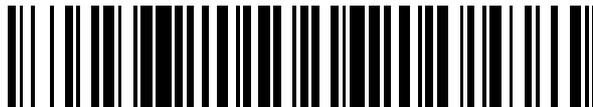


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 312**

51 Int. Cl.:

A01N 25/02 (2006.01)

A01N 25/08 (2006.01)

A01N 25/12 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2011 E 11745996 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2582232**

54 Título: **Control de la infestación de artrópodos utilizando unas partículas que comprenden un entomopatógeno y cera**

30 Prioridad:

16.06.2010 GB 201010042

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

03.02.2016

73 Titular/es:

**EXOSECT LIMITED (100.0%)
Leylands Business Park Colden Common
Winchester SO21 1TH, GB**

72 Inventor/es:

**STORM, CLARE, GILLIAN;
WAKEFIELD, MAUREEN, ELIZABETH y
CHAMBERS, JOHN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 558 312 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Control de la infestación de artrópodos utilizando unas partículas que comprenden un entomopatógeno y cera.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de control de la infestación por artrópodos, a partículas compuestas, y a composiciones para el tratamiento de la infestación por artrópodos y a sus utilizaciones. Particularmente, la invención se refiere a procedimientos de control de la infestación por artrópodos en áreas de almacenamiento de cereales, a procedimientos para la aplicación de composiciones en forma de polvos secos en
10 artrópodos, a composiciones de polvos secos que comprenden agentes biológicos asociadas a partículas hidrófobas, a procedimientos de producción de dichas composiciones y a sus utilizaciones.

Las zonas de almacenamiento de alimento seco y las zonas de almacenamiento de cereales, tales como los silos de grano y depósitos de grano en los que se almacena el grano inmediatamente después de la cosecha o antes del procesamiento, atraen artrópodos tales como ácaros y coleópteros, en particular coleópteros. Entre otras zonas de
15 almacenamiento de alimentos secos y grano se incluyen almacenes en los que se almacena el alimento seco y el grano antes de su envío, e instalaciones de transporte tales como las de los contenedores de envío, las bodegas de los barcos, los camiones y similares. Entre las zonas de almacenamiento adicionales de alimento seco y grano se incluyen aquellas en las que se guardan productos de grano, tales como harinas, legumbres secas, lentejas, arroz y otros productos derivados del grano y/o de alimentos secos. Algunos artrópodos, tales como algunos insectos, por
20 ejemplo coleópteros de los depósitos de grano, se alimentan del grano y son una causa importante de pérdida económica para el granjero y las industrias de procesamiento del grano.

Al extraer el grano de las zonas de almacenamiento del mismo, permanecen muchos artrópodos, que habitan fisuras y grietas en paredes, suelos y otras estructuras de soporte, tales como columnas y/o estanterías. Los
25 procedimientos convencionales de control de las infestaciones de artrópodos basados en la utilización de productos químicos que se aplican en formulaciones en húmedo en zonas de almacenamiento vacías resultan eficaces en la medida en que matan los artrópodos que entran en contacto con el producto químico aplicado. Sin embargo, las formulaciones químicas húmedas no entran en fisuras y grietas habitadas por poblaciones de artrópodos. Estas poblaciones sobreviven a la aplicación de los productos químicos que se aplican en las superficies del medio
30 circundante y, de esta manera, son libres de infestar nuevos cargamentos de grano depositados en la zona de almacenamiento, por lo que se repite el ciclo de infestación del grano, con las concurrentes pérdidas económicas.

Otros procedimientos de tratamiento de las zonas de almacenamiento de grano se basan en la aplicación de niveles relativamente elevados de productos químicos artropodicidas en forma de polvos secos. Sin embargo, la eficacia de
35 estos tratamientos se reduce con el tiempo.

Se han utilizado agentes biológicos en la técnica anterior en un intento de controlar las infestaciones de diversos tipos de artrópodos en diversos contextos. En particular, determinadas cepas de hongos entomopatógenos, tales como *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Lecanicillium* spp. han resultado útiles en el control de
40 determinados artrópodos. Aunque los hongos entomopatógenos se perciben claramente como candidatos para el control de infestaciones de artrópodos, también resulta evidente que la mayoría de cepas de hongos entomopatógenos resultan inadecuadas como candidatas para el control de las infestaciones de artrópodos en la multitud de los denominados entornos de campo, en los que resultaría deseable la utilización eficaz de hongos. Con frecuencia se ha demostrado que cepas candidatas de hongos aparentemente adecuadas son incapaces de tolerar
45 los extremos ambientales que con frecuencia se presentan en los entornos artificiales, tales como las zonas de almacenamiento de grano u otros entornos en los que pueden guardarse alimentos relacionados con el grano (por ejemplo harina) o grano.

Un problema al utilizar agentes biológicos tales como cepas candidatas de hongos entomopatógenos que podrían descubrirse en un país y proponerse para la utilización en un contexto de un país diferente es que dichas cepas
50 podrían no funcionar bien en el nuevo contexto porque son incapaces de tolerar los extremos de las condiciones que predominan en el medio del país en el que deben utilizarse. Además, las restricciones normativas pueden ser tan estrictas que hagan inviable la importación de una cepa candidata probable y ello podría estar asociado a dudas de si podrá demostrarse su probable eficacia en un medio exótico.

55 La patente US nº 4.925.663 describe la utilización, entre otros, de una formulación de polvos secos que comprende arroz en polvo y una determinada cepa de un hongo, *Beauveria bassiana*, que presenta una virulencia particular contra las hormigas rojas al utilizarse en un espacio abierto.

60 Meikle *et al.*, J. Econ. Entomol. 100:1-10, 2007, describen la utilización de cera de carnauba como portador de esporas de *Beauveria bassiana* (cepa Bb05002 que es autóctona de Francia) en colmenas de abejas para el control de ácaros Varroa. Se informa de que el medio dentro de la colmena presenta una humedad relativa (HR) de entre 40% y 50%, aparentemente con temperaturas de entre 33°C y 36°C. Aparentemente el medio ambiente dentro de la colmena de abejas no está sometido a los amplios extremos de HR y temperatura entre otros factores porque las abejas regulan activamente la temperatura en el interior.
65

El documento WO 2006/121350 describe la provisión de determinados cultivos biológicamente puros de cepas de hongos entomopatógenos, tales como *Beauveria bassiana*, para el control de insectos fitopatógenos para la utilización contra *Thysanoptera* (trípidos), *Hemiptera* (mosca blanca) y otros. Las composiciones descritas en dicha referencia aparentemente se aplican en plantas en el campo en forma de pulverización húmeda.

Wakefield M.E. *et al.*, *Alternative Methods to Chemical Control*, páginas 855 a 862, 2006, se refieren a la utilización de polvos de esporas secas (conidios) de un aislado de *B. bassiana* contra artrópodos. Se observaron diferencias significativas en la capacidad de los conidios de unirse y germinar sobre diferentes especies de artrópodo de grano almacenado. No existe sugerencia de unión de los conidios a portadores para mejorar la administración de las esporas en los artrópodos. Lord J.C., *Journal of Stored Products Research* 43:535-539, 2007, se refiere a la aplicación de conidios de un aislado de *B. bassiana* en coleópteros de grano almacenado bajo diversos ambientes de estrés por desecación. Se observaron diferencias significativas en la mortalidad de diferentes especies de coleóptero. La conclusión aparente es que los niveles de humedad ambiental desempeñan un papel en la eficacia de *B. bassiana* en su ataque a los insectos, aunque no se conoce de qué manera. No se encuentra contemplada la utilización de un portador hidrofóbico capaz de transportar una concentración elevada de esporas hasta los sitios diana.

Un objetivo de la presente invención consiste en superar o por lo menos reducir las desventajas de los procedimientos convencionales de tratamiento de zonas de almacenamiento de grano para la infestación por artrópodos. Dicho objetivo y otros resultarán evidentes a partir de la descripción y ejemplos, posteriormente.

Dicho objetivo se alcanza mediante la utilización de una partícula compuesta según la reivindicación 1.

Sin pretender limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que las partículas que se adhieren a la cutícula del artrópodo lo hacen a través de fuerzas electrostáticas que actúan entre las partículas que se encuentran electrostáticamente cargadas y la cutícula del insecto. Dichas partículas típicamente son partículas dieléctricas y se cree que mantienen la carga electrostática mediante la generación de fuerzas eléctricas al frotar las partes móviles del artrópodo.

Las partículas utilizadas en la invención presentan un grado de hidrofobicidad en el que las fuerzas hidrófobas entre las esporas y la cutícula del artrópodo que es superior a las fuerzas electrostáticas entre las esporas y las partículas utilizadas en la invención, por lo tanto las esporas son capaces de desprenderse de dichas partículas y después se unen preferentemente a la cutícula de artrópodo.

De esta manera, las esporas del hongo entomopatógeno para la utilización en la invención presentan una hidrofobicidad que es diferente de la hidrofobicidad asociada a las partículas hidrófobas. Preferentemente la hidrofobicidad de las esporas también es diferente a la de la cutícula del artrópodo del grano almacenado, de manera que las esporas se adhieren preferentemente a la cutícula de por lo menos una especie de artrópodo de grano almacenado. De esta manera, el grado de hidrofobicidad de las esporas típicamente es superior a la hidrofobicidad de las partículas hidrófobas de utilización en la invención que, a su vez, presentan un grado de hidrofobicidad que es superior a la hidrofobicidad de la cutícula del artrópodo. De esta manera, el grado de hidrofobicidad de las esporas utilizadas en la invención puede presentarse como:

hidrofobicidad de las esporas > hidrofobicidad de las partículas hidrófobas utilizadas en la invención > hidrofobicidad de la cutícula del artrópodo. Naturalmente el experto en la materia apreciará que, en otras palabras, el grado de hidrofobicidad de las esporas es inferior a la hidrofobicidad de las partículas, que a su vez presentan un grado superior de hidrofobicidad al de la cutícula del artrópodo. Con el fin de someter a ensayo el grado de hidrofobicidad de los componentes representativos utilizados en la invención tal como se ha indicado de manera general anteriormente, y por lo tanto su conveniencia para la utilización en la presente invención, el experto en la materia será capaz de realizar simplemente una evaluación visual de la proporción de esporas:partículas, y de partículas:cutícula de artrópodo o esporas:partículas:cutícula, utilizando técnicas utilizadas comúnmente, tal como la utilización de un microscopio de barrido electrónico. Típicamente, las partículas hidrófobas utilizadas en la invención portan las esporas hasta la cutícula del artrópodo de grano almacenado, haciendo que entren en contacto con la misma, o las partículas cargadas llevan las esporas hasta una estrecha proximidad con la superficie de la cutícula del artrópodo, en donde las esporas se desprenden de la partícula portadora debido a las diferencias de hidrofobicidad entre la partícula portadora y la espora y se adhieren preferentemente a la superficie de la cutícula. Tras llevar las esporas de la invención a la cutícula, son capaces de germinar sobre la cutícula de dicha especie o especies de artrópodo de grano almacenado y de penetrar en las cutículas del mismo.

Mediante la utilización de la hidrofobicidad de las esporas y de la atracción electrostática de las partículas portadoras utilizadas en la invención se consigue un sistema portador eficiente que es capaz de transportar las esporas hasta las superficies de la cutícula del insecto diana. Las esporas del hongo mismas seguidamente pueden depositarse sobre la cutícula del insecto, en donde las esporas germinan y penetran en la cutícula del insecto. En los casos en que las esporas no resulten suficientemente atraídas a la cutícula del insecto por fuerzas hidrófobas, sino que permanezcan sobre las partículas que se adhieren a la superficie de la cutícula del artrópodo, las esporas del hongo

sobre la partícula portadora deberían ser capaces de germinar sobre o en proximidad a la superficie de la cutícula del insecto y de penetrar en la misma.

5 Las composiciones de polvos secos de la invención pueden contener además excipientes adecuados utilizados comúnmente en la técnica, tales como agentes de flujo o agentes antiapelmazantes seleccionados de entre bicarbonato sódico, ferrocianuro sódico, ferrocianuro potásico, ferrocianuro cálcico, fosfato óseo, silicato sódico, dióxido de silicio, silicato cálcico, trisilicato de magnesio, polvos de talco, aluminosilicato sódico, aluminosilicato potásico, aluminosilicato de calcio, bentonita, silicato de aluminio, ácido esteárico, polidimetilsiloxano y similares.

10 Además, las composiciones de polvos secos de la invención pueden contener otros componentes, tales como aditivos seleccionados de entre bloqueantes de rayos UV, tales como beta-caroteno o ácido p-aminobenzoico, agentes colorantes tales como abrillantadores ópticos y agentes colorantes disponibles comercialmente, tales como agentes colorantes alimentarios, plastificadores tales como glicerina o aceite de soja, antimicrobianos tales como sorbato de potasio, nitratos, nitritos, óxido de propileno y similares, antioxidantes tales como vitamina E, hidroxianisol
15 butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) y otros antioxidantes que pueden encontrarse presentes, o mezclas de los mismos. El experto en la materia apreciará que la selección de dichos aditivos incluidos comúnmente se realizará dependiendo del propósito final y necesidad percibida.

20 Las composiciones de polvos secos de la invención deben resultar eficaces en el control de las poblaciones de artrópodos de grano almacenado. Las esporas de hongo entomopatógeno (también denominadas "conidios" en la técnica) utilizadas en la invención deben ser capaces de germinar sobre la cutícula de por lo menos un artrópodo de grano almacenado y tras germinar, de penetrar en la cutícula de artrópodos receptores y matarlos. Estas esporas son de la cepa de *Beauveria bassiana*, depositada bajo el Tratado de Budapest, IMI 398548, en el Centre for
25 Agriculture and Biosciences International (CABI), Bakeham Lane, Egham, Surrey, TW20 9TY, Reino Unido, el 11 de mayo de 2010. Dichas esporas de *Beauveria bassiana* son capaces de germinar y, tras germinar, de penetrar en la cutícula de los artrópodos de grano almacenado, tal como coleópteros de grano almacenado. Preferentemente las esporas son activas contra por lo menos las especies siguientes de coleóptero de grano almacenado: *Oryzaephilus surinamensis* (gorgojo dientes de sierra), *Sitophilus granarius* (gorgojo del grano) y *Cryptolestes ferrugineus* (gorgojo castaño de la harina).

30 La expresión "por lo menos una especie de artrópodo de grano almacenado" se refiere a artrópodos de grano almacenado que son insectos, tales como coleópteros o polillas de grano almacenado y/o las larvas de los mismos, que habitan zonas de almacenamiento de grano. Se indican anteriormente ejemplos de dichas especies de coleóptero de grano almacenado.

35 La expresión "zona de almacenamiento de grano" en el contexto de la presente invención incluye sitios de almacenamiento de alimentos secos y/o grano, tales como silos de grano y depósitos para grano en los que se almacenan alimentos secos o grano inmediatamente después de la cosecha o antes del procesamiento, e incluye almacenes en los que se almacenan alimentos secos y grano antes del envío, e instalaciones de transporte tales como contenedores de transporte, bodegas de barcos, camiones, aviones, zonas de almacenamiento en
40 supermercados, centros de almacenamiento de alimentos secos, y similares. La expresión "zona de almacenamiento de grano" incluye en su ámbito aquellas zonas de almacenamiento en las que se almacenan productos de grano recolectado, tales como granos de trigo, centeno, cebada, maíz y sorgo, y alimentos secos derivados de granos o semillas recolectados, tales como harinas, legumbres secas, lentejas, legumbres, arroz y otros productos
45 alimentarios, tales como pasta seca derivada de cereales y/o otros alimentos secos.

En el contexto de la presente invención, "control de poblaciones de artrópodos de grano almacenado" se refiere a que la población de artrópodos en la que se aplican las composiciones de la invención es una que sufre pérdidas debidas a muerte, enfermedad que puede conducir finalmente a muerte y/o incapacidad de reproducirse o reducción
50 de la capacidad de reproducirse. Preferentemente el control de las poblaciones de artrópodos de productos almacenados se refiere a que por lo menos 80%, preferentemente 90%, de la población de artrópodos muere dentro de los primeros 28 días de la aplicación de las composiciones de la invención. Preferentemente, las poblaciones de artrópodos que resultan adversamente afectadas por las composiciones de la invención mueren o por lo menos sufren efectos subletales que contribuyen a la reducción a largo plazo de la población como resultado de la
55 aplicación de composiciones de polvos secos de la invención en las zonas de almacenamiento de grano. El experto en la materia apreciará que la población de artrópodos de almacenamiento de grano en la que se aplican las composiciones de la invención pueden estar constituidas de una o más de una especie de artrópodos. Entre los ejemplos de especies de artrópodos que pueden constituir una población de artrópodos de grano almacenado que pueden resultar afectadas por las composiciones de la invención se incluyen coleópteros de grano almacenado,
60 tales como *Oryzaephilus surinamensis* (carcoma dentada del grano), *Sitophilus granarius* (gorgojo del grano) y *Cryptolestes ferrugineus* (carcoma achatada del grano).

Las partículas compuestas hidrófobas de la invención típicamente comprenden ceras con un punto de fusión $\geq 50^{\circ}\text{C}$, más preferentemente $\geq 60^{\circ}\text{C}$, y todavía más preferentemente están constituidas de ceras duras con un punto de fusión $\geq 70^{\circ}\text{C}$. Entre las ceras adecuadas utilizadas en la invención se incluyen la cera carnauba, la cera de abejas,
65 la cera china, la cera de goma laca, la cera de blanco de ballena, la cera de candelilla, la cera de ricino, la cera de

ouricuri y la cera de salvado de arroz.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona la utilización de una composición de polvos secos según la reivindicación 9.

5 Preferentemente, las partículas compuestas presentan un diámetro volumétrico medio $\geq 10 \mu\text{m}$ y más preferentemente las composiciones secas de la invención presentan un diámetro volumétrico medio $\geq 12 \mu\text{m}$. Dichas composiciones con un diámetro volumétrico medio $\geq 10 \mu\text{m}$ no se consideran un peligro torácico tan grande como las partículas de tamaño más pequeño y no se cree que presenten un riesgo alérgico tan grande en el ser humano.

10 Para preparar las partículas compuestas, las esporas del hongo entomopatógeno pueden mezclarse con las partículas hidrófobas, tales como partículas de cera carnauba, en una proporción en peso de entre 5% y 95% en peso de partículas hidrófobas a esporas, preferentemente en una proporción en peso de entre por lo menos 50% y 80% en peso de partículas hidrófobas a esporas, o más preferentemente de por lo menos 75% en peso de partículas hidrófobas a esporas. Las partículas preferentemente pueden micronizarse hasta un DVM $\geq 34 \mu\text{m}$ para mantener las formulaciones dentro de límites seguros de DVM. El experto en la materia apreciará que podrían utilizarse otras proporciones de partículas hidrófobas:esporas para preparar partículas compuestas de la invención según el tamaño de la partícula hidrófoba y sus propiedades físicas, tales como las propiedades electrostáticas.

20 Las partículas compuestas pueden contener además excipientes adecuados utilizados comúnmente en la técnica, tales como agentes de flujo o agentes antiapelmazantes seleccionados de entre bicarbonato sódico, ferrocianuro sódico, ferrocianuro potásico, ferrocianuro cálcico, fosfato óseo, silicato de sodio, dióxido de silicio, silicato de calcio, trisilicato de magnesio, polvos de talco, aluminosilicato sódico, aluminosilicato potásico, aluminosilicato cálcico, bentonita, silicato de aluminio, ácido esteárico, polidimetilsiloxano y similares.

25 Además, las partículas compuestas pueden contener otros componentes, tales como aditivos seleccionados de entre bloqueantes de los rayos UV, tales como beta-caroteno o ácido p-aminobenzoico, agentes colorantes tales como blanqueadores ópticos y agentes colorantes disponibles comercialmente, tales como agentes colorantes alimentarios, plastificadores tales como glicerina o aceite de soja, antimicrobianos tales como sorbato potásico, nitratos, nitritos, óxido de propileno y similares, antioxidantes tales como vitamina E, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) y otros antioxidantes que pueden encontrarse presentes, o mezclas de los mismos. El experto en la materia apreciará que la selección de dicho aditivos incluidos comúnmente se llevar a cabo según el propósito final y la necesidad percibida.

35 Las composiciones para la utilización en la invención, en las que por lo menos el 50% en volumen de la composición es $\geq 10 \mu\text{m}$, se cree que presentan un riesgo menor para la respiración torácica y que resultan menos alergénicas para el ser humano. Además, mediante la utilización de las composiciones se consigue un medio eficiente de administración de un número más elevado de esporas fúngicas de interés en las poblaciones diana de artrópodos de grano almacenado y en las cutículas de los mismos de lo que ha resultado posible hasta hoy.

40 Las composiciones pueden producirse mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- i) micronizar partículas de portador hidrofóbico seco, y
- ii) mezclar esporas secas de *Beauveria bassiana* con dichas partículas de portador.

45 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un procedimiento de control de la infestación por artrópodos del grano almacenado en una zona de almacenamiento de grano, en el que se presentan partículas compuestas tal como se definen según la invención, a las superficies de una zona de almacenamiento de grano mediante:

- 50 i) la recolección de las partículas compuestas en un aparato de espolvoreo,
- ii) la liberación de dichas partículas de dicho aparato de espolvoreo y hacia el interior de dicha zona de almacenamiento de grano.

55 En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento de control de la infestación por artrópodos de zonas de almacenamiento de grano en una zona de almacenamiento de grano, en el que una composición de polvos secos tal como se define según la invención se presenta a las superficies de una zona de almacenamiento de grano.

60 Se ha depositado un cultivo biológicamente puro de un nuevo aislado de *Beauveria bassiana* en CABI, Bakeham Lane, Egham, Surrey, TW20 9TY, Reino Unido, el 11 de mayo de 2010 de acuerdo con el Tratado de Budapest referente al depósito de microorganismos, recibiendo el número de depósito IMI 398548.

A continuación se proporcionan ejemplos y figuras que ilustran la invención. Debe apreciarse que la enseñanza de los ejemplos y figuras no debe interpretarse como limitativa de la invención en modo alguno.

65

Figuras

- 5 **Figura 1:** imágenes de microscopía electrónica de barrido de esporas del aislado IMI 398548 de *Beauveria bassiana* mezcladas con: (a) caolín, (b) caolín recubierto de ácido esteárico, (c) caolín recubierto con cera carnauba, (d) tierra diatomácea, (e) tierra diatomácea recubierta de ácido esteárico y (f) tierra diatomácea recubierta con cera carnauba. Las esporas son identificables como discos cóncavos de 2 a 3 μm .
- 10 **Figura 2:** imágenes de microscopía electrónica de barrido de esporas de aislado IMI 398548 de *Beauveria bassiana* mezcladas con (a y b) partículas de cera carnauba. Las esporas son identificables como discos cóncavos de 2 a 3 μm .
- 15 **Figura 3:** imágenes de microscopía electrónica de barrido de cutícula de *Oryzaephilus surinamensis* tras la exposición a copos de avena tratados con partículas de cera de carnauba y la mezcla de esporas de aislado IMI 398548 de *Beauveria bassiana* (a y b). Pueden apreciarse claramente partículas de cera de carnauba y esporas adheridas a la cutícula del insecto, en particular en torno a las fosas sensoriales. Las partículas de cera de carnauba son identificables como partículas irregulares de 2 a 10 μm y las esporas como discos cóncavos de 2 a 3 μm .
- 20 **Figura 4:** % media de coleópteros del grano, de tres especies, muertos en cada categoría de tratamiento 28 días después de la exposición a los tratamientos.
- 25 **Figura 5:** media de diámetros volumétricos medios (DVM) de formulaciones de cera de carnauba en polvo/esporas con diferentes proporciones de cera a esporas y con cera micronizada a diferentes velocidades. La columna negra representa las esporas solas (0E - sin cera carnauba). Las columnas sombreadas presentan errores estándares.

Sección de ejemplos

30 1. Descripción general

La presente sección contiene información sobre:

- 35
- por qué se seleccionan partículas de cera de carnauba como un portador adecuado para las esporas de *B. bassiana* diseñadas para la utilización contra artrópodos del grano almacenado, tales como los coleópteros del grano almacenado.
 - cómo se preparan las formulaciones de biopesticida.

40

 - de dónde proceden los materiales.
 - El ensayo de eficacia de las formulaciones en el campo.

45 2. Sumario

La utilización de cera de carnauba mezclada con esporas de *B. bassiana* (*Bb*), aislado IMI 398548, para el control de plagas de los almacenes en grano almacenado y para ambientes de procesamiento es una combinación particular útil porque:

- 50
- las esporas solas son suficientemente pequeñas para constituir un riesgo respiratorio, aunque la adición de partículas de cera de carnauba con determinados diámetros volumétricos medios de partícula a las esporas incrementa el diámetro medio de partícula hasta un nivel superior al umbral de riesgo.

55

 - Las esporas se adhieren al exterior de las partículas de cera de carnauba y acaban colocalizándose. Se ha observado que la colocalización es significativamente más baja en el caso de que las esporas se mezclen con otras partículas en polvo de un intervalo de tamaños de partícula similar.
 - Las partículas de cera de carnauba se adhieren a las cutículas de insecto mediante atracción electrostática; de esta manera, la cera de carnauba transporta las esporas hasta el sitio de infección del artrópodo.

60

 - Al adherirse la partícula compuesta de espora:cera carnauba a un insecto, se observa que las esporas se desenganchan de la partícula de cera de carnauba y se unen preferentemente a la cutícula del artrópodo, 'administrando' de esta manera las esporas en la cutícula del artrópodo gracias al componente partícula de cera de carnauba de la partícula compuesta.

65

- Al someterla a ensayo en un ambiente de almacenamiento de grano, una formulación de partículas de cera carnauba:aislado *Bb* (IMI 398548) resultó en niveles de mortalidad más altos de tres plagas diana de artrópodo de grano almacenado (coleópteros de grano almacenado) que una formulación de base aceite con la misma concentración de esporas.

5

3. Introducción

Dichos estudios forman parte de un programa de investigación para desarrollar la utilización de esporas fúngicas y reducir el uso de pesticidas químicos en ambientes de almacenamiento y procesamiento de alimentos. El objetivo principal de este programa era desarrollar una formulación basada en patógenos para grietas y hendiduras destinada a la utilización como tratamiento de depósitos vacíos de alimentos o de almacenamiento. En lugar de aplicar convencionalmente esporas fúngicas directamente en grietas y hendiduras, dicho programa de investigación ha investigado las perspectivas de utilizar portadores, incluyendo polvos inertes, partículas de cera de carnauba (Exosect Ltd., Winchester, Reino Unido) para la administración de las esporas fúngicas. Los polvos micronizados de cera de carnauba muestran propiedades electrostáticas y se ha demostrado que se adhieren a cutículas de insecto cargadas mediante atracción electrostática.

10

15

4. Cera de carnauba como portador para un micopesticida del grano

El presente proyecto demuestra que para que los aislados controlen plagas bajo las condiciones que representan las presentes en zonas de almacenamiento (de grano), resulta esencial mejorar la incorporación por parte de las plagas de las esporas fúngicas, su germinación sobre las plagas de artrópodos y su penetración en los mismos. Las esporas de *Bb* representan además un riesgo respiratorio significativo si se utilizan solas, debido a que el diámetro volumétrico medio de las esporas secas es de tan sólo 2 a 3 µm. Se ha demostrado que una muestra de polvo que comprende 50% en volumen de partículas con un diámetro aerodinámico ≤ 10 µm representa un riesgo de polvo torácico significativo, y aquellas con 50% de ≤ 4 µm representan un riesgo respirable significativo (British Standards Institution EN481, 1993). El riesgo representado por las esporas de *Bb* es más alto que el de un polvo inerte debido a la naturaleza proteica del material, convirtiéndolas en alérgenos inhalables (Westwood *et al.*, 2005). Por lo tanto, sería importante investigar los sistemas de administración y portadores potenciales de las esporas que podrían potenciar su incorporación y retención sobre las plagas de artrópodos y permitir su uso seguro. La cera carnauba, en el caso de mezclarse con las esporas, podría, mediante atracción electrostática, incrementar la incorporación y la retención de las esporas fúngicas por parte de las plagas de almacenamiento, incrementando simultáneamente además el tamaño de partícula medio de la mezcla hasta superar el nivel umbral de riesgo respirable. El 50% en volumen de las partículas de cera de carnauba en todos los casos es > 10 µm, medido mediante difracción láser de análisis de lotes repetidos en Exosect Limited.

20

25

30

35

4.1. Trabajo realizado por Exosect

Los presentes inventores han realizado una evaluación de la idoneidad de las partículas de cera de carnauba como portador para las esporas de *Bb* en comparación con otros polvos. Los presentes inventores han evaluado la adherencia de las esporas a las partículas de polvos de cera de carnauba bajo microscopía electrónica de barrido (MEB). Se seleccionó la tierra diatomácea (TD) y la arcilla de caolín para la comparación con las partículas de cera carnauba, ya que estas comprenden materia particulada fina utilizada actualmente en procedimientos convencionales de control de insectos. La capacidad de las esporas de adherirse a cada uno de los polvos se evaluó bajo MEB. La capacidad de las mezclas de polvos y esporas para después adherirse a las cutículas de los coleópteros se evaluó mediante el examen de los coleópteros tratados, *O. surinamensis*, bajo MEB.

40

45

La TD y la arcilla de caolín se mezclaron directamente con aislado de *Bb* atenuado seco (IMI 398548) o se formularon con recubrimientos de ácido esteárico o cera de carnauba (cera carnauba fundida) mediante fusión de los componentes en un recipiente, enfriamiento y posterior micronización en un molino utilizando procedimientos conocidos de la técnica. Se mezclaron los siete tipos de polvos con esporas fúngicas en una proporción de 5:1 (p/p) y se examinaron bajo MEB. A continuación, se expusieron diez coleópteros (de *O. surinamensis*) durante 48 h en placas Petri a 10 g de copos de avena que contenían 0,15 g de una mezcla de partículas de cera de carnauba y esporas en una proporción de 2:1 (p/p). A continuación, se extrajeron los coleópteros dejándolos en copos de avena limpios durante 24 h y después se examinaron bajo MEB.

50

55

Los polvos de arcilla de caolín y las partículas de TD utilizados en los estudios comprendía tamaños variables (diámetro de entre 1 y 5 µm) y eran de forma irregular. Se observaron algunas esporas que se adherían al exterior del caolín o de las partículas de TD; muchas esporas permanecieron sueltas dentro de ambas mezclas (figuras 1a y 1d). Al formular caolín y TD con un recubrimiento de ácido esteárico, se incrementó el tamaño de las partículas y las mezclas se apelmazaron aunque la adherencia de las esporas aparentemente mejoró (figuras 1b y 1e). Un recubrimiento de partículas de cera de carnauba provocó que los polvos de caolín formasen grandes agregados con algunas partículas de tamaño >100 µm; sin embargo, se observaron esporas que se adherían a todo el exterior de dichas partículas. Al recubrir TD en cera carnauba, se incrementó el tamaño de partícula, aunque no se agregó tanto como el caolín recubierto con cera carnauba; las esporas se adherieron bien a las partículas recubiertas (figs. 1c y 1f). La adherencia de las esporas fue mejor al recubrir el caolín y la TA con cera de carnauba que con ácido

60

65

esteárico. La totalidad de dichas formulaciones recubiertas requeriría un procesamiento adicional para reducir el tamaño y la agregación de las partículas.

Al mezclar las partículas de cera de carnauba con las esporas, se observó que las esporas se adherían en todas las superficies externas de las partículas de cera (figuras 2a y 2b) y no resultó necesario ningún procesamiento adicional para reducir el tamaño de las partículas. Se estimó que el % de superficie de polvos de portador cubierto con las esporas era de aproximadamente <5% para caolín y TD, de 10% a 20% para caolín recubierto con carnauba y TD, y de 50% para cera de carnauba sola. La cera de carnauba sola resultó en la mejor cobertura de las esporas y ésta también fue la formulación más sencilla de preparar debido a que se mezcló directamente sin aplicar primero un recubrimiento.

Al tratar los coleópteros de grano almacenado con la mezcla de esporas y cera carnauba, se identificó fácilmente las esporas y partículas de cera de carnauba adheridas a las cutículas de *O. surinamensis*, en particular en hendiduras y estructuras de la cutícula, tales como fosas sensoriales (figuras 3a y 3b). Los presentes inventores observaron además que las esporas ya no se adherían al exterior de las partículas de cera de carnauba sino que ahora aparentemente se adherían directamente a la cutícula del insecto.

En conclusión, la afinidad de las esporas de *Bb* y de las partículas de cera de carnauba proporciona pruebas de que la cera de carnauba podría actuar como un portador adecuado para las esporas y que resultaría superior a otros polvos con intervalos de tamaño de partícula similares. Las imágenes de MEB de *O. surinamensis* tratado con una mezcla de cera de carnauba y esporas mostraron que las esporas se desprendían de las partículas de cera de carnauba y se unían a la cutícula de los insectos. De esta manera, a pesar del excelente nivel de adherencia de las esporas a las partículas de cera carnauba, las esporas claramente presentaban una afinidad mayor para la cutícula de los insectos que para las partículas de cera carnauba. Boucias *et al.* (1988) demostraron que la hidrofobicidad de la cutícula de insecto y la pared conidial aparentemente media en la adhesión y no las fuerzas electrostáticas. La capacidad de unos polvos portadores de colocalizarse con las esporas y después desprenderse de las esporas al encontrarse en contacto con el insecto son atributos deseables de un sistema de administración de esporas.

Preparación de la formulación a base de cera carnauba

Para determinar la composición óptima de la formulación, Exosect investigó el efecto del diámetro volumétrico medio (DMV) de las partículas de cera de carnauba y la proporción de cera de carnauba a esporas atenuadas sobre el DVM final de la mezcla. El objetivo del estudio era determinar composiciones de formulación que se encontrasen comprendidas dentro de los límites del DMV seguro. Se seleccionaron tres velocidades que resultaron en lotes de cera de carnauba con DMV de 15,12, 34,14 y 62,33 μm . Se obtuvieron esporas de *Beauveria bassiana* atenuadas (calentadas en un horno) de la cepa IMI 398548 de CABI (Bakeham Lane, Englefield Green, Egham, Surrey TW20). Se mezcló cada lote de cera de carnauba con esporas en proporciones (p/p) de 3:1, 1:1 y 1:3 en viales para muestra separados. Se generaron tres muestras de réplica para cada formulación. Se midió el DMV y X50 (diámetro de partícula que es superior o igual al diámetro de 50% de las partículas) de cada muestra, así como las muestras de réplica de los lotes de cera de carnauba sola y las esporas solas, utilizando la difracción láser a una presión de 4 mbar (Sympatec: RODOS acoplado a HELOS H2098).

Se calculó el DVM medio de cada tipo de formulación a partir de las tres réplicas (figura 5). Las muestras de esporas con partículas de diámetros $2,49 \pm 0,0173 \mu\text{m}$, tal como indica la X50 (hasta el 50% de las esporas presentaba un tamaño de partícula $\leq 2,49 \pm 0,0173 \mu\text{m}$), presentaba de hecho una media de DVM de $10,41 \mu\text{m} \pm 0,97 \mu\text{m}$ debido a la presencia de unos cuantos agregados; sin embargo, este nivel es muy próximo al límite de riesgo para la respiración torácica de $10 \mu\text{m}$, lo que indica que las esporas por sí mismas podrían presentar un riesgo significativo para la respiración. Resultó evidente a partir del análisis que la inclusión de polvos de cera de carnauba incrementaba el DVM en comparación con las esporas solas.

Se transformaron logarítmicamente los datos en bruto de DVM para normalizarlos y después se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de los datos, con factores la velocidad de molienda y el porcentaje de cera carnauba. Tras el ANOVA se realizaron comparaciones de Tukey por pares en aquellos casos con efectos significativos, con el fin de determinar las diferencias entre los grupos de tratamiento. El análisis indicó que existían diferencias significativas en el DVM entre uno o más grupos de tratamiento. Se detectó un efecto significativo de la velocidad de micronización y del porcentaje de cera de carnauba sobre el DVM de la formulación (ANOVA: $F_{2,35}=144,245$, $P<0,001$ y $F_{3,35}=144,245$, $P<0,001$, respectivamente). No se observó diferencia estadísticamente significativa en el DVM de formulaciones que contenían 25% o 50% de cera carnauba, aunque el DVM de las formulaciones con 75% de cera de carnauba era significativamente mayor. Las formulaciones que se prepararon con cera de carnauba micronizada a 2.500, 4.000 o 8.000 rpm eran todas significativamente diferentes entre ellas, resultando la velocidad más lenta de molienda, de 2.500 rpm, en las formulaciones con el DVM más grande.

Los datos indican que la velocidad de molienda y el % de cera de carnauba pueden utilizarse para controlar el DVM de la formulación final. Se observaron diferencias más pequeñas entre las formulaciones micronizadas con la velocidad de molienda más rápida, de 8.000 rpm, y la velocidad de micronización más lenta, de 2.500 rpm. No se observó una gran diferencia de DVM entre las formulaciones que contenían 25% o 50% de cera carnauba. La

adición de 25% de cera de carnauba a las esporas incrementó el DVM de 10,41 μm a $>13 \mu\text{m}$, con la condición de que la cera se hubiese micronizado a 4.000 rpm o más lentamente; para el 50%, este DVM era $> 15 \mu\text{m}$ y para 75% este DVM era $> 20 \mu\text{m}$.

5 Se recomienda que la cera de carnauba en polvo para las formulaciones de biopesticida destinadas a grano se muele a ≤ 4.000 rpm debido a que la utilización de cera de carnauba molida a 8.000 rpm no incrementa el DVM significativamente en comparación con esporas solas, ni siquiera utilizando 75% de cera carnauba. Las esporas presentan una influencia mucho más fuerte sobre el DVM que la cera de carnauba debido a que son menos densas y, por lo tanto, para el mismo peso ocupan un volumen aproximadamente tres veces mayor (estimación visual) que la cera carnauba. En el caso de que pueda mantenerse la eficacia mediante la utilización de concentraciones más altas de cera de carnauba (por ejemplo 75% de cera en comparación con 25%), podrá reducirse el riesgo para la respiración que supone la formulación. También es probable que el incremento de la concentración de cera de carnauba resulte beneficioso para la aplicación del producto al incrementar el volumen del producto a la misma concentración de esporas, facilitando de esta manera la aplicación uniforme sobre la misma superficie.

15 Las esporas pueden mezclarse con la cera de carnauba en una proporción de entre 5% y 95% en peso del producto final, preferentemente por lo menos 50% en peso de cera carnauba, o más preferentemente por lo menos 75% en peso de cera carnauba, micronizada hasta un DVM $\geq 34 \mu\text{m}$ para mantener las formulaciones dentro de los límites seguros de DVM.

20 **5 Proveedores de materiales**

El aislado de *Bb* IMI 398548 se ha depositado en el CABI, tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria.

25 Las partículas de cera de carnauba utilizadas en la invención se prepararon mediante trituración de cera de carnauba no refinada (disponible de The British Wax Refining Co. Ltd., 62 Holmethorpe Avenue, Holmethorpe Industrial Estate, Redhill, Surrey, Reino Unido), triturándolas, seguido de una etapa de micronización utilizando técnicas utilizadas comúnmente.

30 **6. Ensayos de eficacia en el campo**

35 6.1. Método

Se llevó a cabo un ensayo a escala piloto de una formulación de biopesticida de base aceite y la basada en aceite carnauba.

40 El objetivo del ensayo era evaluar las formulaciones contra tres especies de insecto (*Oryzaephilus surinamensis* cepa Tram (gorgojo dientes de sierra), *Sitophilus granarius* cepa Gainsborough (gorgojo del grano) y *Cryptolestes ferrugineus* cepa C124 (gorgojo castaño de la harina)) aplicadas en recintos hechos de madera contrachapada en el ambiente de almacenamiento de grano. Resultó necesario examinar el efecto de las dos formulaciones al aplicarse a concentraciones similares: $2,5 \times 10^{10}$ conidios/ m^2 y $5,1 \times 10^{10}$ conidios/ m^2 . Además, se evaluó la viabilidad de Iso conidios en las dos formulaciones bajo condiciones de almacenamiento de grano típicas en el Reino Unido. También se llevó a cabo una comparación con un pesticida química actualmente registrado, pirimiphos metilo (Actellic). La formulación de polvos se pesó y se distribuyó uniformemente la cantidad apropiada en la superficie de suelo de los recintos asignados utilizando un cepillo de tamaño pequeño. La formulación de aceite y el pesticida de referencia se aplicaron utilizando pulverizadores calibrados. Se utilizaron cinco recintos de réplica para cada tratamiento y el control. Se añadieron cincuenta insectos de cada especie a cada recinto 24 h después del tratamiento y a continuación se evaluó la mortalidad en cada recinto 14 y 28 días después de la adición de los insectos. Se esterilizaron las superficies de los insectos muertos utilizando solución de hipoclorito sódico, se mantuvieron en un ambiente húmedo y se examinaron tras 3 a 4 días para evidencia de micosis con el fin de demostrar si la mortalidad se debía o no al tratamiento de *Bb*. Se realizó un seguimiento de la temperatura y la humedad durante todo el experimento.

55 6.2. Resultados

Se ilustran los resultados en la figura 4 y en la Tabla 1 (a continuación).

60 Tabla 1: % medio de mortalidad derivado de insectos 28 días después de la exposición a diferentes tratamientos. El % de mortalidad se expresa en términos del número acumulado de insectos muertos recuperados tras 14 y 28 días dividido por el número total de insectos recuperados tras 28 días y el número de insectos muertos tras 14 días. Los números entre paréntesis son los intervalos de confianza al 95% derivados. (A) Comparación de tratamientos y controles para las formulaciones de biopesticida. El blanco de aceite es el portador aceite sin conidios. El blanco de polvos es cera de carnauba sola (denominada Entostat® en la figura 4).

65

	Mortalidad media en %*		
	<i>S. granarius</i>	<i>O. surinamensis</i>	<i>C. ferrugineus</i>
Control (sin tratamiento)	1,7 a (0,3, 9,5)	11,4 a (4,5, 26,1)	8,7 a (3,5, 20,2)
Blanco de aceite	4,7 a (1,6, 13,2)	12,4 a (5,3, 26,4)	26,0 b (15,7, 39,9)
Blanco de polvos	5,8 a (2,2, 14,2)	9,3 a (3,4, 22,8)	21,5 a, b (12,1, 35,3)
Aceite 2,5x10 ¹⁰ /m ²	53,6 b (42,2, 64,6)	45,3 b (30,5, 61,0)	79,2 c (65,9, 88,2)
Aceite 5,1x10 ¹⁰ /m ²	56,5 b (44,9, 67,3)	52,5 b (37,4, 67,2)	79,8 c (66,1, 88,9)
Polvos 2,5x10 ¹⁰ /m ²	90,6 c (81,4, 95,5)	83,1 c (68,4, 91,8)	94,1 d (83,5, 98,1)
Polvos 5,1x10 ¹⁰ /m ²	90,9 c (82,1, 95,6)	79,8 c (64,8, 89,4)	95,1 d (84,6, 98,6)

*En cada columna, las medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (GLM, P>0,05)

El aislado IMI 398548 mostró un buen nivel de viabilidad (90,6% de germinación) y no se detectaron contaminantes.

5 La temperatura media registrada en el almacén de grano durante todo el ensayo fue de 16,0°C, con un mínimo de 6,7°C y un máximo de 24,4°C. La humedad media durante el ensayo registrada era de 77,1%, con un mínimo de 45,2% y un máximo de 96,0%.

10 La viabilidad de los conidios tanto en la formulación de aceite como de polvos se mantuvieron en niveles muy altos durante todo el ensayo, observándose una germinación superior al 80% con ambas formulaciones recuperadas de los cuadrados de madera contrachapada tratados.

A los 14 días de la exposición:

- 15
- se observó un efecto altamente significativo del tratamiento sobre la mortalidad de las tres especies tras 14 días de exposición (GLM, $F_{6,34}=26,65$, $P<0,001$; $F_{6,34}=18,57$, $P<0,001$ y $F_{6,34}=28,25$, $P<0,001$, para *S. granarius*, *O. surinamensis* y *C. ferrugineus*, respectivamente).
- 20
- No se observó ningún efecto de los controles de portador sobre la mortalidad.
 - La mortalidad de *S. granarius* y *C. ferrugineus* con las formulaciones de esporas tanto en aceite como de polvos en cualquiera de las concentraciones fue significativamente superior que en no tratados y tratamientos de portador.
- 25
- La mortalidad de *O. surinamensis* para la formulación de aceite que contenía 5,1x10¹⁰ conidios/m² y para ambas concentraciones de la formulación de cera de carnauba fue significativamente superior que para el no tratamiento o los controles de portador.
- 30
- El tratamiento con las formulaciones de cera carnauba:esporas resultó en una mortalidad significativamente superior para *S. granarius* y *O. surinamensis* que con las formulaciones de esporas en aceite a cualquiera de las concentraciones.
- 35
- El tratamiento con el pesticida de referencia resultó en una mortalidad significativamente superior que con todos los demás tratamientos.

A los 28 días de la exposición:

- 40
- Se observó un efecto altamente significativo del tratamiento sobre la mortalidad de las tres especies tras 28 días de exposición (GLM, $F_{6,34}=60,31$, $P<0,001$; $F_{6,34}=20,25$, $P<0,001$ y $F_{6,34}=35,47$, $P<0,001$, para *S. granarius*, *O. surinamensis* y *C. ferrugineus*, respectivamente).
 - No se detectó ningún efecto de los controles de portador sobre la mortalidad excepto con base aceite sobre *C. ferrugineus*.
- 45
- Las formulaciones de esporas tanto a base de aceite como a base de cera de carnauba a cualquiera de las concentraciones provocó una mortalidad significativamente superior de las tres especies que los controles no tratado y de portador.

- Se observaron diferencias significativas entre las formulaciones Entostat y de esporas en aceite bajo ambas concentraciones para las tres especies sometidas a ensayo al nivel de probabilidad del 5%.
- El tratamiento de pesticida de referencia resultó en una mortalidad significativamente superior que todos los demás tratamientos.

El examen posterior de los insectos muertos confirmó que la mayoría de muertes en los tratamientos de formulación de esporas había sido causada por micosis, mientras que las muertes en los tratamientos de pesticida y de control no se debieron a micosis. Lo anterior demuestra que *Bb* fue responsable de las muertes en los tratamientos relevantes.

6.3. Sumario

En resumen, las formulaciones de esporas a base de aceite y de cera de carnauba provocaron una mortalidad significativamente superior que cualquier tratamiento de control, aunque no tan alta como el tratamiento de pesticida de referencia (que provocó una mortalidad del 100%, tal como se esperaba). La formulación a base de cera de carnauba con la concentración más alta provocó una mortalidad de entre 80% y 95% de las tres especies sometidas a ensayo 28 días después de la exposición (figura 4). En general, las formulaciones a base de cera de carnauba presentaron un nivel de control más elevado que las formulaciones a base de aceite. Ambas formulaciones conservaron un buen nivel de viabilidad bajo condiciones de almacenamiento de grano típicas en el Reino Unido durante hasta 28 días.

7. Referencias

- Armsworth, C. G., I. H. Baxter, L. E. E. Barton, G. . Poppy, and C. Nansen. 2006. Effects of adhesive powders on the mating and flight behavior of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 99, 1194-1202.
- Armsworth, C. G., C. D. Rogers, L. E. E. Barton, C. Soares, and G. M. Poppy. 2008. Uptake of adhesive powders from lure stations by Mediterranean fruit fly (Dipt., Tephritidae). *J. Appl. Entomol.* 132: 45-53.
- Barton, L.E.E., Armsworth, C.G., Baxter, I.H., Poppy G.M., Gaunt, L.F., Nansen, C, 2006. Adhesive powder uptake and transfer by Mediterranean Fruit Flies, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 130, 257-262.
- Baxter, I. H. 2008 Entomopathogen based autodissemination for the control of *Plodia interpunctella* (Hiibner) - an examination of the critical components. PhD Thesis University of Southampton.
- Baxter, I. H., N. Howard, C. G. Armsworth, L. E. E. Barton, and C. Jackson. 2008. The potential of two electrostatic powders as the basis for an autodissemination control method of *Plodia interpunctella* (Hiibner). *J. Stored Prod. Res.* 44:152-161.
- Boucias D. G., Pendland J. C. & Latge J. P. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1795-1805.
- British Standards Institution (1993) BS EN 481 :1993 Workplace atmospheres. Size fraction definitions for measurement of airborne particles. ISBN 0 580 221 0 7.
- Howse, P. E., and K. L. Underwood. 2000. Environmentally-safe pest control using novel bioelectrostatic techniques: initial results and prospects for area-wide usage, pp. 295-299. In K. H. Tan (ed.), *Area-wide control of fruit flies and other insects*. Penerbit University Sains Malaysia, Penang.
- Meikle, W. G., G. Mercadier, N. Hoist, C. Nansen, and V. Girod. 2007. Duration and spread of an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes), used to treat varroa mites (Acari: Varroidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) hives. *J. Econ. Entomol.* 100: 1 -10.
- Nansen, C, MacDonald, K.M., Rogers, CD., Thomas, M., Poppy, G.M., Baxter, I.H., 2007. Effects of sex pheromone in electrostatic powder on mating behaviour by *Lobesia botrana* males. *Journal of Applied Entomology* 131 , 303-310.
- Nansen, C, Barton, L.E.E. & Nansen, M. 2007. Uptake, retention, and repellency of a potential carrier of active ingredients in crack and crevice treatments for stored-grain beetles. *Journal of Stored Products Research*, vol. 43, no4, pp. 417-424.
- Westwood, G.S., Huang, S. & Keyhani, N.O. 2005. Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Clinical and Molecular Allergy* 3.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una partícula compuesta en el control de la infestación de artrópodos de almacenamiento de grano en una zona de almacenamiento de grano, en la que la partícula compuesta comprende:
- 10 i) una partícula hidrófoba que se adhiere a la cutícula de por lo menos una especie de un artrópodo de almacenamiento de grano; y
- 15 ii) unas esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, cepa IMI 398548, que se adhieren a las partículas hidrófobas y pueden germinar sobre la cutícula de por lo menos una especie de artrópodo de almacenamiento de grano.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que la partícula hidrófoba es una cera que presenta un punto de fusión $\geq 50^{\circ}\text{C}$.
3. Utilización según la reivindicación 2, en la que la cera presenta un punto de fusión $\geq 60^{\circ}\text{C}$.
4. Utilización según la reivindicación 2 o 3, en la que la cera se selecciona de entre cera de carnauba, cera de abejas, cera china, cera de goma laca, cera de de blanco de ballena, cera de candelilla, cera de ricino, cera de ouricuri y cera de salvado de arroz.
5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la cera es la cera de carnauba.
6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que por lo menos una especie de artrópodo de almacenamiento de grano es un insecto.
7. Utilización según la reivindicación 6, en la que por lo menos una especie de artrópodo de almacenamiento de grano se selecciona de entre *Oryzaephilus surinamensis* (carcoma dentada del grano), *Sitophilus granarius* (gorgojo del grano) y *Cryptolestes ferrugineus* (carcoma achatada del grano).
8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la partícula compuesta presenta un diámetro $\geq 10 \mu\text{m}$.
9. Utilización de una composición de polvos secos eficaz en el control de poblaciones de artrópodos de almacenamiento de grano en una zona de almacenamiento de grano, comprendiendo la composición unas partículas compuestas que comprenden:
- 40 i) unas partículas hidrófobas que se adhieren a las cutículas de una o más especies de artrópodo de almacenamiento de grano; y
- 45 ii) unas esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, cepa IMI 398548 que se adhieren a las partículas hidrófobas y pueden germinar sobre las cutículas de por lo menos una especie de artrópodo de almacenamiento de grano.
10. Utilización según la reivindicación 9, en la que las partículas compuestas presentan un diámetro medio volumétrico $\geq 10 \mu\text{m}$.
11. Utilización según la reivindicación 10, en la que el diámetro medio volumétrico es $\geq 12 \mu\text{m}$.
- 50 12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que el peso de las partículas hidrófobas es de 50 a 80% en peso de las partículas compuestas.
13. Procedimiento de control de la infestación de artrópodos de almacenamiento de grano en una zona de almacenamiento de grano, en el que las partículas compuestas como se definen según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 se presentan a las superficies de la zona de almacenamiento de grano:
- 55 i) recogiendo las partículas compuestas en un aparato de espolvoreo, e
- 60 ii) liberando las partículas compuestas de dicho aparato de espolvoreo y hacia el interior de la zona de almacenamiento de grano.
14. Procedimiento de control de la infestación de artrópodos de almacenamiento de grano en una zona de almacenamiento de grano, en el que una composición de polvos secos como se define según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 se presenta a las superficies de la zona de almacenamiento de grano.

Figura 1

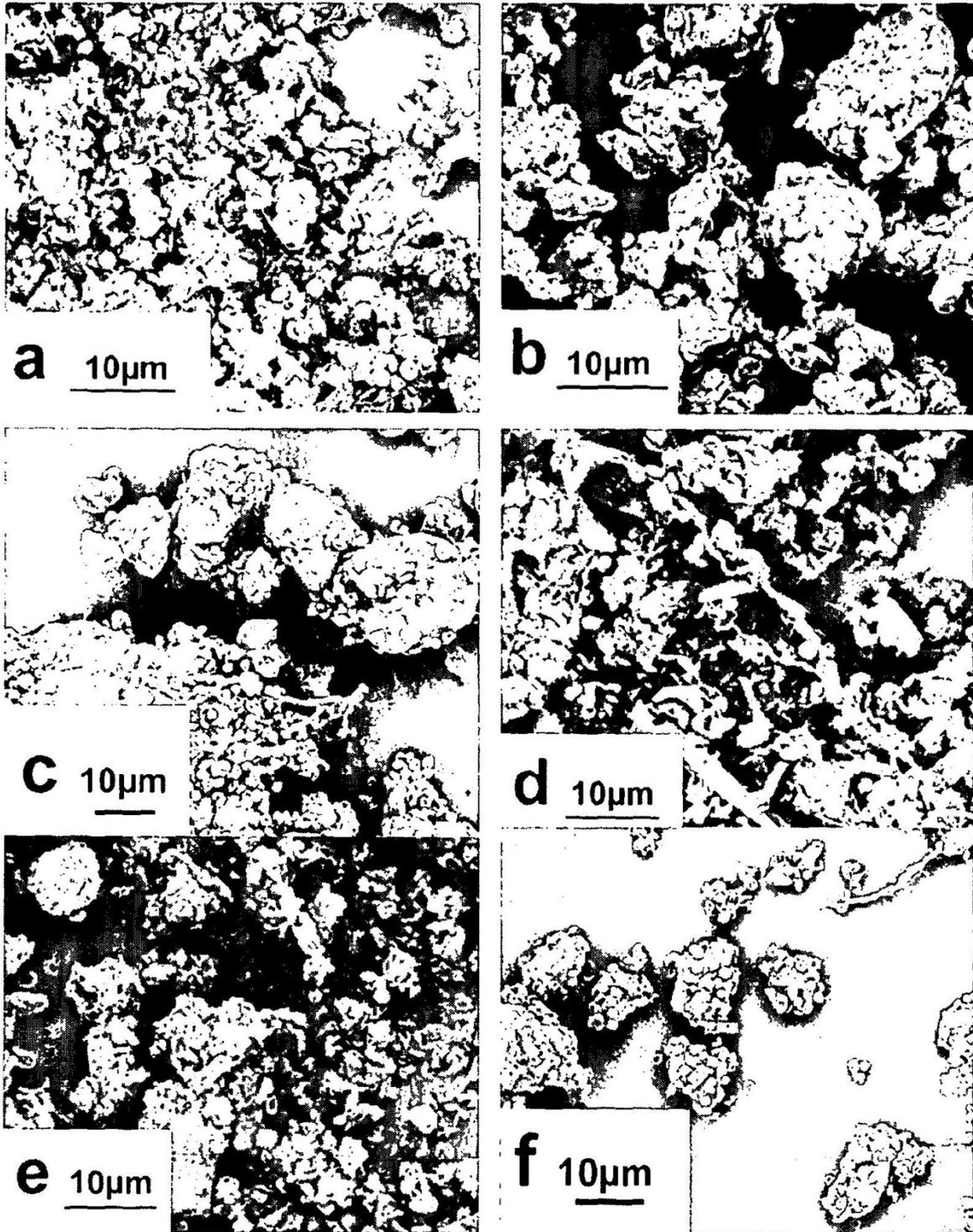


Figura 2

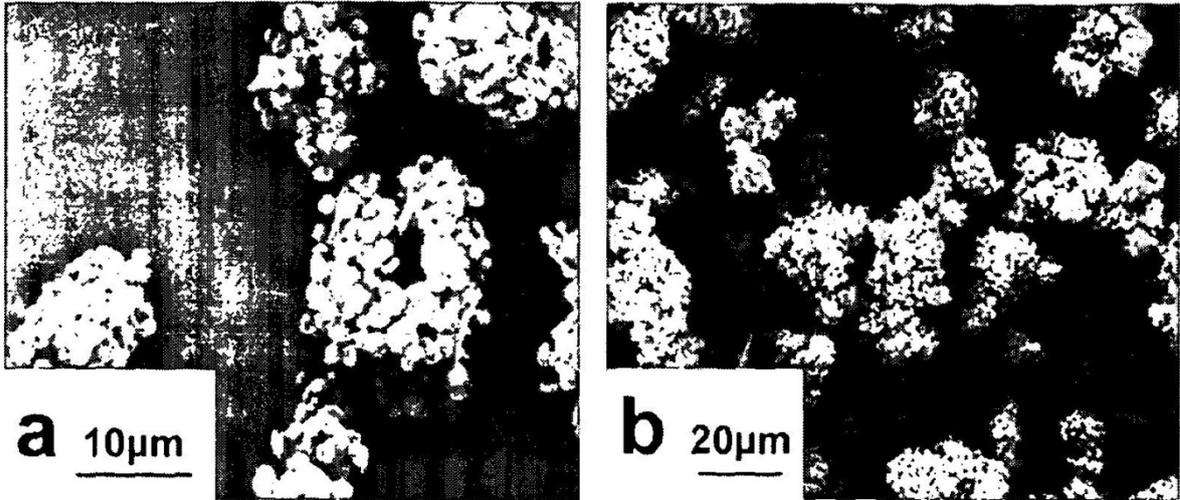
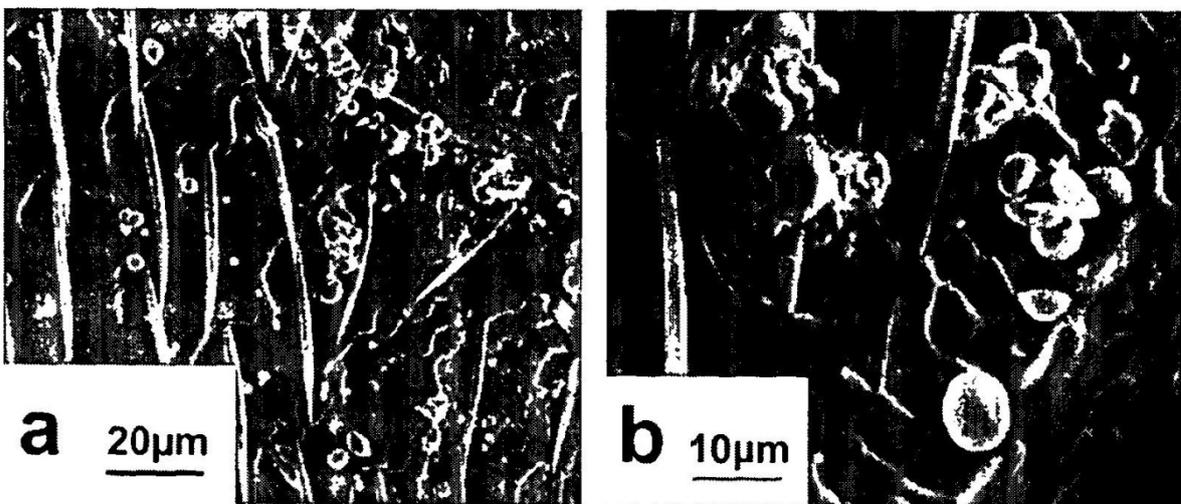


Figura 3



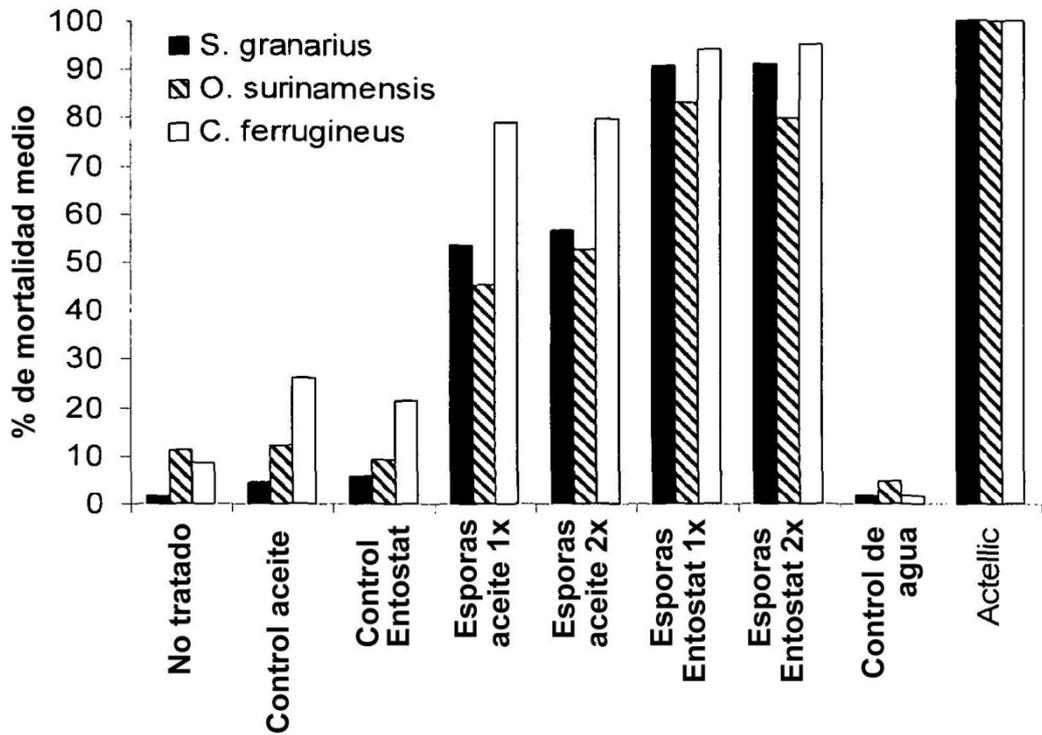


Figura 4

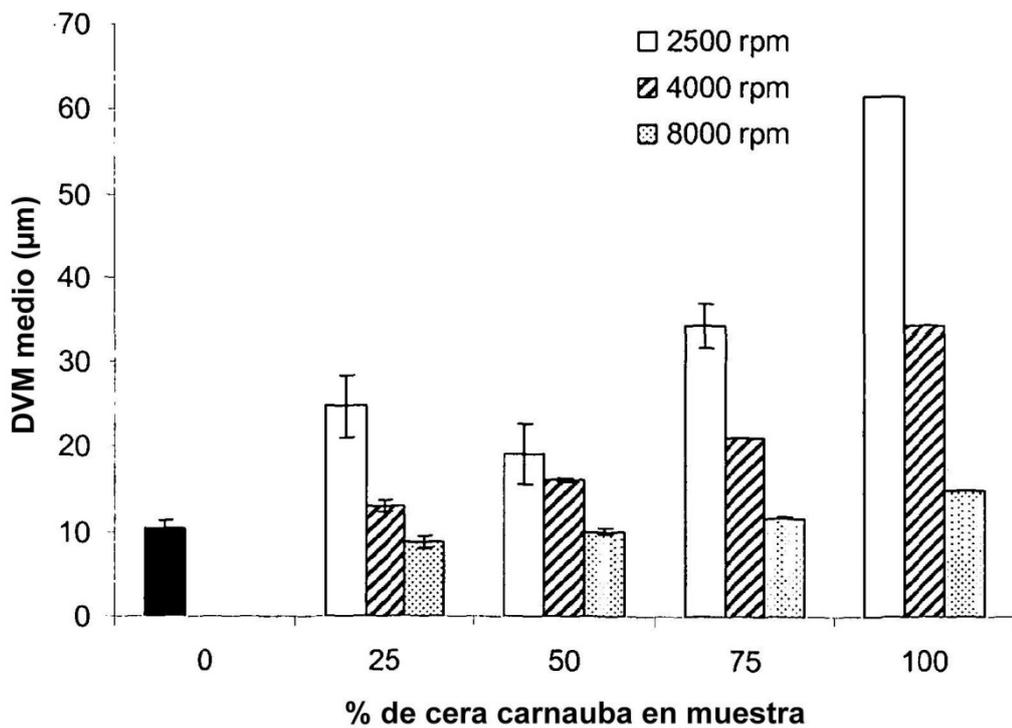


Figura 5