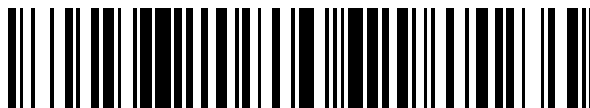


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 626**

21 Número de solicitud: 201301180

51 Int. Cl.:

B09C 1/10

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.12.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.06.2015

71 Solicitantes:

UNIVERSIDADE DE VIGO (60.0%)

Campus Universitario s/n

36310 Vigo (Pontevedra) ES y

UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA (40.0%)

72 Inventor/es:

DOMÍNGUEZ MARTÍN, Jorge;

AIRA VIEIRA, Manuel y

SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, Juan Carlos

54 Título: **Procedimiento para eliminar productos fitosanitarios presentes en suelos**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un procedimiento que utiliza la actividad de las lombrices de tierra para acelerar la eliminación de productos fitosanitarios presentes en el suelo. El procedimiento se aplica particularmente a compuestos organofosforados y piretroides, y explota la secreción de enzimas carboxilesterasas en el tubo digestivo de las lombrices de tierra, además de otras características ecológicas de las lombrices. La inoculación de esta especie en suelos contaminados con residuos de fitosanitarios facilita la degradación de estas sustancias como consecuencia de la acción de la lombriz como "biorreactor dinámico", reduciendo o eliminando las limitaciones de otros sistemas biotecnológicos para alcanzar tal fin, como son la inoculación de microorganismos o la estimulación de las comunidades microbianas existentes en el suelo.

ES 2 538 626 A1

DESCRIPCIÓN**Procedimiento para eliminar productos fitosanitarios presentes en suelos****Sector de la técnica**

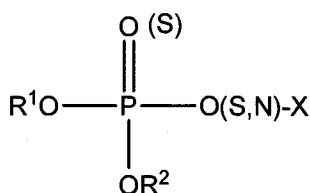
La presente invención se enmarca en el sector agrícola, particularmente en el campo de la
5 la utilización de procedimientos biológicos para eliminar productos fitosanitarios. Más particularmente hace referencia a la utilización de las lombrices de tierra en la biorremediación enzimática de suelos contaminados por plaguicidas organofosforados y piretroides.

10 Estado de la técnica

El uso intensivo de productos fitosanitarios en la agricultura genera un importante riesgo ambiental con repercusiones directas para la salud pública y la calidad del suelo. Entre los efectos adversos descritos en la literatura científica, cabe destacar la contaminación de las
15 aguas superficiales y subterráneas, la alteración de las comunidades de microorganismos que controlan los ciclos de nutrientes del suelo y los efectos tóxicos en los organismos del suelo, incluidos aquellos que participan en el control integrado de plagas.

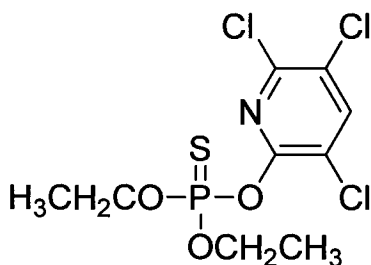
Actualmente, los métodos de recuperación de suelos contaminados por fitosanitarios emplean diversos procedimientos biológicos que, en términos generales, consisten en: (1) incrementar la capacidad de degradación del propio suelo a través de la bio-estimulación
20 de las comunidades de microorganismos naturales; tal estimulación se consigue manipulando las condiciones del suelo (humedad, adición de enmiendas orgánicas, aireación, etc.); (2) liberar microorganismos modificados genéticamente (OMGs) a fin de degradar específica y eficientemente ciertos grupos de fitosanitarios; (3) cultivar especies vegetales que ofrezcan una rizosfera apropiada para la proliferación de microorganismos y
25 liberación de enzimas extracelulares con actividad catalítica sobre los fitosanitarios; y (4) añadir preparados enzimáticos con la capacidad de degradar los fitosanitarios de interés (Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N., Zoppini, A. (2013) Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. Soil Biology and Biochemistry. 58,
30 216–234).

- Estos métodos biotecnológicos comparten una serie de limitaciones relacionadas con la supervivencia de los microorganismos (escasez de nutrientes, humedad del suelo, toxicidad de los fitosanitarios), la accesibilidad de éstos a los fitosanitarios, la regulación ambiental en materia de gestión de OMGs y/o los elevados costes que suponen algunos de estos métodos de biorremediación. En la última década se han explotado diversos sistemas biológicos que proporcionan ventajas adicionales a los ya existentes. En este sentido, las lombrices de tierra han sido utilizadas como agentes de proliferación microbiana ofreciendo una serie de ventajas como la aireación del suelo y el mantenimiento de una comunidad de microorganismos bien desarrollada y estable. Así, estos anélidos han favorecido la biorremediación de suelos contaminados por metales tóxicos y contaminantes orgánicos persistentes (Hickman, Z.A., Reid, B.J. (2008) Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environment International* 34, 1072–1081; Boyer S., Wratten, S.D. (2010) The potential of earthworms to restore ecosystem services after opencast mining – A review. *Basic Applied Ecology* 11:196–203).
- 15 Nuestra invención pretende ofrecer un servicio ambiental en el ámbito agrícola marcado por el bajo coste de su aplicación y su reducido o nulo impacto ambiental. Con la adición de lombrices endogeicas en un suelo tratado con fitosanitarios (o incluso antes de acometer un tratamiento de fitosanitarios) se logra incrementar la degradación de estas sustancias. La invención se centra en la degradación de dos grupos de fitosanitarios de uso común y actual en la agricultura, los plaguicidas organofosforados y los piretroides.
- Los compuestos organofosforados constituyen un amplio grupo de plaguicidas que se presentan como ésteres, tioésteres o tionoésteres derivados del ácido fosfórico, fosfónico, fosfinico o fosforamídico. El esqueleto molecular básico se configura de acuerdo con la fórmula general (I): un átomo de fósforo pentavalente al que se unen dos radicales arilo o alquilo (R^1 y R^2) directamente o a través de átomos de oxígeno o azufre, un grupo X (también denominado grupo saliente) característico de cada organofosforado, y finalmente un átomo de oxígeno o azufre que se une al P con un doble enlace. El grupo X suele ser un radical arilo, alifático, aromático o un heterociclo, y contribuye de forma importante a las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas del insecticida (Sogorb, M.A., Vilanova, E. (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters* 128, 215–228).

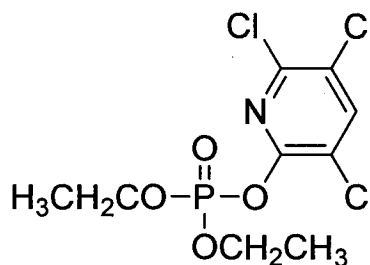


(I)

El nivel de toxicidad de este grupo de plaguicidas lo proporciona el doble enlace “fósforo-oxígeno (ó azufre)”. Así, cuando la molécula se encuentra como “P=S” (ej. clorpirifós) su toxicidad es relativamente baja por presentar una afinidad baja por el sitio activo de su diana tóxica (la enzima acetilcolinesterasa presente en las sinápsis químicas). Sin embargo, cuando el átomo de azufre es sustituido por el oxígeno, la toxicidad de la molécula aumenta hasta 100 veces; a esta forma química o metabolito (P=O) se la denomina “oxon” (ej.: clorpirifós-oxon).

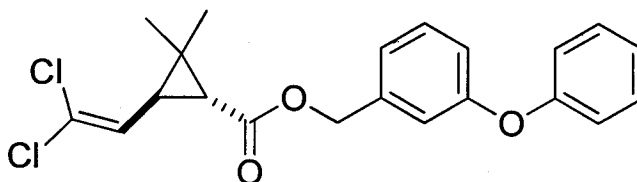
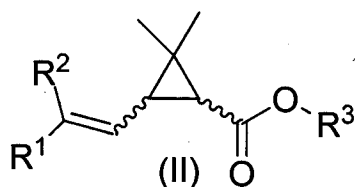


clorpirifos



clorpirifos-oxon

- 10 Los piretroides son insecticidas que derivan estructuralmente de las piretrinas (II): donde R^1 y R^2 son átomos de halógenos o radicales alquilo o arilo, y R^3 es típicamente un grupo alquilo, arilo, o alquilarilo. Son un grupo de sustancias naturales con actividad biocida producidas por las flores de *Chrysanthemum*. Estos fitosanitarios son muy liposolubles y presentan un coeficiente de reparto con el carbono orgánico (K_{OC}) elevado, lo que explica
- 15 que estas moléculas se retengan con facilidad en los complejos orgánicos del suelo. Uno de los piretroides sintéticos más utilizados es la *trans*-permetrina.

*trans*-permetrina

Descripción de la invención

La presente invención describe un procedimiento para la degradación de fitosanitarios organofosforados y piretroides que, por sus propiedades fisicoquímicas, se acumulan en los suelos. El procedimiento de la invención explota la acción de un grupo de enzimas hidrolasas denominadas carboxilesterasas (*Enzyme Commission* no. 3.1.1.1) que son liberadas en el tubo digestivo de una variedad de lombrices de tierra y actúan sobre estos grupos de agroquímicos. Se demuestra y caracteriza, por un lado, la existencia de estas enzimas en el lumen intestinal de la lombriz y, por otro, se muestra la capacidad detoxificante de estas enzimas sobre los fitosanitarios anteriormente mencionados. Estos hallazgos se obtuvieron en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*; garantizando éstos últimos la viabilidad y eficacia del método en condiciones de campo.

El tubo digestivo de las lombrices de tierra ofrece un ambiente anóxico caracterizado por la presencia constante de material organomineral (suelo), mucus, una comunidad de microorganismos simbiote y un cóctel de enzimas digestivas, incluidas las carboxilesterasas, que permiten la degradación y absorción de los nutrientes.

La actividad carboxilesterasa se pone de manifiesto mediante ensayos enzimáticos utilizando múltiples sustratos y técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida y condiciones no desnaturalizantes (zimografías). Una vez demostrada la presencia de esta actividad enzimática en el lumen gastrointestinal de la lombriz, se procede a evaluar su actividad detoxificante hacia los plaguicidas organofosforados y piretroides.

- Las enzimas carboxilesterasas descomponen los compuestos organofosforados a través de la fosforilación del sitio activo de la enzima y la liberación de un radical del plaguicida organofosforado denominado grupo saliente (Figura 1). En consecuencia, la enzima pierde su funcionalidad y no puede catalizar la hidrólisis de otra molécula de organofosforado (inhibición irreversible de la enzima), siendo así un mecanismo de detoxificación saturable (Thompson, C., Richardson, R. (2004) Anticholinesterase insecticides. En: Pesticide Toxicology and International Regulation., eds Marrs TC, Ballantyne B (John Wiley & Sons, Ltd), pp 89–127.). Mediante esta interacción química, denominada detoxificación no catalítica, el insecticida se degrada y es eliminado del suelo.
- En el caso de plaguicidas piretroides como la *trans*-permetrina, cipermetrina, esfenvalerato o deltametrina, la interacción con las enzimas carboxilesterasas origina la formación de los correspondientes ácido y alcohol como consecuencia de la hidrólisis de la función éster del insecticida (Figura 2). Para este tipo de compuestos, el proceso de detoxificación mediado por la enzima está marcado por una simple reacción de hidrólisis, siendo así un proceso no saturable.

Descripción de las figuras

- Figura 1. Mecanismo de inhibición de las enzimas carboxilesterasas sobre compuestos organofosforados.
- Figura 2. Mecanismo de hidrólisis de enzimas carboxilesterasas sobre compuestos piretroides.
- Figura 3. Hidrólisis del fitosanitario *trans*-permetrina por acción de la actividad carboxilesterasa gastrointestinal de la lombriz *Aporrectodea caliginosa*. A) Actividad de hidrólisis en el tejido gastrointestinal y en el contenido intestinal de *Aporrectodea caliginosa*. B) Cinética de hidrólisis del insecticida *trans*-permetrina por la acción de las carboxilesterasas en el tejido gastrointestinal y luminal. C) Ejemplo de perfil cromatográfico que muestra los productos de la hidrólisis de la *trans*-permetrina después de incubar el insecticida en presencia de extracto de tejido gastrointestinal de la lombriz.
- Figura 4. Inhibición de la actividad carboxilesterasa gastrointestinal de la lombriz *Aporrectodea caliginosa* por acción del insecticida organofosforado clorpirifós-oxon. Los geles de electroforesis representan los zimogramas (actividad carboxilesterasa medida en

el propio gel) de muestras de tejido y contenido gastrointestinal de la lombriz en presencia del insecticida clorpirifós-oxon.

Descripción detallada de la invención

- 5 Las lombrices de tierra útiles para el procedimiento de la invención son lombrices de tierra endogeas y/o anécicas pertenecientes a distintas especies. En una realización particular, las lombrices de tierra se seleccionan de entre las especies *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea longa*, *Aporrectodea rosea*, *Aporrectodea trapezoides*, *Aporrectodea tuberculata*, *Dendrobaena madeirensis*, *Dendrobaena octaedra*,
10 *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus castaneus*, *Lumbricus rubellus*, *Lumbricus friendi*, *Lumbricus festivus*, *Octodrilus complanatus*, *Octolasion lacteum*, *Scherotheca gigas* y *Scherotheca savigny*.

EJEMPLO 1

- 15 Se describe la actividad *in vitro* de las enzimas carboxilesterasas aisladas de la lombriz *Aporrectodea caliginosa*. Se detalla la extracción y la actividad inhibidora observada con clorpirifós, como representante del grupo de los organofosforados, y *trans*-permetrina, como representante del grupo de los piretroides.

Extracción y caracterización de la actividad hidrolítica

- 20 La extracción de tejidos de lombrices y material organomineral se describe en Sánchez-Hernández et al. (Sánchez-Hernández, J.C., Mazzia, C., Capowiez, Y., Rault, M. (2009) Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications. Comparative Biochemistry and Physiology. 150C, 503-511.) La actividad hidrolítica de las enzimas se caracterizó mediante técnicas espectrofotométricas en
25 microplacas y utilizando una batería de ésteres carboxílicos como sustratos (α -naftil acetato, β -naftil butirato, 4-nitrofenil acetato, 4-nitrofenil butirato y 4-nitrofenil valerato). Las actividades enzimáticas se realizan bajo aquellas condiciones analíticas propias de la fisiología del animal (pH=7.4 y 22°C). El uso de múltiples sustratos se justifica por la presencia, tanto en el tejido gastrointestinal como en el contenido luminal, de varias

isoenzimas con una marcada variación en la capacidad de hidrólisis de los sustratos seleccionados.

Los extractos de tejido gastrointestinal y contenido luminal contienen múltiples formas (isoenzimas) que contribuyen a la actividad esterásica total. Estas isoenzimas fueron separadas utilizando geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Las electroforesis se realizaron utilizando equipos de electroforesos vertical Bio-Rad Tetra Cell (Bio-Rad, USA). Las muestras (10 µl) se cargan en el gel de apilamiento (4% acrilamida) y se separan en un gel al 12.5 % y de 0.75 mm de grosor. Las condiciones de electroforesis están descritas en Sánchez-Hernández et al. (Sánchez-Hernández, J.C., Mazzia, C., Capowiez, Y., Rault, M. (2009) Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 150C, 503-511.). Las bandas con actividad carboxilesterasa se evidencian en el propio gel incubándolo durante 30 min en placas de Petri a 22-23°C (agitación continua) en presencia de tampón fosfato de sodio 0.1M (pH=6.5), una solución de 0.5 mg/ml de α -naftil acetato o α -naftil butirato y 25 mg de la sal Fast Blue RR. La sensibilidad de las distintas isoenzimas que se separan en el gel a la inhibición causada por insecticidas organofosforados o carbamatos puede ser explorada en el mismo gel; para ello y una vez terminada la electroforesis, el gel se trata de la siguiente manera:

- Lavado del gel con 50 ml de tampón fosfato sódico 0.1 M (pH 6.5) durante 10 min.
- Incubación del gel con 50 ml de tampón fosfato sódico 0.1 M (pH 6.5) conteniendo el insecticida (2×10^{-5} M chlorpirifós-oxon o bien 10^{-4} M carbofurano) durante 30 min.
- Dos lavados (5 min cada uno) con 50 ml de tampón fosfato sódico 0.1 M (pH 6.5).
- Incubación del gel en 50 ml de tampón fosfato sódico 0.1 M (pH 6.5) conteniendo α -NA (ó α -NB) y Fast Blue RR durante 15 min.
- Lavado del gel con agua destilada.

Finalmente, el gel se escanea utilizando el sistema de captura de imágenes de Bio-Rad Gel DocTM EZ Imager system y las bandas se identifican y analizan con el programa informático *Image Lab* (version 3.0.1, Bio-Rad Laboratories).

Para examinar la capacidad detoxificante de las carboxilesterasas del tubo digestivo de la lombriz, se emplearon: a) *trans*-permetrina como representante de la clase de los piretroides, y b) clorpirifós como representante del grupo de organofosforados

5 a) *trans*-Permetrina

La hidrólisis de la *trans*-permetrina se determinó siguiendo el procedimiento de Ross et al. (Ross, M., Borazjani, A., Edwards, C., Potter, P. (2006) Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochemical Pharmacology* 71, 657-669). La muestra (20 µl) se incubó con 70 µl de tampón Tris-HCl 50 mM (pH=7.4) y 10 µl de *trans*-permetrina (500 µM, concentración final) durante 60 minutos a 22°C. La reacción de hidrólisis se detiene con la adición de 100 µl de acetonitrilo frío conteniendo 4 µM de 3-(4-metoxi)-fenoxibenzaldehído) como estándar interno. Finalmente la muestra se centrifuga (16.000 g, 5 min y 4°C) y se inyecta una alícuota de 20 µl en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC Agilent Technologies 1200 Series, Santa Clara CA, USA) para cuantificar el producto formado durante la hidrólisis (alcohol 3-hidroxibenzílico, 3-PBOH). Este analito fue separado en una columna de fase inversa (Kromasil 100 C-8, 150 x 4 mm, 3.5 µm), empleando una fase móvil formada por 90% acetonitrilo:10% H₂O (fase A) y H₂O a pH=1.7 ajustado con 85% H₃PO₄ (fase B). Se utilizó el siguiente gradiente: incremento lineal desde 50:50 (v/v) de fases A:B a 100 de fase B en 10 minutos; mantener durante 5 minutos y retornar a las condiciones iniciales en 1 minuto para equilibrar la columna durante 6 minutos. El flujo de fase móvil fue de 0.5 ml/min y el 3-PBOH se detectó a 230 nm. La cuantificación se realizó empleando una curva de calibrado con el 3-PBOH, preparando los distintos niveles de concentración en soluciones de acetonitrilo 50 mM:Tris-HCl buffer (1:1, v/v) conteniendo el estándar interno.

Los experimentos *in vitro* realizados con los extractos obtenidos del lumen gastrointestinal de la lombriz muestran la capacidad de las carboxilesterasas de hidrolizar la *trans*-permetrina, como piretroide modelo utilizado en este estudio (Figura 3, A). Además la tasa de hidrólisis presenta un comportamiento típico de cinética de Michaelis-Menten (Figura 3, B). El uso de técnicas cromatográficas permitió individualizar los productos de hidrólisis enzimática (Figura 3, C) que no estuvieron presentes cuando la enzima fue

previamente inhibida corroborando, por tanto, su participación en la hidrólisis de la *trans*-permetrina.

b) Clorpirifós

Las reacciones de inhibición irreversible de las carboxilesterasas con clorpirifós se realizó en microplacas de 96 pocillos de fondo plano y 300 µl de volumen final. La mezcla de inhibición consistió en 20–25 µl de la muestra, tampón Tris-HCl 0.1 M (pH=7.4) y la concentración adecuada de clorpirifós. La reacción de inhibición se realizó a 22°C durante 30 minutos y en agitación continua. La actividad carboxilesterasa residual se determinó siguiendo el protocolo descrito por Thompson (Thompson, H.M. (1999) Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology* 8, 369-384). Éste consistió en la adición del sustrato (α -NA ó α -NB) a la reacción a una concentración final de 1 mM.

La actividad carboxilesterasa residual se determinó siguiendo los métodos de Thompson (*vide supra*). La hidrólisis de los ésteres de naftilo (α -NA y α -NB) se lleva a cabo en un medio que contiene la muestra, tampón Tris-HCl 0.1 M (pH=7.4) y el sustrato. La formación del producto de hidrólisis (1-naftol) transcurridos 15 min de reacción a 22°C y en agitación continua, se detiene con la adición de una solución conteniendo SDS (2.5%, peso/volumen) / Fast Red ITR (0.1 %) /Triton X-100 (2.5 %). Las muestras se dejan en oscuridad durante 30 minutos hasta que se forma el producto (1-naftol-Fast Red) que se determina mediante espectrofotometría (λ =530 nm). La cuantificación se realizó con curvas de calibrado externas elaboradas con 1-naftol (5–50 µM). El formato de microplaca permitió ensayar por triplicado un amplio rango de concentraciones. El instrumento utilizado en la determinación espectrofotométrica fue un lector de microplacas Asys HiTech UVM340, Asys HiTech GmbH, Eugendorf, Austria).

Los resultados de inhibición se muestran en la figura 4. La actividad carboxilesterasa del contenido luminal y tejido fue muy sensible al insecticida cuando se utilizó el sustrato 1-NB como indicador de actividad hidrolítica. Las cinéticas *in vitro* mostraron que la sensibilidad de la enzima al insecticida organofosforado muestran un perfil de concentración-respuesta marcadamente diferente dependiendo del sustrato utilizado en el ensayo enzimático. El análisis zimográfico evidencia que no todas las carboxilesterasas

son altamente sensibles al insecticida y por tanto quedan inhibidas frente a la exposición a este compuesto.

EJEMPLO 2

Se describe a continuación una realización preferida de la invención en la que se utiliza la lombriz *Aporrectodea caliginosa* para la descontaminación de suelos contaminados con clorpirifós, como representante de los plaguicidas organofosforado. La capacidad detoxificante de las lombrices se evaluó en dos experimentos en microcosmos:

a) En el primero de ellos, las lombrices fueron expuestas a suelos tratados con el insecticida clorpirifós a una concentración de 10 mg/kg peso seco durante 4 días, una concentración inferior a la estimada cuando se respeta las dosis de aplicación de productos fitosanitarios cuyo principio activo es el clorpirifós (Tejada, M., Gómez, I., del Toro, M. (2011) Use of organic amendments as a bioremediation strategy to reduce the bioavailability of chlorpyrifos insecticide in soils. Effects on soil biology. Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 2075–2081).

b) En un segundo ensayo se probó el metabolito toxicológicamente activo del clorpirifós, el clorpirifós-oxon, a la concentración de 10 mg/kg peso seco.

Los bioensayos se realizaron de la siguiente manera: Un grupo de 20 lombrices adultas se dividió en dos tratamientos experimentales (control y 10 mg insecticida /kg peso seco de suelo). A su vez, cada tratamiento fue replicado 5 veces usando contenedores de plástico de 300 ml de volumen. Inicialmente, los suelos fueron contaminados utilizando placas de Petri (140 x 20 cm) conteniendo 100 g de suelo seco (< 2 mm tamaño de partícula). La contaminación de estos suelos se realizó añadiendo el pesticida disuelto en acetona (0.2 mg/ml). Después de permitir que la acetona se evaporase (aprox. 30 min), el suelo fue mezclado agitando la placa de Petri. A continuación los 100 g de suelo se colocaron en el recipiente de 300 ml para añadir 30 ml de agua destilada (un volumen de agua que correspondió al 80% de su capacidad de campo). Finalmente se introdujeron 2 lombrices por recipiente, y se colocaron en una cámara climatizada a 15°C y oscuridad. Este mismo procedimiento se llevó a cabo para los dos pesticidas. Transcurrido el tiempo de exposición, las lombrices fueron retiradas de los suelos y congeladas a -80°C hasta su posterior análisis.

Localización de la actividad

La actividad carboxilesterasa fue máxima en el contenido gastrointestinal de la lombriz, siendo hasta 5 veces superior a aquélla que se detecta en el suelo donde habita el organismo (Tabla 1).

- 5 **Tabla 1:** Distribución de la actividad carboxilesterasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) en el tubo digestivo de *Aporrectodea caliginosa*. La actividad hidrolítica se determinó utilizando dos ésteres carboxílicos (α -naftil acetato ó α -NA y α -naftil butirato ó α -NB).

Tipo de muestra	α -NA			α -NB		
	n	Media	D.S. ^a	n	Media	D.S.
Tejido	10	0,66	0,12	10	0,55	0,06
Contenido	10	7,94	1,07	10	1,88	0,43
Deyecciones ^b	20	0,28	0,14	20	0,18	0,07
Suelo ^c	10	0,13	0,07	10	0,07	0,04

^a Desviación estándar.

- ^b Las deyecciones fueron recogidas después de colocar las lombrices en placas de Petri durante 24 horas en oscuridad y 15°C.

^c Las muestras de suelo fueron recogidas en el pastizal donde se capturaron las lombrices, pero sin alteración por las lombrices.

- Se encontró una variación de la actividad hidrolítica dependiente del sustrato utilizado en el ensayo de inhibición enzimática. La tasa de hidrólisis registrada fue significativamente mayor con el sustrato de cadena corta (α -naftil acetato, α -NA) que con los sustratos de cadena más larga (α -naftil butirato, α -NB). Los zimogramas revelaron múltiples bandas cuya intensidad de marcaje fue mayor cuando se utilizó el sustrato α -NA que cuando se utilizó el α -NB (Figura 1), corroborando los resultados de los ensayos cinéticos. La intensidad de la reacción fue también mayor en las bandas que aparecen en el contenido gastrointestinal y prácticamente no aparecieron en las deyecciones de la lombriz.

Los ensayos *in vitro* mostraron que el insecticida clorpirifós-oxon inhibió fuertemente la actividad carboxilesterasa en el contenido gastrointestinal y tisular cuando se utilizó el sustrato α -NB. El análisis zimográfico reprodujo los resultados obtenidos en las cinéticas de inhibición. Así, una concentración del insecticida de 1.2×10^{-6} M, causó una fuerte

inhibición de las bandas con una movilidad relativa en el gel correspondiente a 60 kDa cuando se utilizó el sustrato α -NB, pero no así cuando se utilizó el α -NA (Figura 1).

Los experimentos en microcosmos corroboraron los resultados obtenidos *in vitro*. El metabolito activo del clorpirifós (clorpirifós-oxon) causó un 44–52 % de inhibición de la actividad carboxilesterasa, mientras que el porcentaje de inhibición fue mayor para la actividad carboxilesterasa del lumen gastrointestinal (63–75 %). De la misma manera que ocurrió en los ensayos *in vitro*, el uso del sustrato α -NA no manifestó una disminución significativa en la actividad carboxilesterasa de las lombrices que estuvieron en los suelos contaminados con clorpirifós-oxon (Tabla 2).

Comparación inhibición de clorpirifós y clorpirifós-oxon

Tabla 2: Actividad carboxilesterasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), medida con el sustrato α -naftil acetato (α -NA), en el tejido y contenido gastrointestinal *Aporrectodea caliginosa* expuesta durante cuatro días a suelos agrícolas contaminados con el insecticida organofosforados clorpirifós y su principal metabolito clorpirifós-oxon (Cpoxon). No se observó inhibición de la enzima cuando se usó este sustrato como indicador de la actividad hidrolítica de estas enzimas.

Pesticida	Muestra	n	Actividad
Control	Tejido	10	$0,27 \pm 0,09$
	Contenido	10	$6,07 \pm 1,02$
Clorpirifós	Tejido	10	$0,23 \pm 0,18$
	Contenido	10	$9,66 \pm 0,53$
Control	Tejido	10	$0,57 \pm 0,26$
	Contenido	10	$9,16 \pm 1,30$
CPoxon	Tejido	10	$0,44 \pm 0,15$
	Contenido	10	$8,58 \pm 2,24$

Cuando los suelos fueron contaminados con clorpirifós-oxon, se observó un mayor porcentaje de inhibición de la actividad carboxilesterasa en el contenido gastrointestinal de la lombriz que en el tejido (Tabla 3).

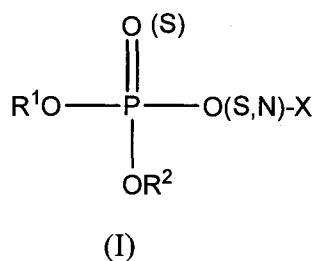
- 5 **Tabla 3:** Inhibición de la actividad carboxilesterasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), medida con el sustrato α -naftil butirato (α -NB), en el tejido y contenido gastrointestinal *Aporrectodea caliginosa* expuesta durante cuatro días a suelos agrícolas contaminados con el insecticida organofosforados clorpirifós y su principal metabolito clorpirifós-oxon (CPoxon).

Pesticida	Muestra	n	Actividad	% inhibición
Control	Tejido	10	$0,11 \pm 0,04$	-
	Contenido	10	$1,44 \pm 0,44$	-
Clorpirifós	Tejido	10	$0,04 \pm 0,02$	63
	Contenido	10	$1,11 \pm 0,17$	22
Control	Tejido	10	$0,21 \pm 0,03$	-
	Contenido	10	$1,78 \pm 0,31$	-
CPoxon	Tejido	10	$0,10 \pm 0,02$	52
	Contenido	10	$0,50 \pm 0,13$	72

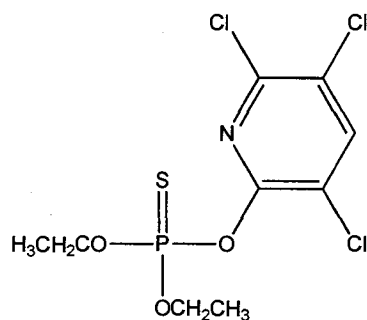
- 10 Estos resultados de inhibición son evidencias indirectas de la detoxificación del suelo por parte de las lombrices, ya que la inhibición tiene que ser debida al clorpirifós o clorpirifós-oxon que fosforila las enzimas carboxilesterasas.

REIVINDICACIONES

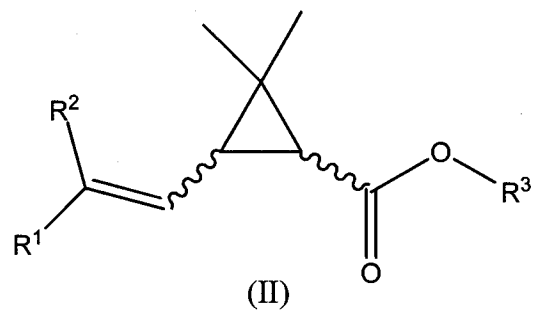
1. Procedimiento para eliminar productos fitosanitarios de suelos **caracterizado por** inocular en el suelo lombrices de tierra que se seleccionan de entre las especies
 5 Allobophora chlorotica, Aporectodea caliginosa, Aporectodea longa, Aporectodea rosea, Aporectodea trapezoides, Aporectodea tuberculata, Dendrobaena madeirensis, Dendrobaena octaedra, Lumbricus terrestris, Lumbricus castaneus, Lumbricus rubellus, Lumbricus friendi, Lumbricus festivus, Octodrilus complanatus, Octolasion lacteum, Scherotheca gigas y Scherotheca savigny.
2. Procedimiento para eliminar productos fitosanitarios de suelos, según la
 10 reivindicación 1 **caracterizado por** el hecho que el producto fitosanitario es un compuesto organofosforado de fórmula general (I).



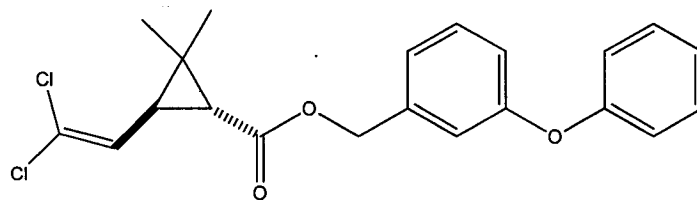
3. Procedimiento para eliminar productos fitosanitarios de suelos, según
 15 reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado por** el hecho que el producto fitosanitario es clorpirifós, de fórmula:



4. Procedimiento para eliminar productos fitosanitarios de suelos, según la
 reivindicación 1, **caracterizado por** el hecho que el producto fitosanitario es un compuesto piretroide, de fórmula general (II).



5. Procedimiento para eliminar productos fitosanitarios de suelos, según reivindicaciones 1 y 4, **caracterizado por** el hecho que el producto fitosanitario es *trans*-permitrina, de fórmula:



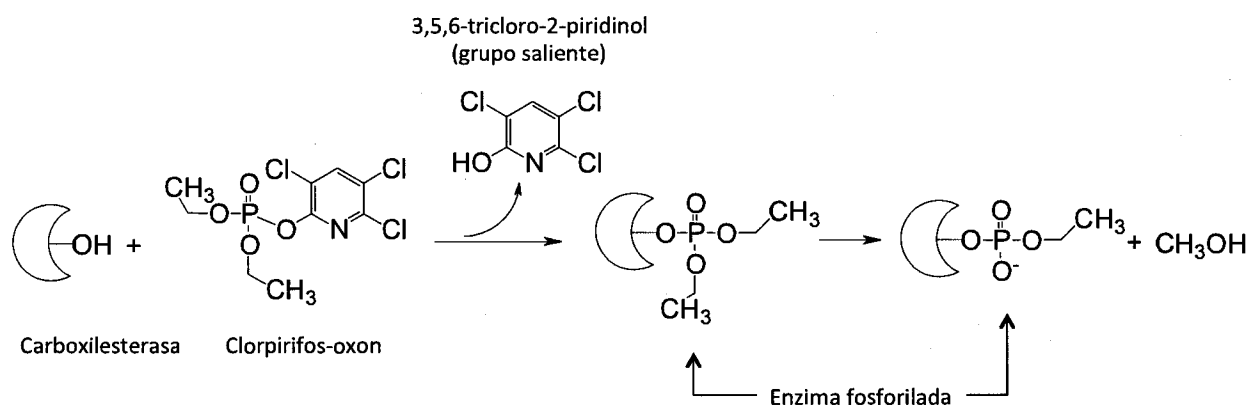


Figura 1

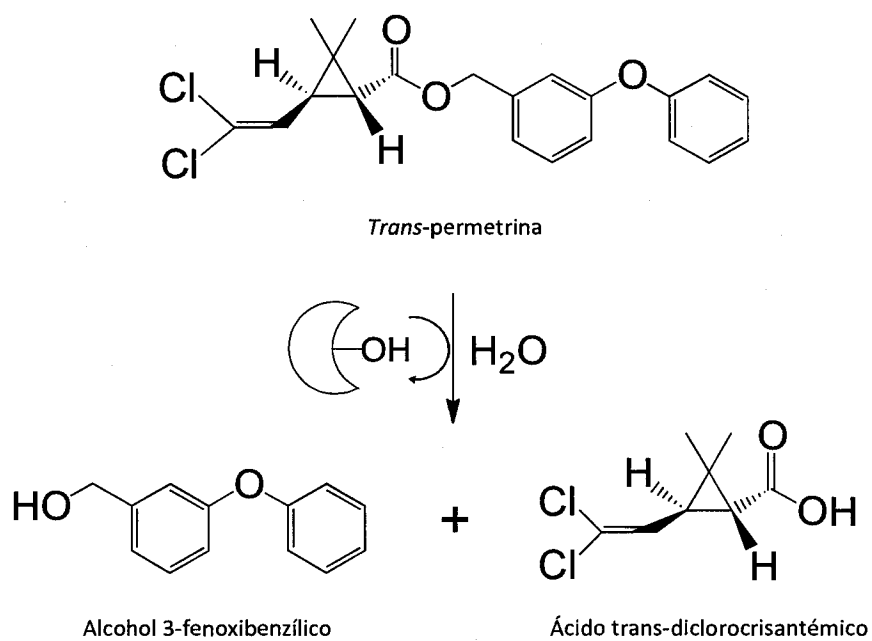


Figura 2

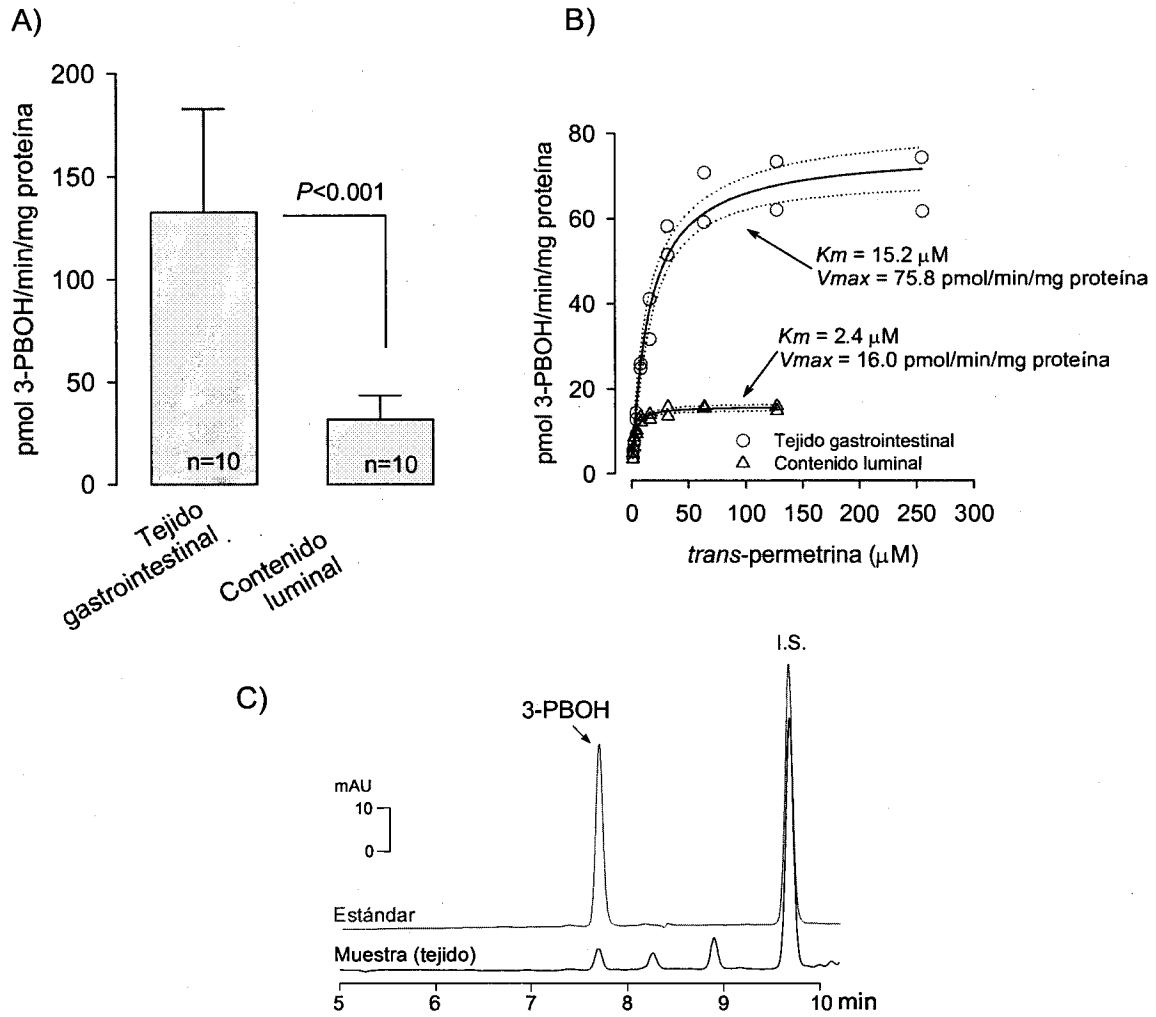


Figura 3

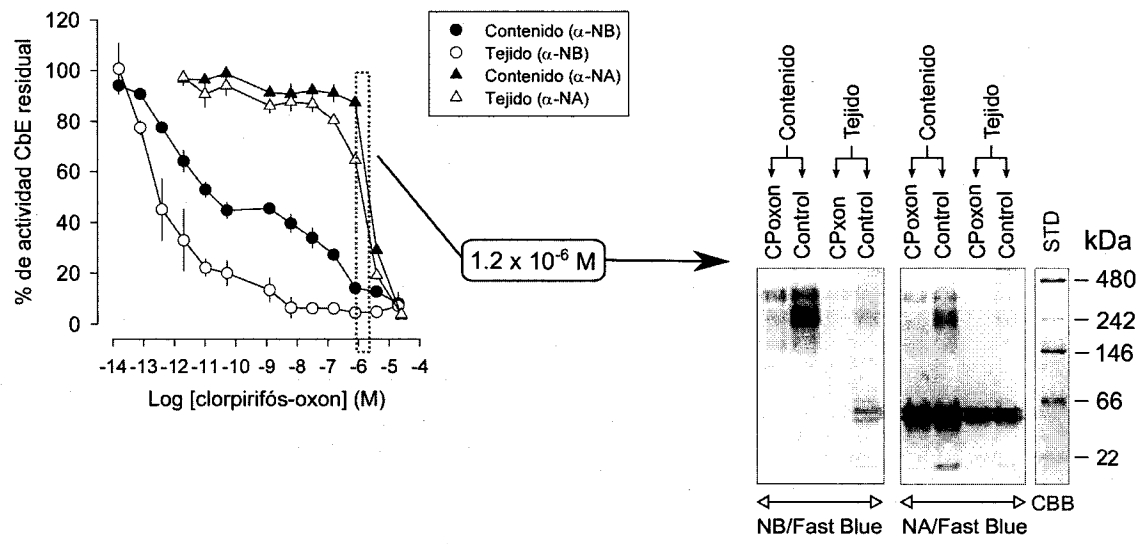


Figura 4



- ②① N.º solicitud: 201301180
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.12.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **B09C1/10** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TEJADA M., GOMEZ I., DEL TORO M. "Use of organic amendments as a bioremediation strategy to reduce the bioavailability of chlorpyrifos insecticide in soils. Effects on soil biology." Ecotoxicology and Environmental Safety (2011) Vol. 74, páginas 2075-2081.	1-3
A	SANCHEZ-HERNANDEZ J. C. "Environmental applications of earthworm esterases in the agroecosystem." Journal of Pesticide Science (2010) Vol. 35, páginas 290-301. Todo el documento.	1-5
A	EIJSAKERS H. "Earthworms as colonisers: Primary colonisation of contaminated land, and sediment and soil waste deposits." Science of the Total Environment (2010) Vol. 408, páginas 1759-1769. Todo el documento.	1-5
A	HICKMAN Z. A., REID B. J. "Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants." Environmental International (2008) Vol. 34, páginas 1072-1081. Todo el documento.	1-5
A	SANCHEZ-HERNANDEZ J. C., MAZZIA C., CAPOWIEZ Y. y RAULT M. "Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications." Comparative Biochemistry and Physiology, Part C (2009) Vol. 150, páginas 503-511. Todo el documento.	1-5

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
20.03.2015

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

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

B09C

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, GOOGLE, XPESP, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.03.2015

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-5
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 4-5
Reivindicaciones 1-3

SI
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	TEJADA M., GOMEZ I., DEL TORO M. "Use of organic amendments as a bioremediation strategy to reduce the bioavailability of chlorpyrifos insecticide in soils. Effects on soil biology." <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> (2011) Vol. 74, páginas 2075-2081.	2011
D02	SANCHEZ-HERNANDEZ J. C. "Environmental applications of earthworm esterases in the agroecosystem." <i>Journal of Pesticide Science</i> (2010) Vol. 35, páginas 290-301. Todo el documento.	2010
D03	EIJACKERS H. "Earthworms as colonisers: Primary colonisation of contaminated land, and sediment and soil waste deposits." <i>Science of the Total Environment</i> (2010) Vol. 408, páginas 1759-1769. Todo el documento.	2010
D04	HICKMAN Z. A., REID B. J. "Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants." <i>Environmental International</i> (2008) Vol. 34, páginas 1072-1081. Todo el documento.	2008
D05	SANCHEZ-HERNANDEZ J. C., MAZZIA C., CAPOWIEZ Y. y RAULT M. "Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications." <i>Comparative Biochemistry and Physiology, Part C</i> (2009) Vol. 150, páginas 503-511. Todo el documento.	2009

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

La presente solicitud de invención consiste en un procedimiento para eliminar productos fitosanitarios organofosforados o piretroides de suelos mediante la inoculación en el suelo de lombrices de tierra (reivindicaciones 1-5).

El documento D01 consiste en un estudio para investigar la absorción y la movilidad del insecticida clorpirifós en un suelo enmendado con residuos orgánicos, así como su efecto sobre la actividad microbiana del suelo y la toxicidad y alteraciones morfológicas de dos especies de lombrices.

El documento D02 consiste en un estudio sobre el uso de las carboxilesterasas de las lombrices de tierra y su papel en la reducción de la toxicidad de pesticidas (ver todo el documento).

El documento D03 consiste en un estudio sobre el papel de las lombrices de tierra en la colonización temprana de suelos contaminados (ver todo el documento).

El documento D04 consiste en un estudio sobre el papel de las lombrices de tierra en el medio ambiente y su influencia sobre los contaminantes orgánicos del suelo para mejorar la biorremediación (ver todo el documento).

El documento D05 consiste en un estudio para determinar la presencia de enzimas carboxilesterasas en el contenido intestinal de las lombrices (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986).

Las reivindicaciones 1-5 se consideran nuevas en el sentido del artículo 6.1 Ley 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).**2.1.- Reivindicaciones 1-3.**

El documento D01 divulga la inoculación de lombrices de tierra de la especie *Lumbricus terrestris* en suelos contaminados con clorpirifós (ver resumen y página 2076), y la disminución de la concentración de insecticida en el suelo de manera significativa al final del experimento (ver página 2077 y 2080).

A la vista de lo que se conoce del documento D01, no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia desarrollar un procedimiento como el descrito en las reivindicaciones 1-3.

Por consiguiente, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-3 no implica actividad inventiva según el artículo 8.1 Ley 11/1986.

2.2.- Reivindicaciones 4-5.

Las reivindicaciones 4-5 se consideran que no implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.