

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 586**

51 Int. Cl.:

C12P 19/62 (2006.01)

A23L 3/3463 (2006.01)

A01N 43/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2016 PCT/US2016/023027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16149572**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2016 E 16765805 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3271470**

54 Título: **Formulaciones en suspensión de natamicina concentradas**

30 Prioridad:

19.03.2015 US 201562135316 P

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

20.04.2020

73 Titular/es:

**VALENT BIOSCIENCES LLC (100.0%)
870 Technology Way
Libertyville, IL 60048, US**

72 Inventor/es:

**HUANG, ZHENGYU;
BELKIND, BENJAMIN, A.;
NAIR, AYYAPPAN;
VENBURG, GREGORY, D.;
FASSEL, ROBERT y
KIM, YONG-KI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 754 586 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

Formulaciones en suspensión de natamicina concentradas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones en suspensión de natamicina concentradas para la inhibición del crecimiento fúngico.

10 Antecedentes de la invención

15 Natamicina *sin.* Pimaricina) es un fungicida de polieno que se obtiene de los microorganismos del suelo, *Streptomyces natalensis*, *Streptomyces lydicus* y *Streptomyces chattanoogensis*. Se produce comercialmente mediante la fermentación y después la lisis de *Streptomyces natalensis*. La natamicina se usa comúnmente para impedir el crecimiento de hongos en alimentos sólidos comestibles, sin embargo, debido a su escasa solubilidad en agua, a menudo es difícil de usar.

20 Una forma mediante la cual se superó el problema de la solubilidad en el pasado fue mediante el uso de un polvo humectable. Una formulación en polvo humectable es una formulación seca, finamente molida. En este tipo de formulación, el ingrediente activo se combina con un portador seco finamente molido, generalmente una arcilla mineral, y con otros ingredientes que mejoran la capacidad del polvo para suspenderse en agua. Tras mezclar el polvo humectable con agua, se forma una suspensión, que después se aplica mediante una técnica de pulverización.

25 Una desventaja de los polvos humectables es que el líquido de pulverización debe mezclarse continuamente para evitar la sedimentación de materiales insolubles. Otra desventaja es que los polvos humectables y las formulaciones en polvo solubles tienden a producir polvo tras manipularlos, tal como cuando se vierten, se transfieren o se miden. Este polvo puede presentar riesgos para la salud. Además, las formulaciones en polvo tienden a humedecerse muy poco y también se solubilizan lentamente tras la adición al agua. Las formulaciones en polvo tardan más en humedecerse, dispersarse y solubilizarse en una mezcla de tanque. La formación de grumos o soluciones de pulverización parcialmente solubilizadas conduce a una distribución desigual de la natamicina en la mezcla de tanque con el potencial de un rendimiento reducido.

30 A veces, la espuma en el tanque de pulverización causada por los adyuvantes del tanque de pulverización también puede afectar la humectación y la solubilidad de los polvos humectables y solubles. Las formulaciones en polvo humectables también pueden dejar residuos insolubles indeseables tanto en el tanque como en los materiales que necesitan tratamiento.

35 Durante muchos años los expertos en la materia han intentado desarrollar formulaciones de natamicina acuosas concentradas. Un desafío es que la molienda de natamicina provoca una viscosidad inaceptablemente alta en la mayoría de las formulaciones. Sin embargo, si la natamicina no se muele, los concentrados en suspensión no son estables porque la natamicina se deposita en la formulación. Otro problema más con las formulaciones de natamicina es que son especialmente susceptibles al crecimiento bacteriano.

40 La patente de Estados Unidos 5,552,151 sugiere formulaciones de natamicina con hasta 40 % p/p de natamicina. Esta patente no proporciona ningún ejemplo de formulación con concentraciones tan altas de natamicina. Además, la patente establece que el intervalo más preferido de natamicina es de 5 a 20 %. Además, esta patente no enseña ni sugiere cómo evitar que la natamicina se deposite en una formulación de concentrado en suspensión. El documento WO 2013/133705 A1 describe suspensiones de alrededor de 10 % de natamicina y no menciona el tamaño de las partículas de natamicina.

45 Las patentes de Estados Unidos 6,291,436 y 6,576,617 describen formulaciones de natamicina sólidas con partículas de menos de 9 micras de diámetro. Sin embargo, estas patentes no enseñan ni sugieren cómo superar los problemas de viscosidad asociados con la natamicina molida en formulaciones líquidas.

50 DSM ha creado con éxito formulaciones de concentrado de natamicina en suspensión con concentraciones de hasta 10 % p/p de natamicina (*es decir*, Zivion A (~4 % de SC), Zivion P (~4 % de SC), Delvo®Coat L02101 (~5 % de SC) y Delvocide L (~10 % de SC), Delvo es una marca registrada de DSM). Si bien estas formulaciones son exitosas, existe una necesidad en la técnica de formulaciones más concentradas. Estas formulaciones permitirán reducir los costos de envío y manejo.

Resumen de la invención

60 En un aspecto, la presente invención se dirige a formulaciones de concentrados en suspensión estables que comprenden: de 25 % \pm 2,5 % a 48 % \pm 4,8 % p/p de natamicina; de 0,1 % \pm 0,01 % a 10 % \pm 1 % p/p de un tensoactivo aniónico, en donde el tensoactivo aniónico es lignosulfonato de sodio, y agua, en donde el tamaño de partícula promedio de las partículas de natamicina es menor que 11 micras de diámetro y la formulación tiene una viscosidad de menos de 1400 mPa·s a 21 grados Celsius.

65 En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a formulaciones para su uso en métodos para inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos en seres humanos, animales, plantas o de hongos de la descomposición de alimentos.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a métodos para proteger un producto que comprende diluir una formulación de concentrado en suspensión que comprende de 25 % ± 2,5 % a 48 % ± 4,8 % p/p de natamicina, de 0,1 % ± 0,01 % a 10 % ± 1 % p/p de un tensoactivo aniónico, en donde el tensoactivo aniónico es lignosulfonato de sodio, y agua, y aplicar la formulación de concentrado en suspensión diluida al producto, en donde la natamicina está presente como partículas en la formulación las partículas tienen como promedio menos de 11 micras de diámetro y la formulación tiene una viscosidad de menos de 1400 mPa·s a 21 grados Celsius antes de la dilución.

Descripción detallada de la invención

El solicitante descubrió inesperadamente que el uso de un sistema de tensoactivos no iónicos y aniónicos específicos, o el uso de tensoactivos aniónicos específicos, con partículas de natamicina de tamaño reducido dio como resultado concentrados en suspensión estables con concentraciones de natamicina de alrededor de 25 % a alrededor de 48 % p/p. Este hallazgo fue inesperado porque muchos otros tensoactivos, algunos con composiciones químicas similares, no pudieron proporcionar resultados satisfactorios (véase, por ejemplo, el Ejemplo 13 más adelante). El solicitante también descubrió que las formulaciones de la presente invención no eran aceptables cuando solo incluían los tensoactivos no iónicos probados porque la viscosidad era indeseable o demasiado alta (véase el Ejemplo 10 más adelante).

Como se usa en la presente descripción, "concentrado en suspensión" se refiere a una formulación en donde las partículas insolubles se suspenden en disolventes líquidos o acuosos. Una característica deseable de los concentrados en suspensión es que tienen partículas insolubles dispersas uniformemente dentro de la formulación. Un concentrado en suspensión no es una solución.

Las formulaciones del solicitante permiten reducciones significativas en los costos de procesamiento, empaque, almacenamiento y transportación. Las formulaciones acuosas también son más seguras y mucho más fáciles de usar que las formulaciones en polvo. Además, todos los componentes de las formulaciones están aprobados por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos para su uso poscosecha (véase 40 CFR § 180.960) y son seguros para su uso en o sobre los alimentos.

En una modalidad, la presente invención se dirige a formulaciones de concentrados en suspensión estables que comprenden de 25 % ± 2,5 % a 48 % ± 4,8 % p/p de natamicina, de 0,1 % ± 0,01 % a 10 % ± 1 % p/p de un tensoactivo aniónico, en donde el tensoactivo aniónico es lignosulfonato de sodio, y agua, en donde la natamicina está presente como partículas que como promedio tienen menos de 11 micras de diámetro y la formulación tiene una viscosidad de menos de 1400 mPa·s a 21 grados Celsius.

Como se usa en la presente descripción, "estable" se refiere a una formulación de concentrado en suspensión de natamicina que no forma sedimento ni exhibe separación de fases después de ser almacenada durante un mínimo de 48 horas a 21 grados Celsius.

La viscosidad de un fluido es una medida de la resistencia del fluido a la deformación por esfuerzo cortante o de tensión. La viscosidad del fluido se mide frecuentemente en unidades centipoises (abreviadas como "cps") donde los números más altos se correlacionan con fluidos más viscosos. La viscosidad de los concentrados en suspensión debe ser inferior a 1400 mPa·s para ser deseable.

En una modalidad preferida, las formulaciones contienen de 30 % ± 3 % a 48 % ± 4,8 % p/p de natamicina. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de 35 % ± 3,5 % a 48 % ± 4,8 % p/p de natamicina.

En otra modalidad más, las formulaciones contienen de 0,1 % ± 0,01 % a 3,0 % ± 0,3 % p/p del tensoactivo aniónico. En una modalidad preferida, las formulaciones contienen de 0,5 % ± 0,05 % a 2,5 % ± 0,25 % del tensoactivo aniónico. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de 0,5 % ± 0,05 % a 1,5 % ± 0,15 % del tensoactivo aniónico.

El tensoactivo aniónico es un polímero polielectrolito, que es un lignosulfonato de sodio tal como Ultrazine NA (disponible de Borregaard LignoTech).

En otra modalidad, las formulaciones también contienen de 0,1 % ± 0,01 % a 10 % ± 1 % p/p de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileno, trioleatos de sorbitán polioxietilado, hexaoleatos de polioxietilen sorbitol y combinaciones de estos. En una modalidad preferida, las formulaciones contienen de 0,1 % ± 0,01 % a 3,0 % ± 0,3 % de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileno, trioleatos de sorbitán polioxietilado, hexaoleatos de polioxietilen sorbitol y combinaciones de estos. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de 0,5 % ± 0,05 % a 2,5 % ± 0,25 % de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileno, trioleatos de sorbitán polioxietilado, hexaoleatos de polioxietilen sorbitol y combinaciones de estos. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de 0,5 % ± 0,05 % a 1,5 % ± 0,15 % de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileno, trioleatos de sorbitán polioxietilado, hexaoleatos de polioxietilen sorbitol y combinaciones de estos.

En una modalidad preferida, el tensoactivo no iónico es un copolímero de bloques de óxido de polialquileno. En una modalidad más preferida, el copolímero de bloques de óxido de polialquileno es Atlas™ G-5000 (disponible de Croda Crop Care).

5 En otra modalidad, las formulaciones de concentrado en suspensión contienen de $46 \% \pm 4,6 \%$ a $75 \% \pm 7,5 \%$ p/p de agua. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de $64 \% \pm 6,4 \%$ a $67 \% \pm 6,7 \%$ p/p de agua.

10 Aún en otra modalidad, las formulaciones contienen natamicina como partículas que tienen un diámetro promedio menor o igual a 9 micras. En una modalidad preferida, las partículas de natamicina tienen como promedio un diámetro menor o igual a 5 micras. En una modalidad más preferida, las partículas de natamicina tienen como promedio un diámetro menor o igual a 3 micras.

15 En una modalidad adicional, las formulaciones contienen un agente anticongelante. Los ejemplos de agentes anticongelantes adecuados incluyen etilenglicol, 1,2-propilenglicol, 1,3-propilenglicol, 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, 1,4-pentanodiol, 3-metil-1,5-pentanodiol, 2,3-dimetil-2,3-butanodiol, trimetilolpropano, manitol, sorbitol, glicerol, pentaeritritol, 1,4-ciclohexanodimetanol, xilenol y bisfenoles tal como bisfenol A.

20 En una modalidad preferida, las formulaciones contienen de $1 \% \pm 0,1 \%$ a $10 \% \pm 1 \%$ p/p de agente anticongelante. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de $3 \% \pm 0,3 \%$ a $7 \% \pm 0,7 \%$ p/p de agente anticongelante. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de $4 \% \pm 0,4 \%$ a $6 \% \pm 0,6 \%$ p/p de agente anticongelante.

25 En una modalidad adicional, las formulaciones contienen un agente antiespumante. Los ejemplos de agentes antiespumantes adecuados incluyen agentes antiespumantes basados en silicona, aceites vegetales, glicoles acetilénicos y aductos de óxido de propileno de alto peso molecular. Un agente antiespumante preferido es un agente antiespumante a base de silicona.

30 En una modalidad preferida, las formulaciones contienen de $0,1 \% \pm 0,01 \%$ a $5 \% \pm 0,5 \%$ p/p de un agente antiespumante. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de $0,5 \% \pm 0,05 \%$ a $2 \% \pm 0,2 \%$ p/p de un agente antiespumante. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de $0,8 \% \pm 0,08 \%$ a $1,2 \% \pm 0,12 \%$ p/p de un agente antiespumante.

En una modalidad adicional, las formulaciones contienen un conservante antibacteriano. Los ejemplos de conservantes antibacterianos adecuados incluyen benzoatos y K-sorbato.

35 En una modalidad preferida, las formulaciones contienen de $0,01 \% \pm 0,001 \%$ a $3 \% \pm 0,3 \%$ p/p de un conservante antibacteriano. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de $0,1 \% \pm 0,01 \%$ a $2 \% \pm 0,2 \%$ p/p de un conservante antibacteriano. En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen de $0,3 \% \pm 0,03 \%$ a $1 \% \pm 0,1 \%$ p/p de un conservante antibacteriano.

40 En una modalidad preferida, las formulaciones contienen:

25 $\% \pm 2,5 \%$ p/p de natamicina;

de $0,1 \% \pm 0,01 \%$ a $10 \% \pm 1 \%$ p/p de un tensoactivo aniónico, en donde el tensoactivo aniónico es lignosulfonato de sodio;

45 de $0,1 \% \pm 0,01 \%$ a $10 \% \pm 1 \%$ p/p de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileno, trioleatos de sorbitán polioxi-etileno, hexaoleatos de polioxi-etileno sorbitol y combinaciones de estos; y

agua,

50 en donde la natamicina está presente como partículas que tienen como promedio menos de 11 micras de diámetro y la formulación tiene una viscosidad de menos de 1400 mPa·s a 21 grados Celsius.

En una modalidad más preferida, las formulaciones contienen:

55 25 $\%$ p/p de natamicina;

1,0 $\%$ p/p de lignosulfonato de sodio; y

0,5 $\%$ p/p de un copolímero de bloques de óxido de polialquileno,

en donde la natamicina está presente como partículas que tienen como promedio menos de 11 micras de diámetro y la formulación tiene una viscosidad de menos de 1400 mPa·s a 21 grados Celsius.

60 En otra modalidad, la presente invención se dirige a la formulación de la presente invención para su uso en métodos para inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos en seres humanos, animales, plantas o de hongos de la descomposición de alimentos.

65 En una modalidad preferida, las formulaciones de la presente invención se usan para inhibir patógenos fúngicos mediante la administración de las formulaciones a un ser humano. Los usos adecuados incluyen el tratamiento de infecciones fúngicas en los ojos, la boca o la piel (queratitis fúngica). Preferentemente, las formulaciones se administran directamente

al área que necesita inhibición del crecimiento fúngico. Las formulaciones son adecuadas para el control de *Candida*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, y *Penicillium* que crecen en un ser humano.

5 En otra modalidad preferida, las formulaciones de la presente invención se usan para inhibir patógenos fúngicos mediante la administración de las formulaciones a un animal. Los usos adecuados incluyen el tratamiento de infecciones fúngicas en los ojos y los tejidos circundantes y las infecciones por tiña. Los animales adecuados incluyen animales domésticos, tales como perros, gatos, vacas y caballos. Preferentemente, las formulaciones se administran directamente al área que necesita inhibición del crecimiento fúngico. Las formulaciones son adecuadas para el control de *Candida*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, y *Penicillium* que crecen en un animal.

10 En otra modalidad preferida, las formulaciones de la presente invención se usan para inhibir patógenos fúngicos mediante la administración de las formulaciones a una planta. Las plantas adecuadas incluyen cultivos cultivados comercialmente.

15 En una modalidad adicional, las formulaciones de la presente invención se usan para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras en medio de cultivo de hongos.

20 En una modalidad preferida, las formulaciones de concentrado en suspensión que se usan para inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos en seres humanos, animales, plantas o de hongos de la descomposición de alimentos comprenden además de 0,1% ± 0,01% a 10% ± 1% p/p de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileno, trioleatos de sorbitán polioxietileno, hexaoleatos de polioxietileno sorbitol y combinaciones de estos.

25 En otra modalidad, la presente invención se dirige a métodos para inhibir el crecimiento fúngico que comprenden diluir una formulación de concentrado en suspensión que comprende de 25 % ± 2,5 % a 48 % ± 4,8 % p/p de natamicina, de 0,1 % ± 0,01 % a 10 % ± 1 % p/p de un tensoactivo aniónico, en donde el tensoactivo aniónico es lignosulfonato de sodio, y agua, y aplicar la formulación de concentrado en suspensión diluida a un producto que necesita protección contra el crecimiento de hongos, en donde la natamicina está presente en la formulación como partículas y las partículas tienen como promedio menos de 11 micras de diámetro y la formulación tiene una viscosidad de menos de 1400 mPa·s a 21 grados Celsius antes de la dilución.

30 En una modalidad preferida, las formulaciones de concentrado en suspensión que se usan para inhibir el crecimiento fúngico comprenden además de 0,1 % ± 0,01 % a 10 % ± 1 % p/p de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileno, trioleatos de sorbitán polioxietileno, hexaoleatos de polioxietileno sorbitol y combinaciones de estos.

35 En una modalidad, las formulaciones de la presente invención se aplican al producto por inmersión, empapado o pulverización.

40 En otra modalidad, las formulaciones se diluyen de 0,01 % ± 0,001 % a 5 % ± 0,5 % p/p de natamicina antes de aplicarse al producto. En una modalidad preferida, las formulaciones se diluyen de 0,5 % ± 0,05 % a 2 % ± 0,2 % p/p de natamicina antes de aplicarse al producto.

45 En una modalidad, los productos incluyen quesos, salchichas, frutas, verduras, nueces, granos de cereales, pienso animal, especias, bebidas u otros productos destinados al consumo.

50 Las formulaciones son adecuadas para su uso en una variedad de quesos. Las formulaciones de la presente invención pueden agregarse a dispersiones de polímeros usadas para encapsular el queso (tal como una corteza) o el queso puede sumergirse o pulverizarse con las formulaciones de la presente invención. Las formulaciones también pueden añadirse a los quesos rallados. Los quesos adecuados incluyen Gouda, edam, cheddar, tilsiter, caciotta, fontina, tallegio, montasio, asiago, provolone, pecorino, romano, quesos azules y quesos indios.

55 Las formulaciones son adecuadas para su uso en una variedad de salchichas. Las formulaciones de la presente invención pueden usarse para sumergir o pulverizar el exterior de las salchichas. Alternativamente, las cubiertas de las salchichas pueden tratarse antes de rellenarse. Las formulaciones también pueden aplicarse a productos cárnicos fermentados. Las salchichas adecuadas incluyen salchichas crudas holandesas, salchichas crudas alemanas y salchichas italianas.

60 Las formulaciones son adecuadas para su uso en muchos tipos de frutas y verduras. Las formulaciones de la presente invención pueden dispersarse sobre las frutas mientras crecen, justo antes de la cosecha o después de la cosecha. En una modalidad preferida, las formulaciones de la presente invención se dispersan sobre las frutas y vegetales después de que se cosechan. En una modalidad alternativa, las formulaciones de la presente invención se dispersan sobre las frutas y vegetales mientras todavía están creciendo en las plantas. Como se usa en este documento, "cosechado" o "poscosecha" significa que las frutas o verduras se han extraído de la planta en la que crecieron y ya no están creciendo. Como se usa en la presente descripción, "dispersión" se refiere a distribuir uniformemente la formulación sobre la superficie del producto.

65

Como se usa en la presente descripción, "proteger" se refiere a reducir la probabilidad de podredumbre inducida por patógenos fúngicos.

5 En una modalidad preferida, la formulación de concentrado en suspensión que se aplica a las frutas o vegetales también incluye de 0,1 % ± 0,01 % a 10 % ± 1 % p/p de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileño, trioleatos de sorbitán polioxietileno, hexaoleatos de polioxietileno sorbitol y combinaciones de estos.

10 Pueden usarse muchos tipos de disolventes aceptables agriculturalmente o farmacéuticamente para diluir las formulaciones de la presente invención. Por ejemplo, son disolventes aceptables el agua, el glicerol, el hexilenglicol, el dipropilenglicol y los polietilenglicoles.

15 Como se usa en la presente descripción, "fruta" se refiere al tejido carnoso asociado con una semilla de una planta comestible. Los ejemplos de frutas incluyen frutas cítricas, bayas, frutas de pepita (como manzanas), frutas de hueso, melones y plátanos.

Los ejemplos de frutas cítricas incluyen naranjas, pomelos, clementinas, mandarinas, limas, kumquats e híbridos de estos.

20 Los ejemplos de bayas incluyen uvas, aronia, arrayán, gayuba, bitberry, zarzamora, arándano, arándano de lowbush, arándano de highbush, grosella buffalo, buffaloberry, che, guayaba chilena, chokeberry, camemoras, arándano de highbush, grosella negra, grosella roja, saúco, agracejo europeo, grosella espinosa, madre selva comestible, mora negra, jostaberry, baya de Junio, arándano rojo, maypop, bayas de pimienta de montaña, mora, muntries, grosella nativa, baya perdiz, phalsa, pincherry, frambuesa negra, frambuesa roja, riberry, salal, bayas de schisandra, espino de mar, bayas de servicio, fresas, frambuesas silvestres y cultivares, variedades e híbridos de estos.

25 Los ejemplos de frutas de pepita incluyen manzana, acerola, manzana silvestre, níspero, mayhaw, níspero, pera, pera asiática, membrillo, membrillo chino, membrillo japonés, tejocote, y cultivares, variedades e híbridos de estos.

30 Los ejemplos de frutas de hueso incluyen albaricoque, cereza dulce, cereza agria, nectarina, melocotón, ciruela, ciruela Chicksaw, ciruela Damson, ciruela japonesa, ciruela damasco, ciruela pasa fresca y cultivares, variedades e híbridos de estos.

35 Los ejemplos de melones incluyen melones cítricos, melones de almizcle, sandía, melón cantalupo, casaba, melón crenshaw, melón pershaw dorado, melón dulce, bolas de miel, melón mango, melón persa, melón piña, melón Santa Claus, melón serpiente y cultivares, variedades e híbridos de estos.

En una modalidad, la formulación diluida se aplica a los cítricos para protegerlos de la podredumbre agria. "Podredumbre agria" se refiere a una infección fúngica causada por *Geotrichum citri-aurantii*.

40 En otra modalidad, la formulación diluida se aplica a las frutas cítricas para protegerlas del "moho verde" o del "moho azul". Estos mohos se refieren a una infección fúngica causada por *Penicillium digitatum* o *Penicillium italicum*.

45 Como se usa en la presente descripción, "vegetal" se refiere a verduras de raíces y tubérculos, hortalizas de bulbo, hortalizas de hoja que no son de brassica, hortalizas de hoja de brassica, legumbres suculentas o secas, hortalizas de fructificación y hortalizas de cucurbitáceas.

En una modalidad preferida, la formulación diluida se aplica sumergiendo, empapando o pulverizando los productos con y sin ceras de recubrimiento.

50 En otra modalidad, las formulaciones se diluyen a una concentración de 0,01 % ± 0,001 % a 5 % ± 0,5 % p/p de natamicina antes de aplicarse a los productos. En una modalidad preferida, las formulaciones se diluyen a una concentración de 0,5 % ± 0,05 % a 2 % ± 0,2 % p/p de natamicina antes de aplicarse a los productos.

55 Los ejemplos de bebidas incluyen jugos, cerveza, vino, refrescos, té helado y yogures de frutas. Los jugos adecuados incluyen jugos de frutas y mezclas de estos, que incluyen limonada y jugos de naranja.

Las formulaciones de la presente invención también podrían incluir los fungicidas lucensomicina, nistatina, anfotericina B o combinaciones de estos.

60 Las formulaciones de la presente invención excluyen específicamente agentes espesantes y materiales antiaglomerantes.

Las formulaciones de la presente invención excluyen específicamente lactosa en polvo y cloruro de sodio.

65 Las formulaciones de la presente invención excluyen específicamente tensoactivos no iónicos de alcohol de polioxietileno, tensoactivos no iónicos de polioxietileno lauril éter y tensoactivos no iónicos de polioxietileno cetil éter.

Las formulaciones de la presente invención pueden aplicarse de modo que la concentración de natamicina sea menor que 1 ppm o mayor que 5 ppm.

5 Como se usa en la presente descripción, cuando los valores numéricos se refieren a cantidades, porcentajes en peso y similares se definen como "alrededor de" o "aproximadamente" cada valor particular, más o menos 10 %. Por ejemplo, la frase "al menos 5,0 % en peso" debe entenderse como "al menos 4,5 % a 5,5 % en peso".

Ejemplos

10 El solicitante usó natamicina en forma de ingrediente activo de grado técnico ("TGAI") cuando preparó las formulaciones de la presente invención. El porcentaje de natamicina en el grado técnico generalmente varía entre 80 % y 99 % p/p. Las variaciones en la actividad de la natamicina en el TGAI deben explicarse disminuyendo o aumentando la cantidad de disolvente en la producción de la formulación de natamicina de la concentración deseada. Esta es una práctica estándar dentro de las guías de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos según 40 CFR § 158.175 (b)(2).

15 El solicitante preparó las siguientes formulaciones de concentrado en suspensión de natamicina como sigue a menos que se indique lo contrario. La natamicina se procesó hasta que tuvo como promedio menos de 11 micras de diámetro. Se añadieron los otros componentes de la formulación y la formulación se agitó hasta que las partículas de natamicina se dispersaron completamente. "c.s.p." se refiere a una cantidad suficiente de agua para alcanzar el % p/p adecuado de la formulación.

Ejemplo 1

Formulaciones en suspensión de natamicina concentradas al 25 %

Tabla 1

Componente (todo en % p/p)	1A	1B	1C	1D	1E	1F
30 Polvo técnico de natamicina	25	25	25	25	25	25
Tensoactivo no iónico de copolímero de bloques de óxido de polialquileno	0,5-2,5	-	-	0,5-2,5	0,5-2,5	0,5-2,5
35 Tensoactivo no iónico de trioleato de sorbitán polioxietileno	-	0,5-2,5	-	-	-	-
Tensoactivo no iónico de hexaoleato de sorbitán polioxietileno	-	-	0,5-2,5	-	-	-
40 Lignosulfonato de sodio (tensoactivo aniónico de polímero polielectrolito)	0,5-1,5	0,5-1,5	0,5-1,5	-	-	-
Tensoactivo aniónico de polímero acrílico de estireno modificado	-	-	-	0,5-1,5	-	-
45 Tensoactivo aniónico de sulfosuccinatos de dioctil sodio	-	-	-	-	0,5-1,5	-
Tensoactivo aniónico de sales de sodio de sulfonato de naftaleno	-	-	-	-	-	0,5-1,5
50 Agente anticongelante	5	5	5	5	5	5
Conservante antibacteriano	0,3-1	0,3-1	0,3-1	0,3-1	0,3-1	0,3-1
Agente antiespumante	1	1	1	1	1	1
55 Agua	c,s,p,	c,s,p,	c,s,p,	c,s,p,	c,s,p,	c,s,p,
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Ejemplo 2

60 Formulaciones en suspensión de natamicina concentradas adicionalmente al 25%

Tabla 2

65

ES 2 754 586 T3

	Componente (todo en % p/p)	2A	2B
5	Polvo técnico de natamicina	25	25
	Tensoactivo no iónico de copolímero de bloques de óxido de polialquileno	-	0,5
	Lignosulfonato de sodio (tensoactivo aniónico de polímero polielectrolito)	1,0	1,0
	Agente anticongelante	5	5
10	Conservante antibacteriano	0,3-1	0,3-1
	Agente antiespumante	1	1
	Agua	c,s,p,	c,s,p,
15		100 %	100 %

Ejemplo 3

Formulación en suspensión de natamicina concentrada al 35 %

20 Tabla 3

	Componente	% (peso/peso)
25	Polvo técnico de natamicina	35
	Agente anticongelante	5
	Tensoactivo no iónico de copolímero de bloques de óxido de polialquileno	0,5-2,5
	Tensoactivo aniónico de lignosulfonato de sodio	0,5-1,5
30	Conservante antibacteriano	0,3-1
	Agente antiespumante	1
	Agua	c,s,p,
35		100 %

Ejemplo 4

Formulación en suspensión de natamicina concentrada al 40 %

40

Tabla 4

	Componente	% (peso/peso)
45	Polvo técnico de natamicina	40
	Agente anticongelante	5
	Tensoactivo no iónico de copolímero de bloques de óxido de polialquileno	0,5-2,5
50	Tensoactivo aniónico de lignosulfonato de sodio	0,5-1,5
	Conservante antibacteriano	0,3-1
	Agente antiespumante	1
55	Agua	c,s,p,
		100 %

Ejemplo 5

60 Formulación en suspensión de natamicina concentrada al 45 %

Tabla 5

65

5
10
15

Componente	% (peso/peso)
Polvo técnico de natamicina	45
Agente anticongelante	5
Tensoactivo no iónico de copolímero de bloques de óxido de polialquileno	0,5-2,5
Tensoactivo aniónico de lignosulfonato de sodio	0,5-1,5
Conservante antibacteriano	0,3-1
Agente antiespumante	1
Agua	c,s,p,
	100 %

Ejemplo 6

Formulación en suspensión de natamicina concentrada al 46 %

20 Tabla 6

25
30
35

Componente	% (peso/peso)
Polvo técnico de natamicina	46
Agente anticongelante	5
Tensoactivo no iónico de copolímero de bloques de óxido de polialquileno	0,5-2,5
Tensoactivo aniónico de lignosulfonato de sodio	0,5-1,5
Conservante antibacteriano	0,3-1
Agente antiespumante	1
Agua	c,s,p,
	100 %

Ejemplo 7

Formulación en suspensión de natamicina concentrada al 47,5 %

40 Tabla 7

45
50
55

Componente	% (peso/peso)
Polvo técnico de natamicina	47,5
Agente anticongelante	5
Tensoactivo no iónico de copolímero de bloques de óxido de polialquileno	0,5-2,5
Tensoactivo aniónico de lignosulfonato de sodio	0,5-1,5
Conservante antibacteriano	0,3-1
Agente antiespumante	1
Agua	c,s,p,
	100 %

Ejemplo comparativo 8

Formulación en suspensión de natamicina concentrada al 50 %

60 Tabla 8

65

Componente	% (peso/peso)
Polvo técnico de natamicina	50
Agente anticongelante	5
Tensoactivo no iónico de copolímero de bloques de óxido de polialquileno	0,5-2,5
Tensoactivo aniónico de lignosulfonato de sodio	0,5-1,5
Conservante antibacteriano	0,3-1
Agente antiespumante	1
Agua	c.s.p,
	100 %

Ejemplo 9

Estudios de viscosidad

El solicitante analizó la viscosidad de las formulaciones de los ejemplos 2A, 2B, 5, 6, 7 y el ejemplo comparativo 8. Este estudio se realizó mediante el uso de procedimientos estándar conocidos y aceptados por los expertos en la materia. Los resultados de este estudio pueden observarse a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9

Formulación	% p/p de natamicina	Viscosidad (mPa·s)
Ejemplo 2A	25	1080
Ejemplo 2B	25	340
Ejemplo 5	45	867
Ejemplo 6	46	940
Ejemplo 7	47,5	1375
Ejemplo comparativo 8	50	2225

Como puede observarse en la Tabla 9 anterior, las composiciones de los Ejemplos 2A, 2B, 5, 6 y 7 tienen viscosidades que hacen que las composiciones sean adecuadas para su uso como concentrado en suspensión para la administración a plantas, animales, o seres humanos (las viscosidades fueron menores que $1400\text{mPa}\cdot\text{s}$) y para otros usos que tienen restricciones de viscosidad similares. En contraste, la formulación de natamicina al 50 % del Ejemplo Comparativo 8 era inaceptablemente espesa ($2225\text{mPa}\cdot\text{s}$). Por consiguiente, el solicitante determinó que son adecuadas las formulaciones de concentraciones de hasta el 48 % de natamicina.

Ejemplo 10

Estudios adicionales de viscosidad

El solicitante analizó la viscosidad de las formulaciones de concentrado en suspensión de natamicina al 25 % con 2 % de diferentes tensoactivos no iónicos. Este estudio se realizó mediante el uso de procedimientos estándar conocidos y aceptados por los expertos en la materia. Los resultados de este estudio pueden observarse a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10

Tensoactivo (2 % p/p)	Viscosidad (mPa·s)
Control, agua añadida en lugar de tensoactivo	2810
Control, tensoactivo aniónico, lignosulfonato de sodio	782
Monolaurato de polioxietileno(20)sorbitano, tensoactivo no iónico	2010
Copolímero acrílico, tensoactivo no iónico	1850
Polioxietileno (20) oleilo éter, tensoactivo no iónico	1720
Copolímero de bloque de óxido de polialquileno, tensoactivo no iónico	2014
Trioleato de polioxietileno(20)sorbitano, tensoactivo no iónico	2960
Hexaoleato de polioxietileno(40)sorbitol, tensoactivo no iónico	7580

Como se observa en la Tabla 10 anterior, los seis tensoactivos no iónicos analizados no lograron proporcionar la viscosidad deseable (~1400 mPa·s o inferior) cuando se usaron solos en formulaciones de concentrado de natamicina en suspensión al 25 %. En contraste, el tensoactivo aniónico, lignosulfonato de sodio, usado solo proporcionó la viscosidad deseable en una formulación de concentrado de natamicina en suspensión al 25 %.

5

Ejemplo 11

Estudio de estabilidad del tamaño de partícula

10

El solicitante analizó cómo el tamaño de partícula de la natamicina afectó la estabilidad de las formulaciones de concentrado en suspensión. Este estudio se realizó mediante el uso de procedimientos estándar conocidos y aceptados por los expertos en la materia. Se comparó una formulación de natamicina al 25 % con partículas de natamicina con diámetros promedio (D(4,3)) de 11 micras con una formulación de natamicina al 25 % con partículas de natamicina con diámetros promedio de 3 micras. Los resultados de este estudio pueden observarse a continuación en la Tabla 11.

15

Tabla 11

Diámetro promedio D(4,3) de partículas de natamicina (micras)	Inicial	30 min	4 horas	24 horas	48 horas
11	Homogéneo	Algo de sedimentación	16 % de sedimentación	48 % de sedimentación	N/A
3	Homogéneo	Homogéneo; sin sedimentación o separación			

20

25

Como puede observarse en la Tabla 11 anterior, la formulación con las partículas de natamicina más pequeñas fue homogénea y no exhibió sedimentación ni separación incluso después de 48 horas. En contraste, una formulación similar con partículas de natamicina más grandes formó sedimento después de solo 30 minutos. A las 24 horas, hubo sedimentación excesiva que requirió 10 inversiones para resuspender.

30

Este estudio muestra que el tamaño de partícula es un aspecto importante de las formulaciones de concentrado en suspensión del solicitante.

35

Ejemplo 12

Otro estudio de estabilidad del tamaño de partícula

40

El solicitante analizó cómo los tamaños de partículas de 9 micras afectan la estabilidad de las formulaciones de concentrados en suspensión. El estudio usó procedimientos estándar conocidos y aceptados por los expertos en la materia. Se comparó una formulación de natamicina al 25 % con partículas de natamicina con diámetros promedio (D(4,3)) de 11 micras con una formulación de natamicina al 25 % con partículas de natamicina con diámetros promedio de 9 micras. Los resultados de este estudio pueden observarse en la Tabla 12 a continuación.

45

Tabla 12

Diámetro promedio D(4,3) de partículas de natamicina (micras)	Inicial	30 min	4 horas	24 horas	48 horas
11	Homogéneo	Algo de sedimentación	16 % de sedimentación	48 % de sedimentación	N/A
9	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	1,4 % de sedimentación	2,8 % de sedimentación

50

55

Como puede observarse en la Tabla 12 anterior, la formulación con las partículas de natamicina más pequeñas fue homogénea y no exhibió sedimentación o separación después de 4 horas. En contraste, una formulación similar con partículas de natamicina más grandes formó sedimento después de solo 30 minutos. A las 24 horas, hubo sedimentación excesiva que requirió 10 inversiones para resuspender.

60

Este estudio muestra que el tamaño de partícula es un aspecto importante de las formulaciones de concentrado en suspensión del solicitante.

65

Ejemplo 13

Análisis de tensoactivos no iónicos y aniónicos alternativos

Mientras desarrollaba las formulaciones de la presente invención, el solicitante también probó otras numerosas combinaciones de tensoactivos que no mostraron sinergia. Un resumen de estos resultados se encuentra en la Tabla 13 a continuación.

Tabla 13

Tensoactivos aniónicos	Tensoactivos no iónicos						
	Alcoholes de polioxietileno	Polioxietileno lauril éter	Polioxietileno cetil éter	Copolímeros acrílicos	Copolímeros de bloques de óxido de polialquileno	Trioleatos de sorbitán polioxietilenado	Hexaoleatos de polioxietileno sorbitol
Polímeros polielectrolitos	No sinergia	No sinergia	No sinergia	No sinergia	Sinergia	Sinergia	Sinergia
Polímeros acrílicos de estireno modificado	No sinergia	No sinergia	No sinergia	No sinergia	Sinergia	Sinergia	Sinergia
Sulfosuccinatos de dioctil sodio	No sinergia	No sinergia	No sinergia	No sinergia	Sinergia	Sinergia	Sinergia
Sales de sodio de sulfonato de naftaleno	No sinergia	No sinergia	No sinergia	No sinergia	Sinergia	Sinergia	Sinergia

Como se ilustra en la Tabla 13, el solicitante no pudo predecir qué tensoactivos exhibirían sinergia y permitirían suspender grandes cantidades de natamicina (hasta 48 % p/p) mientras proporcionaban la viscosidad deseable de las formulaciones. El solicitante probó sin éxito tensoactivos no iónicos de alcohol de polioxietileno, tensoactivos no iónicos de polioxietileno lauril éter, tensoactivos no iónicos de polioxietileno cetil éter y tensoactivos no iónicos de copolímero acrílico. En contraste, todos los tensoactivos reivindicados proporcionaron formulaciones adecuadas que eran estables y tenían baja viscosidad.

Ejemplo 14

Control de moho gris y moho azul de la manzana

La formulación 2B de la Tabla 2, anterior, se analizó para determinar su capacidad de controlar el moho gris y el moho azul de la manzana.

Método

Preparación del inóculo

Se recuperó un aislado de *Botrytis cinerea* (A810) y de *Penicillium expansum* (A003) de colecciones de cultivo madre guardadas en gel de sílice a 4 °C. Después de 3 días de crecimiento en agar de papa y dextrosa (PDA), *B. cinerea* se esporuló bajo una luz fluorescente 12 durante 2 semanas. Se preparó una suspensión conidial añadiendo 20 ml de agua

estéril y retirando suavemente los conidios con un asa plástica estéril. Se filtró una suspensión de esporas a través de dos capas de gasa. La concentración final se ajustó a 1×10^5 conidios/ml con un hemocitómetro. Para *P. expansum*, los conidios secos se transfirieron a 5 ml de agua estéril que contenía Tween 20® al 0,01 % (Tween es una marca registrada de Croda Americas LLC) mediante un asa plástica después de humedecer en el agua Tween 20®. Después de agitar vigorosamente, las esporas se diluyeron en agua Tween 20® al 0,01 % y se ajustaron a 1×10^4 conidios/ml.

Inoculación de las frutas

Se compraron manzanas orgánicas 'Red Delicious' que se lavaron con hipoclorito y se envasaron en una empacadora comercial de manzanas. Las manzanas se incubaron a temperatura ambiente al menos 12 horas antes del experimento. Después, las manzanas se inocularon en la herida añadiendo 10 µl de las suspensiones de inóculo preparadas como se explicó anteriormente en una herida creada con una cabeza de clavo (3 x 4 mm). Las manzanas se incubaron a temperatura ambiente durante 4 horas antes de los tratamientos con fungicidas.

15 Tratamiento

Las manzanas se colocaron en una bolsa de malla de polietileno y se sumergieron en soluciones fungicidas durante 30 segundos. Los fungicidas analizados fueron la formulación 2B de la presente invención, Zivion® M (10,34 % de natamicina, Zivion es una marca registrada y está disponible en DSM IP Assets BV de los Países Bajos) y Shield-Brite® FDL 230SC (20,4 % de fludioxonilo, Shield Brite es una marca registrada de Pace International, LLC; Shield-Brite® FDL 230SC está disponible en Pace International, LLC). Después de los tratamientos, las manzanas se colocaron en bandejas de fibra de manzana en una caja de cartón y se almacenaron a 4 °C al aire. Las manzanas sumergidas en agua se usaron como control. Se usaron veinte manzanas por réplica y 4 réplicas por tratamiento. Se trataron y usaron para el análisis de residuos de fruta al menos 1 kg de manzanas por tratamiento. Se tomaron muestras de las soluciones líquidas y se analizaron para determinar las concentraciones de natamicina.

Análisis de datos

Las evaluaciones se realizaron después de 6 semanas de almacenamiento en frío. El porcentaje de incidencias de descomposición en los tratamientos de inmersión se sometieron a transformación arcoseno y se analizaron con SAS PROC GLM (versión 9.1; SAS Institute) para comparar los tratamientos. Las medias se separaron por la diferencia menos significativa protegida de Fisher a $P = 0,05$.

Resultados

Este estudio se realizó para determinar la eficacia de las formulaciones de natamicina de la presente invención para controlar el moho gris y el moho azul de la manzana mediante la aplicación de inmersión acuosa.

En general, la formulación 2B de la presente invención mostró un mejor rendimiento que Zivion® M en el control tanto del moho gris como del moho azul de las manzanas cuando se aplicó mediante inmersión acuosa. Véanse las Tablas 14 y 15, respectivamente. La formulación 2B fue igualmente eficaz que fludioxonilo 180 ppm contra ambos patógenos cuando se aplicó a 750 ppm o 1,000 ppm. Las 3 tasas de la formulación 2B fueron igualmente eficaces entre sí para controlar el moho gris (Tabla 14), mientras que la formulación 2B de 500 ppm fue menos eficaz que la de 750 ppm o 1,000 ppm para controlar el moho azul (Tabla 15).

Independientemente de las tasas, las manzanas tratadas con Zivion® M mostraron una mayor incidencia de descomposición de moho gris y moho azul que las tratadas con la formulación 2B. Sorprendentemente, la diferencia en la tasa de descomposición no puede explicarse únicamente por la diferencia de 2,5 veces en la cantidad de natamicina entre la formulación 2B y Zivion® M. Primero, la formulación 2B mostró una reducción del moho de más de 2,5 veces que Zivion® M. Específicamente, a una tasa de aplicación de 1,000 ppm la formulación 2B dio como resultado 3,5 veces menos moho gris que la aplicación de la misma tasa de Zivion® M. Véase la Tabla 14. A una tasa de aplicación de 750 ppm la formulación 2B dio como resultado 4,3 veces menos moho gris que Zivion® M. A una tasa de aplicación de 750 ppm la formulación 2B dio como resultado 3,68 veces menos moho azul que Zivion® M.

En segundo lugar, las concentraciones líquidas y los residuos de natamicina en la fruta fueron muy similares entre la formulación 2B y Zivion® M en ambos ensayos. Véanse las Tablas 14 y 15. Por lo tanto, las formulaciones de natamicina de la presente invención muestran resultados inesperados sobre las formulaciones de natamicina disponibles comercialmente.

Se necesitará investigación adicional para investigar por qué las formulaciones de natamicina se desempeñaron de manera diferente en el control del moho gris y el moho azul en las manzanas.

Tabla 14

65

Tratamiento	Tasa objetivo (ppm)	Natamicina medida (ppm)		Moho gris (%)
		Solución	Fruta	
Agua		0	0,00	88,8 a*
Formulación 2B	1000	1076	2,11	2,5 ef
	750	801	1,75	3,8 def
	500	528	1,25	7,5 cde
Zivion® M	1000	1089	2,34	8,8 bcd
	750	803	1,89	16,3 b
	500	544	1,18	13,8 bc
Shield-Brite® FDL 230SC	180	171	0,43	1,3 f

* Los valores con una letra común no son significativamente diferentes según el análisis de varianza y la diferencia menos significativa a $P = 0,05$.

Tabla 15

Tratamiento	Tasa objetivo (ppm)	Natamicina medida (ppm)		Moho azul (%)
		Solución	Fruta	
Agua		0	0,00	95,0 a*
Formulación 2B	1000	1006	2,21	21,3 c
	750	751	1,60	16,3 c
	500	497	1,24	42,5 b
Zivion® M	1000	1093	2,43	55,0 b
	750	784	1,65	60,0 b
	500	519	1,18	60,0 b
Shield-Brite® FDL 230SC	180	156	0,38	8,8 c

* Los valores con una letra común no son significativamente diferentes según el análisis de varianza y la diferencia menos significativa a $P = 0,05$.

Ejemplo 15

Control de enfermedades poscosecha en cítricos

La formulación 2B de la Tabla 2, arriba, se analizó para determinar su capacidad de controlar el moho verde de limones y naranjas y la podredumbre agria en limones.

Métodos

Preparación de las frutas

El 15 de diciembre de 2014 en el Centro de Investigación y Extensión Lindcove de la Universidad de California (UC-LREC), se cosecharon dos contenedores de limones verde claro 'Eureka' y naranjas 'Washington navel'. Pace International, LLC proporcionó un contenedor adicional de limones 'Eureka' amarillos, más maduros que se cosechó de la región del Distrito 1 de California. Toda la fruta se lavó a presión a 100 psi durante 20 segundos en 200 ppm de cloro, después se dividió en bolsas de 150 frutas cada una. Las bolsas se colocaron a 20 °C durante 36 horas antes de la inoculación de 6 a 9 P.M. el 17 de diciembre de 2014.

Preparación del inóculo

Para este estudio se usó un aislado de *Penicillium digitatum* (A857; sensible a los fungicidas) y otro de *Geotrichum citri-aurantii* (A005). Los cultivos fúngicos se reactivaron a partir de reservas en gel de sílice y se cultivaron en PDA. La placa se inundó con solución Tween® 20 al 0,01 % para *P. digitatum* y agua estéril para *G. citri-aurantii*, y los conidios se

rasparon con un asa estéril. Las concentraciones finales se ajustaron a 5×10^5 y 5×10^7 esporas/ml para *P. digitatum* y *G. citri-aurantii*, respectivamente. Ambas soluciones se mantuvieron en una hielera hasta que se usaron.

Inoculación de las frutas

5

Se usaron limones y naranjas sin tratamientos con fungicidas poscosecha. Para la inoculación de *P. digitatum* y *G. citri-aurantii*, se sumergió una varilla de acero estéril (1 x 2 mm) en la suspensión del inóculo y se inoculó la herida de la fruta haciendo una punción única en la superficie ecuatorial de 12 a 16 horas antes de aplicar los tratamientos. Los palets de limones inoculados con *G. citri-aurantii* se cubrieron con una bolsa plástica para mantener la humedad alta. Después del tratamiento, las frutas se colocaron en bandejas de cavidades para frutas en cajas de cartón y se colocaron en la habitación grande con temperatura controlada en UC-LREC a 50 °F.

10

15

Los fungicidas analizados fueron la formulación 2B de la presente invención, Shield-Brite® FDL 230SC, Mentor® (45 % de propiconazol; Mentor es una marca registrada y está disponible desde Syngenta Participations AG), Shield-Brite® TBZ 500D (42,3 % de tiabendazol; disponible de Pace International, LLC), Shield-Brite® Penbotec® 400SC (37,14 % de pirimentanilo; Penbotec es una marca registrada de Johnson & Johnson Corporation; Shield-Brite® Penbotec® 400SC está disponible a través de Pace International, LLC), PacRite® Fungaflor 75 WSG (100 % de imazalilo; PacRite® es una marca registrada de Pace International, LLC) y Graduate A + ® (fludioxonilo en combinación con azoxistrobina; Graduate A + es una marca registrada disponible a través de Syngenta Participations AG).

20

Método de aplicación

25

Los fungicidas se aplicaron mediante la recirculación con dispositivo regulador con dos canales y un tiempo de residencia de alrededor de 7 segundos con un volumen del sistema de 75 galones y un flujo de 50 gal/minuto con o sin adición de cera de recubrimiento, excepto que se aplicó tiabendazol mediante la pulverización con cera en gabinete de cera con secador a 120 °F ("cera").

30

Tratamiento

1. Moho verde en limones

35

La fruta se inoculó 12-16 horas antes del tratamiento a 68 °F con *P. digitatum*. Se aplicaron los tratamientos a 3 juegos de 45 limones desde las 9 a.m. hasta las 2 p.m. el 18 de diciembre de 2014, seguido de almacenamiento a 50 °F hasta el 5 de enero de 2015, cuando se examinaron para detectar el desarrollo de la descomposición.

2. Moho verde en naranjas

40

La fruta se inoculó 12-16 horas antes del tratamiento a 68 °F con *P. digitatum*. Se aplicaron los tratamientos a 3 juegos de 45 naranjas desde las 9 a.m. hasta las 2 p.m. el 18 de diciembre de 2014, seguidos del almacenamiento a 50 °F hasta el 5 de enero de 2015, después 3 días a 72 °F, después 4 días a 50 °F que terminaron el 12 de enero de 2015 cuando se examinaron.

45

3. Podredumbre agria en limones

La fruta se inoculó 12-16 horas antes del tratamiento a 68 °F con *G. citri-aurantii*. Se aplicaron los tratamientos a 3 juegos de 45 limones desde las 9 a.m. hasta las 2 p.m. el 18 de diciembre de 2014, seguidos del almacenamiento a 50 °F hasta el 5 de enero de 2015, después 3 días a 72 °F, después 4 días a 50 °F que terminaron el 12 de enero de 2015 cuando se examinaron.

50

Análisis de datos

55

El porcentaje de incidencias de descomposición se sometió a transformación arcoseno y se analizó con SAS PROC GLM (versión 9.1; SAS Institute) para comparar los tratamientos. Las medias se separaron por la diferencia menos significativa protegida de Fisher a $P = 0,05$. La separación de la media a través del LSD protegido de Fisher_{0,05} en la Tabla 16 a continuación fue 3,4 para el moho verde en limones, 13,6 para el moho verde en naranjas y 5,8 para la podredumbre agria en limones.

60

Resultados

Este estudio se realizó para determinar la eficacia de las formulaciones de natamicina de la presente invención en el control del moho verde de limones y naranjas y la podredumbre agria de limones por inmersión acuosa o aplicación con dispositivo regulador.

65

En general, la aplicación de la formulación 2B de la presente invención dio como resultado significativamente menos moho verde y podredumbre agria que en el control. Véase la Tabla 16. Además, la aplicación de la formulación 2B dio como

resultado estadísticamente menos moho verde y podredumbre agria que los fungicidas comerciales. Específicamente, la aplicación de la formulación 2B a través de un dispositivo regulador a 500 ppm y a través de un dispositivo regulador a 1,000 ppm con cera de almacenamiento dio como resultado estadísticamente menos moho verde en limones que 2,000 ppm Shield-Brite® TBZ 500D aplicado a través de un pulverizador con cera. Véase la Tabla 16. La aplicación de la formulación 2B a través de un dispositivo regulador a 500 ppm y 1,000 ppm y por inmersión a 500 ppm dio como resultado estadísticamente menos moho verde en naranjas que 300 ppm Shield-Brite® FDL 230SC aplicado a través de un dispositivo regulador. Véase la Tabla 16. Finalmente, la aplicación de la Formulación 2B a través de un dispositivo regulador a 500 ppm y 1,000 ppm dio como resultado estadísticamente menos moho verde en naranjas que 3,500 ppm Shield-Brite® TBZ 500D aplicado a través de un pulverizador con cera. Véase la Tabla 16. En conclusión, la formulación 2B de la presente invención es capaz de controlar el moho verde y la podredumbre agria en limones y naranjas, así como, y en algunos ejemplos mejor que, los fungicidas disponibles comercialmente.

Tabla 16

Tratamiento	Tasa objetivo (ppm)	Método de aplicación	Cera	Moho verde (%)		Pudrición agria (%)
				Limones	Naranjas	Limones
Agua				100	96,3	37,8
Formulación 2B	500	Dispositivo regulador	No	0,7	24,7	6
Formulación 2B	500	Dip 30 segundos	No	4,4	26,1	4,4
Formulación 2B	1000	Dispositivo regulador	No	4,5	22,4	14,7
Formulación 2B	1000	Dispositivo regulador	Cera de almacenamiento, sin fungicida	1,9	39,1	10
Formulación 2B	1000	Dispositivo regulador	Cera, sin fungicida	3,4	40,8	14,2
Formulación 2B	1000	Dip 30 segundos	No	3	43,7	2,9
Shield-Brite® FDL 230SC	180	Dispositivo regulador	No	1,3	29,1	-
Shield-Brite® FDL 230SC	300	Dispositivo regulador	No	2,2	46,1	-
PacRite® Fungaflor 75 SWG	500	Dispositivo regulador	No	0,6	11,4	-
Shield-Brite® Penbotec® 400SC	500	Dispositivo regulador	No	1,5	12,3	-
Shield-Brite® TBZ 500D	3500	Cera	Cera, fungicida	5,7	38,9	-
Formulación 2B + Shield-Brite® FDL 230SC	500 + 180	Dispositivo regulador	No	0	21,1	-
Formulación 2B + Shield-Brite® FDL 230SC	1000 + 300	Dispositivo regulador	No	1,3	41,3	-
Formulación 2B + PacRite® Fungaflor 75 SWG	1000 + 500	Dispositivo regulador	No	0	11	-
Formulación 2B + Shield-Brite® Penbotec® 400SC	1000 + 500	Dispositivo regulador	No	0	10,4	-
Formulación 2B + Shield-Brite® TBZ 500D	1000+3500	2B, dispositivo regulador	Cera, fungicida	1,5	8	-

5

10

15

Tratamiento	Tasa objetivo (ppm)	Método de aplicación	Cera	Moho verde (%)		Pudrición agria (%)
				Limonas	Naranjas	Limonas
Graduate A + ®	300 + 300	Dispositivo regulador	No	0	22	-
Mentor®	540	Dispositivo regulador	No	-	-	2,8
Mentor®	540	Dip 30 segundos	No	-	-	0,7

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de concentrado en suspensión estable para la inhibición del crecimiento fúngico que comprende:
de 25 % \pm 2,5 % a 48 % \pm 4,8 % p/p de natamicina;
de 0,1 % \pm 0,01 % a 10 % \pm 1 % p/p de un tensoactivo aniónico, en donde el tensoactivo aniónico es lignosulfonato de sodio; y
agua,
en donde la natamicina está presente como partículas que tienen como promedio menos de 11 micras de diámetro y la formulación tiene una viscosidad de menos de 1400 mPa·s a 21 grados Celsius.
2. La formulación de conformidad con la reivindicación 1 que comprende además de 0,1 % \pm 0,01 % a 10 % \pm 1 % p/p de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileno, trioleatos de sorbitán polioxietilenado, hexaoleatos de polioxietilen sorbitol y combinaciones de estos, preferentemente en donde la formulación contiene de 0,1 % \pm 0,01 % a 3,0 % p/p de tensoactivo no iónico, de nuevo preferentemente, en donde el tensoactivo no iónico es al menos un copolímero de bloques de óxido de polialquileno.
3. La formulación de conformidad con la reivindicación 1, en donde la formulación contiene de 30 % \pm 3 % a 48 % \pm 4,8 % p/p de natamicina, preferentemente en donde la formulación contiene de 35 % \pm 3,5 % a 48 % \pm 4,8 % p/p de natamicina.
4. La formulación de conformidad con la reivindicación 1, en donde la formulación contiene de 0,1 % \pm 0,01 % a 3,0 % p/p de tensoactivo aniónico.
5. La formulación de conformidad con la reivindicación 1 que comprende de 46 % \pm 4,6 % a 75 % \pm 7,5 % p/p de agua.
6. La formulación de conformidad con la reivindicación 1 en donde las partículas de natamicina tienen un diámetro promedio menor o igual a 9 micras.
7. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones de la 2 a la 6, en donde la formulación comprende:
25 % \pm 2,5 % p/p de natamicina;
1,0 % \pm 0,1 % a 10 % \pm 1 % p/p de lignosulfonato de sodio;
0,5 % \pm 0,05 % p/p de un copolímero de bloques de óxido de polialquileno; y
agua,
en donde la natamicina está presente como partículas que tienen como promedio menos de 11 micras de diámetro y la formulación tiene una viscosidad de menos de 1400 mPa·s a 21 grados Celsius.
8. La formulación de conformidad con la reivindicación 1 para su uso en un método para inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos humanos, animales o vegetales.
9. La formulación para su uso de conformidad con la reivindicación 8 en donde la formulación de concentrado en suspensión comprende además de 0,1 % \pm 0,01 % a 10 % \pm 1 % p/p de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileno, trioleatos de sorbitán polioxietilenado, hexaoleatos de polioxietilen sorbitol y combinaciones de estos.
10. Un método para inhibir el crecimiento de hongos que comprende:
(a) diluir una formulación de concentrado en suspensión que comprende de 25 % \pm 2,5 % a 48 % \pm 4,8 % p/p de natamicina, de 0,1 % \pm 0,01 % a 10 % \pm 1 % p/p de un tensoactivo aniónico, en donde el tensoactivo aniónico es lignosulfonato de sodio y agua; y
(b) aplicar la formulación de concentrado en suspensión diluida a un producto que necesita protección contra el crecimiento de hongos,
en donde la natamicina está presente como partículas que tienen como promedio menos de 11 micras de diámetro y la formulación tiene una viscosidad de menos de 1400 mPa·s a 21 grados Celsius antes de la dilución.
11. El método de conformidad con la reivindicación 10 en donde la formulación de concentrado en suspensión comprende además de 0,1 % \pm 0,01 % a 10 % \pm 1 % p/p de un tensoactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en copolímeros de bloques de óxido de polialquileno, trioleatos de sorbitán polioxietilenado, hexaoleatos de polioxietilen sorbitol y combinaciones de estos.
12. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde la formulación diluida se aplica por inmersión, empapado (inundación) o pulverización.
13. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde la formulación se diluye de 0,01 % \pm 0,001 % a 5 % \pm 0,5 % p/p de natamicina, preferentemente en donde la formulación se diluye de 0,5 % \pm 0,05 % a 2 % \pm 0,2 % p/p de natamicina.