

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 638**

51 Int. Cl.:

A01N 65/00	(2009.01)
A01N 65/42	(2009.01)
A01P 7/04	(2006.01)
A01N 25/08	(2006.01)
A01P 5/00	(2006.01)
A01P 17/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2006 PCT/GB2006/001290**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2006 WO06109028**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2006 E 06726691 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 1868439**

54 Título: **Un plaguicida y repelente**

30 Prioridad:

09.04.2005 GB 0507227

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2018

73 Titular/es:

**ECOSPRAY LIMITED (100.0%)
Grange Farm Cockley Cley Road
Hilborough, Thetford, IP26 5BT, GB**

72 Inventor/es:

**GROOM, MURREE y
SADLER-BRIDGE, DAVID**

74 Agente/Representante:

POINDRON, Cyrille

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 660 638 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

Un plaguicida y repelente

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al uso de materiales tales como, por ejemplo, insecticidas, nematodos y molusquicidas y, más particularmente, se refiere al uso de un concentrado obtenido del ajo para estos fines.

10 Revisión del estado de la técnica conocido por el solicitante

Se espera que la revisión de la Unión Europea de los ingredientes activos de los plaguicidas conduzca a la eliminación de más del 66% de las sustancias activas actualmente aprobadas para 2007. Por lo tanto, se necesitan nuevos plaguicidas más respetuosos con el medio ambiente.

15 El uso de aceite de ajo como repelente aviar ha sido previamente informado por Hile et al en el Journal of Agricultural and Food Chemistry 2004, Volumen 52, Nº 8, páginas 2192 a 2196 (1). También se han publicado preparaciones derivadas del ajo que muestran actividad repelente de insectos y la toxicidad del ajo para el mosquito y otras larvas de insectos, véase E. Block, et al, Angew Chem. Int. Ed. Engl. 1992, 31, 1135-1178 (2); Kadota, Y. Insect repellents made from plant and herb extracts, JP 2003192516, 2003 (Chem. Abstr. 2003, 139, 48654) (3); y Bhuyan, M.; Saxena, B.N.; Rao, K.M. Repellent Property of Oil Fraction of Garlic, *Allium Sativum* Linn. Ind. J. Exp. Biol. 1974, 12, 575-6 (4). Se hacen referencias adicionales en la referencia (1) a preparaciones derivadas de ajo que tienen actividad repelente hacia animales pequeños y también que las aplicaciones tópicas de ajo reducen las infestaciones de ácaros de las aves del norte en gallinas ponedoras. La actividad nematocida de la alicina, un extracto del ajo, también ha sido reportado en International Journal of Pest Management, 1993, 39 (4), 390-392 (5). Las propiedades molusquicidas del ajo también han sido reportadas, D.K. Singh y A. Singh. *Allium sativum* (garlic), A potent new molluscicide, Biological Agriculture and Horticulture 1993, vol. 9, No. 2, páginas 121 a 124 (6). Una revisión de las propiedades antimicrobianas de la alicina fue reportada por S. Ankri y D. Mirelman en Microbes and Infection, 1999, 125-129 (7).

30 Un artículo en el Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 2003, 25, páginas 1024-1038, titulado "Insecticidal Properties of Garlic", Singh et al detallan varios métodos convencionales de preparación de extractos de ajo tales como extracción con agua, extracción con disolvente y también detalla el uso de la destilación al vapor para obtener aceite de ajo.

35 Un artículo en el Indian J. Agric. Sciences 1980, 50, páginas 507-510 titulado "Extracts of garlic as possible sources of insecticides" detalla el uso del aceite de ajo obtenido por destilación al vapor de los dientes de ajo picados; el uso de un extracto metanólico del ajo; y el uso de extractos en agua y éter obtenidos cuando el ajo picado se exprimía a través de una pieza de muselina, como insecticidas contra *Spodoptera litura*, *Euproctis* sp. y *Culex* sp.

40 El resumen de un artículo en el Ind. J. Nematology 1991, 21, páginas 14-18 (Gupta et al) se refiere al uso de un extracto acuoso de ajo que tiene propiedades nematodos. También se hace referencia al uso de una fracción de aceite destilado de ajo que se dice que es tóxico contra las larvas de nematodos. Además, el resumen detalla el uso de clavo en polvo como nematocida.

45 Solicitud de patente de los Estados Unidos: la patente de Estados Unidos No. 5.733.552 detalla el uso de un zumo de ajo diluido sobre hierba, arbustos y árboles como un medio para repeler mosquitos.

50 Solicitud de patente europea: EP0945066A1 se refiere al uso de una mezcla de aceite o extracto de ajo que se combina con aceites esenciales para proporcionar un insecticida/fungicida mejorado.

55 El documento WO2005/055713 (documento que pertenece a la técnica anterior según el artículo 54(3) EPC) describe composiciones basadas en polisulfuros de dialilo y a bioplaguicidas que comprenden dichas composiciones.

El documento CN1372840A describe aceite de ajo y un método de preparación del mismo.

60 Calvo-Gomez et al (J. Chromotography A, 2004, volumen 1036, páginas 91 a 93) describen el análisis por cromatografía de gases - espectrometría de masas de una microextracción en fase sólida del aceite de ajo obtenido por hidrodestilación.

Calvey et al (J. Agric. Food Chem., volumen 45, páginas 4406 a 4413) describen la extracción con fluido supercrítico y LC-APCI-MS de tiosulfatos y compuestos relacionados de homogeneizados de ajo, cebolla y puerro salvaje.

65 Staba et al (J Nutr. 2001 Mar; 131(3s): 1118S-9S) proporcionan un comentario sobre los efectos de la extracción y formulación del ajo sobre la composición del producto.

Singh et al (Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 2003, 25 (4): 1024 a 1038) describen una revisión de las propiedades insecticidas del ajo.

5 Mason et al (Crop Protection, 1997, volumen 16, no. 2, páginas 107 a 108) describen la repelencia del extracto de ajo para estorninos europeos.

Allium S.E. (Artículo de Internet, 1997-11-16, URL: http://www.cyberstreet.com/garlic/gar_bar.htm, obtenido 1999-06-29) describe el producto Garlic Barrier® y sus usos (por ejemplo, control de insectos).

10 Hay problemas asociados con la producción de aceite de ajo ya que requiere una separación del aceite del jugo natural. Esto normalmente implica que el ajo sea triturado y calentado a 100°C para llevar a cabo una destilación al vapor. El aceite de ajo se separa luego de una fase acuosa al enfriarse.

15 También existen ciertos problemas inherentes al uso de aceite de ajo, ya que el aceite de ajo a temperatura ambiente es un líquido viscoso que es difícil de diluir y requiere el uso de un disolvente portador que también debe ser miscible con el líquido utilizado como diluyente. El uso de tales disolventes portadores restringe el uso del aceite de ajo en la agricultura orgánica y presenta otras dificultades relacionadas con los aspectos de salud y seguridad asociados con el uso de dichos solventes.

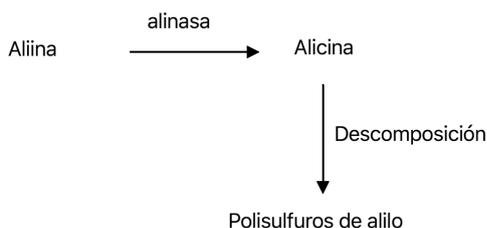
20 Por lo tanto, es ventajoso que, en lugar de aislar el aceite del ajo como se describió previamente, el ajo simplemente se triture y el jugo así producido se use directamente. Desafortunadamente, el zumo de ajo aislado de esta manera es propenso a la descomposición a través de una combinación de degradación química y actividad microbiológica. Los componentes azufrados del zumo de ajo presumiblemente se oxidan hasta dióxido de azufre/azufre y los componentes orgánicos se oxidan/hidrolizan hasta cetonas o se degradan hasta dióxido de carbono a través de la respiración. Como tal, si se va a utilizar el zumo de ajo extraído, debe aislarse en forma fresca del ajo y usarse casi de inmediato para garantizar la máxima eficacia como plaguicida/biocida. Se puede retener un nivel de actividad del material marcadamente reducido como repelente después del almacenamiento.

30 Por lo tanto, sería ventajoso si pudiera proporcionarse un material que tuviera las propiedades asociadas con el aceite de ajo/extracto de ajo fresco en términos de su repelencia para diversas formas de vida y su acción como plaguicida, pero que no requiera la etapa de destilación a vapor involucrada en el aislamiento del aceite de ajo. Tal material se describe aquí junto con un proceso para la producción de ese material.

35 Antecedentes

Se cree que las propiedades del aceite de ajo y los extractos de ajo, como se describió anteriormente, se derivan de la presencia de polisulfuros de alilo que se producen después de la ruptura de las paredes celulares del ajo durante el proceso de trituración. En este proceso, la aliina se convierte en alicina por una enzima llamada alinasa. Posteriormente, la alicina se descompone para formar polisulfuros como se muestra en el esquema 1.

40



Esquema 1

45 Se cree que los polisulfuros de alilo dan a los extractos de ajo y al aceite de ajo su actividad biológica y propiedades repelentes. Se cree que esta actividad biológica del ajo se debe a los polisulfuros de alilo que actúan como inhibidores de enzimas, secuestrantes de metales, disolventes que son activos en las membranas celulares, inhibidores respiratorios y como antibióticos generales.

Sumario de la invención

50 Se proporciona el uso de un plaguicida o repelente que comprende un concentrado de zumo de ajo líquido, obtenido por la eliminación de agua del zumo de ajo y que tiene un valor Brix de entre 60 y 80, tal como:

- a. un nematocida;
- b. un molusquicida;
- 55 c. un insecticida contra la mosca de la raíz de la col; o
- d. un repelente aviar o de conejo

- 5 El concentrado descrito en este documento tiene las propiedades asociadas con el aceite de ajo/extracto de ajo fresco en términos de su repelencia a diversas formas de vida y su acción como plaguicida, pero no requiere la etapa de destilación involucrada en el aislamiento del aceite de ajo y adicionalmente es estable al almacenamiento a largo plazo sin una disminución en la actividad del material. Esta estabilidad se debe, al menos en parte, a la eliminación de agua del jugo extraído. Esto proporciona un concentrado que posee poco o nada de agua libre que puede ser utilizada por los organismos vivos que normalmente son responsables de la descomposición de las partes componentes del zumo de ajo que le dan su actividad biológica.
- 10 Preferiblemente, el agua se elimina por destilación a presión reducida a temperaturas inferiores a 40°C. De esta manera, la descomposición de las partes componentes del extracto de ajo se minimiza durante su concentración.
- 15 El concentrado tiene un valor Brix entre 60 y 80. Es la eliminación del agua para producir un concentrado con un valor Brix en este intervalo lo que proporciona la estabilidad observada con respecto al concentrado descrito en este documento.
- 20 Preferiblemente, los polisulfuros totales en el concentrado están en el intervalo de 2 a 4% p/p.
- 25 Preferiblemente, los sulfuros de dialilo de la fórmula RSR, RS₂R, RS₃R y RS₄R representan 66% ± 10% en peso del total de polisulfuros presentes, en donde R = grupo alilo.
- 30 Preferiblemente, el sulfuro de dialilo: disulfuro de dialilo: trisulfuro de dialilo: tetrasulfuro de dialilo están presentes en una proporción de 4%-5%:5%-8%:31%-38%:19%-22% como % en peso del total de polisulfuros presentes. Un concentrado que contiene estos componentes, y en estas proporciones proporciona un plaguicida con una actividad biológica consistente que de otro modo podría obtenerse debido a la variabilidad natural de los bulbos de ajo. Los concentrados de un intervalo de material de materia prima pueden mezclarse fácilmente para lograr esta composición.
- 35 Preferiblemente, el agua se extrae por ósmosis inversa.
- 40 De esta manera, se describe un proceso en el que se consume la cantidad mínima de energía para aislar el concentrado. Además, el concentrado tiene una eficacia máxima como plaguicida ya que se minimiza el nivel de calentamiento al que se expone el concentrado.
- 45 Se pueden agregar polisulfuros adicionales para enriquecer el contenido de polisulfuros. Se espera que tal adición de polisulfuros mejore el rendimiento de la mezcla como un plaguicida, como un repelente y también se espera que mejore el tiempo de residencia de la mezcla cuando se aplica bajo condiciones al aire libre.
- 50 Los polisulfuros pueden agregarse en forma de aceite de ajo. El aceite de ajo es una forma particularmente útil de polisulfuros para usarse con propósitos de enriquecimiento debido a la falta de agua en el aceite, la adición de materiales que contienen agua desestabilizaría la matriz del concentrado reduciendo la estabilidad del material.
- 55 También se describe un proceso para la producción de un plaguicida en forma de un concentrado líquido obtenido a partir del ajo mediante las etapas de:
- trituración del ajo
 - separando del material sólido del líquido producido
 - llevar a cabo una etapa de calentamiento en el líquido para pasteurizarlo
 - y eliminación del agua del líquido mediante destilación a presión reducida a una temperatura de aproximadamente 40°C.
- 60 Al aislar y concentrar el zumo de ajo de esta manera se obtiene un concentrado que tiene la máxima eficacia como plaguicida y que además evita el gasto de energía asociado con la destilación a alta temperatura que se usa normalmente para producir aceite de ajo.
- 65 Más preferiblemente, el agua se elimina del líquido a una temperatura de menos de 25°C y a una presión reducida apropiada. De esta forma, la eficacia del material producido como plaguicida puede optimizarse aún más.
- Se prefiere particularmente que el agua se extraiga por ósmosis inversa. De esta forma, se proporciona un proceso en el que se gasta la cantidad mínima de energía para aislar el concentrado. Además, el concentrado tiene una eficacia máxima como plaguicida ya que se minimiza el nivel de calentamiento al que se expone el concentrado.
- En las realizaciones preferidas, el plaguicida o repelente comprende gránulos basados en harina de madera impregnados con el concentrado de zumo de ajo líquido. Por lo tanto, el plaguicida se basa completamente en materiales que se producen naturalmente en el ajo y los únicos residuos que deja el uso del plaguicida son los mismos residuos que dejan los cultivos de puerros o ajo. Sin embargo, el uso del plaguicida divulgado deja residuos en un nivel mucho más bajo que los observados por el cultivo de puerros y cultivos de ajo. Adicionalmente, se cree

también que impregnar un gránulo de harina de madera de este modo da como resultado un secado adicional eficaz del concentrado y, de este modo, se mejora el tiempo durante el cual el concentrado mantiene su actividad. También mejora la facilidad de manejo del material y su longevidad en el campo.

5 El plaguicida en forma de concentrado líquido o gránulos impregnados de concentrado, como se describió previamente, es particularmente útil como insecticida. Se ha demostrado que el concentrado o los gránulos impregnados descritos son eficaces para controlar la mosca de la raíz de la col y es tóxico para las larvas de mosquitos, así como otras larvas. Se cree que estos resultados demuestran que estos materiales serán eficaces contra una gama mucho más amplia de insectos que son plagas conocidas.

10 El plaguicida en forma de concentrado líquido o los gránulos impregnados de concentrado, como se describió previamente, es particularmente útil como nematocida. Se ha encontrado que el concentrado de ajo y el gránulo impregnado descrito son particularmente eficaces contra los nematodos.

15 El plaguicida en forma de concentrado líquido o los gránulos impregnados de concentrado, como se describió previamente, es particularmente útil como repelente para aves. Los productos a base de ajo han demostrado previamente ser efectivos como repelentes para las aves. Por lo tanto, es razonable suponer que el concentrado líquido y/o los gránulos impregnados de concentrado descritos en la presente memoria también mostrarán dicha actividad, pero con los beneficios adicionales de la estabilidad conferida por la matriz del concentrado.

20 El plaguicida en forma de concentrado líquido o gránulos impregnados de concentrado, como se describió previamente, es particularmente útil como repelente de conejos. Los resultados incluidos en la presente descripción muestran que el gránulo impregnado de concentrado actúa como un repelente para conejos y, por lo tanto, es razonable suponer que el concentrado mostrará la misma actividad.

25 El plaguicida en forma de concentrado líquido o gránulos impregnados de concentrado, como se ha descrito previamente, se puede usar como un repelente de insectos.

30 Se describe una composición plaguicida caracterizada porque comprende gránulos basados en harina de madera impregnados con aceite de ajo líquido. Los resultados divulgados en este documento muestran la efectividad de los gránulos impregnados con el concentrado de ajo de la presente descripción y, por lo tanto, es razonable suponer que el aceite de ajo impregnado sobre gránulos a base de harina de madera mostraría una actividad similar. Al impregnar el aceite de ajo en tales gránulos, se simplificaría la manipulación del aceite de ajo y también se eliminaría el requisito del uso de disolventes para la dispersión del aceite de ajo.

35 Se describe una composición plaguicida caracterizada porque comprende gránulos a base de harina de madera impregnados con líquido extraído de ajo recién triturado. Los resultados divulgados en este documento muestran la efectividad de los gránulos impregnados con el concentrado de ajo de la presente descripción y por lo tanto es razonable suponer que el líquido extraído del ajo recién triturado impregnado en gránulos a base de harina de madera mostraría una actividad similar. Además, el jugo extraído impregnado en la harina de madera tendrá una estabilidad mejorada contra la descomposición ya que un cierto grado del agua se unirá con la harina de madera y se eliminará agua adicional mediante el proceso de secado descrito en este documento.

45 Descripción detallada

Se puede producir un zumo de ajo concentrado de acuerdo con el siguiente método:

- 1) Se lava el ajo fresco;
- 2) Se tritura el ajo;
- 50 3) Se lleva a cabo un prensado para separar los sólidos del líquido;
- 4) El zumo de ajo se filtra (la filtración normalmente se lleva a cabo usando un filtro de 50 micras);
- 5) Se lleva a cabo una etapa de pasteurización, se calienta el jugo a una temperatura de 90°C durante aproximadamente 30 segundos o se puede usar una temperatura inferior de 60°C durante un período más prolongado de hasta 2 minutos;
- 55 6) Luego, se puede llevar a cabo una etapa de clarificación para eliminar cualquier material suspendido en el líquido;
- 7) El agua se elimina por destilación reducida al vacío.

Esto produce el extracto de ajo concentrado como un líquido marrón viscoso.

60 El agua se elimina por destilación a presión reducida a una temperatura inferior a 40°C, ya que esto evita la descomposición de los componentes del concentrado de ajo y más preferiblemente la presión se reduce hasta un punto tal que la eliminación de agua puede ser llevada a cabo a 25°C.

65 Es importante señalar que ninguna de las técnicas anteriores citadas detalla la formación de un concentrado de zumo de ajo en el que el agua se elimina de un zumo de ajo simplemente por destilación a presión reducida. Toda la técnica anterior conocida por el solicitante detalla el uso de técnicas de extracción estándar para aislar los

ingredientes activos del zumo de ajo mediante el uso de extracción con agua, técnicas estándar de extracción con disolventes o mediante el uso de destilación a vapor para obtener aceite de ajo.

5 El análisis del concentrado producido por el método anterior proporciona datos analíticos en los siguientes intervalos:

Materia seca (Brix): 60-80

pH (Sol. al 10%): 4,0-5,0

Acidez (meq/kg): 300-400

10 (Equivalente a 2,1-2,8% de ácido cítrico monohidratado)

Carbohidratos disponibles 45-55%

1 kg de concentrado es equivalente a aproximadamente 7 kg de ajo fresco

15 Análisis por HPLC

El método de análisis preferido para determinar la relación relativa de los polisulfuros de dialilo presentes en el concentrado es la HPLC. Los detalles de los métodos de HPLC y el método de la literatura en los que se basan se proporcionan en el Apéndice 1. El tercer método (RBSULF3) descrito en el Apéndice 1 que corresponde al método RBSULF1 con un tiempo de equilibrio extendido es el método preferido de análisis por HPLC. Se proporciona un cromatograma obtenido a partir de una muestra estándar de Garlic Oil Gold (cromatograma 1) con los picos principales del cromatograma identificados. El cromatograma 2 es también un cromatograma para un estándar de ajo. También se muestra un cromatograma de una muestra para un concentrado de zumo de ajo, etiquetado como, Producto de Ajo (cromatograma 3).

25 El análisis del concentrado por HPLC muestra que los polisulfuros totales presentes están en el intervalo de 2,4 a 3,6% p/p. De estos polisulfuros, los sulfuros de dialilo de la fórmula RSR, RS₂R, RS₃R y RS₄R (R = grupo alilo de la fórmula -CH₂CHCH₂) están presentes en la proporción aproximada de 4%-5%: 5%-8%: 31%-38%:19%-22% como% en peso del total de polisulfuros presentes. Estos polisulfuros representan colectivamente aproximadamente 66% +/- 10% de todas las especies organoazufradas presentes en el concentrado según lo determinado por HPLC.

30 El concentrado producido por el proceso anterior tiene, por lo tanto, un alto grado de similitud química con respecto a los polisulfuros presentes en aquellos materiales que se encuentran en los líquidos producidos simplemente triturando y procesando ajo fresco y a los presentes en aceite de ajo.

35 Se cree que la actividad biológica del concentrado de ajo descrito en este documento se debe a esta relación particular de polisulfuros de dialilo y polisulfuros de metil-alilo.

40 La eliminación de agua de la manera anterior para proporcionar un concentrado de ajo que mantiene su estabilidad cuando se almacena durante un período prolongado tiene ventajas claras en comparación con el proceso utilizado para aislar el aceite de ajo, o en comparación con el jugo obtenido simplemente aplastando fresco ajo. Se cree que el concentrado producido por el proceso anterior mantendrá la actividad como se describe a continuación durante al menos 3 años, un período mucho más largo que el zumo de ajo no concentrado. Se analizaron muestras de concentrado para un componente activo clave, después del almacenamiento en condiciones típicas industriales de "abuso de temperatura", con los siguientes resultados:

Edad del concentrado	Concentración total de polisulfuro
3 años 10 meses	2,96 (% p/p)
3 años 2 meses	2,74 (% p/p)
2 años 9 meses	2,67 (% p/p)
1 año 4 meses	3,61 (% p/p)

La consistencia de estos resultados analíticos demuestra la estabilidad a largo plazo del producto.

50 Se cree que el calentamiento del líquido extraído a una temperatura de 60-90°C durante un corto período de tiempo conduce a la conversión de la alicina en el extracto de ajo que se convierte en polisulfuros con la relación particular de polisulfuros de dialilo descrita aquí. Se ha encontrado que la relación es particularmente efectiva en las aplicaciones que se describen a continuación.

55 Preparación de gránulos impregnados con el concentrado de ajo

Los inventores también han desarrollado una forma granulada del concentrado de ajo. Los gránulos son una formulación del concentrado de ajo previamente descrito impregnado en harina de madera con un aglutinante

también presente en las proporciones que se muestran en la tabla 1 a continuación. A menos que se indique lo contrario, la referencia a los gránulos de harina de madera impregnada con concentrado de ajo es una referencia a los gránulos de la composición que se muestra en la tabla 1.

5 Tabla 1 que muestra la composición de los gránulos impregnados con concentrado de ajo

Nombre químico	CAS. No.	Descripción química	Nombre comercial	Función	Contenido (%)
Carboximetil celulosa sódica	9004-32-4	Carboximetil celulosa de sodio de alta pureza	Blonose	Aglutinante	1,65%
Harina de madera	Lignina (9005-53-2) Celulosa (9004-34-6)	Asociación de celulosa, lignina y poliosis de madera	Lignocel	Portador	53,35%
Aceite de ajo	800-78-0	Concentrado de ajo (grado alimentario)		Ingrediente activo	45%

La carboximetilcelulosa de sodio, la harina de madera y el concentrado de ajo se mezclan entre sí de manera que se aglomeran en gránulos/pellas casi esféricos con un diámetro de entre 1 mm y 2 mm. Los gránulos así producidos son de color marrón amarillento y tienen un fuerte olor a ajo/azufre.

10 Los gránulos se secan posteriormente mediante el uso de aire caliente a aproximadamente 60°C durante hasta 2 horas. El análisis posterior por HPLC del concentrado contenido dentro del gránulo muestra las mismas cantidades relativas de los cuatro sulfatos de alilo, de la fórmula: RSR, RS₂R, RS₃R y RS₄R (R = grupo alilo de la fórmula CH₂CHCH₂), como se encontró mediante el análisis llevado a cabo en el concentrado.

15 La eficacia de los gránulos es muy dependiente de la humedad, véase el ejemplo 5 que se refiere al uso de tales gránulos para controlar la mosca de la raíz de la col (e incluye resultados que demuestran este efecto).

20 Se cree que la formación de gránulos de este modo a partir del concentrado estabiliza adicionalmente los componentes activos del concentrado.

25 Todos los ensayos descritos a continuación se llevaron a cabo en secreto y bajo acuerdos de no divulgación. Tenga en cuenta que, a partir de aquí, los ejemplos pueden ser de la invención reivindicada o no, y que ningún texto debe entenderse como que el alcance de la protección es más amplio que el definido por las reivindicaciones.

Ensayos de repelencia de conejos usando gránulos de ajo

30 Se han llevado a cabo todos los ensayos no públicos que muestran que los gránulos impregnados con concentrado de ajo son eficaces como repelentes de conejos, véase el Ejemplo 1. Estos ensayos proporcionan pruebas sólidas de que los gránulos/granitos de ajo son eficaces para disuadir a los conejos de comer zanahorias cuando las zanahorias libres de ajo también están disponibles, véase el Ejemplo 1. Los gránulos/granitos utilizados en los ensayos fueron producidos a partir de harina de madera impregnada con ajo a un nivel de 5% y/o 20% y preparados como se describió previamente.

35 Actividad nematocida del concentrado de ajo

40 Se ha encontrado que el concentrado de ajo de la presente divulgación es eficaz como un nematocida. Los resultados iniciales *in vitro* establecieron la toxicidad del concentrado como nematocida como se muestra en el Ejemplo 2 y proporcionaron indicaciones de la dilución del concentrado de zumo de ajo (denominado NEMguard en el Ejemplo 2) que debería usarse en ensayos de campo. Cuando se utilizó el concentrado de ajo como una formulación líquida a través de riego por goteo en cultivos de patata, para proteger contra nematodos enquistados y en forma libre, se observó un aumento del 14% en el rendimiento bruto del cultivo después de dos aplicaciones del concentrado de zumo de ajo.

45 Se ha encontrado que el concentrado de ajo denominado NEMguard elimina casi todos los nematodos presentes en 24 horas a una dilución de 0,05% v/v con agua, con una concentración total de la solución de 0,1% v/v la muerte puede lograrse en 4 horas y con una concentración total de la solución de 0,25% v/v, la muerte puede lograrse en 1 hora. Preferiblemente, el NEMguard se debe mezclar con agua al final del período de riego de la planta, de esta forma se reduce la elución del producto lejos del objetivo primario. Dichos tratamientos deberían idealmente llevarse a cabo semanalmente durante el ciclo de crecimiento del cultivo.

50 El período crítico durante el cual deben aplicarse nematodos con respecto a los cultivos de raíces es el primer período de 4 a 5 semanas después de la perforación. Durante este tiempo, los nematodos atacan la nueva y delicada punta de la raíz que conduce a la bifurcación de la raíz y apuntalamiento con la consecuente pérdida de

calidad y rendimiento. El impacto de los nematodos de vida libre puede ser tal que cultivos enteros no sean económicos para la cosecha.

5 La LD50 de NEMguard (el concentrado de ajo) para nematodos de vida libre se ha identificado como 0,025% v/v, y tiene efectos nematocidas contra nematodos tanto de vida libre como de quiste. El concentrado se ha utilizado para proteger cultivos de patatas, zanahorias, chirivías, fresas y melones (por ejemplo, PCN - Nematodo Enquistador de la Patata).

10 Los detalles relativos al uso de gránulos impregnados con el concentrado de ajo denominado NEMguard se proporcionan en el Ejemplo 3. El cuerpo principal de evidencia relacionado con la efectividad de los gránulos se deriva del uso de gránulos aplicados a través de una sembradora con un aplicador granular estándar como se describe en el Ejemplo 3.

15 El Ejemplo 3 también incluye referencia a resultados de ensayo *in vitro*, véase 3.2, llevado a cabo disolviendo gránulos impregnados con concentrado de zumo de ajo (denominado ECOguard en la sección 3.2 del ejemplo 3) en agua y luego introduciendo muestras de diversas especies de nematodos parásitos de plantas en el sobrenadante. Sin excepción, se eliminaron todas las especies de nematodos con concentraciones de soluciones de 2,5% p/v de gránulos en agua en 2 horas.

20 La referencia en el ejemplo 3, sección 3.3, de NEMguard es una referencia al uso del concentrado de ajo y muestra la eficacia, mediante el uso de ensayos *in vitro*, del concentrado de ajo contra el nematodo *Longidorus elongatus*, así como otros nematodos.

25 Las secciones 3.4 y 3.4.1 del Ejemplo 3 muestran la eficacia de los gránulos de harina de madera impregnados con el concentrado de ajo contra Globedera pallida (PCN - Nematodo Enquistador de la Patata).

30 Las secciones 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3 del Ejemplo 3, el Ejemplo 3A y el Ejemplo 3B muestran la eficacia de los gránulos impregnados con harina de madera para reducir la bifurcación observada en los cultivos de zanahoria debido a la eficacia de los gránulos impregnados de harina de madera contra los nematodos de la zanahoria.

El Ejemplo 4 proporciona resultados adicionales relacionados con la efectividad de los gránulos de harina de madera impregnada con el concentrado de ajo en la reducción de la bifurcación de la raíz en zanahorias debido a la efectividad de los gránulos para controlar los nematodos de la zanahoria.

35 También se muestran en el Ejemplo 4 resultados relacionados con la eficacia de una aplicación combinada de gránulos de harina de madera impregnados con concentrado de ajo (gránulos NEMguard) y concentrado/líquido de ajo (CL AIL 0021) para controlar el nematodo enquistador de la patata (PCN).

40 Resultados adicionales en el Ejemplo 4 muestran la efectividad de los gránulos de harina de madera impregnada con el concentrado de ajo (denominado ECOguard GR) y el concentrado de ajo (denominado ECOguard SR y CL AIL 0021) para controlar el nematodo agallador *Meloidogynae* spp., en melón oriental.

45 Los resultados se presentan en el Ejemplo 4A que muestra la efectividad de los gránulos impregnados con ajo (denominados NEMguard®) para controlar una variedad de especies de nematodos, es decir *Longidorus elongatus*, *Pratylenchus crenatus*, *Tylenchorhynchus dubius* y *Paratrichodorus pachydermus*, en un campo utilizado para cultivar fresas.

Mosca de la raíz de la col

50 Se ha demostrado que el uso de la forma granulada del concentrado denominado gránulos de ECOguard proporciona una reducción significativa del daño de la mosca de la raíz de la col cuando se usa en cultivos de colinabo, véase el Ejemplo 5.

55 La aspersión de huevos de la mosca de la raíz de la col directamente con una solución al 1% del concentrado de ajo mostró una menor tasa de eclosión de los huevos que una muestra de control de huevos que no se dispersaron.

Ácaro rojo de las aves de corral

60 También se ha encontrado que el concentrado de ajo actúa como un biocida para la reducción de infestaciones de ácaros rojos de aves de corral. El concentrado tiene una ventaja particular, en comparación con compuestos tales como la cipermetrina (vendida bajo el nombre comercial Barricade), ya que puede aplicarse dentro de construcciones infestadas de ácaro rojo con las aves aún dentro de las construcciones, pero los huevos deben removerse antes de su uso. Este es el primer biocida botánico, conocido por los solicitantes, que ha demostrado ser eficaz para reducir las infestaciones de ácaros rojos de las aves de corral, a la tasa de uso recomendada, el concentrado actúa como un biocida de contacto.

65

El concentrado es particularmente eficaz como biocida cuando se usa en espacios confinados o en entornos ligeramente sucios.

5 Los niveles de mortalidad superiores al 85% se observan normalmente en estudios de uso estimulado y se han informado y observado efectos similares a partir de ensayos de campo confidenciales: véase el Ejemplo 6.

El concentrado también funciona como un repelente y parece inhibir la recolonización.

10 Los biocidas convencionales tienden a tener acción de sitio único (inhibición de la acetilcolinesterasa) y la resistencia a estos compuestos puede acumularse rápidamente a través de la selección y la mutación en la población.

Se cree que el concentrado descrito en la presente memoria (denominado como Breck-a-sol) para uso como un medio de control contra el ácaro rojo de las aves de corral) tiene una acción multisitio, por ejemplo

- 15
- Inhibición de enzimas respiratorias
 - Ruptura de la membrana y despolarización
 - Secuestro de iones metálicos y quelación en citosol

20 La probabilidad de que los ácaros rojos creen resistencia al concentrado de ajo es, por lo tanto, menor debido a la complejidad bioquímica de cómo funciona el producto como biocida.

Impacto medioambiental

25 La creciente conciencia de los problemas medioambientales en los últimos años ha llevado a la promoción de prácticas agrícolas más respetuosas con el medio ambiente y a un aumento en la producción de alimentos que portan la etiqueta de orgánico. Como tal, la provisión del extracto de ajo descrito aquí para uso como plaguicida o repelente es un paso adelante significativo, ya que los productos de descomposición formados por el uso del extracto son completamente naturales, correspondientes a los mismos materiales que quedan en el suelo después de haber cultivado ajo o puerros, pero a un nivel mucho más bajo. Típicamente, los cultivos comerciales de ajo y cebolla liberarán 120-600 veces más polisulfuros en el suelo que una aplicación de 12 kg/ha de gránulos de ECOguard, véase la referencia (1). Un análisis detallado de esta afirmación se proporciona en el Apéndice 2, en el que el concentrado de ajo se denomina AIL 0021 y CL AIL.

30

35 Enriquecimiento del concentrado de zumo de ajo mediante la adición de aceite de ajo.

La mezcla de polisulfuro contenida en el concentrado de zumo de ajo de la presente divulgación se asemeja a la mezcla de polisulfuro de aceite de ajo destilado. El contenido de polisulfuro del concentrado de zumo de ajo, producido de acuerdo con la presente descripción, puede por lo tanto enriquecerse después de su producción mediante la adición de aceite de ajo. El enriquecimiento de la mezcla de polisulfuro del concentrado de zumo de ajo proporciona de esta manera un material que tiene un nivel elevado de polisulfuros mientras que las propiedades de la matriz de zumo de ajo continúan estabilizando la mezcla resultante con respecto al almacenamiento a largo plazo. De esta forma, el contenido de polisulfuro puede aumentar hasta más del 7% p/p. Se espera que el aumento en el nivel de polisulfuros en la mezcla resultante mejore el rendimiento de la mezcla como plaguicida, como repelente y también se espera que mejore el tiempo de residencia de la mezcla cuando se aplica bajo condiciones al aire libre.

40

45

La invención se define por las reivindicaciones que siguen. Se cree que el plaguicida, descrito en este documento, es particularmente eficaz con respecto a su toxicidad para las larvas de mosquitos y otras larvas de insectos, así como nematodos, áfidos (Hemíptera), gorgojos de la vid, diversos escarabajos (Coleópteros), polillas y mariposas (Lepidóptera), moluscos, ácaros y mosca de la raíz de la col. El material es especialmente efectivo como nematocida.

50

En relación con su repelencia, el material es particularmente eficaz como repelente para insectos, conejos y ciertas especies de aves.

Ejemplo 1 - Ensayos de repelencia de alimentación del conejo usando ajo III

55 Introducción

Los experimentos preliminares no públicos en grupos de conejos vivos demostraron un efecto significativo del ajo como repelente de la alimentación del conejo. Se llevaron a cabo experimentos más detallados en 20 conejos alojados individualmente. En esta ocasión, los conejos se seleccionaron al azar para recibir granitos impregnados con concentrado de zumo de ajo a niveles de 5% o 22%. Se encontró que las legumbres impregnadas con concentrado de zumo de ajo inducen un efecto repelente significativo, aunque no se encontraron diferencias significativas en la efectividad entre las dos concentraciones de ajo.

60

Se llevaron a cabo ensayos adicionales no públicos que se diseñaron para examinar la longevidad de la respuesta repelente al ajo con la edad del granito. Este informe proporciona información sobre el protocolo experimental y resume los resultados de esta prueba.

5 Materiales y métodos

El trabajo se realizó en 20 conejos cautivos de origen silvestre. Aunque normalmente encerrados en parejas, cada conejo se mantenía individualmente en corrales al aire libre de tres por dos metros durante cinco días, antes y durante el experimento. Cada conejo tenía acceso, en todo momento, a alimento de conejo comercial peletizado, así como a pasto que crecía libremente en cada corral, y agua sin restricción. Los conejos se alimentan principalmente en el crepúsculo, por lo que los experimentos tuvieron lugar aproximadamente entre las 15:30 y las 09:00 horas. El tiempo de exposición ligeramente más prolongado en comparación con los ensayos previos fue inevitable debido a la corta duración del día en esta época del año.

15 Antes del comienzo del experimento, los granitos de un paquete recién abierto se pesaron previamente en forma seca, para determinar el número promedio de gránulos secos necesarios para estimular una densidad de 12 kg de granitos por hectárea por tazón. En promedio, esto equivale a 5 granitos de control (que contienen 0% de ajo) y 6 granitos de prueba (impregnadas con 5% de concentrado de zumo de ajo) por tazón.

20 Seis semanas antes del inicio del experimento, los paquetes recién abiertos de control y los granitos de prueba se dejaron entonces 'expuestas a la intemperie' en macetas separadas al aire libre. Las macetas plásticas de 23 cm etiquetadas se llenaron hasta aproximadamente 3 cm de profundidad con grava, seguidas por aproximadamente 8 cm de tierra (John Innes número 2, compost a base de tierra). La tierra se reafirmó mediante riego con aproximadamente 200 ml de agua destilada. Se dejó drenar, y se dispersaron suficientes granitos (~ 2 g) en la parte superior de la tierra para garantizar cantidades adecuadas durante la prueba. Las macetas se dejaron al aire libre durante un período de 2 horas (es decir, granitos frescos = 0 semanas) o durante 2, 4, 5 o 6 semanas hasta el momento en que se usaron en un experimento. La exposición a la intemperie durante el período de 16 semanas incluyó exposición al sol, a la lluvia (ver a continuación) y a temperaturas que oscilan entre -12°C y 20°C.

Mes	Lluvia real (mm) > 5 mm que cayó en un solo día				Número de días de lluvia
Desde el 12 de septiembre	6,1	14,8	5,7	14,4	13
Octubre	16,4	9,5	11,7	15,6	20
Noviembre	39,5	12,1	6,7	10,1	23
Hasta el 27 de diciembre	27,1	7,5	9,0		16

30 Antes del inicio de la prueba y durante los días no experimentales, se les daba a los conejos regularmente rodajas de zanahoria para minimizar la neofobia. Se utilizó una prueba de dos opciones, con zanahorias en rodajas presentadas en dos cuencos separados, uno con granitos de control y otro con granitos de prueba; se suministraron 200 g de zanahoria en cada plato. Los tazones se colocaron en estaciones de alimentación separadas, ubicadas lo más separadas posible dentro del corral para evitar que el olor del ajo impactara en el control. Para evitar los efectos de posición, se intercambiaba la ubicación de las estaciones de alimentación y los tazones para la segunda noche del experimento.

40 Hubo 10 semanas de experimentos en total en este ensayo, aunque esto no incluyó las seis semanas de exposición a la intemperie de los granitos antes del inicio del experimento. Para evitar efectos de habituación, cada conejo se sometió a prueba durante los 2 días experimentales, una vez cada dos semanas. Cada una de las cinco exposiciones a la intemperie de los granitos se probaron en los 20 conejos, es decir, cada conejo se analizó cinco veces. Los granitos con diferentes períodos de exposición a la intemperie se asignaron a los conejos usando un diseño de cuadrado latino aleatorio. Los experimentos de alimentación de conejos comenzaron el 24/10/00 y finalizaron el 28/12/00.

50 El día del experimento, se colocó el número requerido de granitos expuestos a la intemperie (para estimular una tasa de 12 kg ha⁻¹) sobre un papel de filtro húmedo (humedecido con 3 ml de agua destilada) en un tazón de barro vidriado. Se colocó una malla de alambre revestida de plástico en el tazón para evitar que los granitos entren en contacto directo con la zanahoria. Esto permitía que los olores de los granitos penetraran la zanahoria e imitaban a los granitos que se encontraban muy cerca pero que no estaban en contacto con aquellas partes de la vegetación que consumían los conejos en el campo.

55 Resultados

60 El porcentaje total de alimento que se consumió durante los dos días en cada estación de alimentación se calculó después de restar los "residuos" de zanahoria que habían quedado inaccesibles para los conejos después de caer a través de la rejilla revestida de plástico. Se llevó a cabo un análisis de varianza para investigar los efectos del conejo, la semana de prueba y la edad de los granitos impregnados con concentrado de zumo de ajo en el porcentaje total de alimento ingerido (en ambas estaciones de alimentación).

No hubo evidencia de que la edad de los granitos tuviera un efecto sobre la cantidad total de alimento ingerido ($p = 0,479$). Sin embargo, se encontró que la cantidad de alimento consumido varió considerablemente entre los conejos (d.f. = 16; $p < 0,001$), aunque no hubo evidencia de que la cantidad total de alimento consumido varió con el paso de las semanas (d.f. = 16; $p = 0,104$).

La variación individual entre conejos en la respuesta a los granitos impregnados con concentrado de zumo de ajo se muestra en la Figura 1. La Figura 1 muestra una comparación de zanahoria ingerida entre estaciones de alimentación con granitos impregnados con concentrado de ajo y con granitos no impregnados con concentrado de ajo. También se observó que solo cuando los granitos estaban frescos hubo una respuesta de alimentación positiva más consistente debido a la presencia de granitos de control en vez de impregnados con concentrado de zumo de ajo.

Para el análisis del efecto del ajo, el porcentaje de zanahoria consumida en la estación con granitos de ajo se restó del porcentaje en la estación de control, para obtener la reducción en el porcentaje de zanahoria consumida debido al concentrado de zumo de ajo. La reducción media en el porcentaje de zanahoria consumida en las diferentes edades del granito se da en la tabla a continuación.

Edad del granito (semanas)	0	2	4	5	6
Reducción media en el porcentaje de zanahoria consumida del tazón de ajo frente al de control	22,6%	4,9%	0,7%	3,6%	1,5%

El ANOVA indicó que había evidencia fuerte ($p = 0,007$) de que, en promedio, los conejos comían menos zanahoria de la estación de alimentación con granitos de ajo, en promedio cuando los granitos eran frescos, que cuando los granitos eran más viejos. No hubo pruebas ($p = 0,5$) de que los granitos expuestos a la intemperie dos semanas o más fueran efectivas. Con un intervalo de confianza del 95%, la reducción de la zanahoria ingerida cuando se usaron granitos frescos varió del 10% al 36%.

Obsérvese que no se encontraron evidencias de un efecto de transferencia de la edad del granito experimentada por un conejo en la ocasión previa de la prueba.

Por lo tanto, parece que los granitos frescos tuvieron un efecto sobre la preferencia de los conejos, aunque no hubo evidencia de que los granitos expuestos a la intemperie durante dos semanas o más fueran efectivas.

Conclusiones y recomendaciones

Existe una fuerte evidencia para sugerir que el ajo es efectivo, cuando se presenta como granitos frescos, para disuadir a la mayoría de los conejos de comer zanahoria cuando también está disponible la zanahoria libre de olor a ajo. Sin embargo, no hay evidencia de que esta respuesta continúe una vez que los granitos hayan sido expuestos al ambiente durante el otoño y el invierno, durante dos o más semanas.

Con base en los resultados consistentes y sobresalientes con los granitos frescos, se recomienda que se realice una prueba experimental similar, pero con una dosis mayor en porcentaje de ajo por granito, que pueda contrarrestar el deterioro aparente por exposición a la intemperie, y así prolongar la longevidad de esta respuesta. Específicamente, el porcentaje de concentrado de zumo de ajo en los granitos podría aumentarse hasta 11% o 22%. ¿El aumento de densidad de los granitos de 12 Kg ha⁻¹ a 20 Kg ha⁻¹ o superior (densidad máxima de 150 Kg ha⁻¹) puede no alcanzar una mayor longevidad si los granitos son igualmente expuestos a la intemperie?

Ejemplo 2 - Uso de concentrado de zumo de ajo (NEMguard®) contra PCN (nematodo enquistador de la patata-Globodera pallida)

NEMguard® es un concentrado de zumo de ajo que actúa como un potente nematocida.

Una secuencia de trabajo de desarrollo con formulaciones NEMguard® ha identificado evidencia clara de efectos nematocidas tanto contra nematodos quísticos como de vida libre.

La formulación líquida de NEMguard® en particular se presta para la administración a través de riego por goteo y el trabajo preliminar realizado en cultivos de patata produjo resultados muy alentadores, con un aumento del 14% en el rendimiento bruto atribuido a dos aplicaciones de NEMguard®. Este ensayo no público fue en un campo con una población significativa de nematodos enquistadores de la patata (PCN).

El trabajo in vitro ha permitido a los inventores desarrollar adicionalmente el protocolo de campo. El protocolo sobre la tasa de uso del producto se presenta a continuación.

1.0 Concentración de uso de las soluciones

5 Se ha demostrado que las soluciones del concentrado de zumo de ajo (NEMguard®) diluidas al 0,05% v/v producen una muerte casi total dentro de las 24 horas. Con concentraciones de solución de 0,1% v/v, la eliminación total se puede lograr en 4 horas. Con una concentración de solución de 0,25% v/v, la eliminación total se puede lograr en 1 hora. Por lo tanto, se debe planificar el uso del concentrado para operar dentro de estas tres diluciones para lograr un equilibrio entre la eficacia y el costo.

10 Opción 1 (temporizada)

Si se asume que el concentrado se agrega a un volumen de 1.000 litros al final de una secuencia de riego, entonces se necesitan las siguientes relaciones de adición de volumen.

@	0,05% v/v en 1.000 litros	=	0,5 litros de NEMguard®
@	0,1% v/v en 1.000 litros	=	1,0 litros de NEMguard®
@	0,25% v/v en 1.000 litros	=	2,5 litros de NEMguard®

15 Idealmente, el tiempo de percolación para los últimos 1.000 litros se debe gestionar para maximizar la persistencia en el volumen de suelo que se espera contenga PCN migrante. Claramente, la adición al final de la secuencia reduce la elución del producto lejos del objetivo primario. Se supone que el suelo en o cerca a la capacidad del campo mostrará un drenaje reducido, lo que permitirá mantener la dosis de administración durante el mayor tiempo posible.

20 Es preferible mezclar NEMguard® con los últimos 1.000 litros de agua antes del bombeo. Si esto no es posible, entonces NEMguard® debe agregarse a la tubería durante un período de varios minutos para aumentar las posibilidades de una mezcla adecuada.

25 Opción 2 (general)

Si suponemos que se va a agregar el concentrado de zumo de ajo (NEMguard®) durante todo el evento de suministro de irrigación ~ 9.000 litros durante 1-2 horas, se deben considerar las siguientes adiciones de volumen:

@	0,05% v/v en 900 litros	=	4,5 litros
@	0,1% v/v en 900 litros	=	9,0 litros
@	0,25% v/v en 900 litros	=	22,5 litros

30 La consideración de los dos enfoques de suministro, cronometrado y general identifica los volúmenes de tasa de uso de evento único de entre 2,51 y 22,51 como probables para dar evidencia de eficacia.

35 En vista de la rapidez con la que NEMguard® mata a los nematodos, el enfoque general debería ser la maximización de la dosis máxima, mientras que se minimiza el volumen de agua por razones económicas.

Las permutaciones aumentan considerablemente si se aumenta la tasa total/ha haciendo que haya más producto disponible.

40 2.0 En conclusión

La LD₅₀ de NEMguard® para nematodos de vida libre se ha determinado independientemente a ~ 0,025% v/v. Esto claramente proporciona un margen considerable para las concentraciones de suministro del producto sustancialmente superiores a este valor, mientras que siguen siendo económicas en relación con otros nematodos.

45 La rapidez con la que NEMguard® mata favorece las "explosiones" de concentración relativamente alta de la solución que podría lograrse que persistiera al agregarse al final de un evento de riego.

50 Este enfoque también permite varias aplicaciones repetidas, por ejemplo, en intervalos semanales durante seis semanas.

La alternativa es aplicar el producto como una sola dosis alta a través de un evento de riego completo.

55 Si la administración y la infraestructura del sistema lo permiten, se debe considerar el enfoque de múltiples explosiones.

3.0 Protocolo esquemático

Supongamos que se administran 9.000 L en 1-2 horas. 1.000 litros tardan 6.6 minutos en ser bombeados (casi 1 hora)

5 1 Bombear 7.000-8.000 litros de agua normal en el cultivo.

2 Agregar 2,5-5 L de NEMguard® a los últimos 1.000 litros, esto es ~ 53 minutos (faltando 6,6 minutos para terminar)

3 Bombear

4 Si la adición de NEMguard® tarda 2 minutos, el último pulso se diluye en ~ 660 litros, lo que debería ser adecuado para distribuir el producto.

10 5 Repetir semanalmente por 3 o 6 semanas dependiendo de la concentración de la solución utilizada y la tasa total/Ha seleccionada.

Ejemplo 3 - Eficacia del concentrado de ajo y los gránulos impregnados con el concentrado contra los nematodos

15 3.0 Resumen

Un programa de ensayos de campo no públicos en cultivos de patata y tubérculos ha identificado niveles comercialmente significativos de reducción de daños donde las formulaciones propuestas (NEMguard®) se han aplicado para controlar nematodos.

20 El cuerpo principal de evidencia se deriva del uso de productos granulados aplicados en la perforación, cuando se compara con la eficacia de productos tales como Temik. Se han llevado a cabo un número limitado de ensayos por organizaciones independientes aprobadas por la Directiva de Seguridad de Plaguicidas, u organizaciones similares acreditadas en su propio país (Corea del Sur). Las conclusiones en estos reportes apoyan la reivindicación de que NEMguard® tiene propiedades nematocidas.

25 La formulación más avanzada, en forma de "NEMguard" granulada, parece muy adecuada como alternativa a Temik y Vydate en tubérculos.

30 Existe un alto grado de consistencia dentro de la experimentación *in vitro* y de campo.

3.1 Preliminares

35 En el momento en que los inventores han estado examinando productos de ajo para su uso en la protección de cultivos, el potencial para una formulación como nematocida se ha vuelto cada vez más claro. Una combinación de cribado primario *in vitro* y ensayos de campo no públicos replicados en cultivos de patata, chirivía, zanahoria y melón en Europa y Corea ha proporcionado evidencia de que los productos químicos pueden matar a los nematodos mediante los productos de ajo (NEMguard®). Las plantas en el campo parecen responder a las aplicaciones bajo la superficie de los gránulos y líquidos con aumentos significativos en el vigor y el rendimiento bruto, que parecen relacionarse con los efectos nematocidas.

45 En el caso de los tubérculos, como la zanahoria, hay una clara evidencia independiente de que los problemas de calidad tales como la bifurcación de las raíces y la retraso en el crecimiento causados por nematodos de vida libre pueden reducirse significativamente a partir de una aplicación única de gránulos de NEMguard® aplicados en la perforación.

50 Los experimentos controlados *in vitro* y bioensayos controlados *in vivo* con *Longidorus elongates* y *Globodera rhostochiensis* también proporcionan evidencia de que NEMguard® es un poderoso nematocida con una eficacia comparable a la observada con Temik.

Se espera que la revisión europea del ingrediente activo plaguicida conduzca a la eliminación de aproximadamente el 66% de las sustancias activas actualmente aprobadas hacia el 2007. Los productos nematocidas como el Aldicarb ya están bajo un intenso escrutinio. La derogación se ha otorgado para su uso en cultivos aprobados hasta 2007.

55 Por lo tanto, existe una gran oportunidad para que los productos ambientalmente benignos que tienen actividad nematocida/nematostática reemplacen aquellos productos altamente tóxicos tales como Aldicarb, Vydate y bromuro de metilo.

60 3.2 Introducción al programa

El trabajo preliminar de bioensayo con ajo contra nematodos se llevó a cabo en 1998. Este trabajo implicó disolver prototipos de gránulos de ECOguard formulados con concentrado de zumo de ajo en agua y luego introducir muestras de varias especies de nematodos parásitos de plantas en el sobrenadante. Sin excepción, todas las especies murieron en concentraciones de solución de 2,5% p/v de gránulos respecto al agua en 2 horas.

65

En el caso de *Globodera pallida* (PCN) y *Longidorus elongatus* (bifurcación de la raíz), la mortalidad alcanzó estos niveles en cuatro horas con una concentración de la solución de 1,25% p/v. En el caso de *Longidorus spp.* se produjo una mortalidad significativa a las 24 horas con una concentración de la solución de 0,25% p/v.

5 A partir de estos experimentos de selección primaria, los inventores han mantenido un programa de investigación y desarrollo en nematología, mediante una combinación de ensayos de campo no públicos y más investigación *in vitro*.

10 Los datos de uso tanto *in vitro* como a escala de campo de las formulaciones han identificado claramente propiedades nematicidas con tasas de uso que son económicas. Este es particularmente el caso cuando los gránulos se han aplicado a cultivos de tubérculos tales como zanahorias y chirivías para protegerlos del daño causado por nematodos de quiste y de forma libre.

15 3.3 Resultados

Tabla 3.3.1 Efectos *in vitro*, porcentaje de mortalidad (SCRI 1998). Primeros experimentos con concentrado de zumo de ajo (NEMguard®)

Especie de nematodo /Tasa de producto	Contacto durante 2 h	Contacto durante 4 h	Contacto durante 6 h	Contacto durante 24 h
Paratrichodorus				
2,5 %	100	100	100	100
1,25%	0	100	100	100
0,25%	0		4	14
Granito de control	0	0	0	0
Globodera				
2,5%	100	100	100	100
1,25	98	100	100	100
0,25%	7	13	18	72
Granito de control	0	0	0	0
Longidorus				
2,5	100	100	100	100
1,25	77	100	100	100
0,25	3	4	34	58
Granito de control	0	0	0	0

20 Los datos anteriores muestran claramente que existe un material tóxico para los nematodos en la formulación de "NEMguard®".

25 Se confirmó este resultado, cuando se usó concentrado de zumo de ajo en un bioensayo *in vitro*, comparando la tasa de muerte con la concentración de la solución. La Figura 2 es una representación gráfica que muestra el bioensayo *in vitro* del concentrado de zumo de ajo contra *Longidorus elongatus*. La mortalidad se agrupa según el tiempo de contacto (1-24 horas) en las diversas diluciones.

Los datos indican que el LD₅₀ a las 24 h es ~ 0,025%.

30 3.4 Impacto de los gránulos en nematodos de vida libre

Las pruebas de campo no públicas en cultivos de patata proporcionaron evidencia de un impacto sobre PCN a medida que aumentaba la tasa de aplicación. Cuando NEMguard® se aplicó a cultivos de tubérculos, el impacto del producto puede evaluarse a través de las diferencias en la cantidad y el tipo de malformaciones de la raíz atribuidas a la alimentación de los nematodos.

35 La industria de tubérculos del Reino Unido se basa en gran medida en Temik como un medio para reducir el daño a la raíz y promover el rendimiento en los cultivos de zanahoria y chirivía. En 2003, los inventores iniciaron un programa de pruebas de campo no públicas para evaluar el potencial de NEMguard® para reemplazar a Temik en estos cultivos de hortalizas.

40 Cuando se establecen cultivos de tubérculos, Temik se aplica junto con la semilla en el mismo surco y ofrece protección a la radícula en germinación. Los nematodos atacan la nueva y delicada punta de la raíz, lo que lleva a la bifurcación de la raíz y retraso en el crecimiento, con la consecuente pérdida de calidad y rendimiento. El impacto de los nematodos de vida libre puede ser tal que cultivos enteros no sean económicos para la cosecha.

45

3.4.1 Cultivo de chirivía en Hainford (Norwich)

5 En ensayos no públicos en Hainford (Norwich), los inventores presentaron un bloque aleatorizado de 8 repeticiones y 6 tratamientos, con Temik incluida a una tasa que reflejaba la mejor práctica comercial. NEMguard® se incluyó en cuatro proporciones: 5, 10, 15 y 20 kg/ha y todas ellas se referenciaron frente a un control no tratado. Todas las aplicaciones se realizaron a través de una sembradora comercial con aplicador granular estándar. El sitio había sido probado para poblaciones de nematodos y se consideraba en riesgo de daño, con aplicaciones de Temik justificadas.

10 Se evaluó el cultivo en una etapa intermedia de madurez y se determinó la proporción de raíces bifurcadas y protuberancias.

15 Se produjo una diferencia significativa en la bifurcación de la raíz dentro de los tratamientos, esto se ilustra en la figura 3, que muestra la bifurcación de raíz en cultivo de chirivía en Hainford (Norwich).

Los recuadros (figura 3) representan los intervalos entre cuartiles, que contienen el 50% de los valores. Los bigotes son líneas que se extienden desde la caja hasta los valores más altos y más bajos en todas las repeticiones, excluyendo los valores atípicos. Una línea a través del cuadro indica la mediana. Los tratamientos son significativamente diferentes.

20 Tratamiento

- 1 = Control
- 2 = Temik (Aldicarb)
- 25 3 = NEMguard® 5 kg/ha
- 4 = NEMguard® 10 kg/ha
- 5 = NEMguard® 15 kg/ha
- 6 = NEMguard® 20 kg/ha

30 El control (tratamiento 1) tenía significativamente más raíces bifurcadas y con protuberancias que todos los tratamientos con NEMguard® (3-6), 5-20 kg/ha, respectivamente. Los tratamientos con NEMguard® a razón de 10-20 kg/ha fueron significativamente mejores que Temik. En este sitio de prueba también hubo pruebas de un aumento de soporte de la planta con el aumento de las aplicaciones de NEMguard® (figura 4)

35 Figura 4 - Soporte de la planta en relación con el tratamiento.

Las barras representan el intervalo de valores de réplicas individuales. Las aplicaciones de Temik y todas las de NEMguard® parecen aumentar el soporte de la planta sobre el control. La tasa de 20 kg/ha de NEMguard® casi se separa del control.

40 Tomados en conjunto, los datos sobre la bifurcación de la raíz y los números de soporte de la planta son una buena evidencia de que NEMguard® fue tan eficaz como Temik en la defensa del cultivo por pérdida de plantas y el daño a la raíz.

45 3.5.1 Prueba de zanahoria Posketts Farm, Yorkshire

Una prueba complementaria a la de las chirivías se realizó sobre zanahorias. Este ensayo no público comparó el efecto de las tasas de 20 kg/ha de NEMguard® contra Temik aplicadas a una tasa que refleja las mejores prácticas comerciales. Todos los tratamientos fueron referenciados contra un control no tratado. El sitio se seleccionó sobre la base de los números de nematodos determinados a partir del muestreo del suelo.

La prueba se presentó en tres réplicas con todos los tratamientos aplicados a través de un taladro montado en un tractor convencional.

55 Tabla 3.5.1 Impacto de NEMguard® en la bifurcación de la raíz y el retraso en el crecimiento. Resumen de los resultados de la prueba en Posketts Farm, Yorkshire

- 4 Replica, bloque aleatorio
- 60 1 control
 - 2 Temik
 - 3 ECOguard® estándar 20kg/ha

Porcentaje de raíces bifurcadas y con retraso en el crecimiento en cada repetición.

	Control	Temik	EG (estándar)
Bloque 1	3,2	3,0	4,8
Bloque 2	11,1	4,4	2,8
(continuación)			
	Control	Temik	EG (estándar)
Bloque 3	16,8	7,7	7,8
Bloque 4	8,6	9,0	4,5
Media/réplica	9,92	6,02	4,97

5 Número total de raíces muestreadas/con tratamiento

	441	505	421
--	-----	-----	-----

10 Un análisis estadístico de los datos no reveló diferencias significativas entre los tratamientos. Los datos tienen algunas tendencias claras, con el control que tiene ~ 50% más de zanahorias bifurcadas y con retraso en el crecimiento que los otros tratamientos. La gran cantidad de raíces examinadas/con tratamiento agrega mayor confianza a la solidez de los efectos.

Los dibujos que ilustran los síntomas vistos a través de uno de los bloques se presentan en la Figura 5.

15 El ensayo proporcionó buena evidencia de que las formulaciones de NEMguard® redujeron significativamente la bifurcación de raíces y el retraso en el crecimiento al menos en la medida observada con Temik en la misma prueba.

3.5.2 Resultados de ensayos adicionales relacionados con la prevención de bifurcación de la raíz en zanahorias causada por nematodos.

20 En respuesta a la presión para encontrar alternativas a Temik, se realizó un grupo de ensayos no públicos para comparar y contrastar las eficacias de Temik, Vydate, Nemathorin y NEMguard. Los ensayos con zanahorias se realizaron en tres sitios en Norfolk, Yorkshire y Nottinghamshire e incluyeron NEMguard® a razón de 20 kg/ha aplicado en la perforación. A continuación, se presenta una tabla de resumen del porcentaje de bifurcación de raíz en cada sitio en la tabla 3.5.1

25 Todos los sitios se seleccionaron especialmente con base en las poblaciones de nematodos de vida libre en muestras de suelo.

30 Tabla 3.5.2 Diferencias relativas en el porcentaje de bifurcación de raíces en 3 cultivos de zanahoria.

Producto	Tasa/ha	Ensayo 1, Nottinghamshire	Ensayo 2, Norfolk	Ensayo 3, Yorkshire	Media a través de todos los ensayos
Sin tratamiento		14,3	17,2	14,1	15,2
Temik	8,45	6,3	6,0*	13,7	8,6
Vydate	13,75	9,3	10,4	11,0	10,2
Vydate	20,0	9,2	8,4	15,2	10,9
Vydate	25,0	7,5	6,6*	14,9	9,6
Vydate	55,0	9,0	9,4	9,1	9,2
Nemathorin	17,8	14,3	8,7	10,6	12,2
NEMguard®	20,0	11,2	4,7*	12,8	9,6

* Significativamente mejor que el control

35 Se produjeron efectos significativos en el tratamiento en el sitio de Norfolk, donde NEMguard® fue el tratamiento más eficaz, reduciendo la bifurcación de la raíz en un 73%. Por el contrario, Temik redujo la bifurcación de la raíz en un 65%. Colectivamente en los tres sitios de prueba, NEMguard®, Temik y Vydate (en todas las proporciones) ejercieron niveles de control muy similares.

3.5.3 Ensayos con NEMguard® contra el nematodo del quiste de la zanahoria

40 Los inventores llevaron a cabo un grupo de experimentos en maceta no públicos con zanahorias plantadas en suelo de campo con un historial de producción de cultivos afectados por pérdidas de rendimiento y calidad atribuidas a las actividades de los nematodos del quiste de zanahoria *Heterodera carotae*.

45 Cuando se evaluaron estos experimentos, hubo evidencia de un tratamiento y efecto de la dosis en los síntomas causados por los nematodos del quiste de la zanahoria. Las aplicaciones de NEMguard® a una tasa equivalente a 30 kg/ha parecían superiores a cualquier otro tratamiento.

5 Se inició un estudio de escala de campo no público después del experimento en maceta, donde se compararon cuatro tasas de NEMguard®, 10, 20, 30 y 40 kg/ha con un control no tratado. Este ensayo se evaluó de forma independiente y produjo un claro tratamiento y efecto dosis de importancia económica. Todas las aplicaciones de NEMguard® aumentaron el rendimiento vendible en la prueba. La mayor ganancia se produjo con NEMguard® aplicado a razón de 20 kg/ha, que aumentó el rendimiento total en 12,6 toneladas/ha.

Los efectos de NEMguard® en la prueba de campo se muestran en la tabla a continuación. El número de raíces comercializables también aumentó con 10-30 kg/ha de ECOguard®.

10 Con las siguientes suposiciones, el uso de ECOguard® en zanahorias ofrece una ganancia económica sustancial:

La cosecha promedio en el otoño es de 100 toneladas/ha.

El precio de venta medio por kg es de 0,78 Dkr.

15

Aproximadamente 1.000.000 de zanahorias por hectárea con un peso óptimo de 100 gramos por zanahoria.

Tabla A: El beneficio económico de usar ECOguard® en zanahorias Lammefjorden.

Tratamiento	Zanahorias comercializables (toneladas/ha)	Rendimiento extra (toneladas/ha)	Peso total (toneladas/ha)	Rendimiento extra (toneladas/ha)	Rendimiento total extra (toneladas/ha)
0 kg	69,4	-	75,0		
10 kg	73,4	4,0	76,6	1,6	5,6
20 kg	76,2	6,8	87,6	12,6	19,4
30 kg	78,5	9,1	86,3	11,3	20,4
40 kg	73,1	3,7	79,8	4,8	8,5

20 Los datos en la tabla A anterior, identifican claramente una respuesta a la dosis, con efectos óptimos observados a razón de 20 kg/ha de NEMguard®.

Ejemplo 3A

25 Ensayo no público con nematodo del quiste de la zanahoria

Propósito: El propósito del ensayo fue observar una posible respuesta a la dosis en el ataque de los nematodos del quiste de la zanahoria, con el fin de determinar la dosis óptima que se utilizará en una prueba de campo.

Cultivo: Zanahorias F₁ CR 501. Recubiertas con Thiram.

Inicio del ensayo: 15 de enero de 2004

Evaluación del ensayo: 7 de abril de 2004 y 11 de mayo de 2004

Parcelas: 10 filas de macetas por tratamiento. Sin replicas

Plants: 10 semillas por maceta

Tratamientos: Sin tratamiento
 10 kg/ha = 14 gránulos/maceta = 50 mg/maceta
 20 kg/ha = 28 gránulos/maceta = 100 mg/ maceta
 40 kg/ha = 56 gránulos/maceta = 200 mg/ maceta
 80 kg/ha = 112 gránulos/maceta = 400 mg/ maceta

Las semillas y gránulos se cubrieron con aprox. 0,5-1 cm de tierra en las macetas.

Resultados:

30 En la primera evaluación a principios de abril hubo una gran diferencia en la apariencia de las raíces entre los diferentes tratamientos. Las zanahorias no tratadas tenían menos raíces blancas que las zanahorias tratadas con 10-80 kg/ha. No hubo diferencia visible en las dosis. Las zanahorias eran muy pequeñas y se decidió esperar otro mes antes de la evaluación final.

35 No fue posible hacer un análisis estadístico en este ensayo de selección porque solo había 10 macetas por tratamiento. Por lo tanto, los resultados solo pueden mostrar una tendencia de lo que se puede esperar en el campo.

Tabla 1: los resultados divididos entre tratamientos.

Tratamientos (kg/ha)	0	10	20	40	80
Número promedio de quistes	14,4	12,7	9,1	6,6	8,3
Longitud promedio de la hoja más larga	11,28	11,00	12,67	12,78	11,83
Puntuación promedio del vigor	2,33	2,11	2,89	3,33	3,11

Puntuación del vigor:

- 5 1: Pobre
2:
3:
4: Las mejores plantas

10 Número de quistes:

Se contó aproximadamente el número de quistes por zanahoria. Se estimó un promedio de la cantidad de quistes para todas las plantas por maceta.

15 El número de quistes pareció disminuir con el aumento de las dosis de concentrado de ajo. La longitud de la hoja más larga y el vigor de las plantas tendieron a aumentar al aumentar la dosis. La dosis de 80 kg/ha puede ser fitotóxica porque la longitud de las hojas y la puntuación del vigor disminuyeron en comparación con las dosis anteriores, pero al mismo tiempo pareció aumentar el número de quistes.

20 Tabla 2: El número promedio de quistes y la longitud de la raíz más larga dividida entre categorías.

Categoría del vigor	1	2	3	4
Número promedio de quistes	16,00	10,7	8,8	9,1
Longitud promedio de la hoja más larga	10,8	11,2	11,8	13,08

Puede observarse a partir de la tabla 2, que el número de quistes disminuyó notablemente a partir de la categoría más pobre 1 hasta la mejor categoría 4. La longitud promedio de la hoja más larga aumentó a través de las categorías.

25 Las figuras en la tabla 2 confirmaron la diferencia visible observada entre las plantas.

Tabla 3: Porcentaje de macetas en cada categoría de vigor (9 macetas por tratamiento)

Tratamientos (kg/ha)	0	10	20	40	80
Categoría 1	22%	11,1%	11%	0%	11%
Categoría 2	30,3%	66%	11%	22%	11%
Categoría 3	31,3%	22%	55,5%	22%	33,3%
Categoría 4	11%	0%	22%	55,5%	44,4%

30 Se puede a partir de la tabla 3, que la mayoría de las plantas vitales buenas pasaron de la categoría 2 a la categoría 4 con el aumento de la dosis de 10 a 40 kg/ha. Con 10 kg/ha no había plantas en la categoría 4. Con 40 kg/ha no había plantas en la categoría 1 pero más de la mitad de las plantas estaban en la categoría 4. Por lo tanto, había una tendencia a plantas más vigorosas con dosis crecientes de ECOguard. Se puede observar que 80 kg/ha no fue tan bueno como 40 kg/ha.

35 Conclusión:

- Se observó una respuesta a la dosis.
- El número de nematodos del quiste de la zanahoria disminuyó con la aplicación de 10-40 kg/ha.
- El vigor y la longitud de la hoja más larga aumentaron con la aplicación de 10-40 kg/ha.
- El mayor número de macetas en categorías altas para el vigor (3-4) se encontró con la aplicación de 20-40 kg/ha.
- La dosis óptima para los nematodos del quiste de la zanahoria es probablemente de 20-40 kg/ha.

45 Ejemplo 3B: Resultados adicionales que muestran la eficacia de gránulos impregnados con concentrado de ajo contra nematodos del quiste en zanahorias

Antecedentes:

50 En Lammefjorden en Sealand, se han cultivado las zanahorias durante muchos años porque el suelo es rico en nutrientes y tiene una estructura ideal para las zanahorias. Desafortunadamente, muchos años en el sitio de prueba de la producción de zanahoria han aumentado la presión de la plaga de los nematodos del quiste en tal grado que la producción de zanahorias en muchos suelos es imposible.

Propósito:

El propósito del ensayo fue investigar si el ataque de los cistenematodos en zanahorias tardías podría disminuirse/reducirse.

Plan de ensayos:

En ensayos no públicos, una hectárea de suelo infectado con nematodos se dividió en 6 filas y se perforó con semillas de zanahorias y gránulos de ECOguard. Hubo dos filas sin tratar. Se trazaron y midieron 6 parcelas por hilera con zanahorias (aproximadamente de 80 a 100 zanahorias por parcela).

Tratamientos	0 kg/ha	10 kg/ha	20 kg/ha	30 kg/ha	40 kg/ha	0 kg/ha
--------------	---------	----------	----------	----------	----------	---------

Las zanahorias fueron perforadas y tratadas el 12/05/2004.

El ensayo se evaluó el 25/09/2004.

Se persiguió una banda de un metro con cuatro filas, se clasificó, contó y pesó. Se pudo observar una diferencia de crecimiento entre ECOguard/ha sin tratamiento y 20-30 kg.

Resultados:

Tabla 2: El número de zanahorias buenas y malas.

Número	No. de zanahorias buenas	% Incremento de zanahorias buenas	No. de zanahorias malas	No. Total de zanahorias
0 kg	48,67		37,83	86,50
10 kg	59,33	+15,7	38,33	97,67
20 kg	48,17	-1,0	27,00	75,17
30 kg	58,00	+19,2	26,00	84,00
40 kg	51,17	+5,1	34,33	85,50

El número de zanahorias buenas aumentó con una aplicación de 10 a 30 kg/ha de ECOguard. El tratamiento con 20 kg/ha tuvo aproximadamente el mismo número de zanahorias en las hileras que las zanahorias sin tratar. No hay explicación para la disminución del número de zanahorias.

10 y 30 kg/ha de ECOguard produjeron un 16-20% más de zanahorias comercializables. El número de zanahorias malas disminuyó. El número total de zanahorias aumentó en promedio en 11 zanahorias por fila de un metro.

Hay una tendencia a que las zanahorias respondan con fitotox a la aplicación de 40 kg/ha de ECOguard. Se puede observar en la tabla anterior y en las tablas a continuación que 40 kg/ha no mejoran la calidad de la zanahoria.

La Figura 5 muestra los tipos de deformación causada por los nematodos de quiste, es decir, zanahorias pequeñas con puntas comprimidas, zanahorias divididas y deformadas.

Tabla 1: El peso de las zanahorias buenas y malas.

Tratamiento	Peso de zanahorias buenas (g)	Peso de zanahorias malas (g)	Peso total (g)	% Incremento del peso
0 kg	4494,08	1964,17	6458,25	-
10 kg	5391,00	1950,83	7341,83	+13,7
20 kg	4922,33	1545,50	6467,83	+0,15
30 kg	5583,33	1529,83	7113,17	+10,1
40 kg	4921,17	1820,17	6741,33	+4,4

El peso de las zanahorias buenas aumentó de 10 a 30 kg/ha. El aumento de peso total fue 10-13,5%. De nuevo, 20 kg/ha no encaja en la tendencia.

Tabla 2: El número promedio de raíces por parcela, el peso promedio de la raíz, el aumento porcentual en el peso promedio de la raíz y el porcentaje de zanahorias comercializables.

Tratamiento	Número promedio de raíces por parcela	Peso promedio de la raíz (g)	% Incremento en el peso promedio de la raíz	% Zanahorias comercializables
0 kg	86	75,0		69,4
10 kg	94	76,6	+2,1	73,4
20 kg	76	87,6	+16,7	76,2
30 kg	84	86,3	+15,0	78,5
40 kg	89	79,8	+6,5	73,1

Puede observarse que el número promedio de raíces por parcela fue mayor para 10 kg/ha. El número más bajo de zanahorias fue con 20 kg/ha. Quizás el taladro no perforó las semillas correctamente. No hubo diferencias significativas entre 0, 10, 20, 30 y 40 kg/ha.

5 El peso promedio de la raíz aumentó con 10-30 kg/ha. El aumento fue entre 15-17% de peso de la raíz.

El número de raíces comercializables aumentó con 10-30 kg/ha de ECOguard.

Tabla 3: El beneficio económico de usar ECOguard en zanahorias Lammefjorden.

Tratamiento	Zanahorias comercializables (toneladas/ha)	Rendimiento extra (toneladas/ha)	Peso total (toneladas/ha)	Rendimiento extra (toneladas/ha)	Rendimiento extra total (toneladas/ha)	Margen bruto Dkr/ha
0 kg	69,4	-	75,0	-	-	-
10 kg	73,4	4,0	76,6	1,6	5,6	4.370,00
20 kg	76,2	6,8	87,6	12,6	19,4	15.130,00
30 kg	78,5	9,1	86,3	11,3	20,4	15.910,00
40 kg	73,1	3,7	79,8	4,8	8,5	6.630,00

10

La cosecha promedio en el otoño es de 100 toneladas/ha.

El precio de venta promedio por kg es de 0,78 Dkr.

Aproximadamente 1.000.000 de zanahorias por hectárea con un peso óptimo de 100 gramos por zanahoria.

15 Conclusión:

Hubo una clara tendencia a la reducción del ataque de nematodos de quiste en zanahorias.

20 El número de zanahorias comercializables aumentó en un 17% con 30 kg de ECOguard/ha y el peso promedio de la raíz aumentó de 75 gramos a 86 gramos. Una zanahoria óptima pesa 100 gramos.

Las zanahorias solo se trataron una vez en la perforación: las dosis óptimas son de 2 a 3 tratamientos durante la temporada de crecimiento con gránulos o en forma de concentrado de ajo líquido. Por ejemplo, gránulos en la perforación y líquidos durante la temporada de crecimiento.

25

Ejemplo 4

7.3 ECOguard como nematocida

30 7.3.1 Ensayo con zanahoria

Se han analizado los datos del ensayo no público con zanahoria en Posketts (véase el ejemplo 3) y muestran una clara tendencia hacia la reducción en la bifurcación de la raíz cuando se aplicaron gránulos de NEMguard en el momento de la perforación. Las magnitudes de los efectos se ilustran gráficamente en la figura 6, donde se muestra el tratamiento frente a la tasa de bifurcación.

35

El tratamiento 1 es el control, el tratamiento 2 es Temik y los tratamientos 3 y 4 son aplicación de 20 kg/Ha de gránulos de NEMguard. Las 2 aplicaciones de NEMguard están casi estadísticamente separadas del control y muy similares al patrón de datos observado en Hainford con respecto a las chirivías (véase el ejemplo 3). Por lo menos, NEMguard y Temik parecen producir niveles de efecto similares dentro de los dos cultivos.

40

7.3.2 PCN en Needham Field, Yaxley

45 Tras un informe sobre el aparente aumento del rendimiento bruto en el que se usaron en combinación gránulos de NEMguard y CL AIL 0021 líquido (concentrado de ajo), el campo se muestreó nuevamente para determinar el número de huevos/gramo de PCN residual al final del ciclo productivo del cultivo. Estos resultados se compararon con los datos iniciales de huevos/gramo y se presentan a continuación en la tabla 7.3.2.

Tabla 7.3.2 Números de PCN en el campo de Needham, Yaxley

Sector/tratamientos	Huevos/gramo iniciales	Huevos/gramo finales	Relación Fp/lp
1 gránulo + líquido	(15)	0	0
2 gránulos solamente 30 kg	16	5	0,3
3 gránulos solamente 30 kg	18	1	0,05
4 gránulos + líquido	35	46	1,31

50

Los datos en la tabla 7.3.2 anterior sugieren un alto grado de inhibición de la reproducción de PCN.

Los datos más importantes observados se encuentran en el sector 4 donde había una población comercialmente muy significativa de PCN encontrada al comienzo del cultivo. Los datos del nuevo muestreo también confirman la presencia de una alta población de PCN en este sector, pero la tasa de aumento de la población debido al cultivo de patata parece haber sido mínima y es esencialmente la misma que la encontrada al principio. Este es un resultado muy significativo ya que el uso de nematocidas en cultivos de patata es principalmente para inhibir la reproducción de PCN e idealmente mantener la población de huevos/gramo, tan cercana a la del inicio del cultivo.

Una relación Fp/lp de 1,31 normalmente sería aceptable para la Dirección de Seguridad de Pesticidas (PSD) como prueba de los efectos nematocidas.

7.3.3 Control del nematodo agallador en Sun Melons (Corea)

En ensayos no públicos, se evaluó la eficacia de NEMguard (gránulos impregnados con el concentrado de ajo) y CL AIL 0021 líquido (el concentrado de ajo) como nematocida para el nematodo agallador.

El informe resultante indica que se encontraron diferencias significativas con los tratamientos frente al control, siendo todas las formulaciones de ECOguard estadísticamente equivalentes a Carbofuran.

En conclusión, el informe afirma que "Comparado con Carbofuran Eco-guard GR y SR mostró 83,5-94,9% de eficacia de control 30 días después del tratamiento y 87,9-97,1% de eficacia de control (después de 60 días) sin fitotoxicidad. Por lo tanto, los productos pueden ser utilizados como nematocidas para el nematodo agallador *Meloidogynae* spp., en melón oriental.

Una reevaluación de los datos sugiere que debido a la distribución irregular de los números iniciales de nematodos en el tratamiento se replica al comienzo, el grado de eficacia en comparación con el Carbofuran puede ser menor que el citado anteriormente, pero no obstante es sustancial, con el 1,25% de concentración de la solución que tiene 77% de la eficacia de Carbofuran.

Incluso teniendo en cuenta un grado de precaución en la interpretación de los resultados, los datos coreanos son una buena evidencia de que las formulaciones de CL AIL 0021 actúan como un nematocida para un género de amplia distribución y gran importancia económica.

Ejemplo 4A - Eficacia de NEMguard® contra nematodos que viven en el suelo en un campo utilizado para el cultivo de fresas.

En ensayos de campo no públicos, los siguientes resultados demuestran la eficacia del concentrado de ajo para controlar nematodos en un campo infestado con varias especies diferentes de nematodos, siendo dicho campo utilizado para cultivar fresas. Si tales infestaciones no se controlan, puede tener como resultado que se abandonen tales cultivos de fresas.

En Noruega, el nematodo aguja *Longidorus elongatus* es un importante parásito de la raíz de la fresa, con un umbral perjudicial de 3-5 ind. / 250 g de suelo. Se han abandonado buenos campos debido a *L. elongatus*, y en casos severos se han perdido 2 años de cosecha.

Se estudiaron los efectos de los tratamientos con NEMguard® sobre los parámetros de crecimiento en fresa de primer año (cv. Polka) en un campo infestado con *Longidorus elongatus*, *Pratylenchus crenatus*, *Tylenchorhynchus dubius* y *Paratrichodorus pachydermus* en Marnardal, sur de Noruega 2005. Diferencia significativa (S) al control de fresa observado a $P \leq 0,05$, y se registró una tendencia (t) en el intervalo de $0,10 \geq P > 0,05$; no se observó una diferencia significativa (NS) observada para $P > 0,10$; prueba de 2 muestras.

Tratamiento	Tasa de crecimiento	Número de hojas	Número de carreras	Numero de coronas
NEMguard® 8 g/m ²	S	S	t	NS
NEMguard® 16 g/m ²	S	NS	NS	NS
NEMguard® 32 g/m ²	S	S	NS	NS

NEMguard® es una referencia a los gránulos impregnados con el concentrado de zumo de ajo.

Ejemplo 5: una visión general de los datos de eficacia de ensayos de campo con gránulos de ECOguard utilizados para controlar el daño de la mosca de la raíz de la col en Noruega.

1.0 Preliminares

Se llevó a cabo un extenso programa de ensayos de campo no públicos, que incluyó cinco cultivos de colinabo. El diseño de los ensayos de campo se basó en múltiples aplicaciones de ECOguard® líquido (concentrado de zumo de

ajo) o gránulos (gránulos de harina de madera impregnados con el concentrado de zumo de ajo) y en cuatro de los cinco ensayos de colinabo se hizo referencia contra dimetoato como estándar.

5 El análisis de los datos sin procesar de todos los ensayos con colinabo realizados por los inventores reveló diferencias de tratamiento significativas en el daño de la mosca de la raíz de la col en dos de cinco ensayos (Romedal y Toten). En Toten, la reducción en el daño de la mosca de la raíz de la col provocó un aumento del 28% en el rendimiento vendible.

10 En general, el dimetoato y el ECOguard® parecieron reducir el daño de la mosca de la raíz de la col en niveles similares, aunque esto solo fue significativo en Toten.

15 Una comparación de dos ensayos (Toten y Ga-Fa), con niveles similares de daño de la mosca de la raíz de la col (RDI en los controles 57.33 y 68.69 respectivamente) pero patrones de precipitación ampliamente diferentes durante las aplicaciones del tratamiento, reveló claramente el impacto de la lluvia en la eficacia. Episodios de lluvia intensa y persistente parecieron eliminar cualquier efecto eficaz.

2.0 Resultados

20 Los efectos generales se resumen en las tablas a continuación.

Tabla 1: Índice combinado de daño de la raíz (RDI) cuatro sitios nuevos

Tratamiento	Mid-Troms	Sor Ost	Ga-Fa	Toten*	Media	% Cambio
Control	38,29	24,33	68,69	54,67	46,49	--
Dimetoato	40,60	24,92	65,78	44,33	43,90	-5,8
ECOguard®	36,29	24,33	71,67	42,24	43,63	-6,5

* Diferencia significativa de control y 3 aplicaciones de gránulos de ECOguard®.

La Tabla 2 indica los rendimientos comercializables en cada sitio, kg/muestra (cat 1 + 2, notación noruega, 1 = no dañado, 2 = daño leve)

Tratamiento	Mid-Troms	Sor Ost	Ga-Fa	Toten	Media	% Cambio
Control	5,29	19,87	7,78	11,05	10,99	--
Dimetoato	5,84	22,16	7,27	11,95	11,95	+8
ECOguard®	5,81	23,62	6,81	15,35	12,89	+15

25 Los datos en las Tablas 1 y 2 anteriores indican una reducción media en el daño de la mosca de la raíz de la col asociada con dimetoato y ECOguard®. En Toten, las reducciones en el daño de la mosca de la raíz de la col fueron significativas.

30 ECOguard® produjo la mayor ganancia en material vendible en los cuatro sitios, aproximadamente el doble de lo observado con dimetoato.

35 Los datos correspondientes sobre el impacto agronómico de los tratamientos (Tabla 2) son consistentes con la reducción en el daño de la mosca de la raíz de la col aumentando el rendimiento vendible. En el caso de ECOguard®, el aumento medio en el rendimiento vendible en general fue del 15%, con un valor máximo del 28% registrado en Toten, en consonancia con la reducción significativa correspondiente en el daño de la mosca de la raíz de col en este sitio.

40 Una comparación de eficacia en relación con la lluvia en Ga-Fa y Toten, los dos ensayos con mayor ataque de la mosca de la raíz de la col, muestra que la pérdida de eficacia en Ga-Fa fue casi seguramente atribuible a la falta de lluvia después de la primera aplicación y lluvias muy fuertes asociadas con la segunda y tercera aplicaciones.

45 En Ga-Fa, la lluvia registrada durante los 14 días que cubrían el segundo y tercer tratamiento fue de 95,2 mm. En contraste, durante el mismo período que cubre el segundo y el tercer tratamiento en Toten, la precipitación fue de 17,5 mm, cayendo principalmente como lluvia ligera.

Los registros de lluvia reales para ambos sitios se presentan en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Comparaciones de precipitaciones en Toten y Ga-Fa

Toten Primer tratamiento	30 de junio de 2004		
Ga-Fa Primer tratamiento	11 de junio de 2004		
Cada prueba recibió 3 aplicaciones de gránulos de ECOguard® a intervalos semanales			
Ga-Fa	Lluvia	Toten	Lluvia
8 de junio	0,0	27 de junio	0,1

(continuación)

Toten Primer tratamiento		30 de junio de 2004	
Ga-Fa Primer tratamiento		11 de junio de 2004	
Cada prueba recibió 3 aplicaciones de gránulos de ECOguard® a intervalos semanales			
9	3,2	28	5,1
10	1,2	29	1,2
11 Primera aplicación	0,0	30 Primera aplicación	0,0
12	0,0	1 Julio	1,7
13	0,0	2	19,4
14	0,0	3	-0,1
15	0,0	4	0,0
16	0,0	5	8,3
17 Segunda aplicación	0,0	6 Segunda aplicación	2,0
18	0,0	7	-0,1
19	9,2	8	0,0
20	13,8	9	-0,1
21	3,8	10	0,1
22	6,8	11	0,1
23 Tercera aplicación	2,4	12 Tercera aplicación	0,1
24	28,8	13	1,0
25	16,2	14	0,
26	4,0	15	0,0
27	0,0	16	0,0
28	0,0	17	-0,1
29	10,0	18	15,1
30	0,0	19	0,7
		20	-0,1
Total lluvia 8 - 30 de junio	99,4 mm	27 de junio - 20 de julio	55,4 mm
Precipitaciones desde la segunda aplicación hasta el final del período	95,2 mm	Precipitaciones desde la segunda aplicación hasta el final del período	17,5 mm
Precipitaciones durante cuatro días antes de la primera aplicación	4,2 mm	6,3 mm	

5 Las cantidades de lluvia en cada sitio antes del primer tratamiento fueron muy similares, 4,2 y 6,3 mm. Sin embargo, después de la primera aplicación, los patrones de lluvia en cada sitio se volvieron muy diferentes. El período de 10 días después de la segunda aplicación está sombreado para facilitar la comparación.

10 En Ga-Fa no hubo precipitaciones durante 8 días consecutivos después de la primera aplicación, que también cubrió 2 días en la segunda aplicación. Después de esto, hubo 8 días consecutivos de lluvia ininterrumpida, y la tercera aplicación se hizo en medio de esta lluvia. La cantidad de lluvia registrada en este diluvio de 8 días fue de 85 mm.

15 Con la primera aplicación en Ga-Fa experimentando condiciones totalmente secas durante 8 días y la segunda y tercera aplicación luego experimentando 8 y 4 días respectivamente de lluvia fuerte ininterrumpida, se habría esperado poco o ningún efecto de ECOguard® ya que estos representan los extremos de las condiciones que los inventores creen que tienen un impacto negativo sobre la eficacia. El hecho de que cada tratamiento experimente uno u otro de estos extremos comprometería por completo cualquier impacto sobre la mosca de la raíz de la col. Los datos reflejan esto.

20 Por el contrario, el sitio en Toten experimentó condiciones mucho más establecidas que Ga-Fa. La primera aplicación experimentó un evento de lluvia intensa (19,4 mm) dos días después de la aplicación, lo que probablemente impactó negativamente en la eficacia, pero la segunda y tercera aplicaciones ubicadas hacia el centro del pico de puesta de huevos experimentaron 11 días consecutivos de condiciones establecidas con solo precipitación ligera (1 mm máximo en cualquier día). Estas condiciones se consideran ideales para maximizar la eficacia. Los inventores han presentado previamente datos de estudios de laboratorio que muestran esto. Por lo tanto, se espera que la segunda y la tercera aplicación en Toten hayan sido eficaces.

25 El análisis estadístico del daño de la mosca de la raíz de la col en Toten mostró que tanto el dimetoato como ECOguard® redujeron significativamente el daño ($P = 0,004$), lo que condujo a aumentos agrónomicamente significativos en el material vendible del tratamiento con ECOguard®.

30

En términos de RDI, el dimetoato y ECOguard® fueron significativamente mejores que el control, pero no significativamente diferentes entre sí.

Tratamiento 1 = Control
 Tratamiento 2 = Dimetoato
 Tratamiento 3 = ECOguard®

5 Tratamiento = 1 extraído de:

Nivel de tratamiento	Diferencia de la media	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
2	-0,3100	0,1223	-2,535	0,0302
3	-0,3900	0,1223	-3,190	0,0041

2.1 Romedal

10 El quinto sitio de prueba con colinabo se cosechó antes que los otros cuatro sitios introducidos en la tabla 1 y 2.

Este sitio experimentó generalmente una ligera presión de plagas, pero incluyó un grupo de otros tratamientos con ECOguard® aplicados como aerosoles.

15 Los datos de esta prueba también produjeron diferencias significativas en los tratamientos cuando se analizaron mediante ANOVA GLIM, con todos los tratamientos con ECOguard® que tienen un menor daño de la mosca de la raíz de la col luego del control.

Esto se muestra a continuación

20

Prueba de Kruskal-Wallis en C7

Tratamiento	N	Mediana	Intervalo promedio	Z
1	75	0,00E+00	218,4	2,72
2	75	0,00E+00	175,4	-1,13
3	75	0,00E+00	182,8	-0,47
4	75	0,00E+00	175,4	-1,13
5	75	0,00E+00	188,1	0,01
Total	375			

H = 23,38 DF = 4 P = 0,000 (ajustado por enlaces)

25 Todos los tratamientos con ECOguard® tienen un daño significativamente menor de la mosca de la raíz de la col (P = 0,000) que el control (tratamiento 1). El tratamiento 5 es el gránulo de ECOguard® y muestra una reducción del 14% en el daño total.

La presentación de los datos como índice de daño de la raíz da un valor de 11,6 para el control y 4,9 para los gránulos de ECOguard® (cálculo de PSD).

30 Aunque el nivel de ataque en Romedal fue bajo con un RDI de 11,6, un nivel mucho más alto de ataque ocurrió en Toten, con un RDI de 54,67 (más alta que cualquier cosa observada en los controles de las pruebas de campo del Reino Unido en 2004) con ambos sitios mostrando reducciones significativas en el daño de la mosca de la raíz de la col.

35 La característica común tanto en Romedal como en Toten fue en general condiciones establecidas asociadas con la segunda y tercera aplicaciones de tratamiento. Los datos de lluvia para Toten y Romedal se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Comparaciones de precipitaciones en Toten y Romedal

Toten	Lluvia	Romedal	Lluvia
30 de junio primera aplicación	0,0	Primera aplicación	1,7
1 de julio	1,7		30,2

ES 2 660 638 T3

Toten	Lluvia	Romedal	Lluvia
2	19,4		0,2
3	-0,1		0,0

(continuación)

Toten	Lluvia	Romedal	Lluvia
4	0,0		4,2
5	8,3		4,5
6	2,0		0,0
7 Segunda aplicación	-0,1	Segunda aplicación	0,0
8	0,0		0,0
9	-0,1		0,0
10	0,1		0,0
11	0,1		0,2
12	0,1		2,0
13	1,0		0,0
14 Tercera aplicación	0,0	Tercera aplicación	0,0
15	0,0		0,0
16	0,0		0,0
17	-0,1		17,9
18	15,1		0,7
19	0,7		0,0
20	-0,1		0,0
21	0,0	Cuarta aplicación	0,0
22	0,3		0,7
23	-0,3		0,0
24	33,2		3,3

5 Toten y Romedal iniciaron tratamientos en el mismo día en respuesta a la detección de los primeros huevos de mosca de la raíz de la col. Luego, los tratamientos siguieron un patrón semanal en ambos sitios, y Romedal tuvo un tratamiento más que Toten. El primer, segundo y tercer tratamientos en ambos sitios fueron sincrónicos y experimentaron patrones muy similares y de intensidad de lluvia, que para el período asociado con los tratamientos 2 y 3 fue muy leve en ambos sitios.

10 Como se analiza en la tabla 3, esto contrasta con el patrón de lluvia y la intensidad en Ga-Fa, que fue muy pesado y prolongado durante la segunda y tercera aplicaciones.

15 La evidencia de eficacia en Toten y Romedal parece estar muy estrechamente asociada con las condiciones establecidas y los episodios de lluvia ligera, con la segunda y tercera aplicaciones correspondientes a un pico en la puesta de huevos.

3.0 Conclusiones

20 Las pruebas de campo no públicas en colinabo en Noruega mostraron que los gránulos de ECOguard® produjeron reducciones significativas en el daño de la mosca de la raíz de la col; esto fue independientemente de la intensidad del desafío. Se observaron diferencias significativas en los conjuntos de datos con valores de RDI en el control que van desde 11,9 hasta 54,67.

Los ensayos no incluyeron adiciones factoriales de producto, pero se puede inferir claramente de los datos sobre precipitación que los efectos significativos fueron impulsados en gran parte por el segundo y tercer tratamientos aplicados durante el pico de presión de plagas cuando la mayoría de las lluvias livianas ocurrieron.

5 Estas conclusiones no están en desacuerdo con las alcanzadas en los ensayos de campo no públicos en el Reino Unido si los datos engañosos de los ensayos están restringidos y demuestran colectivamente que se puede obtener un nivel útil de eficacia del producto con aplicaciones oportunas en condiciones ambientales apropiadas.

10 La ganancia máxima de material vendible, 28%, asociada con la aplicación de gránulos de ECOguard® en Toten se considera comercialmente significativa. En el Reino Unido, tal ganancia equivaldría a ~ 11,2 toneladas de material, a un precio de ~ £ 200/tonelada, esto representa un aumento en el retorno de ~ £ 2240/ha.

15 La eficacia de los gránulos depende mucho de la humedad y del tiempo de aplicación con respecto a la puesta de huevos por la mosca de la raíz de la col.

Estos experimentos consideraron el momento de la aplicación de agua a los gránulos con relación al tiempo de colocación de huevos recién puestos en el lugar del bioensayo.

20 En los dos tipos de suelo se usaron los siguientes tratamientos replicados 10 veces con 10 huevos/ensayo:

1. Control (agua + Huevos)
2. Gránulos + huevos
3. Gránulos + huevos + agua añadida 1 día después de los huevos
4. Gránulos + huevos + agua añadida 30 minutos después de los huevos
- 25 5. Gránulos + agua + huevos añadidos después de 1 día
6. Gránulos + agua + huevos añadidos después de 30 minutos

Se obtuvieron los siguientes resultados:
Porcentaje de huevos eclosionados

30

Tabla 1

Tipo de suelo	Tratam. 1	Tratam. 2	Tratam. 3	Tratam. 4	Tratam. 5	Tratam. 6
Natural	95	81	80	12	59	4
Compost	96	76	39	15	68	18
Media	95,5	78,5	59,5	18,5	63,5	11
(Tratam. = Tratamiento)						

Se obtuvieron los siguientes resultados:

35 Porcentaje de huevos eclosionados

Estos resultados proporcionan una clara evidencia de que la aplicación de agua a los gránulos es vital para mejorar la eficacia. El tratamiento 3, que probablemente se parece más a la situación de campo en general, muestra que cuando los huevos y los gránulos están presentes en la base de una planta, seguido por un evento de lluvia, la eclosión del huevo se reduce en un 38%. Este nivel de eficacia puede mejorarse considerablemente (reducción del 80%) si la humectación de los gránulos ocurre poco después de la colocación de los óvulos (tratamiento 4). Este efecto se atribuye al hecho de que los huevos de la mosca de la raíz de la col frescos permanecen permeables unas pocas horas después de la puesta y los activos en ECOguard® entran en los huevos más fácilmente en este momento. También está implícito a partir de los datos anteriores que el momento de aplicación de los gránulos de ECOguard® en relación con la presión de las plagas tendrá un efecto importante en la eficacia (tratamientos de contraste 5 y 6). Es probable que las aplicaciones del producto varios días después de la puesta de huevos sean menos eficaces que las aplicaciones del producto en el momento de la puesta de huevos.

50 Ejemplo 6: Uso de concentrado de ajo en el control del ácaro rojo de aves de corral

Se aplicó un concentrado de ajo denominado Breck-a-sol, al 3% v/v (1,5% v de concentrado de zumo de ajo y 1,5% de aceite adyuvante (aceite de colza)) a razón de 189 ml/m².

55 La Figura 7 muestra los resultados que demuestran la eficacia de Breck-a-sol (Bsol) frente al ácaro rojo de aves de corral, el porcentaje de mortalidad del ácaro rojo se muestra frente a los controles y el uso de Barricade.

Referenciado contra la célula seca	(control positivo)
Agua	(control agua)
Cipermetrina	(1% v/v de Barricade (Bcade) a razón de 189 mL/m ²)

Los resultados para Breck-a-Sol y Barricade no fueron significativamente diferentes entre sí.

- 5 Este patrón de datos se repitió con otros cinco experimentos usando ácaros de diferentes cobertizos y diferentes lotes de concentrado de zumo de ajo.

10 También se investigaron los efectos de la suciedad (polvo) sobre la eficacia. Este trabajo mostró una eficacia útil del producto con niveles "moderados" de suciedad, con la eficacia del concentrado de ajo perdida solo a niveles muy altos de suciedad.

15 En la figura 8, se presentan una serie de datos que comparan el % de mortalidad del ácaro rojo de las aves de corral bajo diferentes niveles de suciedad cuando se aplica Breck-a-sol o Barricade (cipermetrina) como biocida. Los resultados de la aplicación de Barricade están indicados en la clave por BC, Con. seco = Control seco, Agua = la aplicación de agua y los resultados restantes se relacionan con la aplicación de Breck-a-sol.

Se aplicó suciedad en cargas crecientes para reflejar los niveles de suciedad encontrados en las superficies de un cobertizo de aves de corral.

- 20 0,1 (equivalente a ~ 20 g de polvo/m²)
 0,2 (equivalente a ~ 40 g de polvo/m²)
 0,4 (equivalente a ~ 80 g de polvo/m²)
 0,8 (equivalente a ~ 160 g de polvo/m²)

25 Los resultados muestran que el concentrado de zumo de ajo (Breck-a-Sol (Bsol)) proporciona un nivel útil de eficacia cuando la suciedad es ~ 80 g/m², que no fue significativamente diferente a la observada con Barricade aplicado a la suciedad a razón de ~ 40 g/m².

30 Apéndice 1

Análisis de HPLC

Datos de cromatograma de varias muestras de aceite de ajo

- 35 1. Muestras:

Se analizó un aceite de ajo (estándar dorado) junto con otros dos productos: un aceite de ajo (estándar de la industria) y el concentrado de zumo de ajo.

- 40 2. Preparación de la muestra:

Ambas muestras se diluyeron 1:10 con MeCN al 100% (50 µl de muestra en 450 µl de MeCN), El concentrado de zumo de ajo produjo un precipitado blanco después de la dilución. Esto se eliminó usando un filtro para disolvente Target® de 0,2 µm antes del análisis por HPLC,

- 45 3. Análisis de HPLC:

Esto se realizó usando un sistema HPLC Agilent HP1100 con detección de matriz de diodos en combinación con una columna Luna Phenomenex C₁₈ (2) (250 x 4,6 mm, 5 µm) con una precolumna C18 'Securityguard'. La temperatura del automuestreador era de 4°C y la temperatura de la columna era de 37°C y la presión de corte era de 280 bar. Los datos se recolectaron a 240 nm (con datos totales recolectados entre 200-600 nm). Se encontró que el volumen de inyección era casi óptimo a 5 µl para muestras diluidas 1:10. Tres métodos fueron evaluados.

- 50 i. Uno basado en un método de la literatura (véase a continuación), con las siguientes modificaciones: columna Luna y gradiente isocrático de 70% de MeCN (97% de MeCN con 3% de THF) y 30% de agua ultrapura. Tiempo del método = 40 min. (RBSULF1)
- 55 ii. Un segundo método, esencialmente como el anterior, pero utilizando una etapa de gradiente previo antes de la etapa isocrática. (RBSULF2)

ES 2 660 638 T3

Tiempo	% de A (agua ultra pura)	% de B (97% de MeCN/3% de THF)
0	70	30
10	30	70
35	30	70
40	70	30
50	70	30

iii. Un tercer método (RBSULF 3) basado en RBSULF1, pero con un tiempo de equilibrio extendido, es decir, tiempo del método = 50 min.

5

Referencia del método:

Lawson, L.D., Wang, Z-Y.J., Hughes, B.G. (1991). Identification and HPLC quantification of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. *Planta Medica* 57: 363-370

10

Resultados: Todos los cromatogramas a 240 nm

A. Separación

15

Estándar de ajo RBSULF3 (5µL 1:10)

Datos sin procesar para muestras de ajo

20

Aceite de ajo, estándar dorado, inyección de 2,5 µL (aceite diluido 1:10): Se utiliza como material de referencia de la forma del pico y tiempo de retención.

Véase la Figura 9 (Cromatograma 1)

25

Identificación del pico

(Se han hecho las siguientes asignaciones a los picos de los cromatogramas)

1=	Sulfuro de Metil Alilo Disulfuro de Dimetilo	CH ₃ -S-CH ₂ -CH=CH ₂ CH ₃ -S-S-CH ₃
2=	Disulfuro de Metil Alilo	CH ₃ -S-S-CH ₂ -CH=CH ₂
3=	Sulfuro de Dialilo	CH ₂ =CH-CH ₂ -S-CH ₂ -CH=CH ₂
4=	Trisulfuro de Dimetilo	CH ₃ -S-S-S-CH ₃
5=	Disulfuro de Dialilo	CH ₂ =CH-CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH=CH ₂
6=	Trisulfuro de Metil Alilo	CH ₃ -S-S-S-CH ₂ -CH=CH ₂
7=	Tetrasulfuro de Dimetilo	CH ₃ -S-S-S-S-CH ₃
8=	Disulfuro de Trans-1-Propenilo	CH ₂ =CH-CH ₂ -S-S-H
9=	Trisulfuro de Dialilo	CH ₂ =CH-CH ₂ -S-S-S-CH ₂ -CH=CH ₂
10=	Tetrasulfuro de Metil Alilo	CH ₃ -S-S-S-S-CH ₂ -CH=CH ₂
11=	Pentasulfuro de Dimetilo	CH ₃ -S-S-S-S-S-CH ₃
12=	Trisulfuro de Trans-1-Propenilo (Putativo)	CH ₂ =CH-CH ₂ -S-S-S-H
13=	Tetrasulfuro de Dialilo	CH ₂ =CH-CH ₂ -S-S-S-S-CH ₂ -CH=CH ₂
14=	Pentasulfuro de Metil Alilo	CH ₃ -S-S-S-S-S-CH ₂ -CH=CH ₂
15 =	Hexasulfuro de Dimetilo	CH ₃ -S-S-S-S-S-S-CH ₃
16 =	Pentasulfuro de Dialilo	CH ₂ =CH-CH ₂ -S-S-S-S-S-CH ₂ -CH=CH ₂
17 =	Hexasulfuro de Metil Alilo	CH ₃ -S-S-S-S-S-S-CH ₂ -CH=CH ₂
18 =	Heptasulfuro de Dimetilo	CH ₃ -S-S-S-S-S-S-S-CH ₃
19 =	Hexasulfuro de Dialilo	CH ₂ =CH-CH ₂ -S-S-S-S-S-S-CH ₂ -CH=CH ₂

ES 2 660 638 T3

Véase la Figura 10 (Cromatograma 2 - Estándar de ajo)

Véase la Figura 11 (Cromatograma 3 - Concentrado de zumo de ajo)

- 5 Los números de los picos son provisionales, las identificaciones se basan en el perfil que se muestra en el artículo de referencia: hay varios compuestos adicionales en el estándar y el concentrado de zumo de ajo que pueden ser compuestos relacionados.

Muestras: Tabla 2a. Tabla resumen de los datos del producto para varios lotes del concentrado de ajo

10

(Cada compuesto expresado como μg de Di-Alil Sulfuro equivalente g^{-1} de producto)					
	Lote				
Pico No.	9381	0091	1131	0391	0301
	Líquido espeso				
1	82	66	76	55	82
2	131	136	153	104	93
3	87	66	109	104	104
4	579	579	546	409	442
5	841	791	1103	1026	1037
6	846	797	824	693	917
7	T	T	136	115	153
8	T	T	82	55	115
9	4241	3886	4181	4460	3450
10	360	448	415	289	464
11	T	T	T	T	T
12	T	T	T	T	T
13	1916	2233	1971	1643	1676
14	38	55	44	44	22
15	71	87	87	87	49
16	502	731	546	415	480
17	131	191	104	87	115
18	142	262	158	109	164
19	71	120	71	44	71
Total	10038	10448	10606	9739	9434
Como % del total					
DAS (3)	0,9	0,6	1,0	1,1	1,1
DADS (5)	8,4	7,6	10,4	10,5	11,0
DATS (9)	42,2	37,2	39,4	45,8	36,6
3+5+9	51,5	45,4	50,8	57,4	48,7

Apéndice 2: Destino y comportamiento del concentrado de ajo en el medio ambiente

5 La formulación del gránulo de ECOguard® contiene 45% de concentrado de zumo de ajo (AIL 0021) mezclado con 55% de fibra de madera y aglutinante celulósico. Con mucho, el componente más grande en el concentrado de zumo de ajo (AIL 0021), el producto técnico, es el carbohidrato. Se cree que AIL 0021 comprende hasta 50% de carbohidrato en peso en el producto final. Por lo tanto, esta composición produce un gránulo con una composición total de una mezcla al 77,5% p/p de carbohidrato y celulosa biodegradables y solubles.

10 La composición de moléculas organosulfuradas en el concentrado de zumo de ajo es predominantemente moléculas con puentes disulfuro tales como disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo que se cree que están en el intervalo de 3,5% p/p. Estos son compuestos naturales que se encuentran en cualquier ajo triturado.

15 Los efectos biológicos del concentrado de zumo de ajo, observado en experimentación, no se han atribuido a ninguna molécula o grupo de moléculas en particular. Los efectos biológicos observados se han atribuido a la acción del producto como un todo. En las discusiones sobre la química general del ajo, se hizo hincapié en la identificación y cuantificación de algunas de las moléculas organosulfuradas presentes como un medio para establecer y demostrar la consistencia del producto durante la fabricación.

20 Los inventores creen que el residuo de los gránulos de ECOguard® elaborado a partir de concentrado de zumo de ajo (AIL 0021) es predominantemente una mezcla de carbohidratos biodegradables y celulosa derivada de la fibra de madera y la matriz de soporte del aglutinante y de la pulverización y filtración de dientes de ajos frescos enteros, con cualquier residuo organosulfurado proveniente de aproximadamente 3,5% p/p de compuestos organosulfurados.

25 Se cree que los siguientes argumentos se aplican con referencia a:

Agua (degradación y sedimentación/repartición en agua)

Suelo (degradación y movilidad)

30 Aire

35 Los constituyentes menores del concentrado de zumo de ajo (AIL 0021) tal como los metabolitos organosulfurados se caracterizan por moléculas con puentes disulfuro, que son químicamente lábiles que tienden a reaccionar como electrófilos, buscando grupos funcionales nucleofílicos tales como $-NH_2$; $-SH$; $-OH$; $>C=O$. La reacción con estos grupos funcionales rompe el puente disulfuro, que en el caso de un entorno de reacción acuoso produce grupos funcionales que contienen azufre hidratado tales como: $-R-S-OH$, donde R representa la mitad del puente disulfuro.

40 Más específicamente, el trabajo analítico de HPLC sobre la caracterización del concentrado de zumo de ajo (CL AIL 0021), ha mostrado que cuatro de las principales especies moleculares son: sulfuro de dialilo; disulfuro de dialilo; trisulfuro de dialilo y tetrasulfuro de dialilo. Esto es coherente con la descomposición de alicina en monosulfuro, disulfuro y trisulfuro de dialilo que, según los informes, se produce a temperatura ambiente en Block 1992.

45 Además, existe un alto grado de similitud entre la química organosulfurada del ajo y las cebollas. Block 1992 informa: "Estudios pioneros en la década de 1940 por Stoll y Seebeck en Basilea demostraron que el precursor estable del principio antibacteriano del ajo de Cavallito (alicina) es (+)-S-2-propenil-L-cisteína-S-óxido (aliina). En la célula intacta, la aliina y S-alqu(en)il-L-cisteína-S-óxidos relacionados (precursores de aroma y sabor) se localizan en el citoplasma y la enzima C-S liasa alinasa en la vacuola. La ruptura de las células resulta en la liberación de alinasa y la subsiguiente eliminación alfa y beta de los S-óxidos, produciendo finalmente compuestos volátiles y olorosos organosulfurados de bajo peso molecular tales como alicina, que se equilibra fácilmente hasta disulfuro de dialilo y otros alquenos con puentes de azufre".

50 Se producen cuatro sulfóxidos en *Allium* spp

1 S-2-propenil-cisteína S-óxido

55 2 S-(E)-1-propenil-cisteína S-óxido

3 S-metil-cisteína S-óxido

60 4 S-propil-L-cisteína S-óxido

Las cebollas contienen 2, 3 y 4. El ajo contiene 1, 2 y 3.

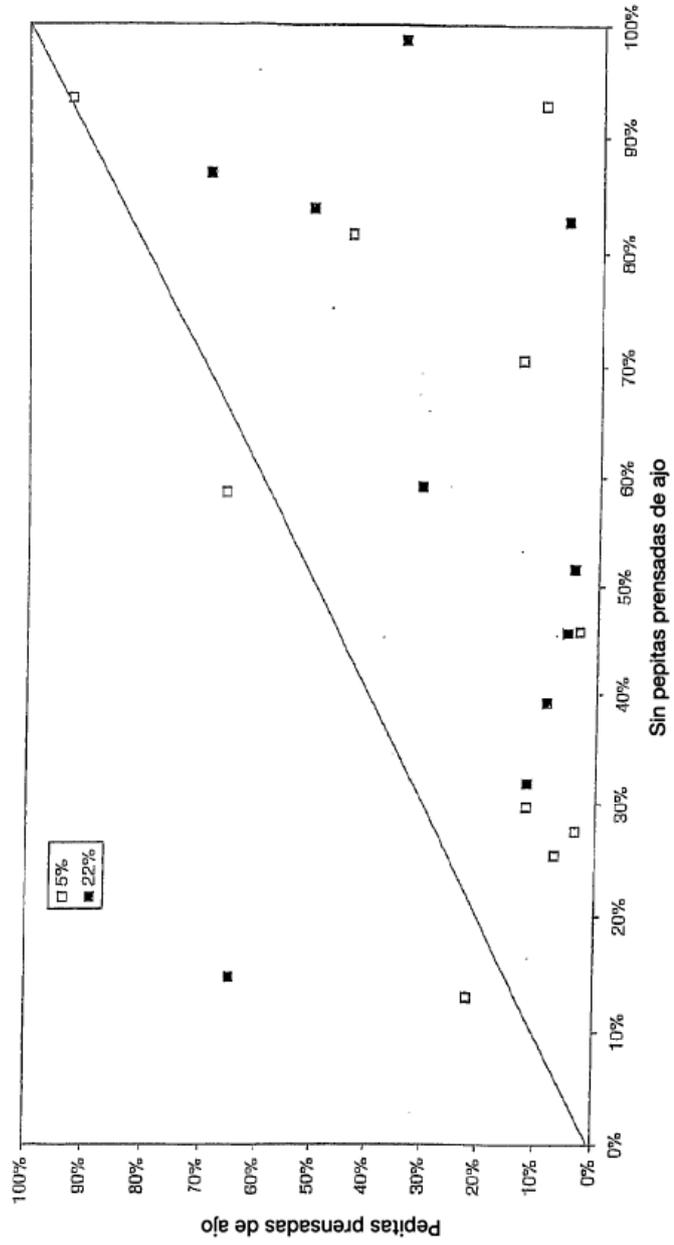
65 Por lo tanto, existe un alto grado de equivalencia en la química de organosulfurados entre cebollas y ajo. En el caso de las cebollas, la acción de la alinasa de cebolla sobre los precursores conduce a polisulfuros de dipropilo en oposición a los polisulfuros de dialilo, que dominan en el ajo.

- 5 Los sulfuros de dialilo son considerados por los inventores como las principales moléculas de organosulfurados en el concentrado de zumo de ajo (producto CL AIL 0021); esto es consistente con la literatura y los resultados analíticos detallados. La concentración promedio de disulfuro de dialilo (DADS) en CL AIL 0021 calculada a partir de 5 lotes de producción es de 12 mg/g. Por lo tanto, esto produce una concentración teórica de DADS en gránulos típicos de ECOguard® de 0,54%.
- 10 El porcentaje real de DADS en un gránulo de ECOguard® es del 0,54% y para DASn del 3,46%. Por lo tanto, una aplicación de 12 kg/ha de gránulos de ECOguard® aplica un máximo de 65 g de disulfuro de dialilo/ha y 415 g/ha de DASn. Se informa por Block 1992, que el ajo, la cebolla y otros miembros de la *Allium* spp, contienen 1-5% en peso seco de metabolitos secundarios de aminoácidos con azufre no proteico. Dado que un cultivo de ajo puede producir 20 toneladas/ha de peso fresco y que el 25% de esta es materia seca, entonces un cultivo comercial típico de ajo producirá entre 50-250 kg de azufre no proteico, es decir, 100-500 veces más que con una aplicación de gránulos de ajo ECOguard®.
- 15 En un análisis gravimétrico simple, una sola aplicación de ECOguard® aplicará de 100 a 500 veces menos azufre orgánico que el que podría liberarse en el medio ambiente a partir de un cultivo comercial, si el cultivo fue abandonado para pudrirse.
- 20 Dado la gran área de cebollas cultivadas en el Reino Unido y el rendimiento relativo por hectárea, las cebollas son una fuente potencialmente mucho más importante de ácidos sulfénicos y polisulfuros que el ajo.
- 25 La Asociación Británica de Productores de Cebolla (BOPA) considera que el desperdicio de cebollas en la cosecha representa aproximadamente el 12% del rendimiento bruto, que para 40 toneladas/ha es de aproximadamente 4,8 toneladas, esta se compone de cebollas de menos de 50 mm de diámetro, diámetro que cae a través de las redes de recolección. Esta basura se dejará en el campo y se escarificará hasta putrefacción. En estas circunstancias, habrá una liberación sustancial de moléculas de organosulfuradas en el medio ambiente. Según Block 1992, esta cifra podría ser de hasta el 5% de la materia seca o 60 kg/ha. En el año 2000, se cultivaron alrededor de 9.000 ha de cebollas en el Reino Unido, con una basura total en los campos estimada en 40.000 T o alrededor de 500 T de compuestos organosulfurados.
- 30 Además, BOPA estima que las empacadoras y procesadores generan 50.000 toneladas adicionales de residuos de cebolla por año, generando hasta 625 T de compuestos organosulfurados adicionales, la mayoría de los cuales serán desechados en vertederos, compostaje en montones de desechos en los límites del campo o por incineración nuevamente generando una tasa similar de liberación de compuestos organosulfurados.
- 35 En cada uno de estos casos, los compuestos se degradan en el medio ambiente mediante procesos naturales, tales como degradación microbiológica, fotólisis y escisión de enlaces por una gama de grupos funcionales electrófilos. Los residuos de ajo en los gránulos de ECOguard® se descompondrían por los mismos procesos.
- 40 Los inventores por lo tanto concluyen que la aplicación de gránulos de ECOguard® al suelo a las dosis recomendadas y por métodos recomendados libera significativamente menos moléculas de organosulfurados a la superficie del suelo que las prácticas agrícolas y de procesamiento de alimentos normales que involucran ajo, cebolla y otros cultivos de *Allium* y que como no existen efectos notables sobre el medio ambiente a partir de las prácticas estándar antes mencionadas, entonces no es necesario abordar con mayor detalle el destino final en el
- 45 tema del medio ambiente. Los mismos argumentos también se aplican al uso directo del concentrado de zumo de ajo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un plaguicida o repelente que comprende un concentrado de zumo de ajo líquido, obtenido por la eliminación de agua del zumo de ajo y que tiene un valor de Brix de entre 60 y 80, como:
- a. un nematicida;
 - b. un molusquicida;
 - c. un insecticida contra la mosca de la raíz de la col; o
 - d. un repelente aviar o de conejos.
- 10 2. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los polisulfuros totales en el concentrado están en el intervalo de 2 a 4% p/p.
- 15 3. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los sulfuros de dialilo de la fórmula RSR, RS₂R, RS₃R y RS₄R representan 66% ± 10% en peso del total de los polisulfuros presentes en el concentrado, en donde R = grupo alilo.
- 20 4. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sulfuro de dialilo: disulfuro de dialilo: trisulfuro de dialilo: tetrasulfuro de dialilo están presentes en el concentrado en la proporción de 4%-5%:5%-8%:31%-38%:19%-22% como % en peso del total de polisulfuros presentes.
5. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el plaguicida o repelente comprende gránulos basados en harina de madera impregnados con el concentrado de zumo de ajo líquido.

Figura 1



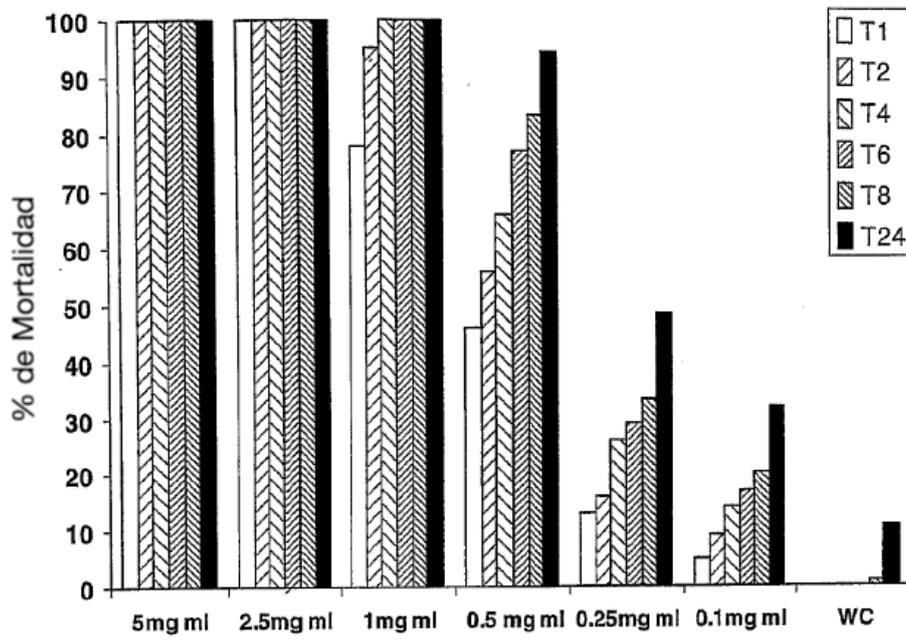


Figura 2

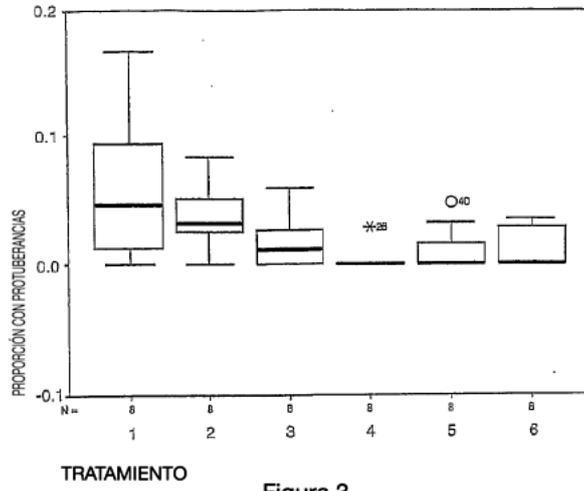


Figura 3

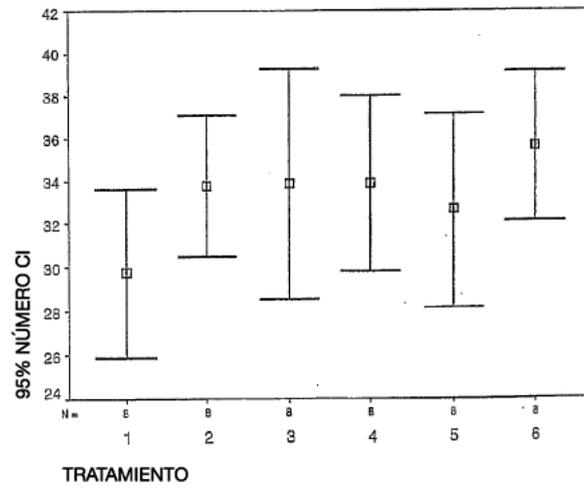


Figura 4

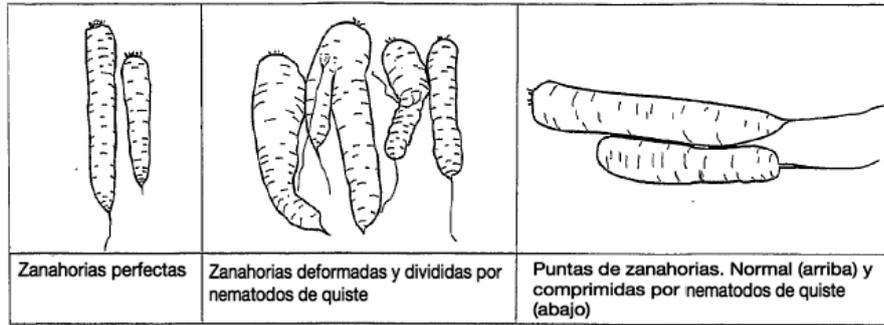


Figura 5

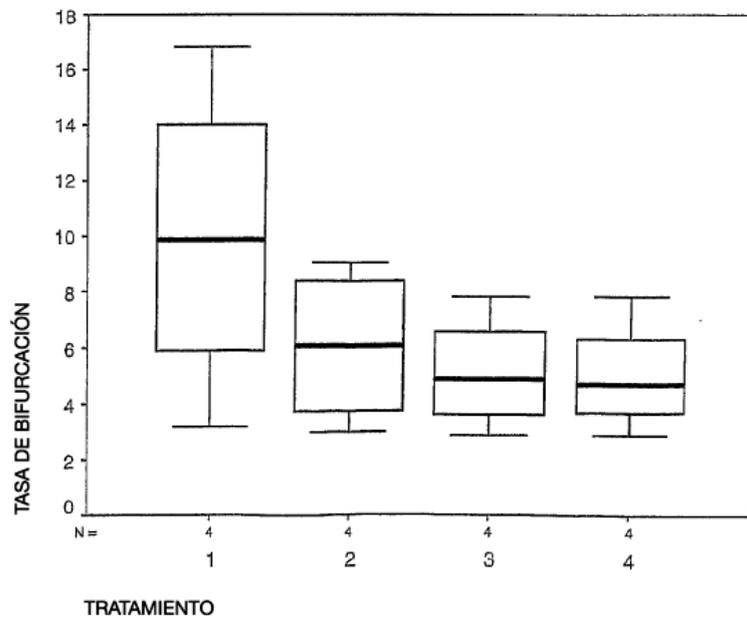


Figura 6

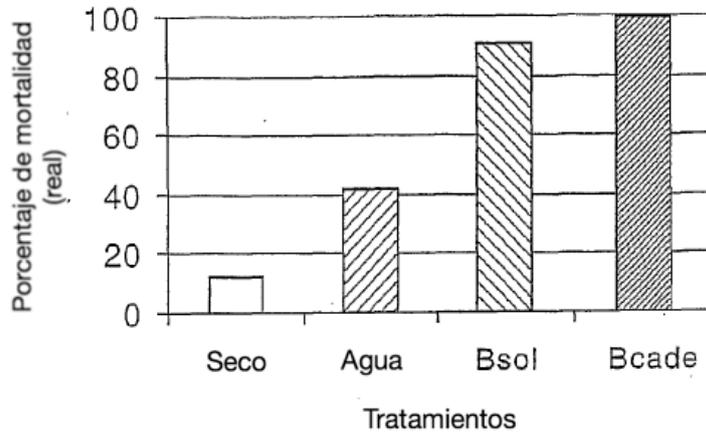


Figura 7

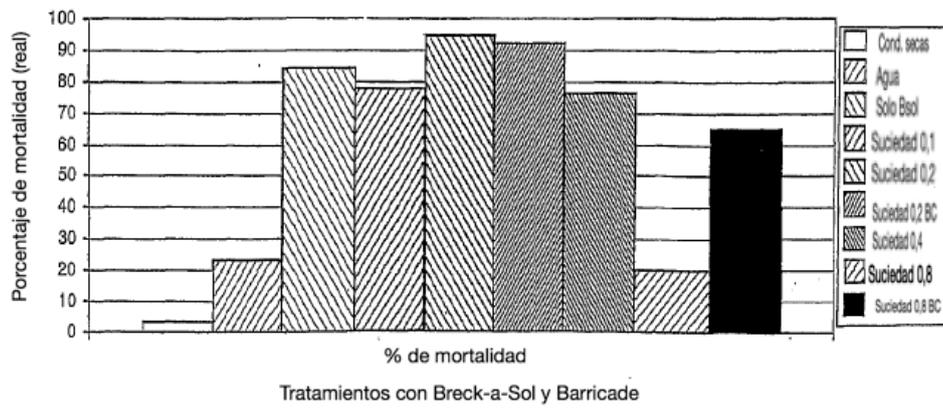


Figura 8

Figura 9 (Cromatograma 1)

Inyección de 2,5 ul de estándar Dorado de Aceite de Ajo (aceite diluido 1:10) - Usado como Material de Referencia de la Forma del Pico y Tiempo de Retención

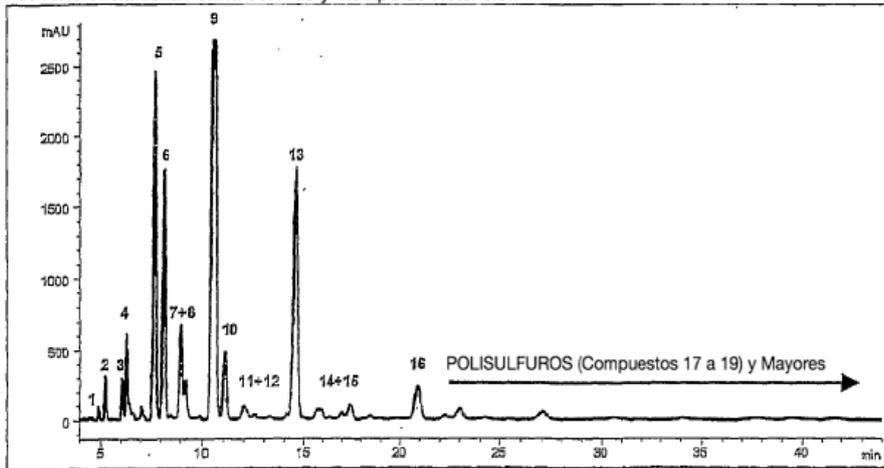


Figura 10 (Cromatograma 2)

Estándar de Ajo RBSULF3 (5 ul 1:10)

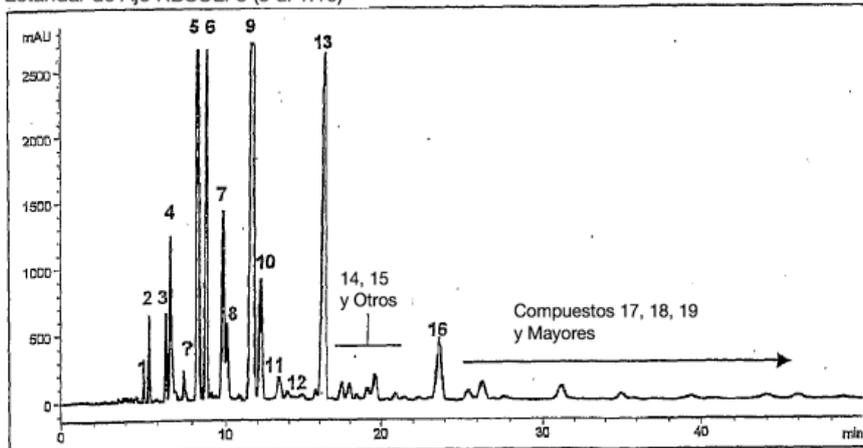


Figura 11 (Cromatograma 3)

Producto de Ajo RBSULF3 (5 ul 1:10)

