

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 844**

51 Int. Cl.:

A23K 20/121 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/GB2014/050803**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140623**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14712714 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2983496**

54 Título: **Piensos para peces complementados**

30 Prioridad:

15.03.2013 GB 201304805

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

12.08.2020

73 Titular/es:

**NEEMCO LIMITED (100.0%)
Fisherwood House Lomond Road
Balloch G83 8SJ, GB**

72 Inventor/es:

**MASON, MICHAEL, PAUL y
STRANG, ROBIN, HENDERSON**

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 778 844 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

Pienso para peces complementados

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere al tratamiento y/o prevención de infecciones y/o infestaciones de plagas en peces y proporciona piensos para peces complementados y otras composiciones, así como también usos y métodos que los aprovechan. De manera adicional, la descripción proporciona métodos para elaborar piensos para peces complementados.

10

Antecedentes de la invención

15

Las plagas afectan a muchos productos cultivados y pueden conducir a pérdidas económicas y de producción considerables. Por ejemplo, los peces, y en particular los peces de cría, son susceptibles a infecciones por ectoparásitos y el salmón del Atlántico de cría (*Salmo salar*) es propenso a infestaciones por piojos de mar. Si se dejan sin tratar, las infecciones por ectoparásitos pueden provocar enfermedades y problemas de desarrollo en los peces.

20

En la actualidad, los agentes para tratar plagas se pueden aplicar directamente al agua (llamados tratamientos de baño) o tratamientos «en piensos», donde el agente se mezcla con piensos para peces o estos se recubren con el agente. Por ejemplo, se pueden aprovechar organofosfatos, peróxido de hidrógeno y piretroides en el tratamiento y/o prevención de infestaciones por ectoparásitos en los peces. Se pueden agregar compuestos de Avermectina a los piensos para peces.

25

El control de plagas de parásitos, por ejemplo, los piojos de mar, le cuesta más de 450 USD millones al año a la industria acuícola debido a la necesidad de comprar parasiticidas y equipos, y de invertir en tiempo del personal en la gestión, control y/o búsqueda de nuevos métodos de control de parásitos. Asimismo, las granjas piscícolas se están rechazando y/o reduciendo en cuanto a su tamaño debido a las infestaciones por parásitos. Existe estrés y mortalidad de peces accidental que se asocia con el tratamiento de peces con tratamientos con antiparasitarios, algunos peces no crecen hasta alcanzar su tamaño completo debido al ayuno antes y/o después de los tratamientos y la comerciabilidad de los peces que han sufrido de infecciones/infestaciones por ectoparásitos se puede ver afectada debido a su apariencia (los parásitos pueden dejar marcas en la piel de los peces), su tamaño reducido y el miedo del consumidor a agentes antiparasitarios residuales en la carne de los pescados.

35

Asimismo, el uso de productos químicos (a veces peligroso) para el control de parásitos puede conducir a publicidad negativa para las granjas piscícolas debido al riesgo que se asocia con el personal que administra los tratamientos, la posibilidad de encontrar residuos químicos en los peces y la contaminación del ambiente. Además, la contaminación cruzada y la inducción de infestaciones en masa (epizootia) de los parásitos entre las granjas adyacentes y el pesado salvaje es otro problema importante que se asocia con estos tipos de infestaciones. Todos estos factores conducen a un mayor control regulador y prácticas agrarias más costosas para evitar y controlar las infestaciones y la transmisión de los parásitos.

40

45

El tratamiento de baño es la administración de fármacos disueltos en agua a través de la inmersión completa durante un período predeterminado. Una ventaja importante de los tratamientos de baño, especialmente cuando se los administra usando buques de procesamiento de pescado es que todos los parásitos quedan expuestos a la misma concentración del fármaco. Sin embargo, la administración de los tratamientos de baño requiere gran cantidad de mano de obra, la transferencia de los peces a los buques de procesamiento de pescado causa pérdidas de ganado y los agentes que se usan son generalmente bastante tóxicos y contaminantes. Los tratamientos con piensos para peces son menos estresantes tanto para los peces como para los productores y permiten la medicación simultánea de todas las jaulas de los peces independientemente de las condiciones climáticas, por lo cual se reduce el riesgo de infección cruzada que se asocia con la necesidad de aplicar tratamientos de baño en jaulas adyacentes de forma simultánea.

50

55

No obstante, debido al problema creciente de la resistencia, se necesitan nuevas formas de tratar y/o prevenir infecciones y/o infestaciones de plagas y entre los objetivos de la presente invención se encuentra evitar o mitigar al menos uno de los problemas que se asocian con la técnica previa.

60

Harikrishnan et ál, Fisheries and Aquaculture Journal, vol. 2010, 24 de mayo de 2010) describen un estudio sobre el efecto de la complementación con dietas con un extracto de hoja de neem en parámetros hematológico y bioquímicos de pescados (*C. mrigala*) infectados con la bacteria *Aphanomyces invadans*.

Talpur et ál, Fish and Shellfish Immunology, n.o 34, 20 de noviembre de 2012, páginas 254-264) evalúan los efectos de una dieta complementada con hoja de neem en respuestas inmunitarias innatas en lubinas asiáticas contra la infección por *Vibrio harveyi*.

- 5 Kumar et ál, Parasitol Res, no 110, 1 de noviembre de 2011, páginas 1795-1800 describen un tratamiento de baño que aprovecha composiciones que contienen «25 % de Azadiractina EC» en un estudio para examinar su eficacia contra el *Argulus* spp. en *Carasius auratus*.

Compendio de la invención

- 10 Los aspectos de la presente invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas. En particular, se proporcionan piensos para peces según la reivindicación 1, piensos para peces para usar para tratar y/o prevenir las infecciones por plagas y/o infestaciones por plagas en los peces según la reivindicación 4 y un método para elaborar piensos para peces complementados con azadiractina según la reivindicación 11.

- 15 La presente descripción proporciona piensos para peces que comprenden un agente de control de plagas.

- 20 Debe entenderse que, cuando sea necesario, el término «que comprende» puede abarcar las expresiones «que consiste esencialmente en» y «que consiste en». Por ejemplo, el agente de control de plagas incluido dentro de los piensos para peces de la presente descripción puede «consistir esencialmente en» un agente de control de plaga o puede «consistir en» un agente de control de plagas. Adicionalmente, cada una de las definiciones proporcionadas en la presente memoria descriptiva aplica a cada aspecto de la presente descripción.

- 25 Un pienso para peces de la presente invención comprende carne de pescado o material proteínico, carbohidratos y grasas. La carne de pescado puede comprender por sí misma uno o más componentes nutricionales. El componente de carne de pescado de un pienso para peces para usar en la presente invención puede comprender materia derivada de vegetales y/o animales. Cualquier materia derivada de animales puede derivar de un pescado y/o algunas otras especies (heterólogas o que no sean de pescado). De manera alternativa, los piensos para peces adecuados de la invención comprenden material proteínico (como una fuente de proteínas, péptidos y/o aminoácidos), carbohidratos y grasas. De manera adicional, un pienso para peces puede comprender uno o más compuestos diseñados para alterar la calidad, cantidad y/o apariencia de un tejido de pescado. Por ejemplo, un pienso para peces puede comprender un compuesto carotenoide para mejorar la apariencia (color) del tejido muscular en un pez.

- 35 La presente descripción proporciona piensos para peces nutricionales y/o no nutricionales que comprenden un agente de control de plagas. Los piensos para peces no nutricionales pueden comprender alguna forma de sustrato que sea comestible por parte de los peces.

- 40 El pienso para peces de la presente descripción puede proporcionarse en forma líquida o sólida. Los piensos de forma sólida pueden comprender gránulos y/o copos.

- Un experto estará familiarizado con los tipos de piensos para peces adecuados y observará que, para cualquier especie de peces dada, la formulación y/o forma de pienso más adecuada (por ejemplo, pienso sólido y/o pienso líquido) puede variar.

- 45 El pienso para peces que proporciona la presente invención se puede usar para alimentar peces salvajes y/o de cría. Con respecto a esto, el pienso para peces se puede usar para alimentar peces de agua dulce y/o agua salada (marina).

- 50 Los piensos que proporciona la presente descripción pueden ser administrados o usados para alimentar a cualquier pez que sea susceptible a infecciones/infestaciones por una o más plagas. Por ejemplo, el pienso puede encontrar aplicación particular en la acuicultura como un componente de una dieta administrada a cualquier pez de cría que incluye, por ejemplo, especies de peces comercialmente importantes. Por ejemplo, los piensos que proporciona la presente descripción pueden formar parte de una dieta administrada a peces de agua dulce, salobre y/o agua de mar. Por ejemplo, el pienso de la presente descripción puede encontrar aplicación como un componente de una dieta administrada a especies que pertenecen a las familias Cyprinidae, Cichlidae, Pangasiidae, Sciaenidae, Serranidae, Carangidae, Sparidae, lateolabracidae, Moronidae, Mugilidae, Cypriniformes, Latidae, Eleotridae, Tilapiini y Salmonidae. Como tal, el pienso para peces de la presente descripción se puede usar para alimentar especies que pertenecen a cualquiera de los géneros dentro de esas familias y, en particular, aquellas especies que sean criadas para el consumo humano o animal. Por ejemplo (y sin limitarnos a ningún ejemplo particular) el pienso para peces descrito en la presente se puede usar para alimentar especies que pertenecen a los géneros *Salmo* y/o *Oncorhynchus*. En particular, el pienso para peces se puede usar para alimentar y/o criar especies de salmón y/o trucha que incluyen, por ejemplo, salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón del Pacífico y/o trucha arcoíris. Asimismo, el pienso para peces se puede usar como un agente de control de plagas de pescados para otras especies de peces dentro de la industria acuícola

tal como lubina o besugo, así como también en la industria de peces decorativos/mascota, por ejemplo, para el control de plagas en los carpa dorada (*Carassius auratus*).

5 La presente descripción proporciona un pienso para peces para especies dentro de la familia *Salmonidae*, donde dicho pienso para peces comprende un agente de control de plagas.

10 Dentro del contexto de la presente descripción, el término «plaga» puede, por ejemplo, abarcar cualquier organismo que sea perjudicial para la salud, valor y/o apariencia de otro organismo. El término plaga puede incluir especie de ectoparásitos/endoparásitos (por ejemplo, gusanos, helmintos, trematodos, piojos, garrapatas y/o ácaros), bacterias, virus, hongos y/o protozoos (lo que incluye, por ejemplo, amebas).

15 Un pienso para peces de la presente descripción puede comprender un agente para controlar una infección/infestación provocada por un parásito, bacteria, virus, hongo y/o protozoos o aportada por estos. Cada agente incluido dentro del pienso para peces de la descripción puede ser capaz individualmente de controlar una o más de una infección/infestación parasitaria, bacteriana, viral, fúngica o protozoaria.

20 Dentro del contexto de la presente descripción, uno experto observará que cuando la plaga es un parásito, el parásito puede ser un endoparásito o un ectoparásito. El pienso para peces de la presente invención comprende Azadiractina para usar en el tratamiento y/o prevención de infecciones/infestaciones por ectoparásitos.

25 El término «endoparásitos» puede abarcar organismos que habitan en uno o más nichos internos de otro organismo. Por ejemplo, un endoparásito puede habitar en uno o más de los tejidos, órganos o sistemas de un organismo hospedador. Por ejemplo, un endoparásito puede habitar en los intestinos y/o sangre de un organismo hospedador. El término «ectoparásito» puede incluir organismos que habitan u ocupan un nicho externo de otra especie. Por ejemplo, un ectoparásito puede habitar u ocupar la superficie de una especie hospedadora. En el caso de los peces, los ectoparásitos pueden habitar en la piel de los peces (a veces en el alojamiento entre las escamas) alimentándose del moco, la sangre, la piel y/o las branquias.

30 Los ectoparásitos de los peces pueden comprender especies que pertenecen a la phylum *Arthropoda*. Como tal, el término «ectoparásitos» incluye crustáceos y especies de piojos que habitan en los hospedadores de los peces. A modo de ejemplo, en el caso de los peces que pertenecen a la familia *Salmonidae* (por ejemplo, *Salmo* y/o *Oncorhynchus* spp.), el pienso para peces proporcionado por la presente invención puede tratar y/o prevenir, por ejemplo, las infecciones y/o infestaciones por piojos. El pienso para peces proporcionado por la presente invención puede tratar y/o prevenir las infestaciones por ectoparásitos tales como aquellas provocadas por el *Argulus* ssp o *Caligus* ssp. En particular, el agente de control de plagas para usar en el pienso para peces descrito en la presente puede ser eficaz para controlar las infecciones/infestaciones por copépodos de los peces.

35 Una especie de copépodo que es un ectoparásito del salmón del Atlántico pertenece al género *Lepeophtheirus* y se lo conoce como piojo de salmón (*Lepeophtheirus salmonis*). Otros tipos de ectoparásitos de copépodos de los peces que pertenecen a la familia *Salmonidae* son *Caligus clemensi* y *Caligus rogercreseyi*. Los piojos, incluidos, por ejemplo, los piojos del salmón, son ectoparásitos que se alimentan de la sangre, el moco y la piel de las especies de salmón. El ciclo de vida del piojo de salmón comprende una cantidad de etapas que comienzan con las etapas de nauplios de natación libre. Después de estas etapas, el nauplios se desarrolla en la etapa de copépodos que se acopla por sí mismo a los peces. A partir de este punto el copépodo se desarrolla a través de las etapas de chalimus y crece a una longitud de aproximadamente 5 mm (macho) y aproximadamente 10 mm (hembra). El chalimus luego avanza a las etapas preadultas y adultas. En las etapas preadultas y adultas el piojo es móvil y puede moverse alrededor del hospedador y de un hospedador a otro.

40 Como tal, la presente invención proporciona un pienso para peces para usar para tratar y/o prevenir infecciones y/o infestaciones por *Lepeophtheirus* según las reivindicaciones adjuntas. La infección y/o infestación por *Lepeophtheirus* puede ser provocada por el piojo del salmón, *Lepeophtheirus salmonis*, y/o puede ser aportada por este. En este caso, el pienso para peces puede ser para especies que pertenecen a la familia *Salmonidae*. Por ejemplo, el pienso para peces puede ser un pienso de *Salmo* y/o *Oncorhynchus* spp. Sin embargo, un experto observará que el pienso puede ser suministrado a cualquier pez que sea susceptible a una infección y/o infestación por *Lepeophtheirus*.

45 Un agente que «controla» una plaga (llamado en la presente «agente de control de» plagas) puede ser cualquier agente que afecte, facilite o aporte a la erradicación o reducción de una infección/infestación por plaga de un pez. De manera adicional o alternativa, los agentes adecuados pueden curar, aliviar o mejorar uno o más de los síntomas que se asocian con una infección/infestación por plagas. Los agentes de control de plagas para usar en la presente descripción pueden ser biológicamente activos para una o más plagas de peces y agentes adecuados puede exterminar o repeler plagas. Los agentes pueden de manera adicional o alternativa, modular (por ejemplo, inhibir o afectar de forma negativa) el comportamiento (por ejemplo, hábitos/patrones de alimentación) y/o el ciclo de vida de una plaga. Los agentes que afectan el ciclo de vida de una plaga pueden

afectar su desarrollo general (modular el crecimiento y/o el desarrollo a través de una o más fases del ciclo de vida) y/o la fecundidad (fertilidad y/o producción de huevos general).

5 En general, a los agentes para usar en la presente descripción se los suele denominar como que tienen efectos antiparasitarios, antibacterianos, antivirales, antifúngicos y/o antiprotozoicos. Es posible usar un agente antiparasitario para usar en la presente descripción para controlar a los endoparásitos y/o ectoparásitos. A los agentes de este tipo se los suele denominar como que tienen efectos antiektoparasitarios y/o antiendoparasitarios. Debería entenderse que cualquier agente dado para usar en cualquier aspecto de la presente descripción puede mostrar uno o más de un efecto antiparasitario (antiektoparasitario, antiendoparasitario), antibacteriano, antiviral, antifúngico y/o antiprotozoico.

10 Un pienso para peces de la presente descripción puede comprender un agente antiektoparasitario, donde dicho agente muestra una o más propiedades que se seleccionan del grupo que consiste en:

- 15 (i) toxicidad para ectoparásitos;
- (ii) modulación del comportamiento de ectoparásitos; y
- (iii) modulación de al menos un componente y/o fase del ciclo de vida de un ectoparásito, lo que incluye, por ejemplo, desarrollo de huevos, deposición de huevos, viabilidad de huevos y/o comportamiento de alimentación.

20 Los agentes de control de plagas de la presente descripción pueden facilitar el tratamiento y/o prevención de una infección/infestación por plagas. Por consiguiente, el pienso para peces proporcionado por la presente descripción puede ser adecuado para usar (quizás como forma de medicamento) para tratar y/o prevenir las infecciones/infestaciones por plagas de los peces. Un medicamento para usar para tratar una infestación y/o infección por plagas de los peces (por ejemplo, una infección/infestación por ectoparásitos) puede comprender un sustrato comestible por los peces y un agente de control de plagas.

25 Debe entenderse que el pienso para peces de la presente descripción puede comprender uno o más agentes de control de plagas o puede complementarse con estos. Cuando un pienso para peces comprende o se complementa con al menos dos o más agentes de control de plagas diferentes, cada agente de control de plagas puede ser individualmente activo (o biológicamente activo) y/o puede ser capaz de modular el comportamiento y/o el desarrollo de una plaga. Cada agente puede ser individualmente eficaz contra una o más plagas diferentes.

30 Sin ánimo de limitarnos a ninguna teoría, se sugiere que cualquier agente de control de plagas proporcionado como un componente de un pienso para peces puede afectar de manera negativa a las plagas que se alimentan de sus hospedadores y, por ejemplo, toman alimentos de la sangre y el moco de estos. Tras la exposición al agente, la plaga se puede modular (es decir, se puede modular el desarrollo/comportamiento de la plaga), exterminar y/o repelar del hospedador.

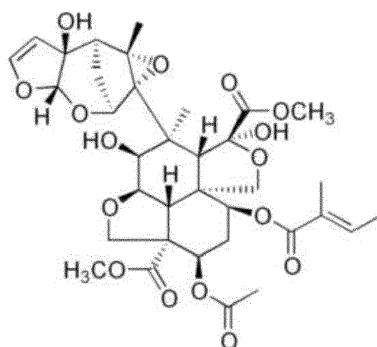
35 Los agentes de control de plagas adecuados para usar en la presente descripción pueden comprender uno o más agentes sintéticos y/o naturales.

40 Por ejemplo, el agente puede comprender un extracto de una planta que pertenece al género *Azadirachta*. El agente se puede obtener o extraer de *Azadirachta indica*, un árbol que se conoce comúnmente como árbol de «Neem». El agente se puede obtener o extraer de cualquier parte de la planta lo que incluye, por ejemplo, las hojas, los tallos, la corteza, la fruta y/o las semillas de esta.

45 Los extractos (composiciones y agentes, por ejemplo) obtenidos o que se pueden obtener del árbol de Neem pueden comprender un rango de compuestos terpenoides complejos ((tetranortripenoides o limonoides). Los más potentes de los muchos terpenoides son un grupo de compuestos llamados azadiractinoides.

50 El agente (control de plagas) para usar en la presente descripción puede comprender el compuesto tetranortriterpenoide, azadiractina. «Azadiractina» es el término colectivo que se le aplica a un gran grupo de limonoides activos de forma insecticida. A una de las azadiractinas (llamada azadiractina A) se la conoce de otro modo como [2aR-[2aα,3β,4β(1aR*,2S*,3aS*,6aS*,7S*,7aS*),4aβ,5α, 7aS*,8β(E),10β,10aα,10bβ]]-10-(acetiloxi)octahidro-3,5-dihidroxi-4-metil-8-[(2-metil-1-oxo-2-butenil)oxi]-4-(3a,6a,7,7a)-tetrahidro-6a-hidroxi-7a-metil-2,7-metanofuro[2,3-b]oxireno[e]oxepin-1a(2H)-il)-1H,7H-nafto-[1,8-bc:4,4a-c]difuran-5,10a(8H)-dicarboxilato de dimetilo.

60 La azadiractina A (Azadiractina A) es la más abundante de un grupo de congéneres azadiractinoides. La azadiractina A constituye aproximadamente 80 % de los azadiractinoides en las semillas de neem. La fórmula estructural de la azadiractina A es:



5 Cabe señalar que el término «azadiractina» tal como se utiliza en la presente pretende abarcar no solo todas las variantes o derivados de origen natural de la azadiractina (por ejemplo, lo que incluye, de modo no taxativo, las azadiractinas A, B, D, E, F, G, H, I, K) sino también todas las variantes, fragmentos, análogos y/o derivados sintéticos. En este sentido, un experto observará que cualquier variante, fragmento, derivado y/o análogo de la azadiractina para usar en la presente invención debería ser funcional, es decir que muestra al menos una propiedad plaguicida.

10 La azadiractina puede producirse de forma sintética usando, por ejemplo, el método de Veitch et ál, 2007 (Synthesis of azadirachtin: a long but successful journey: Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 46(40): 7629-32: véase también Sanderson, 2007: Chemists synthesize a natural born killer": Nature 448 (7154): 630-1). Los fragmentos de azadiractina adecuados (es decir, los fragmentos que son funcionales) se pueden encontrar en "The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells"; Salezadeh A., Jabbar, A., Jennens, L., Ley, S.V. Annadurai, R, Adams, R., Strang, R.H.C. Pest Manag. Sci 58, 268-276, (2002) y "Effect of azadirachtin-derived decalin (perhydronaphthalene) and dihydrofuranacetal (furo(2,3-b)pyran) fragments on the feeding behaviour of *S. littoralis*"; Pest. Sci. 40, 169-173 (1994).

20 También puede ser posible producir azadiractina usando tecnología recombinante y/o técnicas de cultivo celular. Por ejemplo, las células derivadas de plantas que pertenecen al género *Azadirachta* se pueden cultivar en condiciones en las que estas expresan azadiractinas.

25 De manera alternativa, la azadiractina se puede extraer de la *Azadirachta indica* (por ejemplo, de uno o más de las hojas, tallos, corteza, fruta y/o semillas) por medio de uno o más procesos de extracción. Los expertos en la técnica conocerán los métodos de extracción adecuados y pueden incluir, por ejemplo, técnicas que aprovechan el prensado mecánico de semillas (pepitas) de neem y el uso de solventes no polares. De manera adicional o alternativa, las técnicas de extracción de solventes que aprovechan, por ejemplo, el alcohol y aquellas que se describen en US4556562 y US5695763 (derivado de WO9216109 y que incluye EP0579624) se pueden aprovechar como un medio para producir agentes de control de plagas «ricos en azadiractina» para usar en el pienso para peces de la presente invención. Por ejemplo, la azadiractina se puede recuperar de forma eficaz a partir de las semillas del árbol de neem mediante la trituración de las semillas, la extracción de la azadiractina de las semillas trituradas con agua y luego mediante la extracción de la azadiractina del agua usando un solvente no acuoso que no es miscible en agua y tiene una mayor solubilidad de la azadiractina que el agua o un tensioactivo que tiene una temperatura de turbidez de entre 20 °C y 80 °C. La azadiractina concentrada se recupera fácilmente de la segunda solución de extracción y muestra alta actividad como insecticida. Los métodos de extracción que emplean solventes polares (por ejemplo, agua) conducen a extractos que son ricos en componentes polares.

40 Para evitar dudas, debe quedar claro que las composiciones descritas como (o que comprenden) aceite de neem y/o extracto de margosa pueden ser muy diferentes a los agentes de control de plagas de la presente descripción. El agente de control de plagas de la presente descripción es más rico en ingredientes activos azadiractinoides (en particular azadiractina A) que el aceite de neem y otras formulaciones a base de aceite. Esto se debe al hecho de que los azadiractinoides, por ejemplo, la azadiractina A, son terpenoides complejos y relativamente polares con una gran cantidad de funcionalidades de oxígeno, lo cual hace que las moléculas sean moderadamente solubles en agua (2 g.L⁻¹). Como resultado, los azadiractinoides (especialmente, la azadiractina A) están presentes en una concentración mucho mayor en los extractos obtenidos que emplean solventes polares que en extractos de aceite de neem y/o margosa. Sin querer limitarnos a ninguna teoría, la biodisponibilidad de los ingredientes activos al parásito objetivo en el extracto a base de agua puede ser mayor que en el aceite de neem, dado la mayor solubilidad y/o miscibilidad del extracto a base de agua en agua o con esta.

50 Por lo tanto, el agente de control de plagas de la presente descripción puede no ser, comprender, consistir o consistir esencialmente en aceite de neem. El agente de control de plagas (ingrediente activo) del pienso para

peces proporcionado por la presente descripción puede comprender, consistir o consistir esencialmente en azadiractina A.

5 El ingrediente activo y/o agente puede comprender NeemAzal® y/o NeemAzal® Technical. Debería entenderse de aquí en adelante que el término «NeemAzal®» hace referencia a cualquier formulación que comprenda NeemAzal®, incluido NeemAzal® Technical.

10 NeemAzal® se vende para uso primario en el control de insectos de plantas. El uso de NeemAzal® en plantas ha demostrado que conduce a la inhibición de la alimentación en plagas de insectos. Se ha demostrado que NeemAzal® inhibe la muda de insectos, reduce la capacidad de fecundidad y reproducción. NeemAzal® se puede preparar a partir de pepitas de neem mediante el uso del proceso de extracción acuoso de US5695763. La formulación de NeemAzal® (protección vegetal) puede comprender un extracto de neem de base natural, aceite vegetal y un tensioactivo.

15 NeemAzal® Technical es un extracto de semillas de neem elaborado con solventes polares, enriquecido en gran medida con azadiractina A. Es un extracto mucho más estable que, por ejemplo, el aceite de neem u otros extractos a base de aceite de neem. NeemAzal® Technical puede contener 35±2 % (35.000 ppm) de azadiractina A. Otros azadiractinoides menores conforman además el 32 % del peso. Lo que resta puede conformarse de pequeñas cantidades de otros terpenoides (salanina (3-5 %) y nimbina (3-5 %)), sin actividad biológica junto con alguna proteína y polisacárido.

La composición de NeemAzal® Technical puede comprender (% p/p):

25 Azadiractina A 34
 Azadiractina B aprox. 5,5
 Azadiractina D aprox. 2,1
 Azadiractina E ≤ 1
 Azadiractina F ≤ 1
 Azadiractina G ≤ 1
 30 Azadiractina H aprox. 2,3
 Azadiractina I aprox. 0,8
 Azadiractina K y otras Azadiractinas < 2
 Azadiractina aprox. 2
Suma de Azadiractinas: 51,7 %

35 Las formulaciones de NeemAzal® para usar en la presente invención pueden comprender diluciones de NeemAzal® Technical.

40 Un agente de control de plagas adecuado para usar en la presente descripción puede venderse con el nombre de Riddance®. Riddance® comprende azadiractina.

45 En vista de lo anterior, se describe un pienso para peces que comprende azadiractina y/o azadiractina A. El pienso para peces puede ser un pienso nutricional o un pienso no nutricional que comprende un sustrato que los peces pueden consumir.

50 La presente invención proporciona un pienso para peces que comprende NeemAzal® Technical según la reivindicación 1. La descripción proporciona además un pienso para peces, por ejemplo, un pienso adecuado para alimentar a especies dentro de la familia Salmonidae, dicho pienso comprende un agente de control de plagas, donde el agente de control de plagas comprende uno o más agentes que se seleccionan del grupo que consiste en:

- (i) azadiractina (de fuente natural (es decir, extraída de *Azadirachta indica*) y/o producida de forma sintética (quizás usando técnicas de cultivo celular));
- 55 (ii) azadiractina A (de fuente natural (es decir, extraída de *Azadirachta indica*) y/o producida de forma sintética (quizás usando técnicas de cultivo celular));
- (iii) un extracto de neem enriquecido con azadiractina A;
- (iv) NeemAzal® Technical;
- (v) formulaciones de NeemAzal®;
- (vi) azadiractina sintética producida mediante el método de Veitch et ál, 2007;
- 60 (vii) una azadiractina funcional, variante, derivado y/o análogo de esta; y
- (viii) una formulación rica en azadiractina A que se puede obtener mediante el método que se describe en US4556562 y/o US5695763.
- (ix) Riddance®

Debe entenderse que los agentes preparados a partir de extractos vegetales pueden ser complejos por naturaleza y pueden comprender componentes adicionales que no se describen en la presente. En el caso de extractos preparados a partir de plantas que pertenecen al género *Azadirachta* (por ejemplo, *Azadirachta indica*), el extracto puede comprender no solo azadiractina (por ejemplo, azadiractina A y/u otras variantes de azadiractina) sino mucho otros componentes que incluyen cantidades (a veces cantidades de minutos) de, por ejemplo, limonoides Salanina, Nimbina y 6-desacetilnimbina.

Para evitar dudas, el pienso para peces descrito en la presente puede comprender uno o más de los agentes de control de plagas que se describen en la presente junto con uno o más agentes adicionales. Por ejemplo, el pienso para peces puede comprender azadiractina A, NeemAzal®, NeemAzal® Technical y/o cualquier agente de control de plagas definido en la presente junto con uno o más agentes adicionales. Los uno o más u otros agentes adicionales pueden comprender agentes antiectoparasitarios (que incluyen cualquiera de los agentes de control de plagas (por ejemplo, azadiractina A y/o NeemAzal®, NeemAzal® Technical) descritos en la presente), agentes antimicrobianos (agentes antibióticos, antibacterianos, antifúngicos, antivirales), agentes antiparasitarios (por ejemplo, agentes antiendoparasitarios), y agentes antiprotozoicos y/o complementos nutricionales y similares. Los uno o más agentes adicionales pueden o no pueden mezclarse con pienso para peces o puede recubrirse con este (o pueden segmentarse dentro de este). Los uno o más agentes adicionales pueden proporcionarse de forma separada (ya sea en forma líquida o sólida) y administrarse de forma separada (antes o después) o de forma simultánea con un pienso de la presente descripción. El agente de control de plagas puede incorporarse en el pienso para peces o puede mezclarse con este. El agente puede mezclarse con el pienso durante su fabricación de manera que este se distribuye en todo el pienso para peces o una parte de este. Una vez que el agente se mezcló con el pienso para peces, la mezcla de pienso para peces/agentes puede constituirse en gránulos y/o copos según sea necesario.

El agente puede aplicarse al pienso para peces como una o más capas o recubrimientos. Por ejemplo, el agente puede aplicarse a una superficie exterior de un gránulo o un copo, por lo que de esta manera el gránulo o copo de pienso para peces puede recubrirse total o parcialmente con el agente. Una o más capas o recubrimientos pueden aplicarse a una superficie exterior de un copo o gránulos de pienso para peces. Cualquier capa o recubrimiento del agente puede «sellarse» o protegerse por medio de la aplicación de uno o más recubrimientos o capas adicionales de una sustancia de sellado. A modo de ejemplo, una capa o recubrimiento del agente puede sellarse por medio de la aplicación de una capa o recubrimiento de aceite de pescado. De manera adicional o alternativa, una o más capas o recubrimientos adicionales de pienso para peces pueden aplicarse al recubrimiento o capa de pienso para peces (opcionalmente sellados). De esta manera, cualquier gránulo o copo de pienso para peces puede comprender múltiples capas de pienso para peces, sustancia y/o agente de sellado.

Si bien cualquiera de los agentes descritos en la presente se puede mezclar, recubrir o segmentar dentro de los piensos descritos en la presente, el agente de control de plagas puede proporcionarse de forma adicional, alternativa o separada para la administración antes/después o simultáneamente con un pienso para peces (lo que incluye un pienso de la presente descripción). El pienso para peces puede carecer de un agente de control de plagas, tal agente de control de plagas se proporciona como una composición que se administrará de forma separada como se describe.

Como tal, la presente descripción proporciona además una composición para la administración a los peces, tal composición comprende un agente de control de plagas como se define en la presente. Por ejemplo, la composición puede comprender azadiractina, extractos enriquecidos con azadiractina A, formulaciones de NeemAzal®, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente. La composición puede comprender un excipiente, diluyente y/o portador líquido o sólido. La composición puede formularse agregando agua con el fin de permitir una administración de tipo «tratamiento de baño» de la composición a los peces. De manera alternativa, la composición puede proporcionarse en una forma que los peces pueden consumir. La composición se puede formular también para su administración parenteral. Por lo tanto, la composición puede comprender portadores diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Asimismo, la composición puede ser estéril.

Una composición de la descripción puede administrarse antes, durante o después de la administración de cualquiera de los piensos para peces descritos en la presente. Las composiciones de la descripción pueden ser composiciones líquidas y/o sólidas que comprenden uno o más agentes de control de plagas descritos en la presente, tales como, por ejemplo, azadiractina, azadiractina A, NeemAzal® y/o NeemAzal® Technical.

Los tratamientos que aprovechan los piensos para peces complementados del tipo que se describe en la presente pueden denominarse «tratamientos con piensos para peces». Por lo tanto, la presente invención proporciona tratamientos «con piensos para peces» para el tratamiento y/o la prevención de ectoparásitos según las reivindicaciones adjuntas. Sin embargo, los peces que están enfermos y/o infestados/infectados con parásitos y/o los peces menos agresivos pueden comer menos y pueden consumir menores dosis del tratamiento (Ibgoeli et ál., 2014).

Por lo tanto, los regímenes de tratamiento que se basan en el uso de piensos complementados y composiciones de la presente descripción pueden ser particularmente útiles para tratar peces cuyo apetito se ve afectado por enfermedades, infecciones y/o infestaciones y/o peces menos agresivos que comen menos. En dichos casos (y sin querer limitarnos a la teoría) puede aplicarse una composición (que comprende azadiractina) al agua como un tratamiento de baño, esto puede comenzar a afectar el tratamiento y en aquellos peces cuyo apetito se ve afectado de forma negativa por enfermedades, infecciones y/o infestaciones, los peces pueden comenzar a recobrar su apetito a medida que la carga parasitaria disminuye. Los peces pueden alimentarse luego con un pienso para peces de la presente invención (complementado con azadiractina). La alimentación puede administrarse de forma simultánea con la composición y/o separada de esta. Los tratamientos de tipo «con piensos para peces» pueden preferirse a los tratamientos de tipo baño y, por lo tanto, el uso de las composiciones que se describen en la presente para promover un tratamiento inicial que mejora el apetito de un pez puede facilitar el uso final de un tratamiento «con piensos para peces». Asimismo, en peces menos agresivos (o que se alimentan poco) el uso simultáneo de una composición descrita en la presente puede reforzar o asegurar la dosis correcta de azadiractina que se le administra a un pez.

En términos generales, se fijará la dosis/cantidad de agentes de control de plagas que se agrega a un alimento o composición de la presente descripción con el fin de lograr el efecto del control de plagas deseado. Un experto observará que la cantidad exacta del agente de control de plagas que se agregará a un pienso para peces (o composición) de la presente descripción puede variar dependiendo de, por ejemplo, la especie del pez y/o la cantidad de peces a alimentar. Otros factores que influyen en la cantidad de agente agregado al pienso incluyen, por ejemplo, la presencia de posibles competidores para el pienso (es decir, otras especies de animales no objetivo que pueden comer el pienso para peces), el tipo de plaga a controlar, la edad/madurez de los peces, la estación, el tipo de agua (pH, salinidad, pureza, temperatura), la temperatura y la agresividad de los peces.

Cuando el agente es (o comprende) por ejemplo, azadiractina (A) y/o NeemAzal® Technical, el pienso para peces de la presente invención se puede formular de manera que la dosis del agente administrado a los peces a través del pienso puede ser aproximadamente de 1-100 mg, 1-90 mg, 1-80 mg, 1-70 mg, 1-60 mg, 5-50 mg de NeemAzal® Technical por kg de peso corporal/día, aproximadamente 10-40 mg de NeemAzal® Technical por kg de peso corporal/día, aproximadamente 15-35 mg de NeemAzal® Technical por kg de peso corporal/día, aproximadamente 20-30 mg de NeemAzal® Technical por kg de peso corporal/día o aproximadamente 25 mg de NeemAzal® Technical por kg de peso corporal/día.

Un pienso de la presente descripción se puede administrar mientras que sea necesario para lograr el efecto del control de plagas deseado. Por ejemplo, el pienso se puede administrar a lo largo de un período de aproximadamente 1-10 días, aproximadamente 2-8 días, aproximadamente 3-7 días, aproximadamente 4-6 días, aproximadamente 5 días. Típicamente, el pienso se puede administrar durante aproximadamente 7 días. De manera alternativa, el pienso para peces de la descripción puede administrarse a una dosis baja durante un período de tiempo más prolongado. Debe entenderse que el régimen de administración del pienso de la descripción puede ser de una duración variable con el fin de ajustarse a dosis diferentes.

Durante el período de administración, el pienso puede administrarse tantas veces como sea necesario para lograr el efecto del control de plagas deseado. Por ejemplo, el pienso de la presente descripción puede administrarse aproximadamente 1, 2, 3, 4 o más veces por día.

El pienso para peces de la presente invención puede recubrirse al menos parcialmente con el agente.

Aproximadamente 0,1 - 100 g, aproximadamente 90 g, aproximadamente 80 g, aproximadamente 70 g, aproximadamente 60 g, aproximadamente 50 g, aproximadamente 40 g, aproximadamente 30 g, aproximadamente 20 g, aproximadamente 1-10 g, aproximadamente 2-9 g, aproximadamente 3-7 g, aproximadamente 4-6 g o aproximadamente 5 g de NeemAzal® Technical se puede usar por kilogramo de pienso. Un experto observará que esto equivale a aproximadamente 0,01-10 % de p/p (NeemAzal® Technical/pienso).

Sorprendentemente, se ha observado que los agentes de control de plagas que comprenden, consisten esencialmente, o consisten en azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquier agente de extracto de neem descrito en la presente, muestran no solo efectos antiectoparasitarios en los peces, sino también efectos antifúngicos y antiprotozoicos también. Asimismo, pese a la inestabilidad relativa de los agentes antiectoparasitarios que comprenden azadiractina A y/o NeemAzal® Technical en agua, cuando se los aplica a un pienso para peces, azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquier agente y/u agentes que contengan extracto de neem se vuelven al menos estables temporalmente de manera que los ingredientes activos de la composición y/o el pienso para peces (a saber, los agentes antiectoparasitarios) pueden mostrar su actividad biológica completa a lo largo de un período de tiempo prolongado. Sin querer limitarnos por la teoría, la semivida del NeemAzal® Technical en el agua es de 8 días, sin embargo, cuando se incluye NeemAzal® Technical en un pienso para peces de la invención, no hay signo de deterioro en el agua después de aproximadamente 48 horas.

Como tal, la presente descripción proporciona composiciones y/o piensos para peces que comprenden los agentes a base de azadiractina que se describen en la presente para usar como un agente de control de plagas, donde el agente se vuelve estable al menos temporalmente de manera que los ingredientes activos de la composición muestran su actividad biológica completa.

5

Además, cabe señalar que la azadiractina A, el NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de extracto de neem descritos en la presente no muestran ningún efecto tóxico en los peces o humanos y, son, por lo tanto, seguros para usar tanto en reservas de peces salvajes como peces de cría.

10 Los azadiractinoides de los cuales la azadiractina A es el ejemplo predominante, tienen una cantidad de características de importancia:

a) Son altamente específicos en sus objetivos; artrópodos y otros invertebrados son sensibles generalmente, pero los extractos son casi totalmente inocuos a animales más grandes. De hecho, se usa NeemAzal® Technical como parte del IPM en la horticultura junto con avispas y mariquitas.

15

b) No son neurotoxinas, pero parecen tener varios objetivos moleculares. No tienen ningún efecto fulminante inmediato, pero tienen su efecto durante períodos de días a semanas.

c) Tienen una semivida corta en el ambiente.

20

d) Aunque se han usado como biocidas comerciales y productos para protección de plantas durante casi 20 años en los EUA y UE, todavía no ha habido informes de signos de resistencia en organismos objetivos.

Un factor dominante que surge de la inmensa cantidad de trabajo realizado con insectos y garrapatas en la evaluación de extractos que contienen azadiractina es que mientras que los artrópodos y otros invertebrados son sensibles al ingrediente activo (es decir, la azadiractina A), organismos mayores, lo que incluye, mamíferos, no se ven afectados. La dosis para la letalidad aguda para el NeemAzal® Technical en las ratas es > 5000 mg por kg^{-1} de peso corporal. Los efectos adversos crónicos están ausentes, y no hay ningún signo de efecto carcinogénico o en la reproducción. El Manual de Pesticidas coloca a la azadiractina A en la categoría menos tóxica (V).

25

30

Asimismo, dado que la azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquier extracto de neem descrito en la presente son fácilmente solubles en agua, estos no residen en los peces ni se acumulan en estos. En vez de esto, una vez que cesó la administración, el agente puede perder rápidamente su eficacia, a medida que se metaboliza, degrada y/o excreta. En el caso de las reservas de peces de cría, esto asegura un menor tiempo para recolectar después de la administración de un pienso para peces de la presente invención.

35

A menudo, el pienso para peces no consumido o desperdiciado es un problema ya que puede contaminar el ambiente. Esto es particularmente verdadero de los piensos para peces que han sido complementados con uno o más compuestos terapéuticos que, si no se consumen, pueden acumularse en el ambiente provocando daño a los ecosistemas y a otros organismos. Las composiciones que comprenden azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de extracto de neem descritos en la presente se descomponen rápidamente en el ambiente, lo cual reduce el riesgo de contaminación.

40

En común con la mayor parte de los biocidas derivados de plantas, los terpenoides de azadiractina tienen una semivida corta en el ambiente. Estos se hidrolizan en el agua y su desaparición es más rápida cuanto más alcalina sea el agua. Por ejemplo, a pH 7,0 y 20 °C la semivida de los terpenoides de azadiractina es de 19,5 días y a pH 8,0 es de 4,4 días. Como el agua de mar es levemente alcalina, (pH 7,5-8,4) cualquier terpenoide de azadiractina disuelto habrá desaparecido en gran medida en el período de una semana. La azadiractina es catabolizada rápidamente mediante la microflora en el suelo. Se ha descubierto que la semivida en diversos suelos promedia 3 días. Los estudios preliminares con algo de sedimento desde jaulas de abajo en Skye (Escocia) y posteriormente infusinado con el NeemAzal® en el laboratorio indicaron una semivida de 3 semanas para el NeemAzal® Technical agregado al sedimento y se incubó a 15 °C. El material excretado no cambiado se diluirá infinitamente en el agua y se hidrolizará en un período de días en fragmentos más pequeños sin actividad biológica.

55

Por lo tanto, la presente descripción proporciona una composición y/o pienso para peces que comprende azadiractina para usar como un agente de control de plagas para peces, donde las composiciones que comprenden azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera del agente de control de plagas descritos en la presente se descomponen rápidamente en el ambiente, lo cual reduce el riesgo de contaminación.

60

Además, los inventores descubrieron que mientras que se sabe que los agentes antiectoparasitarios que comprenden azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente muestran propiedades insecticidas potentes, cuando se los administra a los peces y/o están presente como un complemento del pienso para peces, los agentes de control de plagas de este tipo muestran un efecto antiectoparasitario potente. De hecho, los inventores mostraron que el NeemAzal® Technical puede

65

tener un efecto sustancial sobre el *Lepeophtheirus salmonis* en el salmón del Atlántico. El pienso para peces complementado con NeemAzal® Technical (recubierto con este o incorporado en este) puede lograr una reducción en (i) las cantidades de chalimus de *Lepeophtheirus salmonis* acopladas al salmón del Atlántico, (ii) la cantidad de preadultos que evolucionan a adultos, (iii) la producción de huevos en hembras, (iv) la cantidad total de adultos hembra y (v) la proporción de gestantes. En particular, los inventores notaron que en los peces (Salmo salar) infectados con chalimus de *Lepeophtheirus salmonis* y las etapas preadultas, se quitó aproximadamente el 92 % de chalimus y el 74 % de las hembras preadultas después del uso del pienso para peces proporcionado por medio de la presente invención (a saber, el pienso para peces complementado con NeemAzal® Technical).

Un método para controlar, prevenir o tratar infecciones o infestaciones por plagas de peces se describe también, tal método comprende administrar a los peces que lo necesitan, una cantidad de un pienso para peces de la presente descripción. El método puede encontrar una aplicación particular en la prevención y/o tratamiento de infecciones y/o infestaciones por ectoparásitos, lo que incluye infecciones y/o infestaciones que comprenden infecciones o infestaciones por piojos de mar en peces salvajes y/o de cría. En los métodos de este tipo el pienso para peces puede comprender un agente que se puede obtener de una planta del género Azadirachta. Por ejemplo, el pienso para peces puede comprender azadiractina A, NeemAzal®, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente.

Los métodos de la presente descripción pueden implicar además el uso de composiciones, por ejemplo, composiciones líquidas (o acuosas) que comprenden azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente. Las composiciones de este tipo se pueden administrar de forma separada y/o simultánea con los piensos para peces descritos en la presente.

Se reconoce que diferentes tipos de tratamiento pueden afectar el apetito de un pez. Asimismo, los peces enfermos/infectados y/o los peces menos agresivos tienden a comer menos que los peces dominantes y saludables. Con el fin de controlar una plaga y superar los problemas que se asocian con la pérdida de apetito por la enfermedad, la infección y/o infestación, se puede agregar cualquier forma de agente de control de plagas descrito en la presente directamente al agua como un tratamiento de baño a efectos de comenzar el tratamiento y mejorar el apetito. Después de esto, se puede administrar un pienso para peces de la presente invención.

Por lo tanto, la descripción proporciona un pienso para peces que comprende azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente y una composición que comprende azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente, para usar a efectos de controlar, tratar y/o prevenir una infección/infestación por plaga de un pez, donde se pretende que el pienso se administre junto/simultáneamente con la composición, después y/o de forma separada de esta.

La descripción proporciona también un método para controlar, prevenir y/o tratar una infección/infestación por plaga de un pez, dicho método comprende administrar a un pez que lo necesita, una composición que comprende azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente y un pienso que comprende azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente, donde la composición se administra junto/simultáneamente con el pienso, después y/o de forma separada de este.

Por consiguiente, los métodos de la presente descripción pueden aprovechar las composiciones y/o piensos para peces, los cuales son adecuados para los peces, lo que incluye cualquier pez que pertenezca a las distintas familias que se detallaron anteriormente, lo que incluye, por ejemplo, aquellos que pertenecen a la familia Salmonidae y que comprende azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente.

Debe entenderse que los peces «que lo necesitan» pueden ser peces que están infectados y/o infestados con una o más plagas, lo que incluye, por ejemplo, ectoparásitos (por ejemplo, piojos de mar) o peces que están predisuestos y/o son susceptibles a la plaga, lo que incluye ectoparásitos, infecciones/infestaciones.

La «cantidad» del agente a administrarse como parte del pienso para peces (en otras palabras, la dosis del agente (por ejemplo, azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente)) puede ser cualquier cantidad o dosis que sea eficaz para tratar o prevenir una plaga, lo que incluye ectoparásitos, infección/infestación. La dosis administrada puede variar dependiendo de múltiples factores tales como el pez y/o las especies de parásitos, la edad del pez, las condiciones del agua y/o el nivel de infección.

Se describe también un agente de control de plagas (por ejemplo, un agente antiectoparasitario) para usar a efectos de tratar y/o prevenir infecciones y/o infestaciones por plaga (ectoparásitos) en peces. El agente de control de plagas puede administrarse aplicando el agente a un pienso para peces, como un tratamiento de baño

- 5 y/o mediante administración parenteral. El agente de control de plagas puede comprender azadiractina A. El agente de control de plagas puede comprender o comprende además NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas de la descripción. Un experto observará que las composiciones de la presente descripción que comprenden azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o un agente de control de plagas descrito en la presente pueden formularse agregando agua.
- Se describe un tratamiento de baño para peces, dicho tratamiento comprende azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente.
- 10 En vista de lo anterior, la presente descripción proporciona también azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente para usar a efectos de tratar o prevenir infecciones/infestaciones por piojos de mar en los peces.
- 15 La descripción puede proporcionar también el uso de azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o un agente de control de plagas descrito en la presente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una infección/infestación por plaga de peces. El medicamento puede encontrar aplicación particular en el tratamiento y/o prevención de infecciones/infestaciones por ectoparásitos en los peces. Los medicamentos pueden aprovecharse en el tratamiento y/o la prevención de infecciones y/o infestaciones por piojos de mar en peces que pertenecen a la familia *Salmonidae*.
- 20 Los agentes de control de plagas para usar y los medicamentos de la presente descripción se pueden administrar de forma parenteral como un tratamiento de baño y/o en piensos.
- 25 Se describe un pienso para peces para usar en el tratamiento y/o la prevención de una infección/infestación por ectoparásitos de los peces. El pienso para peces para usar, puede comprender azadiractina A, NeemAzal®, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente.
- 30 Se describe un complemento de pienso para peces, donde dicho complemento comprende un agente de control de plagas (es decir, del tipo que se describe en la presente). El complemento se puede mezclar con un pienso para peces para proporcionar un pienso para peces de la presente descripción. El complemento puede encontrarse en forma líquida o sólida. El complemento puede comprender azadiractina A, NeemAzal®, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente.
- 35 Se describe un método para elaborar un pienso para peces complementado de la presente descripción, dicho método comprende la etapa de mezclar un pienso para peces con una o más composiciones y/o agentes de control de plagas descritos en la presente para proporcionar un pienso para peces complementado. El método para elaborar un pienso para peces complementado de la presente descripción puede comprender mezclar un pienso para peces con una cantidad de agente de control de plagas tal como azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente. Debe entenderse que el
- 40 pienso para peces puede ser un pienso sólido o un pienso líquido. Cuando el pienso para peces es un pienso sólido, el agente antiectoparasitario puede mezclarse en primer lugar con el pienso para peces para proporcionar un pienso para peces complementado, el pienso para peces complementado puede constituirse luego en gránulos y/o copos, según sea necesario.
- 45 De manera adicional o alternativa, un método para elaborar un pienso para peces complementado de la presente descripción puede comprender la etapa de proporcionar un pienso para peces y aplicar una cantidad de agente de control de plagas a una superficie del pienso. Por ejemplo, el método puede comprender recubrir la capa superior del pienso con una cantidad de agente de control de plagas. Cuando el agente de control de plagas comprende, por ejemplo, azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente, el método puede comprender aplicar una cantidad (por ejemplo, aproximadamente 0,1g a aproximadamente 1000g/kg o 0,1 g/kg, 1 g/kg, 2 g/kg, 3 g/kg, 4 g/kg, 5 g/kg, 6 g/kg, 7 g/kg, 8 g/kg, 9 g/kg o 10 g/kg, 20g/kg, 30g/kg, 40g/kg, 50 g/kg, 60 g/kg, 70 g/kg, 80 g/kg, 90 g/kg, 100 g/kg, 250 g/kg, 500 g/kg, 750 g/kg) de azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente a una superficie de un pienso para peces, por ejemplo, un gránulo de pienso para peces o copo de pienso para peces. El método puede comprender además la etapa de sellar el agente de control de plagas que se aplica a una superficie del pienso para peces. El agente de control de plagas puede sellarse mediante la aplicación de un recubrimiento de aceite de pescado al pienso para peces recubierto con agente de control de plagas. Se puede aplicar cualquier sustancia de sellado usada para sellar el agente de control de plagas de manera que esta recubre la totalidad o parte del recubrimiento de agente de control de plagas.
- 60 Además, se describe la azadiractina A para usar a efectos de tratar o prevenir infecciones y/o infestaciones por plaga de peces. La infección y/o infestación por plaga puede ser causada por un ectoparásito, o aportada por este, del tipo que se describe en la presente. A modo de ejemplo, el ectoparásito puede ser una especie de piojo (un piojo de mar, por ejemplo).
- 65

Además, se describe NeemAzal® Technical para usar a efectos de tratar o prevenir infecciones y/o infestaciones por plaga en los peces. La infección y/o infestación por plaga puede ser causada por un ectoparásito, o aportada por este, del tipo que se describe en la presente. A modo de ejemplo, el ectoparásito puede ser una especie de piojo (un piojo de mar, por ejemplo).

5

Además, se describe un agente de control de plagas que contiene azadiractina para usar a efectos de tratar o prevenir infecciones y/o infestaciones por plaga en los peces. La infección y/o infestación por plaga puede ser causada por un ectoparásito, o aportada por este, del tipo que se describe en la presente. A modo de ejemplo, el ectoparásito puede ser una especie de piojo (un piojo de mar, por ejemplo). En un ejemplo, la descripción proporciona un pienso para peces que comprende un extracto de neem para usar a efectos de tratar o prevenir las infecciones y/o infestaciones por plagas en los peces.

10

Se describe un método para tratar o prevenir una infección y/o infestación por plagas de un pez, tal método comprende administrar una cantidad de azadiractina A, NeemAzal® Technical y/o cualquiera de los agentes de control de plagas descritos en la presente a un pez que lo necesite. Una «cantidad» de azadiractina y/o NeemAzal® puede ser cualquier cantidad eficaz para tratar o prevenir la infección/infestación por plagas. Un «pez que lo necesita» puede ser cualquier pez que tenga o padezca una infección/infestación por plagas o cualquier pez predispuesto y/o susceptible a una plaga. La plaga puede ser un ectoparásito. El ectoparásito puede ser una especie de piojo (por ejemplo, una especie de piojo de mar).

15

20

Descripción detallada

A continuación, se describirá la presente invención en detalle con referencia a las siguientes figuras que muestran:

25

Figura 1: Desarrollo de *L. salmonis* unido con el paso del tiempo. Cohorte II de exposición a piojos - Día -2.

Figura 2: Desarrollo de *L. salmonis* unido con el paso del tiempo. Finales del tratamiento - Día 6.

Figura 3: Desarrollo de *L. salmonis* unido con el paso del tiempo. Muestra 1 - Día 13.

Figura 4: Desarrollo de *L. salmonis* unido con el paso del tiempo. Muestra 2 - Día 28.

30

Figura 5: Estudio complementario A: Cantidades de piojos (todas las etapas) el día 13 (7 días después del tratamiento).

Figura 6: Estudio complementario A: Cantidades de piojos (chalimus > preadultos) el día 13 (7 días después del tratamiento). Los resultados muestran una reducción de ~92 % en las cantidades de chalimus que evolucionan a preadultos.

35

Figura 7: Estudio complementario A: Cantidades de piojos (preadultos > adultos) el día 13 (7 días después del tratamiento). Los resultados muestran una pequeña reducción en las cantidades de preadultos que evolucionan a preadultos.

Figura 8: Estudio complementario A: Cantidades de piojos el día 13 (adulto macho frente a todas las hembras: 7 días después del tratamiento). Los resultados muestran una reducción de ~74 % en piojos preadultos que evolucionan a hembras adultas. Los resultados muestran también que hubo poco efecto en aquellos que evolucionan a machos adultos.

40

Figura 9: Estudio complementario A: Cantidades de piojos (hembras gestantes frente a no gestantes) el día 13 (7 días después del tratamiento). Los resultados muestran que el 57 % de las hembras adultas en los tanques de control tienen cadenas de huevos y que 5 % de las hembras adultas en los tanques tratados tienen cadenas de huevos. Esto equivale a una reducción de 98% en la producción de cadenas de huevos.

45

Figura 10A y B: Estudio complementario A: Cantidades de piojos el día 28 (3 semanas después del tratamiento). Día 13; A: día 13 preadultos y adultos; B: día 28 adultos solamente.

Figura 11: Estudio complementario A: Cantidades de piojos macho el día 28 (3 semanas después del tratamiento). Piojos machos (lo que incluye todos los preadultos y adultos); en el grupo de control, las cantidades descendieron en un 35 %. En el grupo tratado, las cantidades descendieron en un 30%. No hubo ningún efecto considerable en piojos macho

50

Figura 12: Estudio complementario A: cantidades de piojos hembra el día 28 (3 semanas después del tratamiento). Piojos hembra (lo que incluye todos los preadultos y adultos); en el grupo de control las cantidades descendieron en un 42 %. En el grupo tratado, las cantidades descendieron en un 60%. Alrededor del 30 % de los piojos hembra en peces tratados el Día 13 desaparecieron el Día 28 con respecto a los controles.

55

Figura 13: Estudio complementario A: Cantidades de piojos (hembras gestantes frente a no gestantes) el día 28 (3 semanas después del tratamiento). Los resultados muestran que el 66 % de las hembras adultas en los tanques de control tienen cadenas de huevos mientras que el 13 % de las hembras adultas en los tanques de control tuvieron cadenas de huevos. Esto equivale a una reducción de 98% en la producción de cadenas de huevos.

60

Figura 14: Estudio complementario B parte I: Cantidades de piojos (machos adultos frente a hembras) el día 13 (7 días después del tratamiento). No hubo ninguna diferencia considerable en las cantidades de piojos hembra o macho adultos.

Figura 15: Estudio complementario B parte I: Cantidades de piojos (hembras gestantes frente a no gestantes) el día 13 (7 días después del tratamiento). Los resultados muestran que el 95 % de las hembras adultas en los

65

tanques de control puso cadenas de huevos mientras que el 3 % de las hembras adultas en los tanques de control puso cadenas de huevos. Esto equivale a una reducción de 93% en la producción de cadenas de huevos. Figura 16: Estudio complementario B parte I: Cantidades de piojos (macho) el día 28 (3 semanas después del tratamiento). Todos los piojos machos; en el grupo de control, las cantidades disminuyeron al 20 %. En el grupo tratado, las cantidades descendieron en un 27%. No hubo ningún efecto considerable en cantidades de piojos macho

Figura 17: Estudio complementario B parte I: Cantidades de piojos (hembra) el día 28 (3 semanas después del tratamiento). Todos los piojos hembra; en el grupo de control, las cantidades descendieron en un 48 %. En el grupo tratado, las cantidades descendieron en un 77 %. Las diferencias no son estadísticamente considerables debido a la variabilidad de tanque a tanque.

Figura 18: Estudio complementario B: Cantidades de piojos (hembras gestantes frente a no gestantes) el día 28 (3 semanas después del tratamiento). Los resultados muestran que el 97 % de las hembras adultas en los tanques de control tienen cadenas de huevos mientras que el 7 % de las hembras adultas en los tanques de control tienen cadenas de huevos. Esto equivale a una reducción de 96% en la producción de cadenas de huevos.

Figura 19: Estudio complementario B parte II: Día 36, 7 días después de la exposición, 4 semanas después del tratamiento

Figura 20: Estudio complementario B parte II: Día 36, 7 días después de la exposición, 4 semanas después del tratamiento Los resultados muestran que no hay una reducción considerable en cantidades de hembras o machos adultos.

Figura 21: Estudio complementario B parte II: Día 36, 7 días después de la exposición, 4 semanas después del tratamiento Hembras gestantes frente a las no gestantes; los resultados muestran que el 94 % de las hembras adultas en los tanques de control tienen cadenas de huevos mientras que el 88 % de las hembras adultas en los tanques tratados puso cadenas de huevos. No hay una reducción considerable.

Figura 22: Estudio complementario B parte II: Día 55, 3 semanas después de la exposición, 7 semanas después del tratamiento Machos frente a hembras; no hay ninguna reducción considerable en cantidades de hembras o machos adultos.

Figura 23: Estudio complementario B parte II: Día 55, 3 semanas después de la exposición, 7 semanas después del tratamiento

Figura 24: Estudio complementario B parte II: Día 55, 3 semanas después de la exposición, 7 semanas después del tratamiento Hembras gestantes frente a las no gestantes; los resultados muestran que el 88% de las hembras adultas en los tanques de control tienen cadenas de huevos mientras que el 84% de las hembras adultas en los tanques tratados puso cadenas de huevos. No hay una reducción considerable.

Evaluación de la eficacia del NeemAzal® contra los piojos de mar (*Lepeophtheirus salmonis*) que afectan al salmón del Atlántico

Lo que sigue a continuación representa los resultados de un ensayo principal del efecto del agente de control de plagas (es decir, NeemAzal®) agregado al pienso para peces sobre las infecciones/infestaciones por *Lepeophtheirus salmonis* en Salmonidae. El ensayo se llevó a cabo en un instituto de investigación acreditado y demuestra la eficacia de los agentes de control de plagas que contienen azadiractina en el tratamiento del piojo de mar en el salmón. Sin embargo, en el uso comercial las dosificaciones, el tiempo de tratamiento y el período de protección son indicativos solamente y variarán en cuanto a una cantidad de factores que incluyen, de modo no taxativo: especies de peces, ya sea que se usen en agua dulce o marina, temperatura del agua, plaga objetivo, comportamiento de alimentación y condiciones ambientales.

Objetivos

Para evaluar la eficacia del NeemAzal® Technical contra los piojos de mar diferentes, las etapas de vida son de la siguiente manera:

1. Efecto del tratamiento terapéutico en la cantidad de piojos gestantes, producción de huevos y viabilidad de los huevos
2. Efecto del tratamiento terapéutico en la cantidad de piojos de mar y piojos preadultos
3. Efecto del tratamiento anterior en el acoplamiento y desarrollo de copépodos a través de etapas del piojo de mar
4. Efecto del tratamiento anterior en la reinfección por piojos móviles.

Materiales y métodos

- 2 estudios complementarios A & B en paralelo
- Temperatura de 12-15 grados C
- Piojos de mar producidos en cultivo de laboratorio
- Peces infectados con copépodos mediante el uso del modelo de exposición experimental

- A los piojos se los dejó desarrollar hasta la etapa requerida
- Dosificados por alimentación voluntaria durante 7 días
- Peces anestesiados o exterminados y examinados en busca de piojos (cantidades y etapas)
- Muestras de filete para el análisis químico

5

Dosificación

- Objetivo 25 mg de NeemAzal® por kg/día durante 7 días
- Equivalente a aproximadamente 10 mg de azadiractina A por kg/día
- Administrado usando una velocidad de alimentación de 0,5 % de biomasa
- Dieta de prueba recubierta en la parte superior usando 5 g de NeemAzal® por kg de pienso (0,5 % p/p), sellado con aceite de pescado
- Alimentados a mano, 2-4 comidas por día
- Pienso no consumido recolectado para estimar la ingesta real
- Raciones ajustadas diariamente para compensar el pienso no consumido el día previo

10

15

Estudio complementario A

- Tratamiento de peces ya infectados con chalimus y etapas preadultas
- Efecto evaluado en las cantidades de piojos de mar y preadultos en la semana 1 y 3 semanas después del tratamiento
- Efecto evaluado en la producción y viabilidad de huevos de piojos de mar

20

25

Tabla 1: Cronograma para el estudio complementario A

Día	Procedimiento
-26	Exposición a copépodos (cohorte 1)
-12	Los peces se alojaron aleatoriamente en 6 tanques experimentales (41 peces/tanque)
-4	Exposición a copépodos (cohorte II)
-1	Peso por lotes (medio 343 g)
0	Primer día de dietas de prueba
6	Último día de dietas de prueba
13	1 semanas después de la muestra del tratamiento. 20 peces/tanque exterminados y muestreados
28	3 semanas después de la muestra del tratamiento. Peces restantes/tanque exterminados y muestreados

Tabla 2: Estudio complementario A: dosis estimada lograda

30

Dieta	Grupo	Ración media consumida (% de biomasa/día)	Dosis media (mg/kg/día)
Control	A1	0,5	0
Control	A2	0,49	0
Control	A3	0,51	0

NeemAzal®	B1	0,42	20,79
NeemAzal®	B2	0,43	20,26
NeemAzal®	B3	0,45	22,71

Estudio complementario B

- 5
- Parte I: para determinar los efectos del tratamiento terapéutico en piojos adultos adjuntos
 - Parte II: para determinar los efectos del tratamiento profiláctico en el asentamiento y desarrollo de copépodos, la susceptibilidad a la reinfección con piojos móviles, la producción de huevos y el desarrollo en piojos hembra adultos

Estudio complementario B: Parte I

10

- Para establecer los efectos del tratamiento terapéutico en piojos adultos
- Peces infectados con un cohorte de piojos
- Piojos que evolucionaron a adultos y comenzaron la producción de huevos
- Los peces se trataron durante siete días

15

- Se determinaron las cantidades de piojos y etapas (macho, hembra gestante/no gestante) en las semanas 1 y 3 después del tratamiento

Estudio complementario B: Parte II

20

- Para determinar la eficacia a las 3 semanas después del tratamiento contra el asentamiento de copépodos y reinfección de adultos
- Se quitaron los adultos de la parte I
- Los peces fueron expuestos nuevamente con copépodos y piojos adultos a las 3 semanas después del tratamiento

25

- Se tomaron muestras de los piojos después de 7 días y 3 semanas (4 semanas y 7 semanas después del tratamiento)

Tabla 3: Cronograma para el estudio complementario B

Día	Procedimiento
-41	Los peces se alojaron aleatoriamente en tanques experimentales
-37	Exposición a copépodos (cohorte 1)
-24	Peso por lotes (medio 394g)
0	Primer día de dietas de prueba
6	Último día de dietas de prueba
13	1 semanas después de la muestra del tratamiento. Se tomaron muestras de 20 peces/tanque, los piojos se quitaron y los peces se movieron a tanques nuevos para su uso en la parte II
27	3 semanas después de la muestra del tratamiento. Se tomaron muestras de 20 peces/tanque y se los exterminó posteriormente.
28	Parte II: exposición con copépodos y piojos adultos
36	4 semanas después de la muestra del tratamiento. Se tomaron muestras de todos los peces, solamente se quitaron los piojos adultos y los peces fueron devueltos a los tanques

55	7 semanas después de la muestra del tratamiento. Los peces restantes fueron exterminados y se tomaron muestras
----	--

Tabla 4: Estudio complementario B: dosis estimada lograda

Dieta	Grupo	Ración media consumida (% de biomasa/día)	Dosis media (mg/kg/día)
Control	A1	0,48	0
Control	A2	0,49	0
Control	A3	0,49	0
NeemAzal®	B1	0,48	24,46
NeemAzal®	B2	0,49	24,20
NeemAzal®	B3	0,48	24,03

5 Análisis

La presente invención se describirá ahora más detalladamente con referencia a los resultados de un ensayo importante del ingrediente activo que se agrega al pienso.

10 En resumen: el experimento consistió en seis tanques, cada uno con veinte salmones, tres controles («A») y tres tanques de tratamiento («B»).

15 A los peces en tanques experimentales se los alimentó con gránulos de pescado tratados con NeemAzal® de forma tal que estos recibieron, en promedio, 25 mg de NeemAzal®/kg de peso corporal/día durante 7 días, después de lo cual fueron alimentados con alimento de pescado no tratado. Los controles recibieron solamente alimento tratado.

20 Se realizaron tres exposiciones con piojos: en la primera exposición (Figuras 1-13) fue con piojos inmaduros, y en la segunda, solamente se usaron adultos (Figuras 14-18); la tercera exposición fue con piojos inmaduros y maduros 3 semanas después del tratamiento (Figuras 19-24).

25 La primera exposición pretendió seguir los efectos sobre el desarrollo, la segunda exposición estudió los efectos del pienso para peces tratado con NeemAzal® en piojos adultos especialmente con respecto a la fecundidad femenina, y la última exposición tuvo como objetivo estudiar la pérdida de la eficacia de los ingredientes activos con el paso del tiempo.

30 En los intervalos a lo largo del experimento, se contaron los piojos pegados y se establecieron las cantidades de piojos adultos e inmaduros y sus sexos. La fecundidad de las hembras se determinó por medio de la presencia de cadenas de huevos. Las Figuras 1-4 muestran el avance de los piojos a lo largo de sus etapas de desarrollo en el curso del ensayo a lo largo de 4 semanas, comenzando con una mezcla de etapas de chalimus y preadultos y solamente con adultos después de 28 días.

Estudio complementario A: hallazgos clave a los 7 días después del tratamiento.

- 35 • El 92 % del chalimus (a preadultos) que se quitó en el grupo de prueba se comparó con el de control
- Se quitó el 74 % de las hembras preadultas (a adultas)
- Poco efecto en machos preadultos (a adultos)
- La producción de huevos en piojos hembras disminuyó en un 98 % como resultado de la reducción en la cantidad de hembras y una reducción en la proporción de gestantes
- 40 • Los pocos huevos que se produjeron en el grupo de prueba pareció que se incubaron y desarrollaron de forma normal

La Figura 5 representa la cantidad total de piojos, de ambos sexos, en todas las etapas de desarrollo, pegados a los peces, 7 días después del tratamiento. Al descomponer esto en machos y hembras, ambos sexos se

redujeron en un 92 % en las etapas preadultas. Las cantidades de piojos adultos, aunque reducida, no son estadísticamente diferentes a las de los controles.

5 La Figura 6 presenta las cantidades de etapas de chalimus que avanzan a preadultos 7 días después del tratamiento. Las figuras indican una reducción de 92 % (como se indicó anteriormente) en la cantidad de piojos en la etapa de chalimus capaces de evolucionar a preadultos.

10 La Figura 7 presenta las cantidades de piojos preadultos que avanzan a preadultos 7 días después del tratamiento. Los resultados no indican ningún efecto considerable del tratamiento con ingredientes activos en piojos machos que avanzan de la etapa preadulto a adulto, pero no hubo ninguna reducción considerable de 76 % en piojos adultos hembra.

15 La Figura 8 representa las cantidades de piojos machos y hembras adultos 7 días después del tratamiento. Las cantidades resumen los hallazgos anteriores y enfatizan que el desarrollo de las hembras a la etapa adulta se ve gravemente restringido.

20 La Figura 9 representa las cantidades de hembras gestantes y no gestantes 7 días después del tratamiento. En los peces de control, la cantidad de hembras gestantes es un promedio de 57 % de hembras totales, mientras que, en los peces alimentados con el pienso para peces de la invención, la cantidad de hembras gestantes disminuyó al 5 %. Tomando en cuenta la cantidad reducida de piojos hembras en los peces tratados, esto significa una reducción de 98 % en las cadenas de huevos.

Estudio complementario A: hallazgos clave a las 3 semanas después del tratamiento

25

- Todavía no hay ningún efecto en la cantidad de piojos macho
- Se perdieron más piojos hembra en el grupo de prueba que en el grupo de control
- La producción de huevos se prohibió aún en el grupo de prueba
- Los huevos que se produjeron en el grupo de prueba se desarrollaron normalmente. La Figura 10

30 representa las cantidades totales de piojos 7 días después del tratamiento (A) y 21 días después del tratamiento (B). 3 semanas después de que terminara el tratamiento hubo solamente adultos presentes en los peces en contraste con las cantidades a los 7 días, donde la mayoría de los piojos estaban en etapas inmaduras. El tratamiento con pienso para peces de la invención redujo las cantidades de adultos sobrevivientes de ambos sexos en un 87 %.

35 Las Figuras 11 y 12 muestran los resultados de la Figura 10 desglosados por sexo. 3 semanas después de que terminara el tratamiento, la cantidad de machos adultos se redujo en un 64 % en comparación con los de control, mientras que la cantidad de hembras sobrevivientes se redujo en un 90 % en comparación con la de los controles.

40 La Figura 13 muestra la cantidad de hembras gestantes 3 semanas después del tratamiento. No solo se redujeron las cantidades totales de hembras en un 90% como resultado del tratamiento con el pienso de la invención, sino que también casi ninguna de las sobrevivientes era gestante: 12 % en comparación con el 66 % en los peces de control. En general, los peces de control produjeron un total de 884 cadenas de huevos, mientras que los peces tratados produjeron solamente 16 cadenas de huevos, una reducción de 98 % en la

45 cantidad de cadenas.

Estudio complementario B, parte I: hallazgos clave el día 13 (7 días después del tratamiento)

50

- Ninguna reducción considerable en cantidades de piojos machos adultos o hembras adultas
- 93 % de reducción en la cantidad de cadenas de huevos producidas
- Los huevos que se produjeron se desarrollaron de forma normal

55 La Figura 14 presenta las cantidades de piojos 7 días después del tratamiento, después de una infestación por piojos adultos solamente. Cuando la infestación se redujo solamente con piojos adultos, no hubo ninguna mortalidad considerable de piojos 7 días después del tratamiento, lo que indica que, como se esperó a partir de estudios de insectos, el ingrediente activo tiene su efecto principal al interrumpir el proceso de desarrollo.

60 La Figura 15 presenta las cantidades de hembras gestantes 7 días después del tratamiento. Mientras que el 95 % de las hembras de control puso cadenas de huevos, solamente el 3 % de las hembras tratadas con ingrediente activo eran gestantes, una reducción de 93 % en la producción de cadenas de huevos. Esto muestra que el efecto antifecundidad de la dieta que comprende ingredientes activos afectó a hembras maduras.

Estudio complementario B, parte I: hallazgos clave el día 28 (3 semanas después del tratamiento)

- Ningún efecto considerable en las cantidades de macho y hembras adultos

- Efecto continuado en hembras, ninguna producción de huevos todavía

Las Figuras 16 y 17 presentan las cantidades de piojos machos y hembras 13 y 28 días después del tratamiento. No hubo ninguna reducción de cantidades de machos maduros como resultado de la dieta que comprende ingredientes activos. Aunque hubo una reducción aparente en las cantidades de hembras, esta no fue estadísticamente considerable debido a las diferencias entre los tanques.

La Figura 18 representa la fecundidad de piojos hembras 3 semanas después del tratamiento. Los resultados muestran que el efecto de la dieta que comprende ingredientes activos está todavía presente después de tres semanas, ya que la disminución de producción de cadenas de huevos equivale a 96 %.

Estudio complementario B parte II: hallazgos clave

- Ningún efecto profiláctico contra las cantidades de chalimus pegados (exposición de 3 semanas después del tratamiento a 2-15 grados C)
- Ningún efecto profiláctico contra las cantidades de adultos (machos y hembras)
- Ningún efecto profiláctico en la producción de huevos

Las Figuras 19, 20 y 21 representan las cantidades de piojos, macho y hembra y su fecundidad en distintas etapas de desarrollo 4 semanas después del tratamiento.

La exposición a piojos se realizó una semana antes del conteo, y 4 semanas después de que terminó la dieta que comprende ingredientes activos. Los resultados indican que la eficacia de los materiales de ingredientes activos sistémicos cesó.

La Figura 22 representa las cantidades de piojos adultos, macho y hembra, 3 semanas después de la exposición a piojos y 7 semanas después del tratamiento. Los resultados enfatizan que los piojos no tuvieron ninguna restricción en su evolución a adultos entre 4-7 semanas después del tratamiento, lo que confirma que una cantidad eficaz de los ingredientes activos no estuvo más presente en los peces.

Las Figuras 23 y 24 representan las cantidades y la fecundidad de piojos hembra, 3 semanas después de la exposición a piojos y 7 semanas después del tratamiento. Con la excepción de uno de los tanques de prueba, no hubo ninguna diferencia en las cantidades de hembras adultas o su fecundidad.

Conclusiones

- El tratamiento con pienso para peces que comprende NeemAzal® fue muy eficaz en reducir las cantidades de chalimi pegados, en más de 90 %.
- El tratamiento fue eficaz en reducir las cantidades de preadultos, en menor medida, es decir que las hembras se van más afectadas que los machos (17 % de reducción de machos preadultos y 76 % de reducción de hembras preadultas).
- El tratamiento tuvo un pequeño efecto en las cantidades de piojos adultos, en las hembras se redujo levemente y la cantidad de machos es similar en grupos tratados y no tratados.
- El tratamiento eliminó eficazmente la producción de huevos en hembras gestantes. El tratamiento previno la producción de huevos en piojos en desarrollo que sobrevivieron al tratamiento.

Datos adicionales

Dos tanques de treinta y cinco salmones del Atlántico fueron infectados de forma experimental con piojos de mar que luego se los dejó evolucionar a etapas de machos adultos móviles y hembras adultas gestantes. Los peces en un tanque se trataron mediante alimentación voluntaria usando pienso medicado que contiene el producto a base de neem (NeemAzal®) en una dosis de 25mg/kg de biomasa por día durante 7 días, el otro tanque no fue tratado. El pienso medicado pareció consumirse bien y no hubo ninguna mortalidad o signo de reacción adversa en cualquiera de los peces de prueba. Las cantidades de piojos de mar pegados que se contaron 3 semanas después del tratamiento, fueron considerablemente más bajas en el tanque tratado con el producto a base de neem ($7,8 \pm 3$ de piojos por pez en el tanque tratado frente a $16,71 \pm 5,8$ por pez en el tanque de control). Los resultados se muestran en la Figura 25. Además, se redujo considerable la producción de huevos en peces tratados infectados con piojos hembra. De un total de 117 piojos hembra adultos en los peces tratados, solamente dos pusieron cadenas de huevos (1,7 %). En el tanque de control, se registró un total de 177 de piojos hembra adultos de los cuales 173 puso cadenas de huevos (97,7 %). Los resultados se muestran en la Figura 26.

Características de la Azadiractina A

ES 2 778 844 T3

	CIPAC N.º: 627
	CAS N.º: 11141-17-6
	Fórmula molecular: C ₃₅ H ₄₄ O ₁₆
5	Masa molecular: 720,7 g.mol ⁻¹
	Solubilidad en agua (20 °C): 2,9 g.L ⁻¹
	Coefficiente de partición: 0,85-0,95
	DT50 en agua dulce: pH 4,0: 50 días
	pH 7,0: 19 días
10	pH 8,0: 4 días
	DT50 (luz solar): 118 min
	DT50 en el suelo del campo (20 °C): 4-5 días
	DT50 en agua de mar (16 °C): 8 días (No GLP/GEP)
15	DT50 en sedimento de granja piscícola (Skye): 3 semanas (No GLP/GEP)
20	
25	
30	
35	
40	
45	
50	
55	

REIVINDICACIONES

1. Un pienso para peces que comprende:

- 5 (i) alimento para peces; o
(ii) material proteínico, carbohidratos y grasas;

el pienso comprende, además:

10 (iii) una formulación que comprende (% p/p):

- 15 Azadiractina A 34
Azadiractina B aprox. 5,5
Azadiractina D aprox. 2,1
Azadiractina E \leq 1
Azadiractina F \leq 1
Azadiractina G \leq 1
Azadiractina H aprox. 2,3
Azadiractina I aprox. 0,8
20 Azadiractina K y otras Azadiractinas < 2 Azadiractina aprox. 2;
en donde la suma de las azadiractinas es: 51,7 %.

2. El pienso para peces de la reivindicación 1, donde el pienso para peces no comprende aceite de neem.

25 3. El pienso para peces de cualquier reivindicación precedente, donde el pienso para peces comprende además uno o más componentes adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en: agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicos, agentes antiparasitarios y/o complementos nutricionales.

4. Un pienso para peces que comprende:

- 30 (i) pienso para peces; o
(ii) material proteínico, carbohidratos y grasas; el pienso comprende, además:
(iii) azadiractina;
para usar a efectos de tratar y/o prevenir infecciones y/o infestaciones por plagas en los peces, donde al
35 menos uno de: infección/infestación por plagas es una infección/infestación por ectoparásitos y/o
infección/infestación por plagas es provocado por el *Lepeophtheirus salmonis* o aportado por este.

5. El pienso para peces para usar según la reivindicación 4, donde la azadiractina se proporciona como una formulación que comprende (% p/p):

- 40 Azadiractina A 34
Azadiractina B aprox. 5,5
Azadiractina D aprox. 2,1
Azadiractina E \leq 1
Azadiractina F \leq 1
45 Azadiractina G \leq 1
Azadiractina H aprox. 2,3
Azadiractina I aprox. 0,8
Azadiractina K y otras Azadiractinas < 2
Azadiractina aprox. 2;

50 en donde la suma de las azadiractinas es: 51,7 %.

6. El pienso para peces para usar según las reivindicaciones 4 o 5, donde el pienso para peces no comprende aceite de neem.

55 7. El pienso para peces para usar según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el pienso para peces comprende además uno o más componentes adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en: agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicos, agentes antiparasitarios y/o complementos nutricionales.

60 8. El pienso para peces de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el pienso para peces para usar según las reivindicaciones 4 a 7, donde el pienso es para especies de peces que pertenecen a una o más familias que se seleccionan del grupo que consiste en Cyprinidae, Cichlidae, Pangasiidae, Sciaenidae, Serranidae, Carangidae, Sparidae, lateolabracidae, Moronidae, Mugilidae, Cypriniformes, Latidae, Eleotridae, Tilapiini y Salmonidae.

65

9. El pienso para peces para usar según las reivindicaciones 4 a 8, donde el pienso se pretende administrar junto/simultáneamente con, después y/o de forma separada de una segunda composición enriquecida con azadiractina.

5 10. El pienso para peces para usar según la reivindicación 9, donde la segunda composición comprende una azadiractina que se selecciona del grupo que consiste en:

- 10 (i) azadiractina extraída de *Azadirachta indica*;
 (ii) azadiractina producida de forma sintética;
 (iii) azadiractina A extraída de *Azadirachta indica*;
 (iv) azadiractina A producida de forma sintética;
 (v) un extracto de neem enriquecido en azadiractina A;
 (vi) una formulación que comprende (% p/p):

- 15 Azadiractina A 34
 Azadiractina B aprox. 5,5
 Azadiractina D aprox. 2,1
 Azadiractina E \leq 1
 Azadiractina F \leq 1
 20 Azadiractina G \leq 1
 Azadiractina H aprox. 2,3
 Azadiractina I aprox. 0,8
 Azadiractina K y otras Azadiractinas < 2
 Azadiractina aprox. 2

25 en donde la suma de azadiractinas es: 51,7 %

30 (vii) una formulación rica en azadiractina A se puede obtener mediante un método que comprende las etapas de triturar semillas de árbol de neem, extraer azadiractina de las semillas trituradas con agua y luego extraer azadiractina del agua usando un solvente no acuoso que no es miscible en agua y tiene una mayor solubilidad de azadiractina que el agua o un tensioactivo que tiene una temperatura de turbidez de entre 20 °C y 80 °C, y recuperar azadiractina concentrada de la segunda solución de extracción.

35 11. Un método para elaborar un pienso para peces complementado con azadiractina con una formulación, dicho método comprende mezclar:

- (i) pienso para peces; o
 (ii) material proteínico, carbohidratos y grasas; con una formulación que comprende (% p/p):

- 40 Azadiractina A 34
 Azadiractina B aprox. 5,5
 Azadiractina D aprox. 2,1
 Azadiractina E \leq 1
 Azadiractina F \leq 1
 Azadiractina G \leq 1
 45 Azadiractina H aprox. 2,3
 Azadiractina I aprox. 0,8
 Azadiractina K y otras Azadiractinas < 2
 Azadiractina aprox. 2;

50 en donde la suma de las azadiractinas es: 51,7.

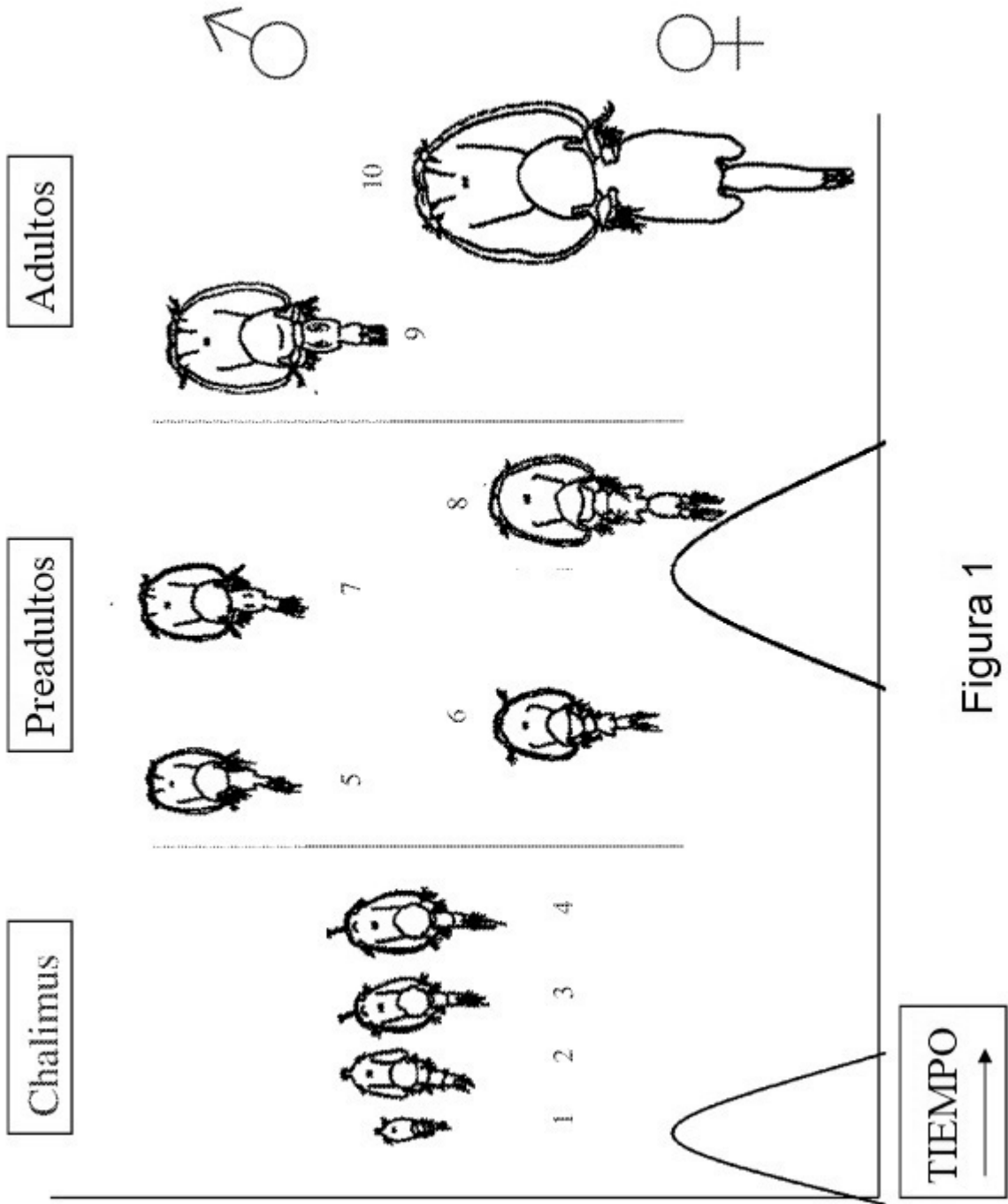


Figura 1

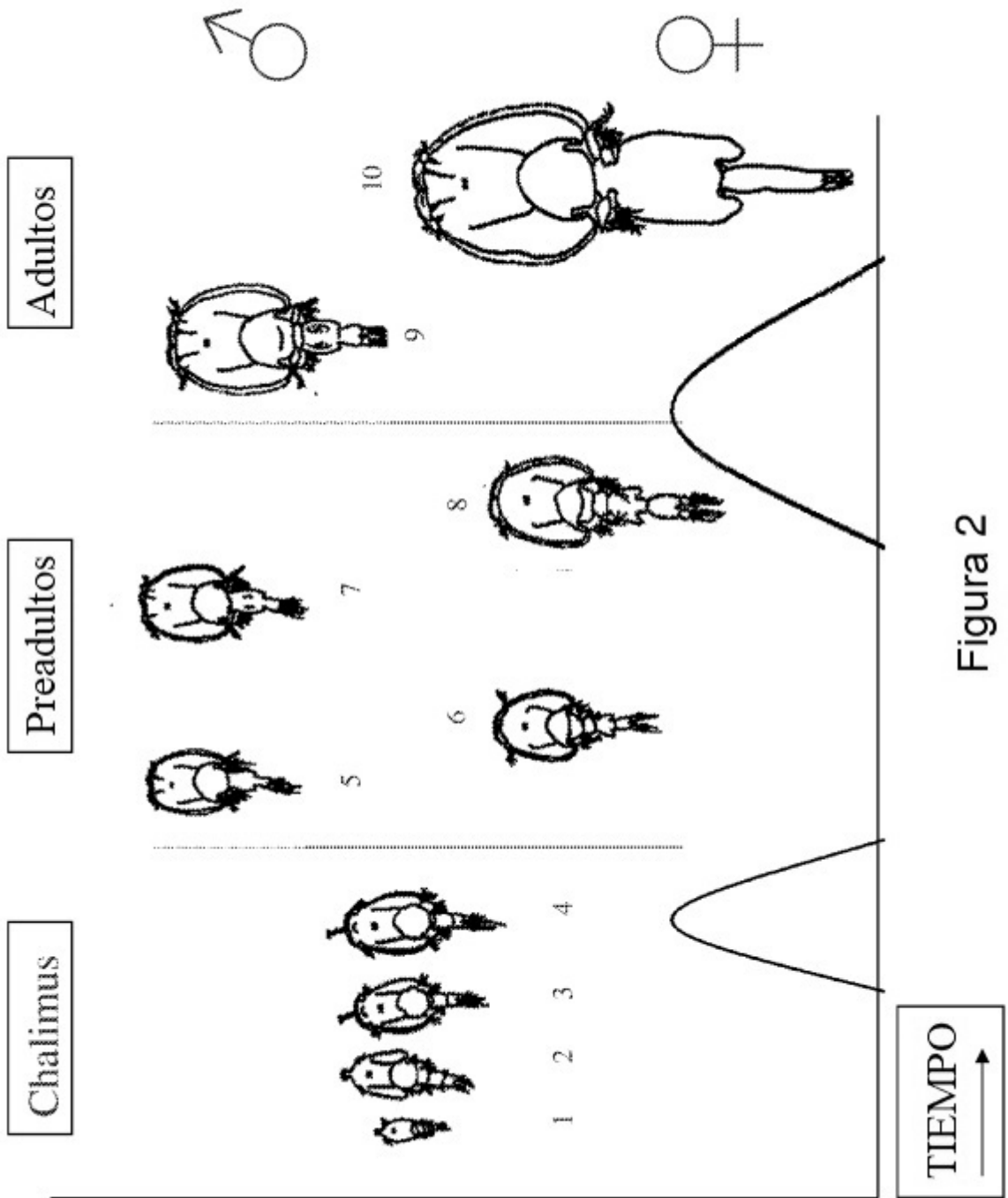


Figura 2

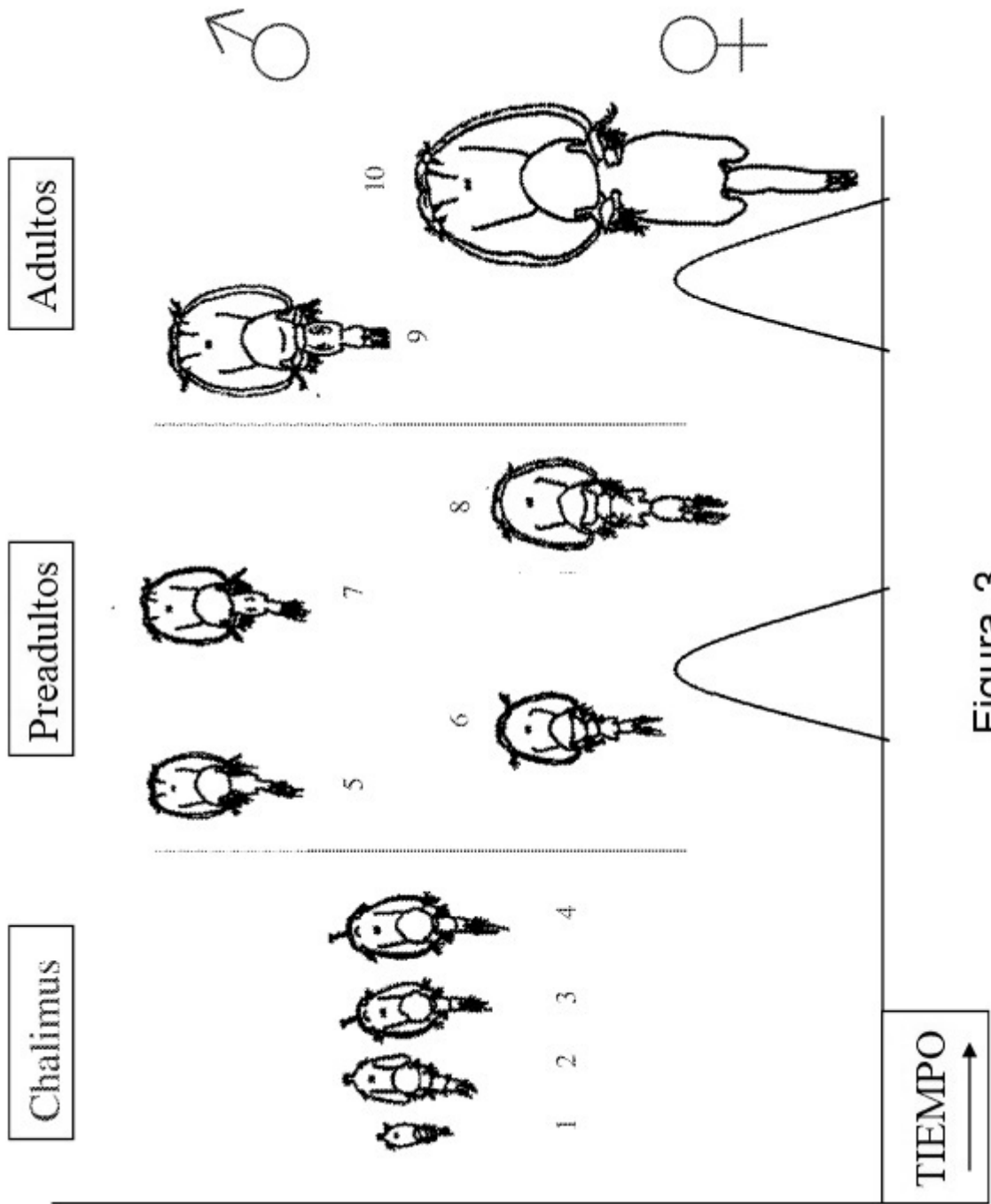


Figura 3

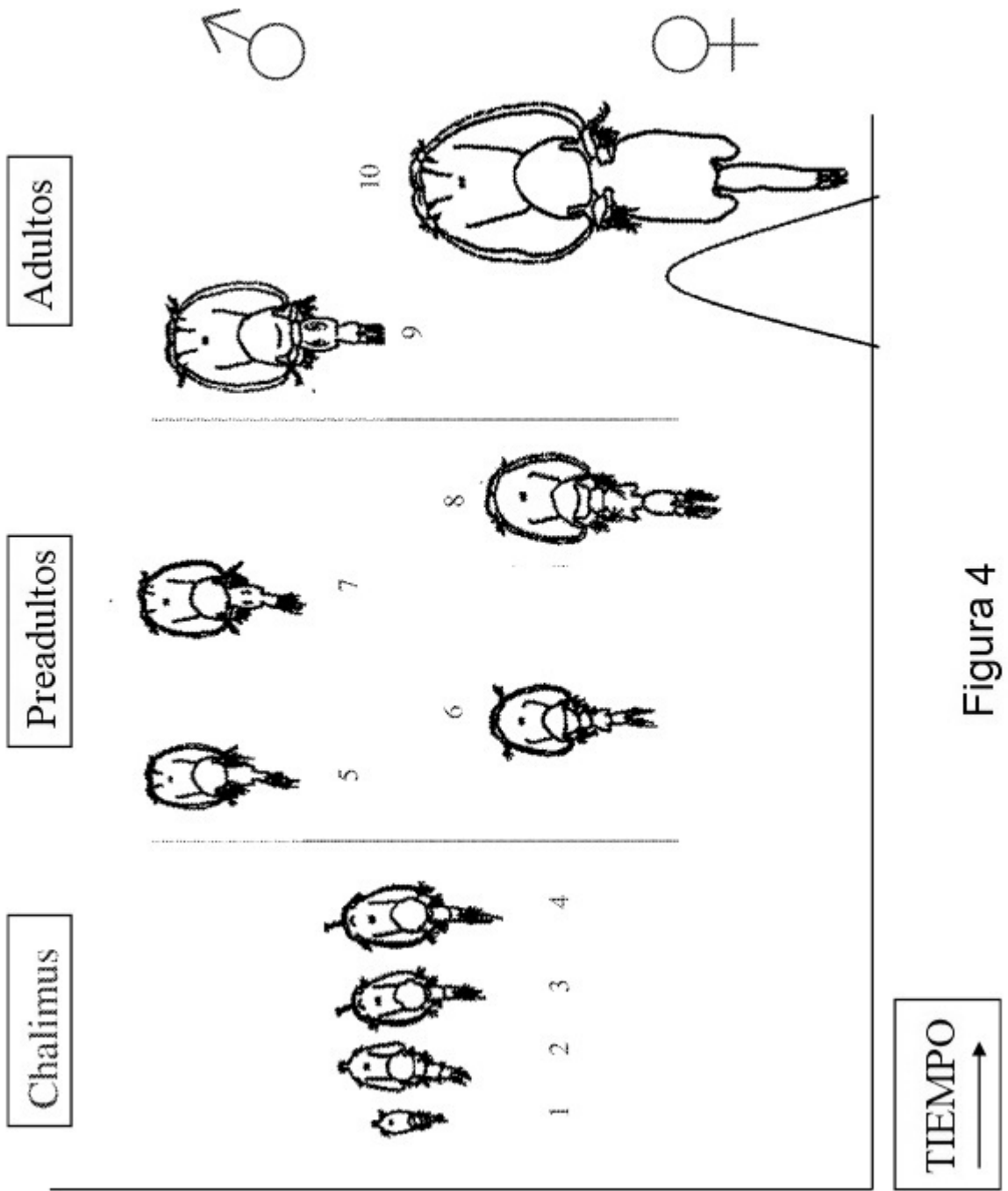


Figura 4

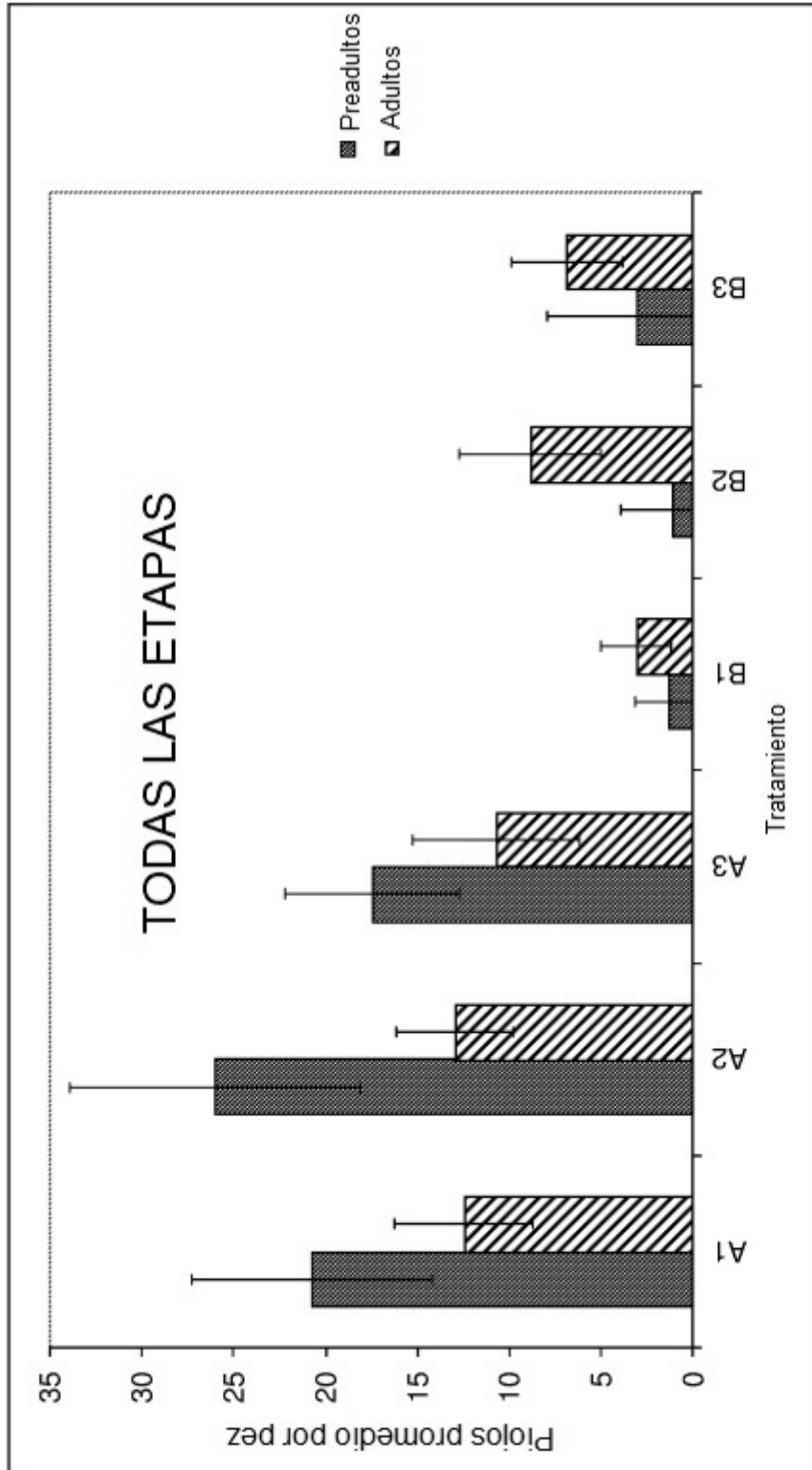


Figura 5

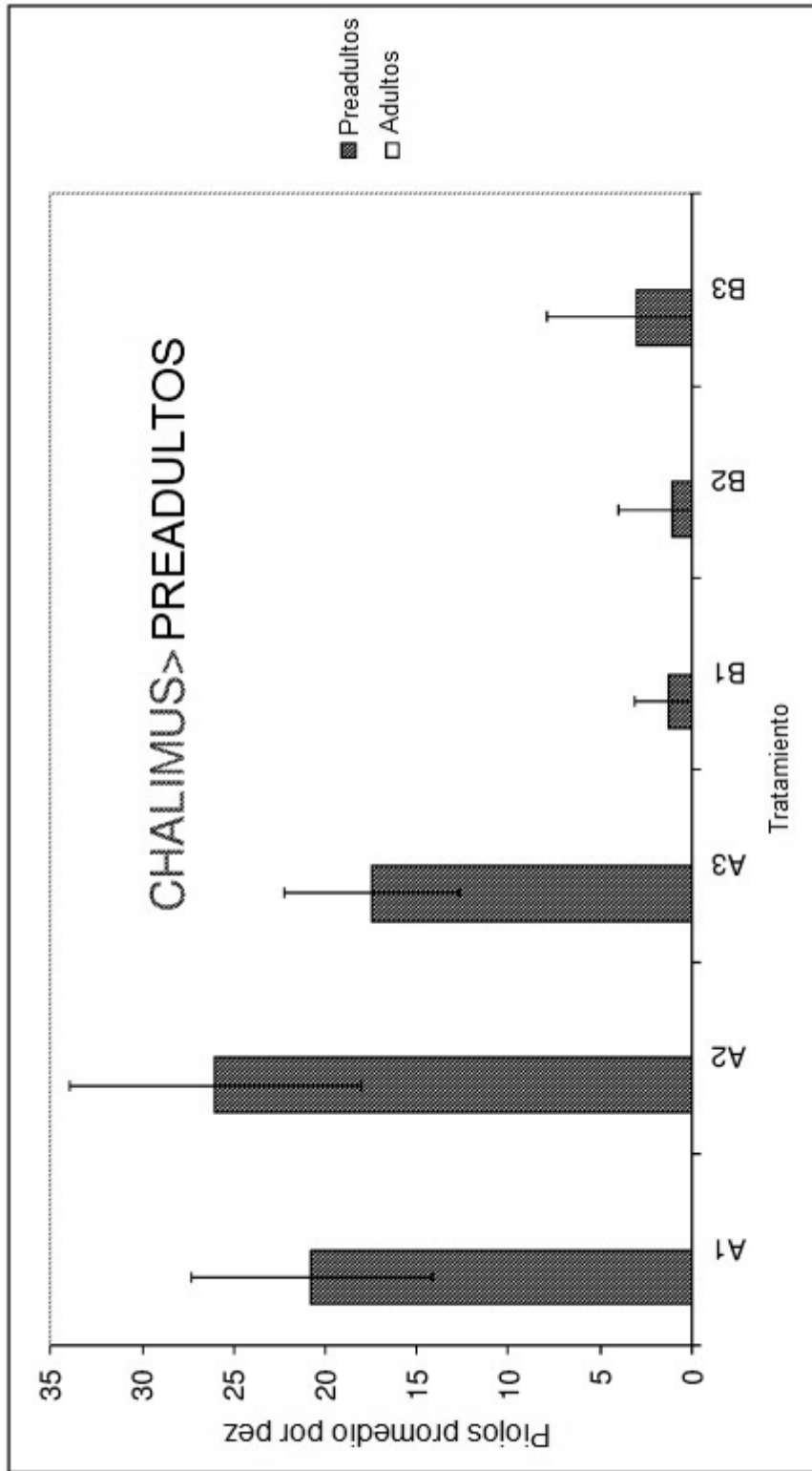


Figura 6

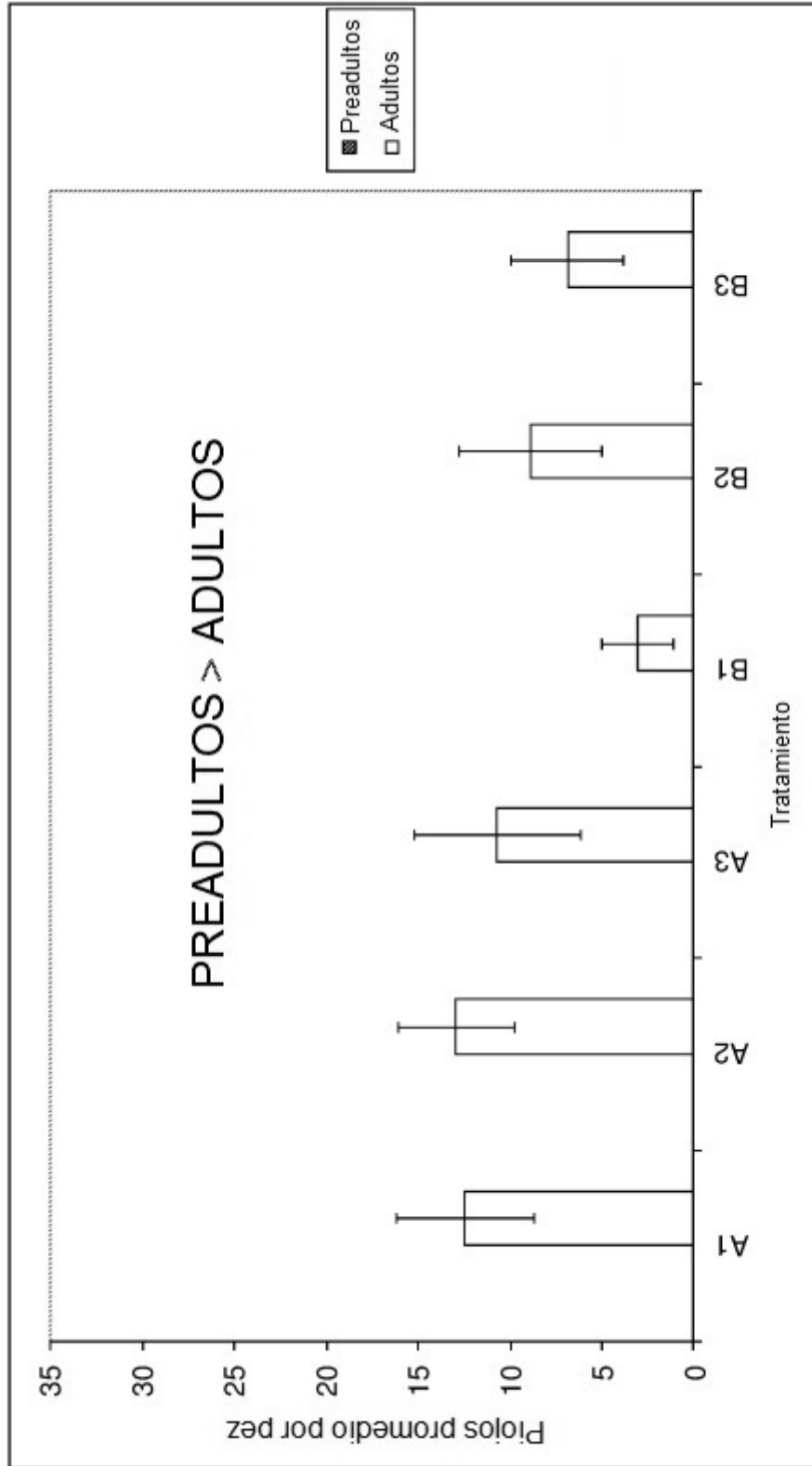


Figura 7

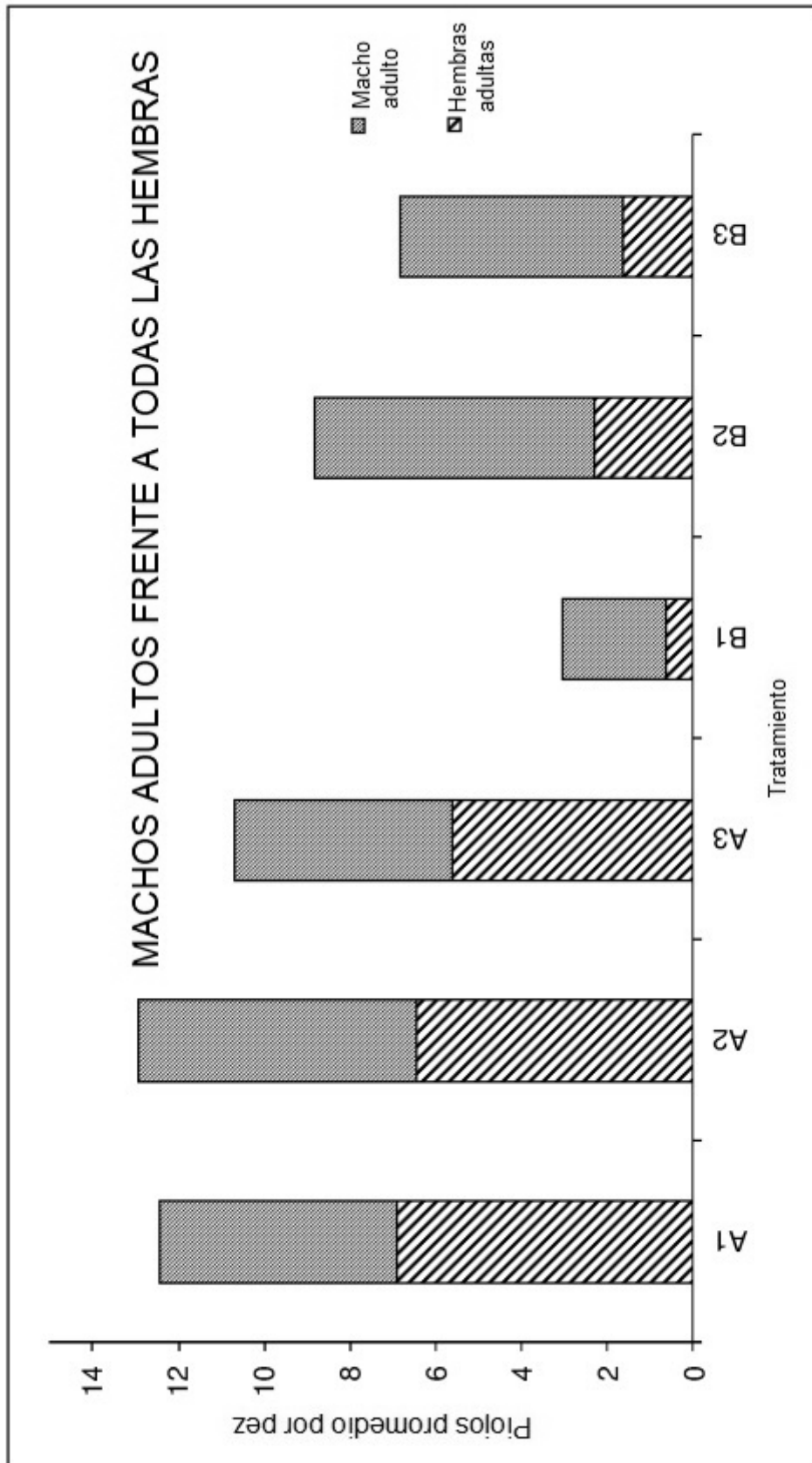


Figura 8

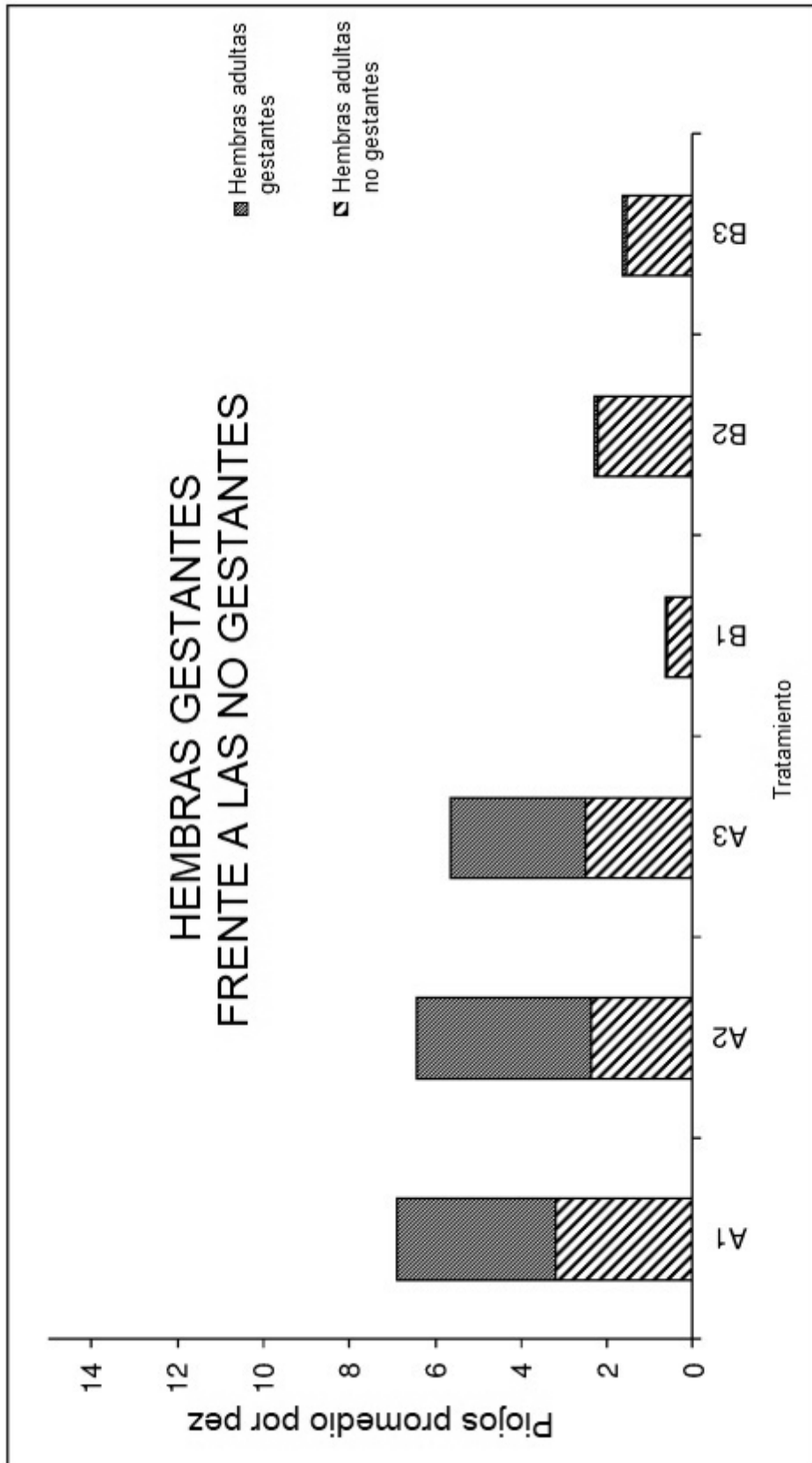


Figura 9

Figura 10 A

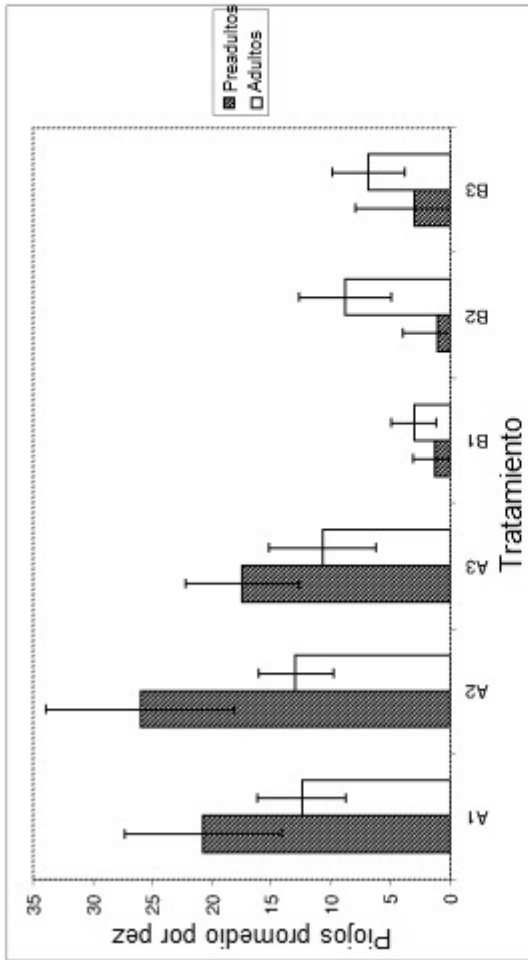
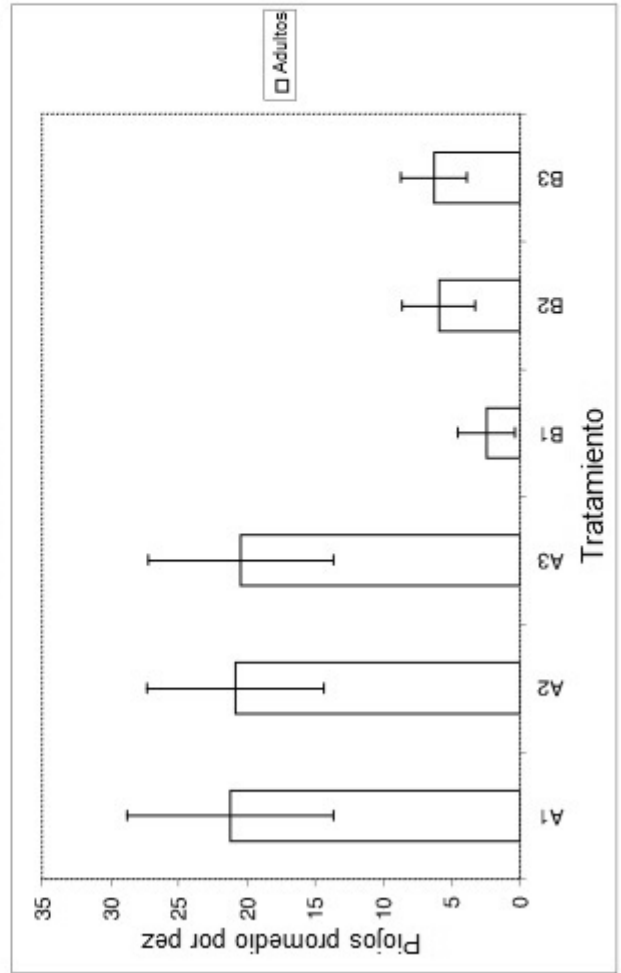


Figura 10 B



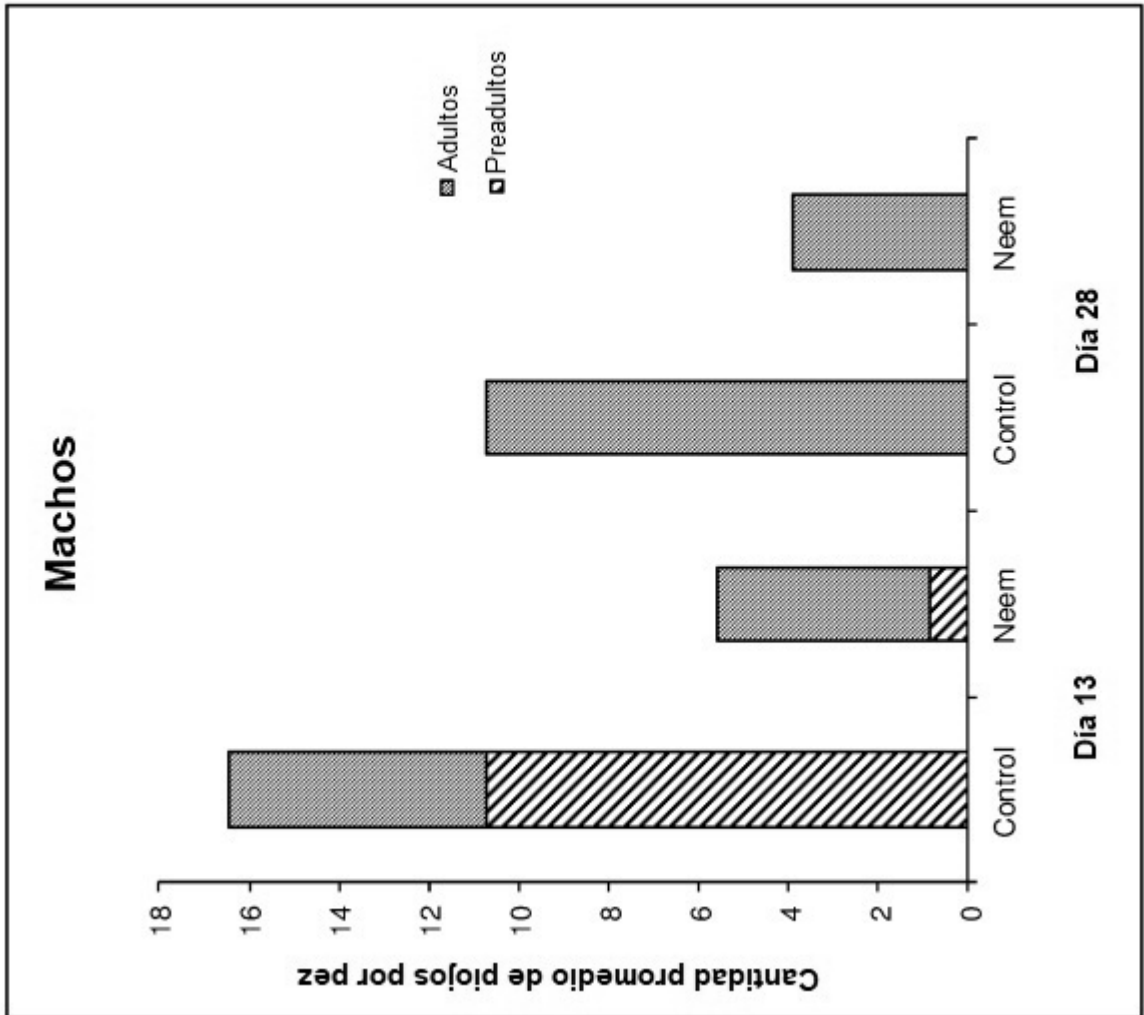


Figura 11

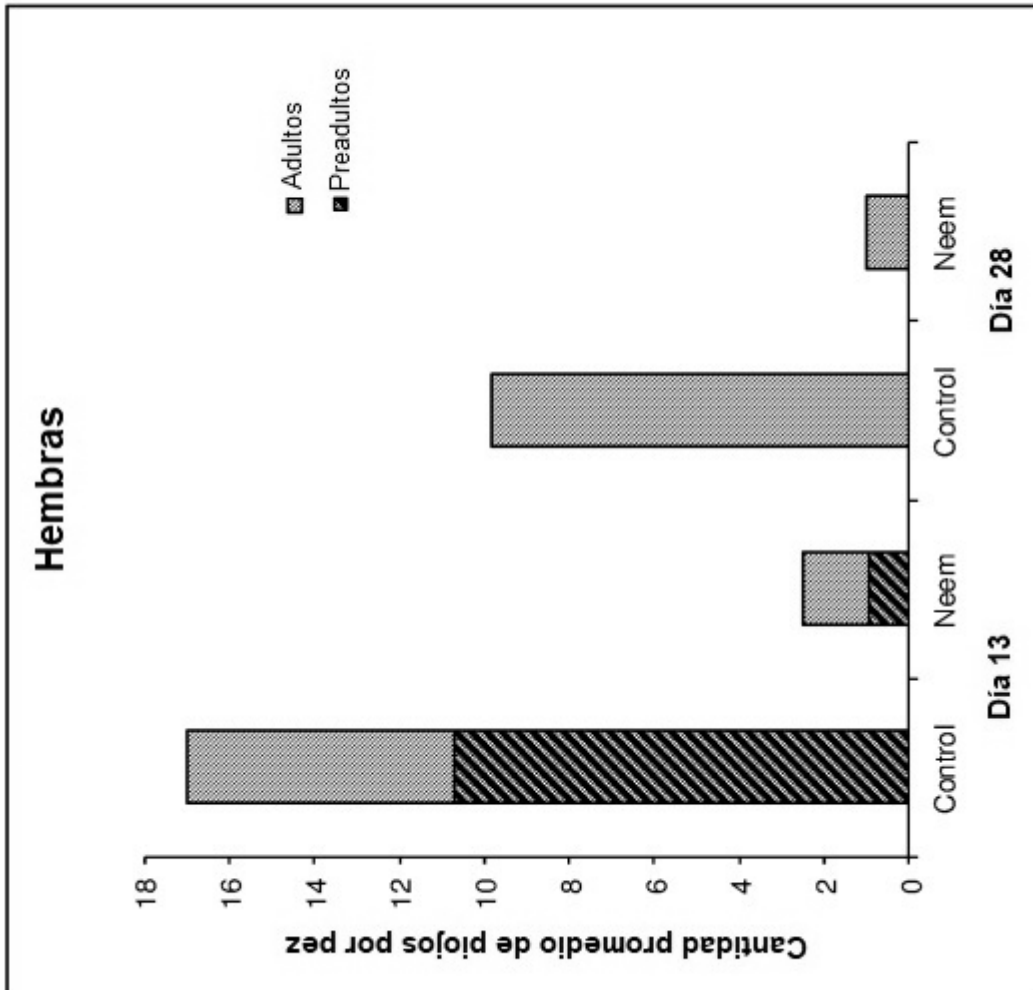


Figura 12

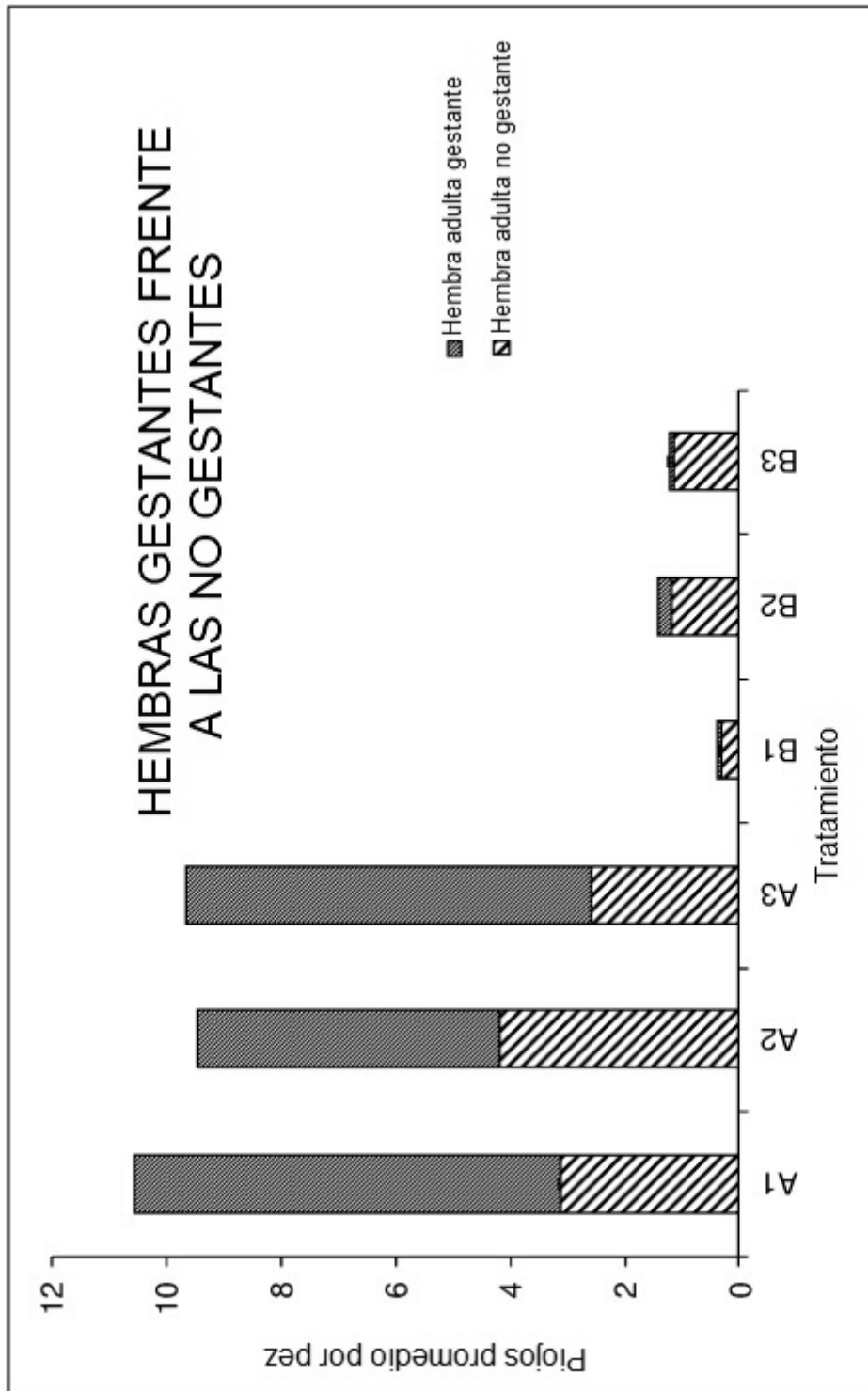


Figura 13

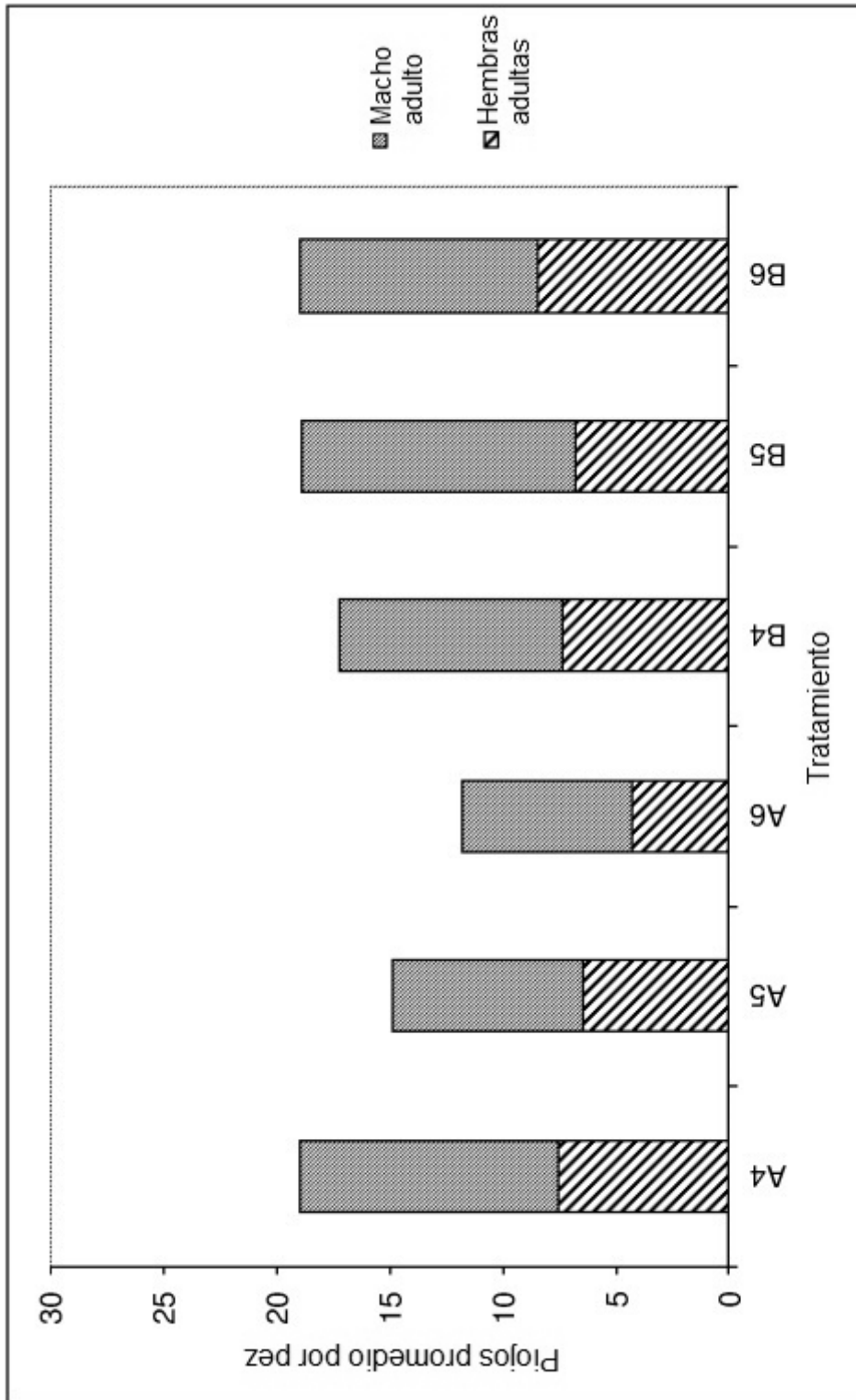


Figura 14

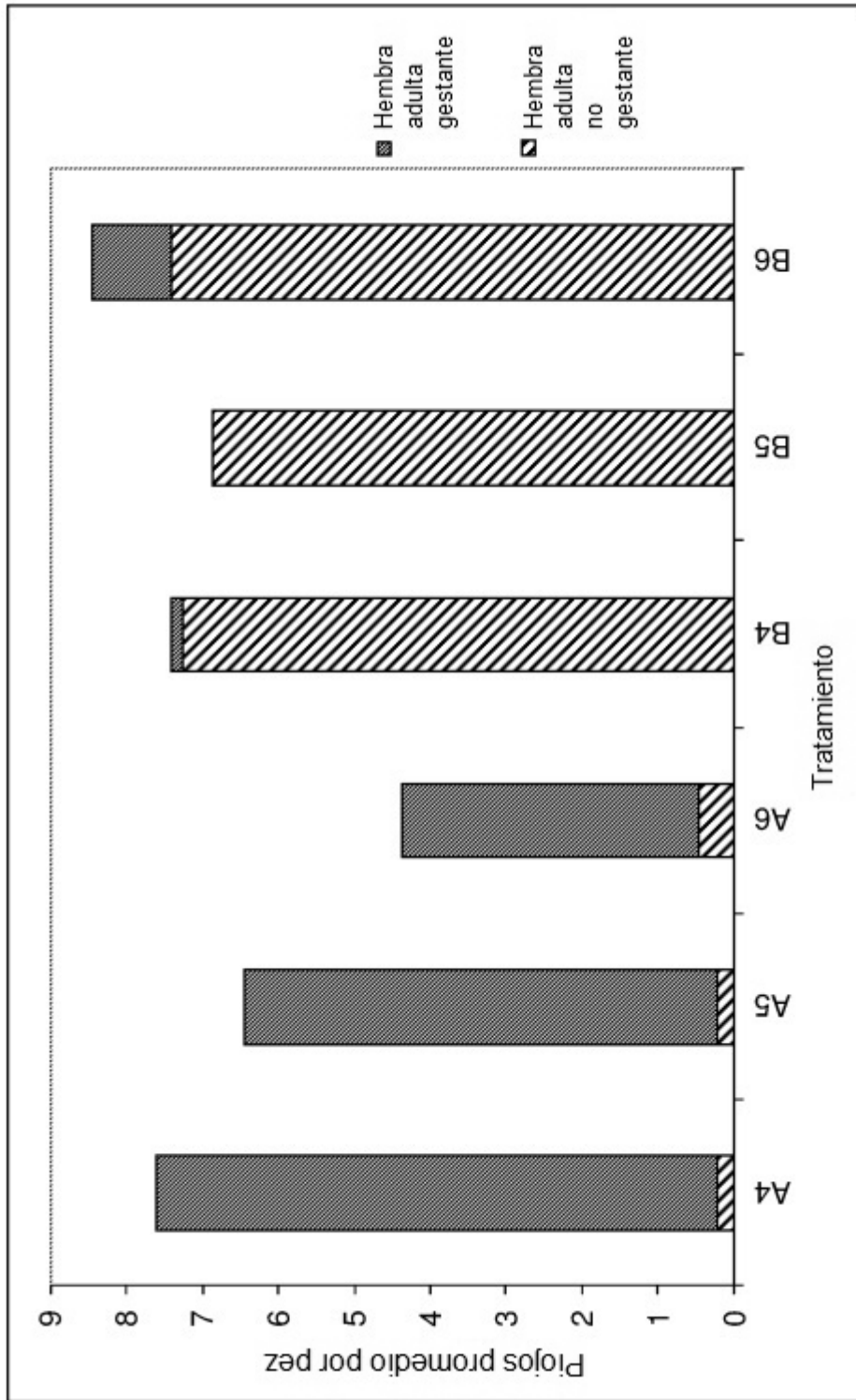


Figura 15

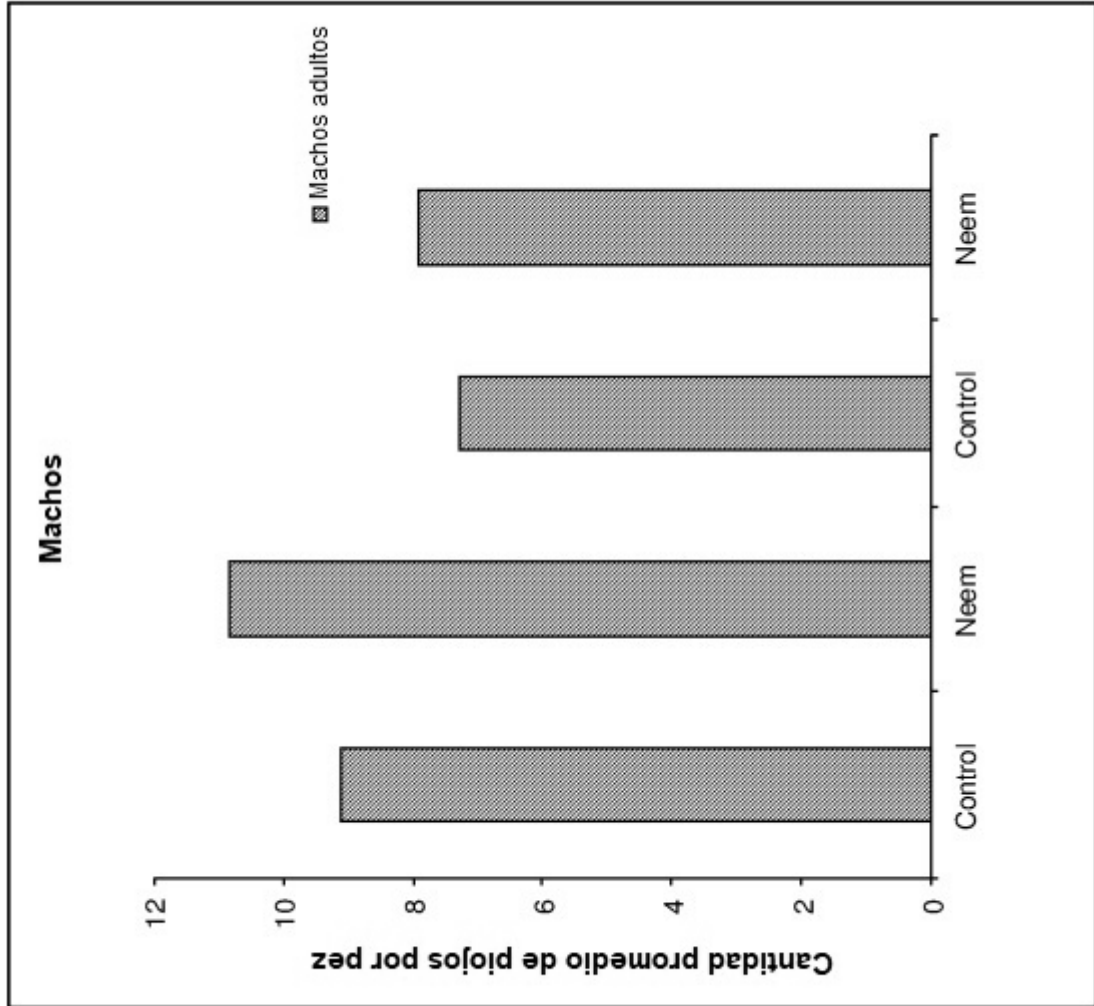


Figura 16

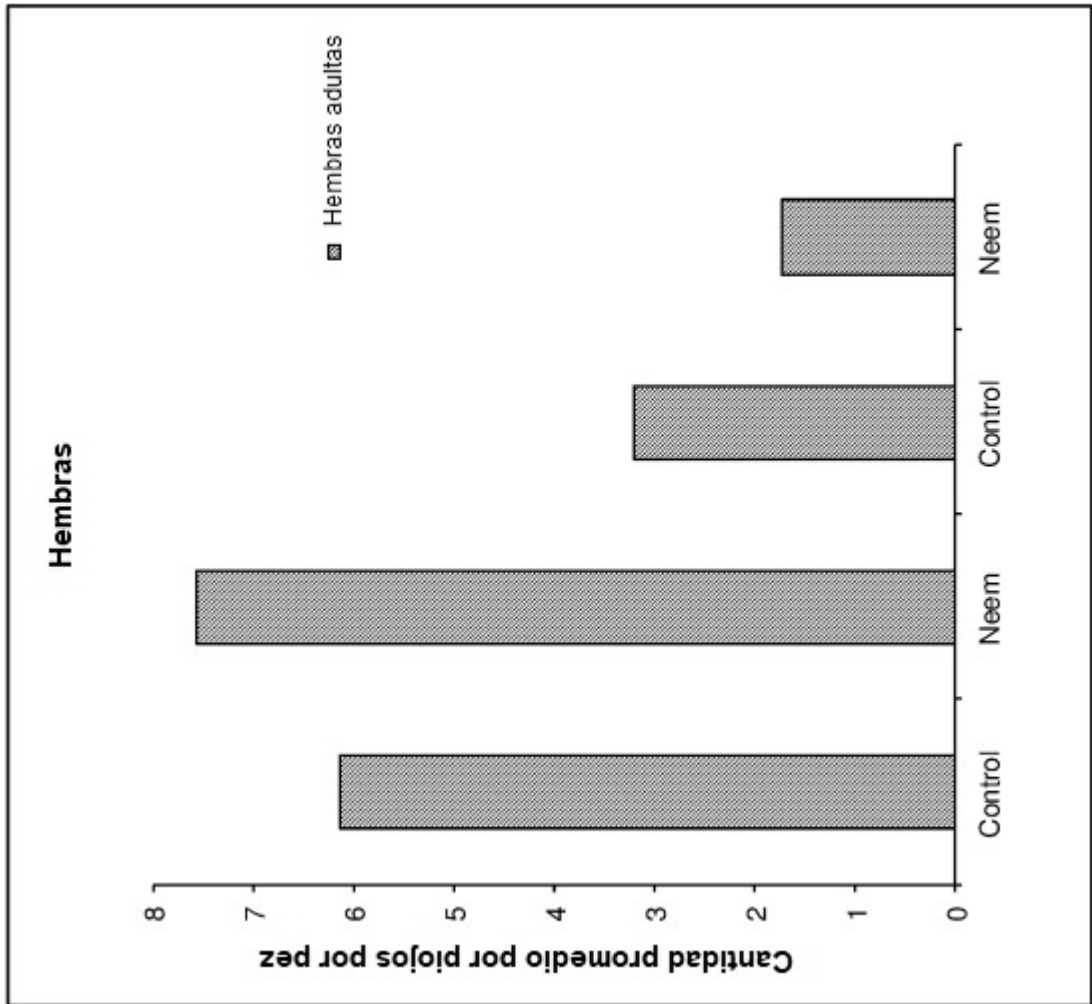


Figura 17

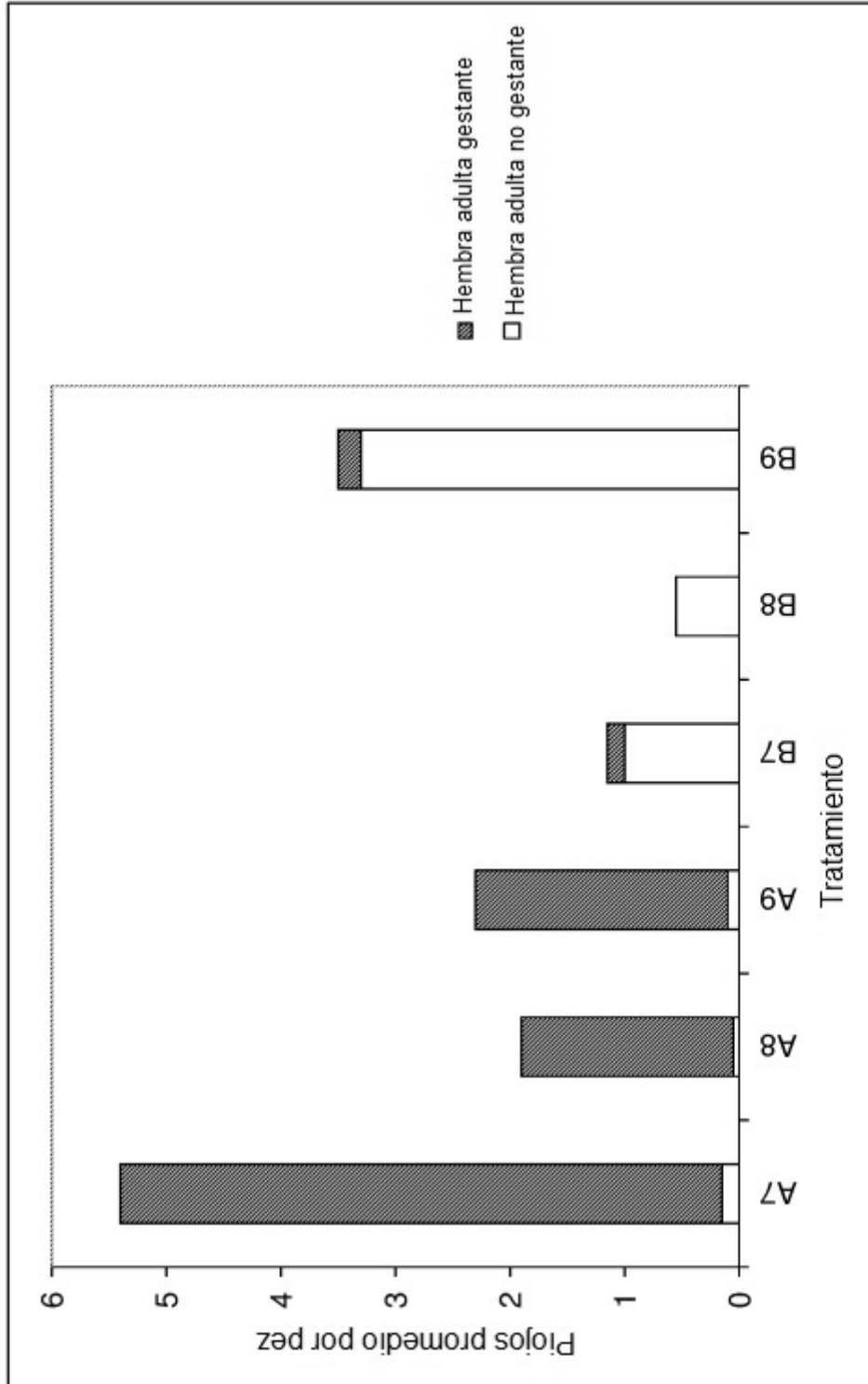


Figura 18

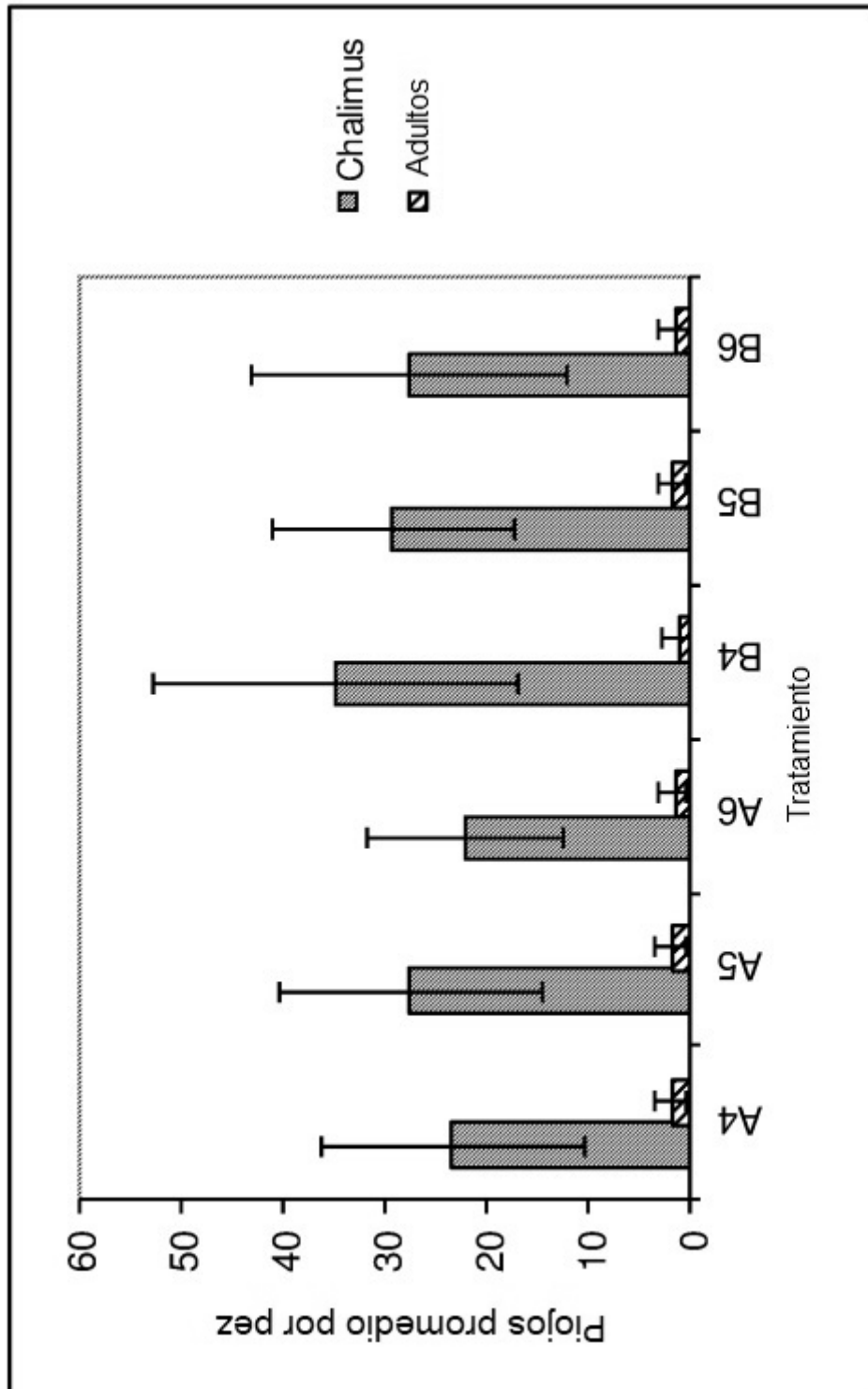


Figura 19

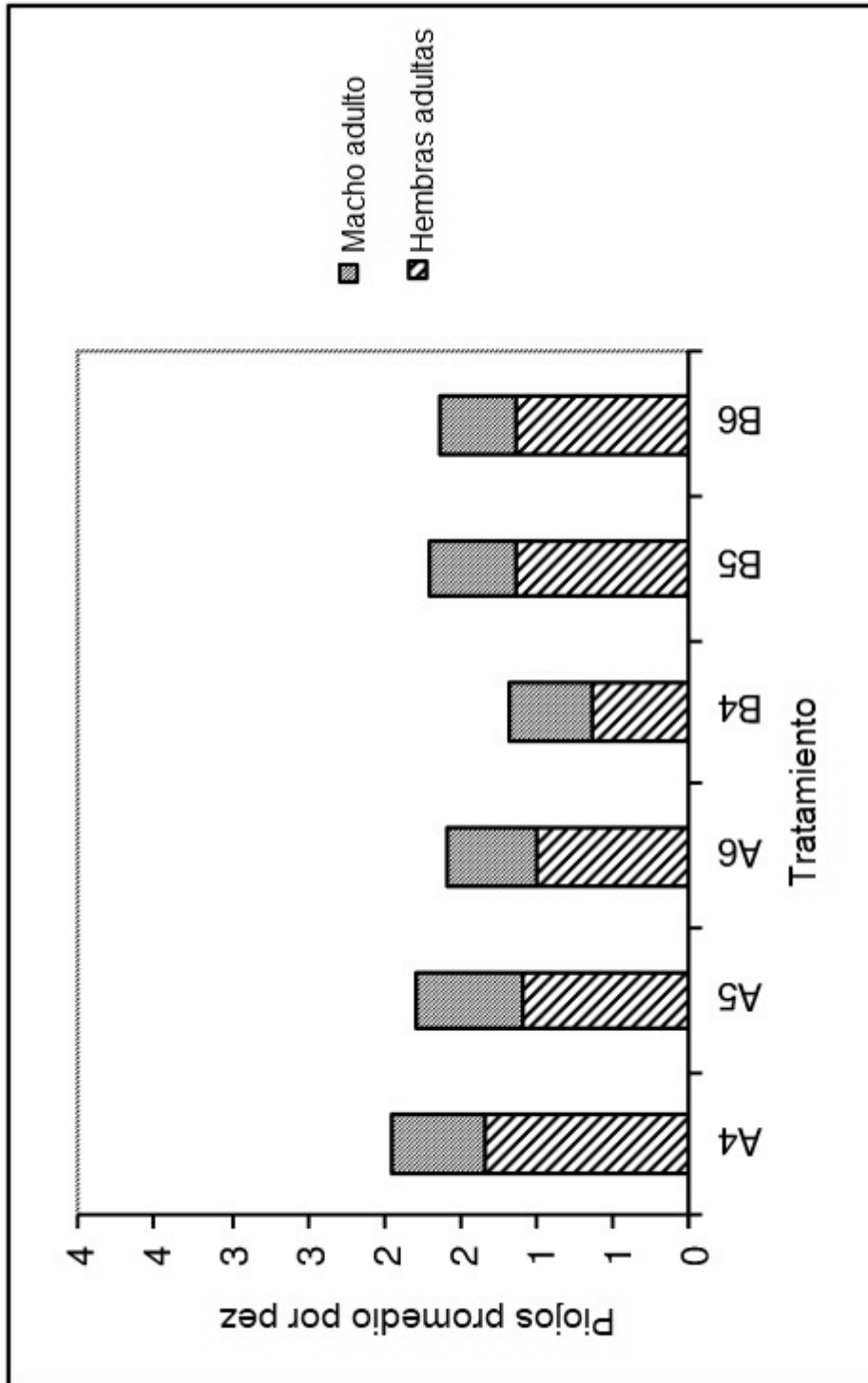


Figura 20

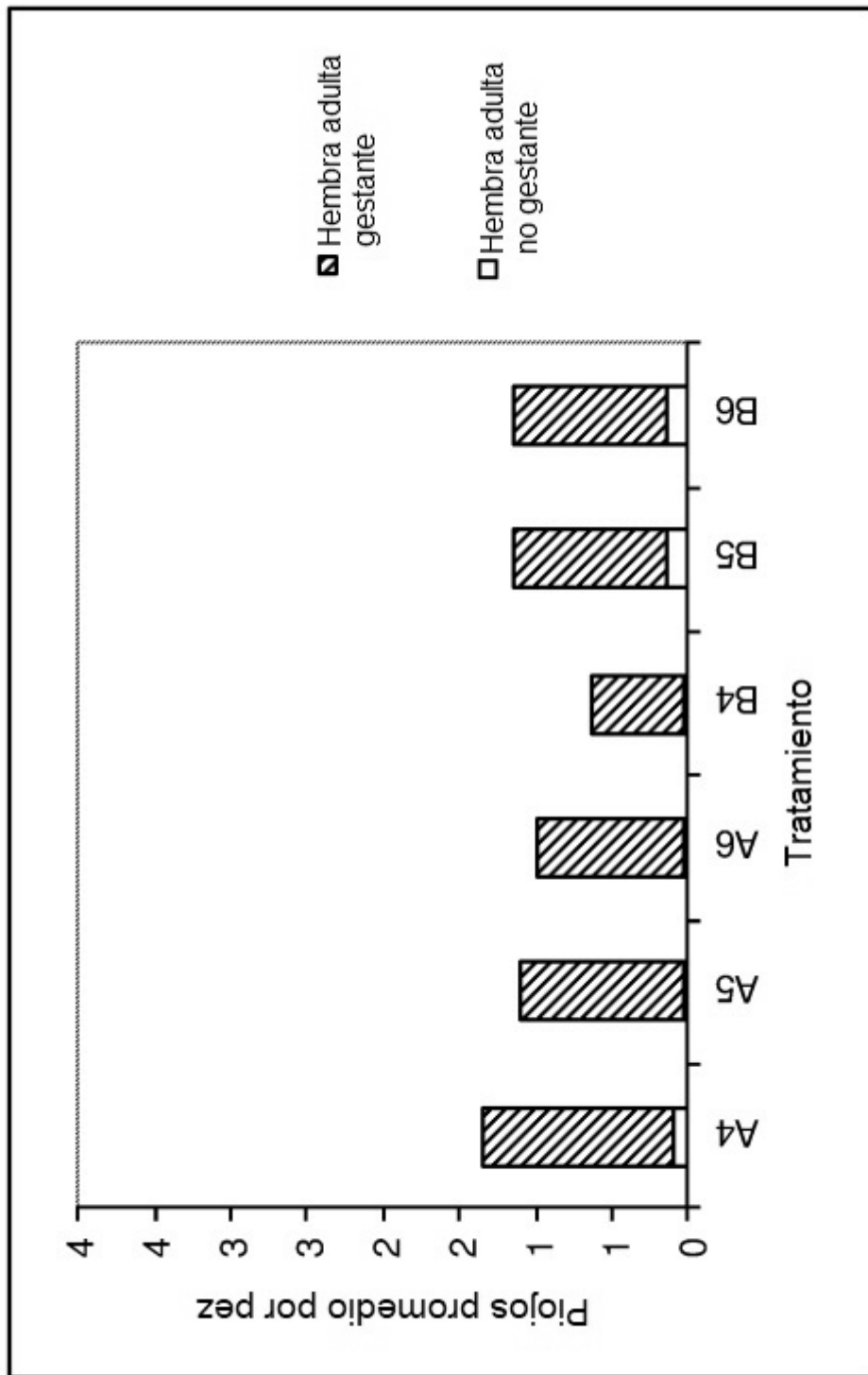


Figura 21

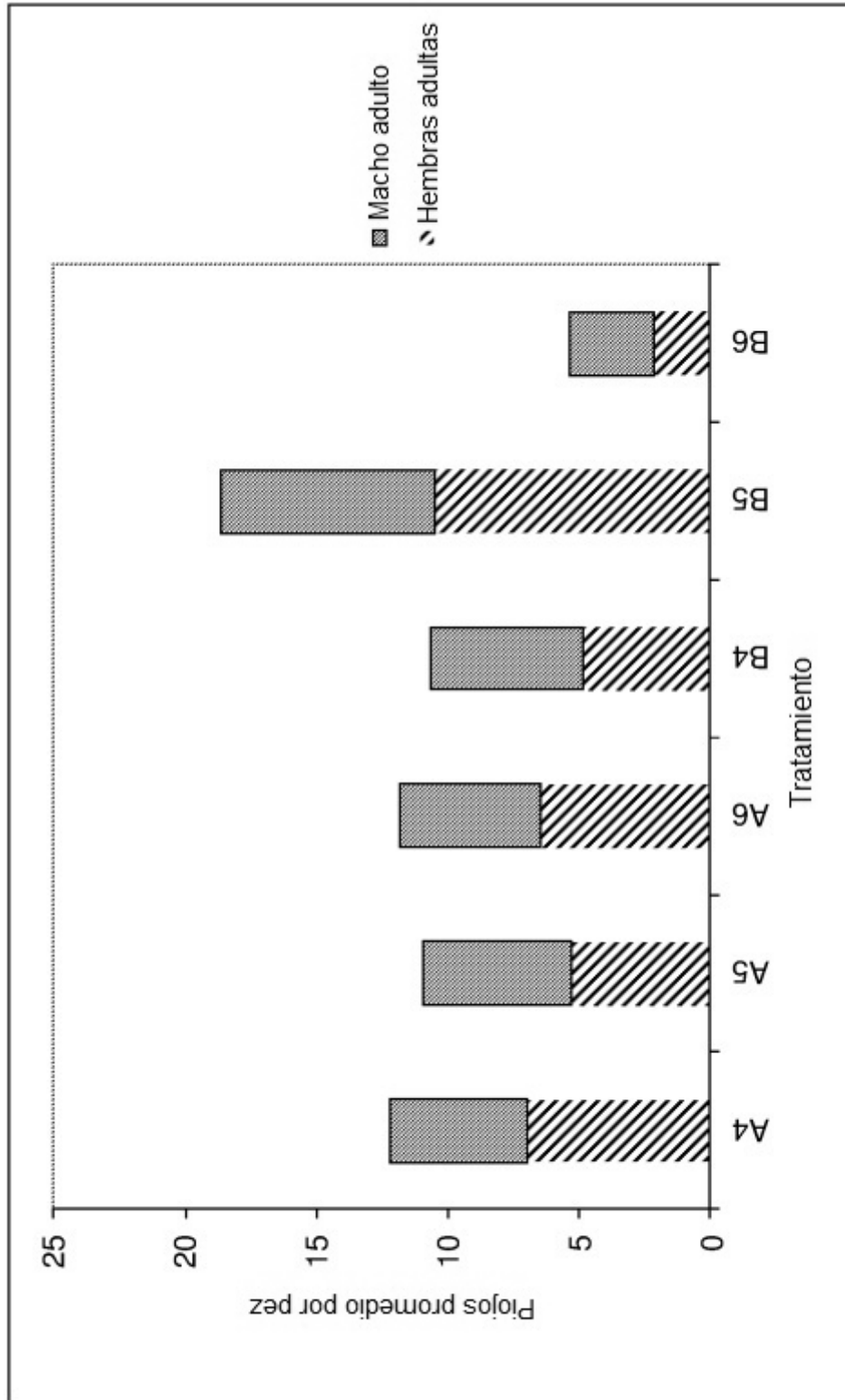


Figura 22

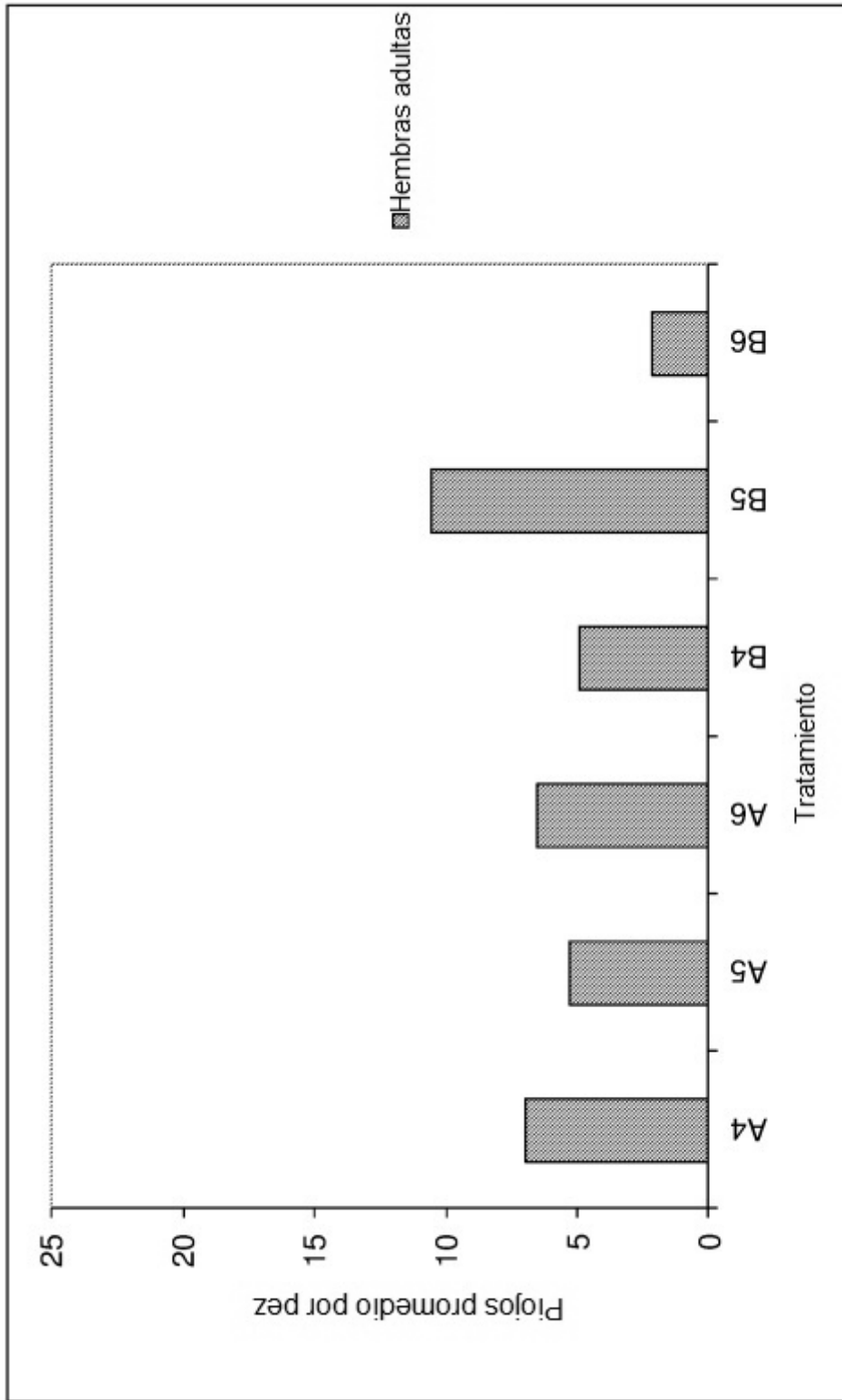


Figura 23

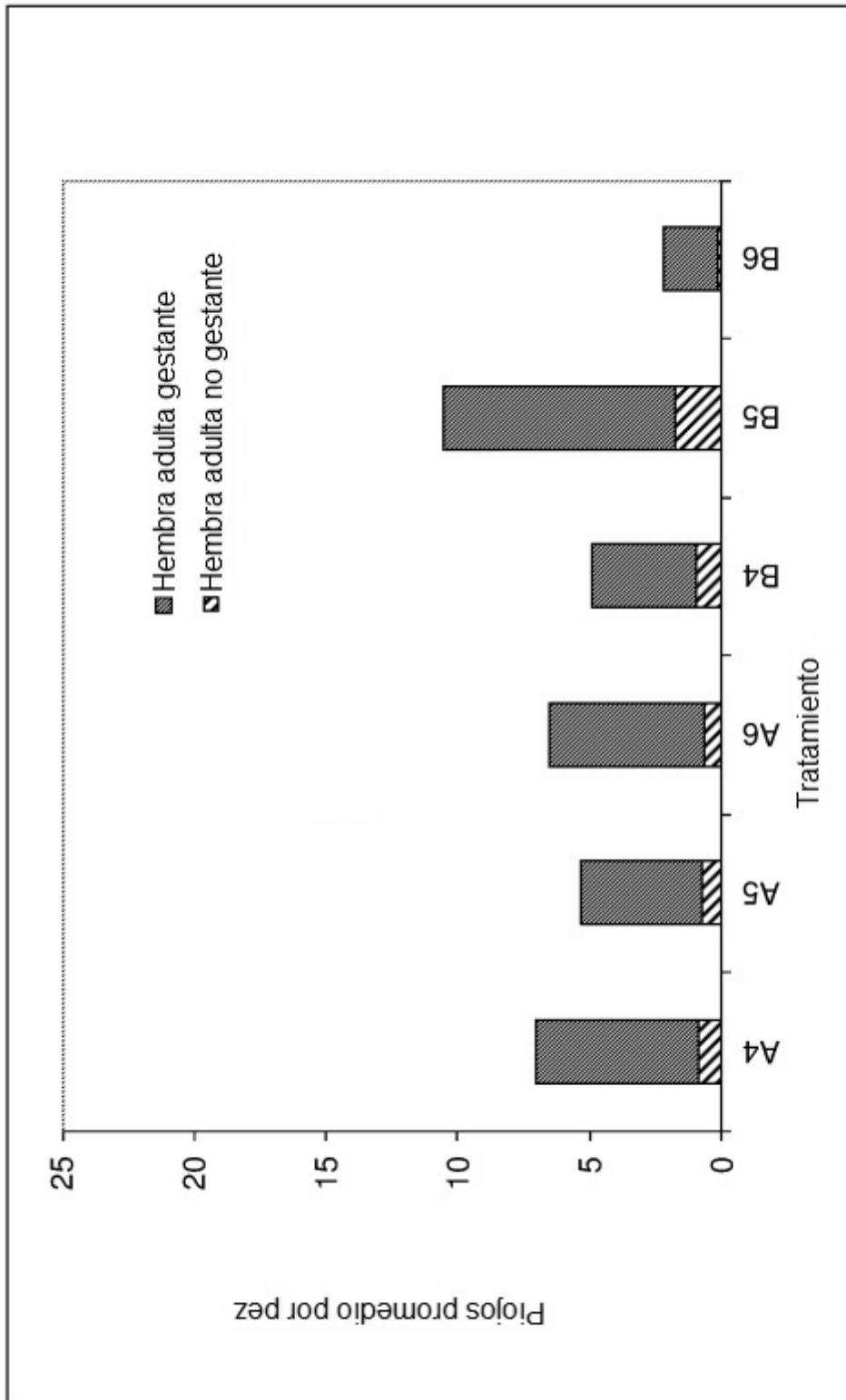


Figura 24

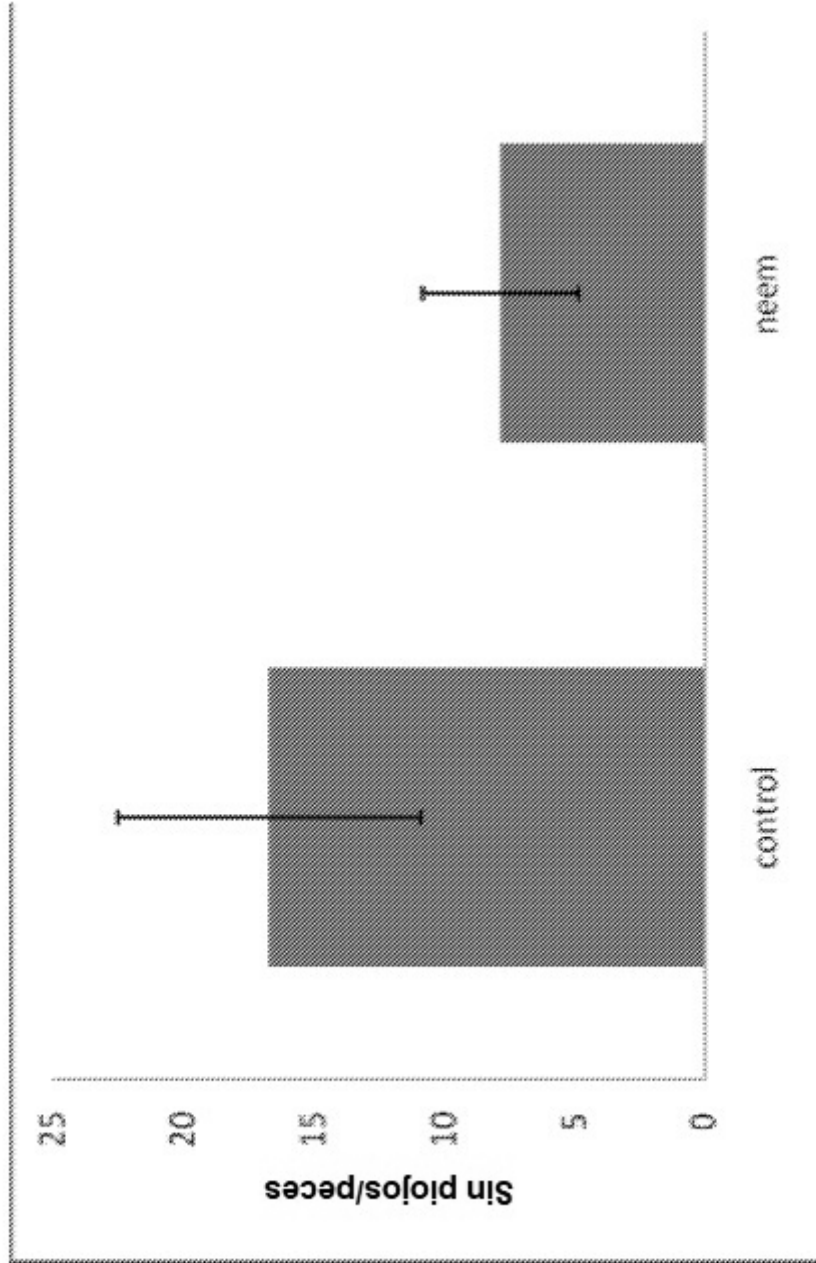


Figura 25

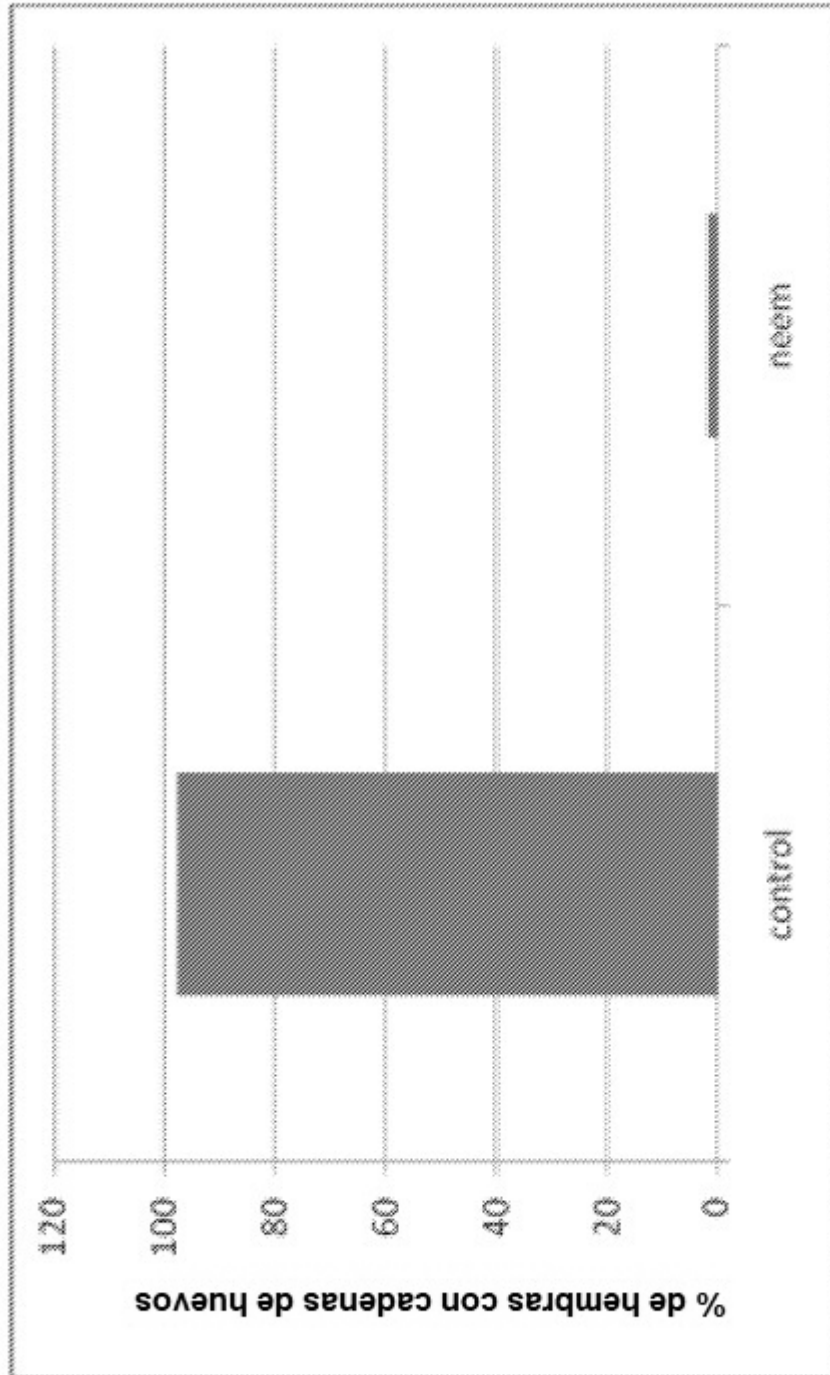


Figura 26