, en las hojas, en aproximadamente un 50% (**Figuras 2 y 3**). Esto es, en términos numéricos expresados en ppm de NO₃⁻ expresado en peso seco, 2802 para las plantas tratadas con NBPT frente a 5445 para las no tratadas con NBPT (diferencia estadísticamente significativa a un nivel de significación del 95%, véase Figura 2).

A continuación, se realizó un ensayo en el que se evaluó el efecto de diferentes dosis del inhibidor de ureasa NBPT, aplicado foliarmente sobre el cultivo en lechugas tipo Batavia cultivadas en suelo en un túnel invernadero ubicado en Tafalla (España). En mayo de 2012 se realizaron semilleros de la variedad Nagore en bandejas alveoladas. Tres semanas más

tarde las plantas fueron trasplantadas al suelo dentro a un marco de 25x25 en dos líneas pareadas sobre acolchado de polietileno blanco dentro un túnel invernadero con cubierta de polietileno térmico. El suelo era muy fértil, ligeramente alcalino, franco, profundo y en el que habitualmente se cultivan hortalizas de hoja de manera intensiva. El suelo había sido
 5 abonado en fondo con 25 kg del fertilizante Nitrofoska/400 m². Las plantas fueron regadas por microaspersión cuando la humedad del suelo descendía de 1/5 de la capacidad de campo. A las tres semanas del trasplante cuando las lechugas alcanzaron el 50% de su tamaño final o cuando se encontraban en estado fenológico igual o mayor a 45 según la
 10 escala internacional BBCH, al grupo de lechugas tratadas con NBPT se les administró sobre las hojas mediante pulverización, 500 ml de una solución acuosa de NBPT a una concentración de 2 mg/mL. Dicha solución acuosa presentaba además del NBPT un surfactante, el Luqmullant (Luqsa, Lleida), a la concentración recomendada por el fabricante, para que el inhibidor penetrase más fácilmente en las hojas de los cultivos. Esta
 15 dosificación es equivalente a la aplicación de 200 g de NBPT por Hectárea. A los 14 días de la aplicación se procedió a la recolección de las plantas que fueron pesadas y a la determinación de su contenido en nitrato en la parte aérea (**Tabla 7 y Figuras 4 y 5**).

Tabla 7. Peso fresco y seco de lechugas (n=12), crecidas en suelo, no tratadas y tratadas
 20 con NBPT aplicado foliarmente. Test estadístico utilizado: Niveles de significación que dan diferencia significativa: al 90% (*), al 95% (**), al 99% (***).

	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Control	449 ± 13 a	19 ± 0.5 a
NBPT	418 ± 15 a	17 ± 0.6 b*

25 Todas las plantas alcanzaron calidad comercial. La diferencia más importante entre los cultivos de lechugas control o tratadas foliarmente con NBPT fue la disminución en el contenido de nitratos en la parte aérea de las plantas, en aproximadamente un 30% (**Figuras 4 y 5**). Esto es, en términos numéricos expresados en ppm de NO₃⁻ expresado en
 30 peso seco, 36709 para las plantas tratadas con NBPT frente a 25960 para las no tratadas con NBPT (diferencia estadísticamente significativa a un nivel de significación del 95%, véase **Figura 4**).

Con el fin de verificar la garantía de la seguridad alimentaria de los cultivos tras la aplicación del método de disminución de nitratos en los tejidos de cultivos hortícolas a través de la aplicación de NBPT, objeto de la presente invención, se realizó la determinación del contenido de la molécula química aplicada, NBPT, en los tejidos vegetales tanto en los
5 ensayos de aplicación de NBPT vía suelo, como en los ensayos de aplicación foliar. Dicho compuesto no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas para cada tratamiento (n=3). La determinación de la presencia de NBPT en las hortalizas analizadas se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray (HPLC-ESI-MS), cuyo límite de detección
10 (sensibilidad de la técnica) es de 125 ppb (expresado sobre peso fresco). De esta manera se puede concluir que la aplicación del método descrito en la presente invención para la reducción de la concentración de nitratos en tejidos vegetales, preferentemente, hortalizas, cuando estas se encuentran en estado fenológico ≥ 45 según la Escala Internacional BBCH, que es aproximadamente al menos 15 días antes de la cosecha, no altera la garantía de
15 seguridad alimentaria del alimento, convirtiéndolo en apto para su consumo inmediato también en fresco.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la reducción de la concentración de nitratos en especies hortícolas cultivables caracterizado por la administración de al menos un inhibidor de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) sobre dichos cultivos de especies hortícolas cuando éstos se encuentran en estado fenológico ≥ 45 según la Escala Internacional BBCH.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que los inhibidores de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) son análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 caracterizado por que los inhibidores de la ureasa del tipo análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: fosforoamidas, tiofosforoamidas, hidroquinonas y benzoquinonas.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 caracterizado por que el inhibidor de la enzima ureasa es el N-(n-butil) tiofósforo triamida (NBPT).
5. Método según la reivindicación 4 caracterizado por que el NBPT se utiliza en estado oxidado (NBPTO).
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 caracterizado por que la concentración de inhibidor de la enzima ureasa utilizado varía de entre 100-400 g de inhibidor por hectárea de cultivo de especie hortícola.
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 caracterizado por que las especies hortícolas cultivables se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: hortalizas de plantas bulbosas, hortalizas de raíz y tubérculo, verduras que forman cabeza y verduras que no forman cabeza.
- 35 8. Método según la reivindicación 7 caracterizado por que las hortalizas de plantas bulbosas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Allium cepa*, *Allium porrum*, *Allium sativum* y *Allium ascalonicum*; las hortalizas de raíz y tubérculo se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Daucus carota*, *Scorzonera*

hispánica, Cichorium intybus, Raphanus sativus, rabanillo, *Dasyatis pastinaca*, *Brassica napus*, *Brassica napus* var. *napobrassica*, *Apium graveolens*, *Brassica napus* var. *rapifera*, *Brassica oleracea* var. *Gongylodes*; las verduras que forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica oleracea* var. *sabauda*, *Brassica campestris* var. *Pekinensis*, *Lactuca sativa*, *Cichorium endivia* y *Cichorium endivia* var. *crispa*; las verduras que no forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Lactuca sativa*, *Spinacia oleracea*, *Brassica oleracea* var. *acephala*, además de *Brassica oleracea* var. *gemmifera*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Brassica oleracea* var. *italica* y *Eruca sativa*.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 caracterizado por que el inhibidor de la ureasa se aplica a los cultivos hortícolas vía foliar o vía suelo.

10. Método según la reivindicación 9 caracterizado por que cuando la aplicación es vía foliar el inhibidor de la ureasa se aplica conjuntamente con un surfactante.

11. Método según la reivindicación 10 caracterizado por que la aplicación del inhibidor conjuntamente con un surfactante se realiza mediante pulverización.

12. Método según la reivindicación 9 caracterizado por que cuando la aplicación es vía suelo el inhibidor de la ureasa se aplica disuelto en el agua de riego.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 caracterizado por que en los cultivos de especies hortícolas se puede aplicar además, previamente a la adición del inhibidor de la ureasa, un fertilizante nitrogenado o un fertilizante orgánico.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 caracterizado por que la disminución en la concentración de nitratos en los cultivos de especies hortícolas tratados con un inhibidor de la enzima ureasa, varía entre un 30-60% respecto a los cultivos de especies hortícolas no tratados con un inhibidor de la enzima ureasa.

15. Uso de al menos un inhibidor de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) para la reducción de la concentración de nitratos en especies hortícolas cultivables caracterizado

por que dicho inhibidor se administra sobre dichos cultivos de especies hortícolas cuando éstos se encuentran en estado fenológico ≥ 45 según la Escala Internacional BBCH.

- 5 16. Uso según la reivindicación 15 caracterizado por que los inhibidores de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) son análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados.
- 10 17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15-16 caracterizado por que los inhibidores de la ureasa del tipo análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: fosforoamidas, tiofosforoamidas, hidroquinonas y benzoquinonas.
- 15 18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15-17 caracterizado por que el inhibidor de la enzima ureasa es el NBPT.
- 20 19. Uso según la reivindicación 18 caracterizado por que el NBPT se utiliza en estado oxidado (NBPTO).
- 25 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15-19 caracterizado por que la concentración de inhibidor de la enzima ureasa utilizado varía de entre 100-400 g de inhibidor por hectárea de cultivo de especie hortícola.
- 30 21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15-20 caracterizado por que las especies hortícolas cultivables se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: hortalizas de plantas bulbosas, hortalizas de raíz y tubérculo, verduras que forman cabeza y verduras que no forman cabeza.
- 35 22. Uso según la reivindicación 21 caracterizado por que las hortalizas de plantas bulbosas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Allium cepa*, *Allium porrum*, *Allium sativum* y *Allium ascalonicum*; las hortalizas de raíz y tubérculo se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Daucus carota*, *Scorzonera hispánica*, *Cichorium intybus*, *Raphanus sativus*, rabanillo, *Dasyatis pastinaca*, *Brassica napus*, *Brassica napus* var. *napobrassica*, *Apium graveolens*, *Brassica napus* var. *rapifera*, *Brassica oleracea* var. *Gongylodes*; las verduras que forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Brassica oleracea*

var. capitata, *Brassica oleracea* var. sabauda, *Brassica campestris* var. Pekinensis, *Lactuca sativa*, *Cichorium endivia* y *Cichorium endivia* var. crispata; las verduras que no forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Lactuca sativa*, *Spinacia oleracea*, *Brassica oleracea* var. acephala, además de *Brassica oleracea* var. gemmifera, *Brassica oleracea* var. botrytis, *Brassica oleracea* var. italica y *Eruca sativa*.

23. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15-22 caracterizado por que el inhibidor de la ureasa se aplica a los cultivos hortícolas vía foliar o vía suelo.

24. Uso según la reivindicación 23 caracterizado por que cuando la aplicación es vía foliar el inhibidor de la ureasa se aplica conjuntamente con un surfactante.

25. Uso según la reivindicación 24 caracterizado por que la aplicación del inhibidor conjuntamente con un surfactante se realiza mediante pulverización.

26. Uso según la reivindicación 23 caracterizado por que cuando la aplicación es vía suelo el inhibidor de la ureasa se aplica disuelto en el agua de riego.

27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15-26 caracterizado por que en los cultivos de especies hortícolas se puede aplicar además, previamente a la adición del inhibidor de la ureasa, un fertilizante nitrogenado o un fertilizante orgánico.

28. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15-27 caracterizado por que la disminución en la concentración de nitratos en los cultivos de especies hortícolas tratados con un inhibidor de la enzima ureasa varía entre un 30-60% respecto a los cultivos hortícolas no tratados con el inhibidor de la enzima ureasa.

29. Composición para el cultivo de plantas que comprende al menos un inhibidor de la ureasa (EC 3.5.1.5), sin presencia de ningún compuesto nitrogenado adicional.

30. Composición según la reivindicación 29 en la que el inhibidor de ureasa se encuentra disuelto en una solución acuosa.

31. Composición según la reivindicación 30 caracterizada por que la solución acuosa es agua de riego.

32. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 29-31 caracterizada por que además comprende un surfactante.
- 5 33. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 29-32 caracterizada por que los inhibidores de la enzima ureasa (EC 3.5.1.5) son análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados.
- 10 34. Composición según la reivindicación 33 caracterizada por que los inhibidores de la ureasa del tipo análogos estructurales de la urea y compuestos relacionados se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: fosforoamidas, tiofosforoamidas, hidroquinonas y benzoquinonas.
- 15 35. Composición según la reivindicación 34 caracterizada por que el inhibidor de la enzima ureasa es el N-(n-butil) tiofósforo triamida (NBPT).
36. Composición según la reivindicación 35 caracterizada por que el inhibidor de la enzima ureasa NBPT se encuentra en estado oxidado (NBPTO).
- 20 37. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 29-36 caracterizada por que las especies hortícolas cultivables se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: hortalizas de plantas bulbosas, hortalizas de raíz y tubérculo, verduras que forman cabeza y verduras que no forman cabeza.
- 25 38. Composición según la reivindicación 37 caracterizada por que las hortalizas de plantas bulbosas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Allium cepa*, *Allium porrum*, *Allium sativum* y *Allium ascalonicum*; las hortalizas de raíz y tubérculo se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Daucus carota*, *Scorzonera hispánica*, *Cichorium intybus*, *Raphanus sativus*, rabanillo, *Dasyatis pastinaca*, *Brassica napus*, *Brassica napus* var. *napobrassica*, *Apium graveolens*, *Brassica napus* var. *rapifera*, *Brassica oleracea* var. *Gongylodes*; las verduras que forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica oleracea* var. *sabauda*, *Brassica campestris* var. *Pekinensis*, *Lactuca sativa*, *Cichorium endivia* y *Cichorium endivia* var. *crispa*; las
- 30 35 35 verduras que no forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Lactuca sativa*, *Spinacia oleracea*, *Brassica oleracea* var. *acephala*,

además de *Brassica oleracea* var. *gemmifera*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Brassica oleracea* var. *italica* y *Eruca sativa*.

- 5 39. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 29-38 caracterizada por que se aplica a las plantas vía foliar o vía suelo.
40. Composición según la reivindicación 39 caracterizada por que la aplicación vía foliar se realiza mediante pulverización.
- 10 41. Composición según la reivindicación 40 caracterizada por que la aplicación vía suelo se realiza disuelta junto con el agua de riego.
- 15 42. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 29-41 caracterizada por que la disminución en la concentración de nitratos en las plantas tratadas varía entre un 30-60% respecto a las plantas no tratadas.
- 20 43. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 29-42 caracterizada por que la concentración de inhibidor de la enzima ureasa varía de entre 100-400 g de inhibidor por hectárea de cultivo
- 25 44. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 29-43 para disminuir la concentración de nitratos en plantas.
- 30 45. Uso según la reivindicación 44 caracterizado por que la disminución en la concentración de nitratos en plantas varía entre un 30-60% respecto a las plantas no tratadas.
- 35 46. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 44-45 caracterizado por que las especies hortícolas cultivables se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: hortalizas de plantas bulbosas, hortalizas de raíz y tubérculo, verduras que forman cabeza y verduras que no forman cabeza.
47. Uso según la reivindicación 46 caracterizado por que las hortalizas de plantas bulbosas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Allium cepa*, *Allium porrum*, *Allium sativum* y *Allium ascalonicum*; las hortalizas de raíz y tubérculo se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Daucus carota*, *Scorzonera*

- 5 *hispánica, Cichorium intybus, Raphanus sativus*, rabanillo, *Dasyatis pastinaca*, *Brassica napus*, *Brassica napus* var. *napobrassica*, *Apium graveolens*, *Brassica napus* var. *rapifera*, *Brassica oleracea* var. *gongylodes*; las verduras que forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica oleracea* var. *sabauda*, *Brassica campestris* var. *pekinensis*, *Lactuca sativa*, *Cichorium endivia* y *Cichorium endivia* var. *crispa*; las verduras que no forman cabeza se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: *Lactuca sativa*, *Spinacia oleracea*, *Brassica oleracea* var. *acephala*, además de *Brassica oleracea* var. *gemmifera*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*,
10 *Brassica oleracea* var. *italica* y *Eruca sativa*.
48. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 44-47 caracterizado por que se aplica a las plantas vía foliar o vía suelo.
- 15 49. Uso según la reivindicación 48 caracterizado por que la aplicación vía foliar se realiza mediante pulverización.
50. Uso según la reivindicación 48 caracterizado por que la aplicación vía suelo se realiza disuelta junto con el agua de riego.
- 20 51. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 44-50 caracterizado por que la concentración de inhibidor de la enzima ureasa varía de entre 100-400 g de inhibidor por hectárea de cultivo.
- 25



Figura 1

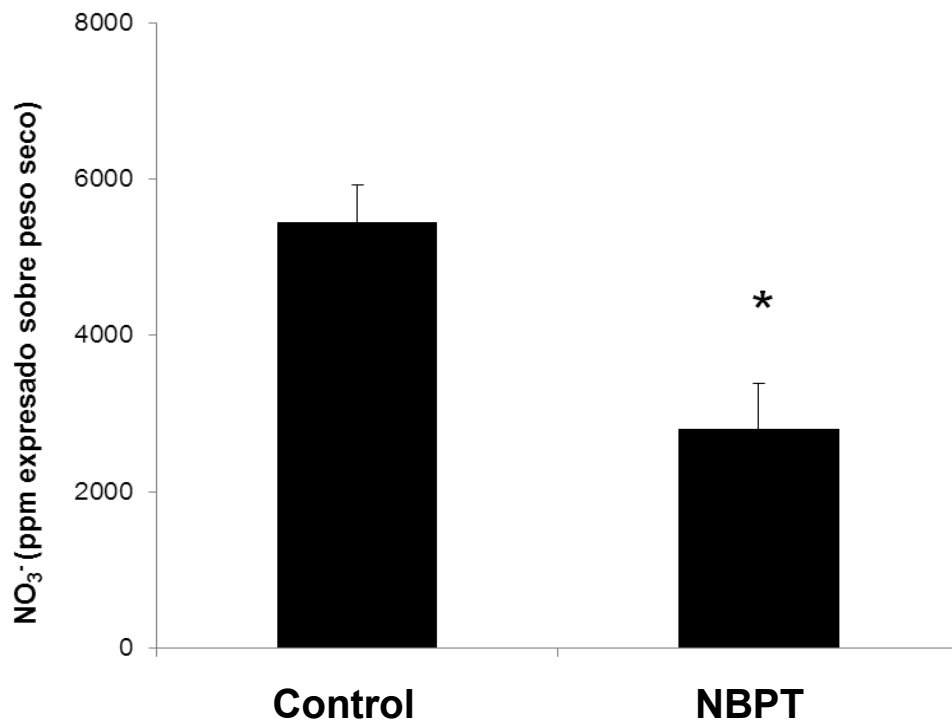


Figura 2

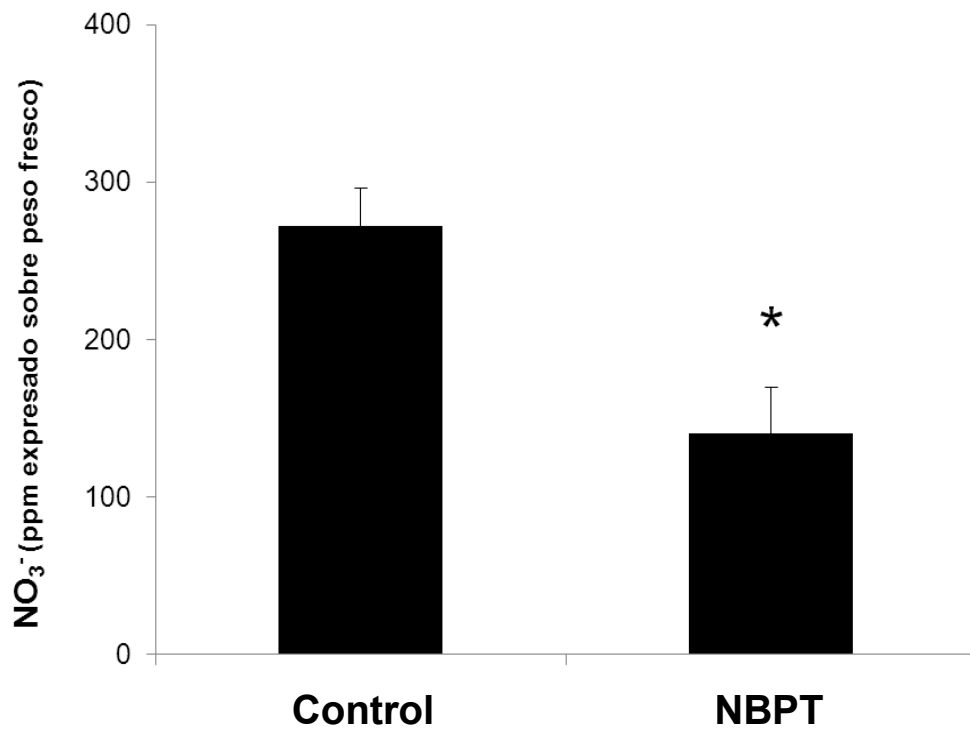


Figura 3

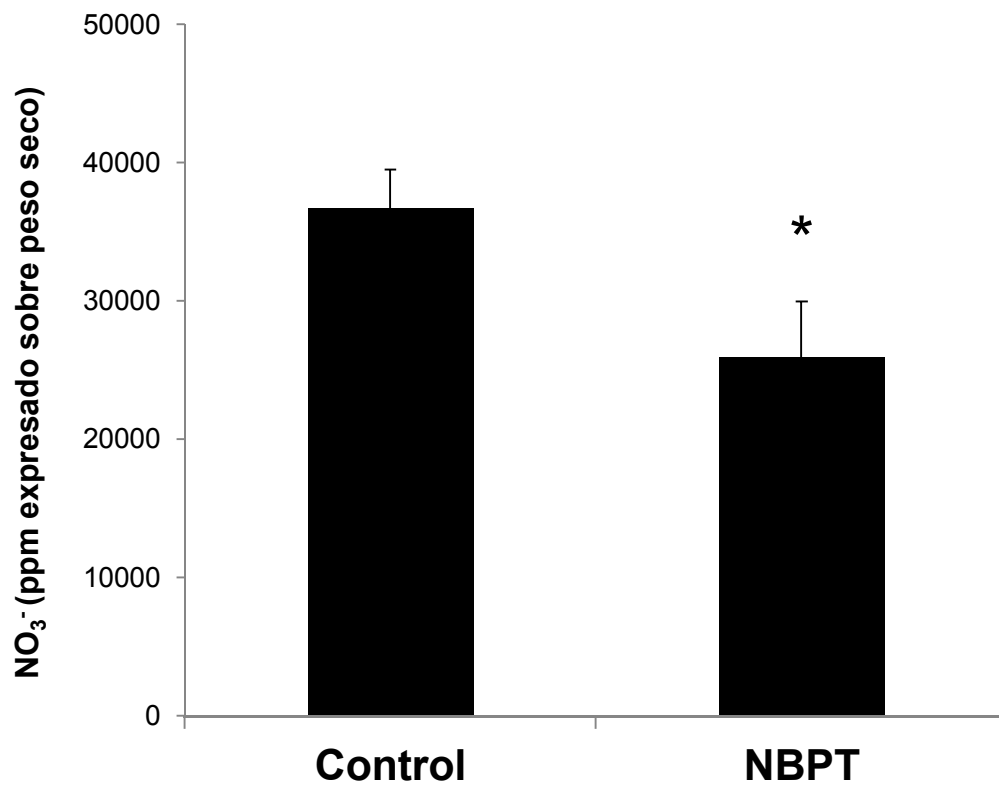


Figura 4

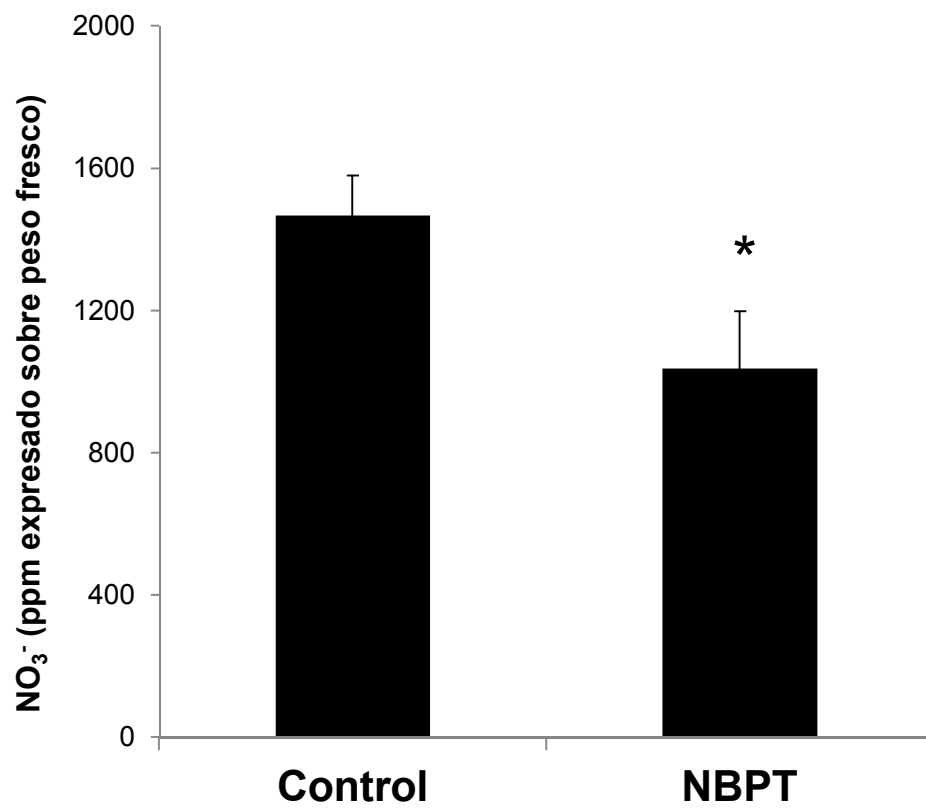


Figura 5



Figura 6



- ②① N.º solicitud: 201330836
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.06.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LI-MIN, C. et al. "Effects of a urease inhibitor NBPT on the growth and quality of rape". 19 th World Congress of Soil Science. Symposium 4.1.2: Management and protection of receiving environments. Soils Solutions for a Changing World, Brisbane, Australia. Agosto 2010. [Publicado en DVD]. Ver páginas 50-52.	1-28
X	"Effects of Nitrification/Urease Inhibitor on Nitrogen Migration, Transformation and Reape Growth". Agricultural Science Paper.) [en línea]. [Registro creado el 01.03.2012]. [Recuperado el 15.10.2014]. Recuperado de Internet: <URL: http://www.agrpaper.com/effects-of-nitrificationurease-inhibitor-on-nitrogen-migration-transformation-and-reape-growth.htm >.	1-28
X	XU, X. et al. "Nitrous oxide and methane emissions during rice growth and through rice plants: effect of dicyandiamide and hydroquinone". Biology and Fertility of Soils 2002, Volumen 36, páginas 53-58. Ver página 53, resumen; página 54, materiales y métodos; página 55, figura 2.	1-3,6,9-17,20, 23-28
X	WO 1997022568 A1 (IMC-AGRIC COMPANY) 26.06.1997, página 1, líneas 4-11; página 12, ejemplo 1.	29,32-43
X	WO 2008000196 A1 (AGRA GROUP, A.S.) 03.01.2008, página 2, líneas 28-30; página 3, líneas 10-14,33-35; página 4, líneas 1-30.	29,33-43
A	RAWLUK, C.D.L. et al. "Uptake of foliar or soil application of ¹⁵ N-labelled urea solution at anthesis and its effect on wheat grain yield and protein". Canadian Journal of Plant Science 2000, Volumen 80, Número 2, páginas 331-334. Ver página 331, resumen.	1-51
A	MONTEMURRO, F. et al. "Effects or urease and nitrification inhibitors application on urea fate in soil and nitrate accumulation in lettuce". Journal of Plant Nutrition 1998, Volumen 21, Número 2, páginas 245-252. Ver página 245, resumen.	1-51
A	DAWAR, K. et al. "Applying urea with urease inhibitor (N-(n-butyl)thiophosphoric triamide) in fine particle application improves nitrogen uptake in ryegrass (Lolium perenne L.)". Soil Science and Plant Nutrition 2012, Volumen 58, Número 3, páginas 309-318. [Disponible en línea el 23.05.2012]. Ver página 309, resumen.	1-51

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.10.2014

Examinador
G. Esteban García

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C05B9/00 (2006.01)

C07F9/22 (2006.01)

A01N57/04 (2006.01)

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

A01N, C05B, C07F

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2, BIOSIS, MEDLINE, GOOGLE SCHOLAR, PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.10.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	5,6,10-12,19,20,24-26,30,31,36,44-51	SI
	Reivindicaciones	1-4,7-9,13-18,21-23,27-29,32-35,37-43	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	30,31,44-51	SI
	Reivindicaciones	1-29,32-43	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LI-MIN, C. et al. Symposium 4.1.2: Management and Protection of receiving environments. Soils for a Changing World, Brisbane, Australia. Ver páginas 50-52.	2010
D02	Agricultural Science Paper. Recuperado de Internet: <URL: http://www.agrpaper.com/effects-of-nitrificationurease-inhibitor-on-nitrogen-migration-transformation-and-reape-growth.htm >.	01.03.2012
D03	XU, X. et al. Biology and Fertility of Soils 2002. Vol. 36, pp. 53-58.	2002
D04	WO 1997022568 A1 (IMC-AGRICO COMPANY)	26.06.1997
D05	WO 2008000196 A1 (AGRA GROUP, A.S.)	03.01.2008
D06	RAWLUK, C.D.L. et al. Canadian Journal of Plant Science 2000, Vol. 80, Nº 2, pp. 331-334	2000

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

El objeto de la invención es un **método** para la reducción de la concentración de nitratos en especies hortícolas cultivables por medio de un inhibidor de la enzima ureasa; el **uso** de un inhibidor de la enzima urea para la reducción de la concentración de nitratos en dichas especies hortícolas; una **composición** para el cultivo de plantas que comprende al menos un inhibidor de la ureasa sin ningún otro compuesto nitrogenado adicional; y el **uso** de dicha composición para disminuir la concentración de nitratos en plantas.

Novedad (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes 11/1986):

El documento D01 divulga un estudio sobre los efectos de añadir un inhibidor de ureasa, como es NBPT (N-(*n*-butil)tiofósforo triamida), a la urea, en el crecimiento y la calidad de plantas de colza (ver página 50, resumen). Los resultados demostraron que el NBPT aplicado sobre el suelo disminuía la concentración de nitratos en los cultivos, que fueron cosechados 40 días después del tratamiento, en un porcentaje que varía aproximadamente entre el 4 y el 33 % (ver página 50, métodos; página 52, conclusión).

Por lo tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-4, 7-9, 13-18, 21-23, 27, 28** no es nuevo según lo divulgado en el documento D01.

El documento D02 divulga la utilización de inhibidores biológicos para controlar la hidrólisis de urea y la nitrificación del nitrógeno, así como para reducir la acumulación excesiva de nitratos en plantas. Así, se realizaron experimentos en el tratamiento de cultivos de colza con urea a la que se habían añadido dicianamida (DCD) como inhibidor de nitrificación y N-(*n*-butil)tiofósforo triamida (NBPT), como inhibidor de ureasa, juntos o por separado. Los experimentos mostraron que la adición de NBPT mejoraba el rendimiento del cultivo, además de reducir la acumulación de nitratos en un 32,63% (ver resumen).

Por consiguiente, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-4, 7-9, 13-18, 23, 27, 28** no presenta novedad según lo divulgado en el documento D02.

El documento D03 divulga un estudio sobre el efecto del inhibidor de ureasa hidroquinona (HQ) y el inhibidor de nitrificación dicianamida (DCD) sobre las emisiones de N₂O y CH₄ durante el crecimiento del arroz y a través de las plantas, en el que se demostró que la presencia de estos inhibidores reducía dichas emisiones, mientras que el contenido de nitratos de las plantas variaba de la misma manera (ver página 53, resumen). La aplicación de los inhibidores se llevó a cabo mezclándolos con el suelo que previamente se había tratado con K₂HPO₄ y urea, y en el que se introdujeron las plantas de arroz de 20 días (ver página 54, materiales y métodos). La presencia de HQ junto a urea dio lugar a una disminución del contenido de nitrato en las partes aéreas de las plantas de arroz durante las distintas etapas del crecimiento (ver página 55, figura 2).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-3, 9, 13-17, 23, 27, 28** no es nuevo a la luz de lo divulgado en el documento D03.

El documento D04 divulga una composición que comprende una fosforamida en un disolvente que puede ser un glicol o derivado de glicol, o en una mezcla de disolventes formadas por dichos glicoles y una amida líquida, pudiendo contener, en ambos casos, surfactantes no iónicos, como son alquilarilpoliéter alcoholes (ver página 1, líneas 4-11). En concreto, se divulgan las composiciones concentradas que comprenden N-(n-butil)tiofósforo triamida (NBPT) como ingrediente activo, que actúa como inhibidor de la enzima ureasa (ver página 12, ejemplo 1).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **29, 32-35, 37-43** no es nuevo según lo divulgado en el documento D04.

El documento D05 divulga una composición que contiene al menos una N-alquiltiofósforotriamida, como es N-(n-butil)tiofósforo triamida (NBPT) en diversas concentraciones (ver página 4, líneas 1-11), y un sistema disolvente que comprende uno o más éteres glicólicos, preferiblemente, dietilenglicol monometiléter (ver página 2, líneas 28-30; página 3, líneas 10-14 y 33-35), y que son miscibles con agua y útiles para su aplicación en agricultura, pudiendo ser añadidas a fertilizantes que contienen urea (ver página 4, líneas 13-30).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **29, 33-35, 37-43** no presenta novedad respecto a lo divulgado en el documento D05.

Actividad inventiva (Artículo 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986):

Las reivindicaciones **5 y 19** se refieren a la utilización de NBPT en estado oxidado (**NBPTO**) en el método de la invención. Aunque esta característica técnica no se halla recogida en los documentos D01-D03, es sobradamente conocido en el estado de la técnica que el NBPTO, al igual que el NBPT, actúa como inhibidor de ureasa, por lo que se considera que el experto en la materia se plantearía, a la luz de lo divulgado en cualquiera de los documentos D01 y D02, su utilización en el método de la invención, sin que ello requiriera el ejercicio de actividad inventiva por su parte.

Siguiendo el mismo razonamiento, la reivindicación **36**, que se refiere a una **composición** que comprende NBPT en estado oxidado (NBPTO), carece de actividad inventiva según lo divulgado en cada uno de los documentos D04 y D05, tomados por separado.

Las reivindicaciones **10, 11, 24 y 25** se refieren a la aplicación foliar del inhibidor de ureasa junto a un surfactante. A pesar de que ninguno de los documentos citados D01- D03 recoge esta posibilidad que, por lo tanto, se considera nueva, la aplicación foliar de fertilizantes y diversos aditivos es de sobra conocida en el estado de la técnica. Así, por ejemplo, el documento D06 divulga la aplicación de urea junto al inhibidor de ureasa NBPT, tanto en el suelo, como por pulverización sobre las hojas de plantas de trigo, en cuyo caso la asimilación de nitrógeno por parte de la planta se ve favorecida por la presencia de un surfactante no iónico, como es el nonilfeniletoxilato (NPE) (ver página 331, resumen).

Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones **10, 11, 24 y 25** carecen de actividad inventiva a la luz de lo divulgado en el estado de la técnica (documentos D01- D03 tomados por separado).

Las reivindicaciones dependientes **6, 12, 20 y 26** se refieren a condiciones concretas de aplicación del método y uso de la invención, como son la cantidad de inhibidor de ureasa utilizado (reivindicaciones **6 y 20**), y la aplicación del mismo vía suelo en el agua de riego (reivindicaciones **12 y 26**). Se considera que la determinación de las condiciones más favorables para la aplicación del método de la invención pertenece a la práctica rutinaria del experto en la materia, por lo que carecen igualmente de actividad inventiva respecto a lo divulgado en cada uno de los documentos D01-D03.

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia la invención recogida en las reivindicaciones dependientes **30 y 31**, que se refieren a una **composición** para el cultivo de plantas sin presencia de ningún compuesto nitrogenado adicional que comprende un inhibidor de ureasa en una **solución acuosa**; como tampoco a la reivindicación independiente **44** (y a las reivindicaciones dependientes **45-51** que dependen de ella), relativa al **uso** de dicha una **composición** para el cultivo de plantas sin presencia de ningún compuesto nitrogenado adicional que comprende un inhibidor de ureasa para disminuir la concentración de nitratos en plantas.

En conclusión, se considera que el objeto de las reivindicaciones **30, 31, 44-51** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.