

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 063**

21 Número de solicitud: 202231040

51 Int. Cl.:

A01N 25/28 (2006.01)
A01N 63/30 (2010.01)
C12N 1/04 (2006.01)
C12N 11/10 (2006.01)
A01P 5/00 (2006.01)
C12R 1/165 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

01.12.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.07.2024

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

30.03.2026

Fecha de concesión:

30.09.2026

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.10.2026

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT D'ALACANT / UNIVERSIDAD DE
ALICANTE (80,00%)
Edificio Torre de Control. Crta. San Vicente del
Raspeig, s/n
03690 San Vicente del Raspeig (Alicante) ES y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(20,00%)**

72 Inventor/es:

**LOPEZ MOYA, Federico;
LOPEZ LLORCA, Luis Vicente;
LOPEZ NUÑEZ, Raquel;
HERAS CABALLERO, Angeles Maria y
ACOSTA CONTRERAS, Florentina Niuris**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **OBTENCIÓN DE COACERVADOS Y SU USO COMO HERRAMIENTA DE CONTROL
BIOLÓGICO EN AGRICULTURA**

57 Resumen:

Obtención de coacervados y su uso como herramienta de control biológico en agricultura. Método de obtención de coacervados de un polímero y esporas de al menos un hongo empleado para el control biológico de plagas agrícolas para su uso como herramienta en el control biológico de plagas y enfermedades vegetales.

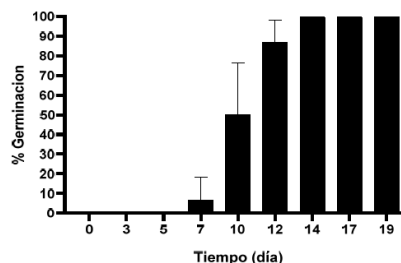


Fig. 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 976 063 B2

DESCRIPCIÓN**OBTENCIÓN DE COACERVADOS Y SU USO COMO HERRAMIENTA DE CONTROL BIOLÓGICO EN AGRICULTURA**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra en el campo de la agrobiotecnología y, en particular se refiere a la obtención de coacervados de un polímero para su aplicación práctica frente a plagas y enfermedades en las plantas.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los polímeros, biopolímeros, y más concretamente el quitosano se han utilizado como antimicrobianos fundamentalmente contra bacterias y hongos aplicado en disolución, películas y otras formulaciones. Se ha demostrado que es efectivo en el control de enfermedades y plagas vegetales. También induce mecanismos de defensa en las plantas contra enfermedades vegetales pre y post cosecha (Lopez-Moya *et al.*, 2017. Induction of auxin biosynthesis and WOX5 repression mediate changes in root development in *Arabidopsis* exposed to chitosan. *Scientific reports*, 7(1), 16813).

15

20

Pochonia chlamydosporia es capaz de reducir la colonización de la raíz por hongos patógenos de las plantas y los daños que éstos producen. A su vez, *Pochonia chlamydosporia* parasita huevos de nematodos formadores de quistes y agalladores. El hongo utiliza para ello apresorios y enzimas extracelulares (principalmente proteasas, quitín deacetilasas y quitosanasas). Además, promueve el crecimiento de la planta produciendo reguladores de su crecimiento.

25

La encapsulación, consiste en formar una capa protectora alrededor de un ingrediente activo o una célula. Entre los procesos que usan encapsulación con quitosano encontramos la gelificación ionotrópica, la precipitación, la atomización o *spray-drying*, la coacervación simple, la coacervación compleja, el entrecruzamiento químico, el entrecruzamiento térmico y la emulsión (Dhawan *et al.*, 2004 *Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods*. *AAPS Pharmscitech*, 5(4), 122-128).

30

35

La coacervación simple se basa en la disminución en solubilidad del polímero, que forma una capa o partícula mediante el goteo de una solución ácida del polímero sobre una solución básica. Con ello se consigue la precipitación del polímero y la formación de una cápsula de dicho polímero (Park y Chang, 2000. Microencapsulation of microbial cells.

5 *Biotechnology Advances*. 18(4), 303-319).

Algunos hongos tienen la capacidad de permanecer viables encapsulados en diferentes polímeros. En el estudio de Liu C. and Liu S, 2008. *Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae (MA126)*. Journal of Microencapsulation, 26(5)377-384, se explora una técnica de recubrimiento para la microencapsulación de conidios del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (MA126). En mencionado estudio utilizan el alginato de calcio para elaborar microcápsulas junto con los conidios de *M. anisopliae*, una vez formadas las microcápsulas usan, entre otros compuestos (Dextrina, sal sódica de ácido algínico de algas pardas (HPMC), el quitosano como método de recubrimiento de la cápsula para obtener una mayor estabilidad. Este documento no divulga que la matriz donde se encapsulan los conidios esté enteramente formada de quitosano. Adicionalmente indican que el compuesto más efectivo para la formulación de estas cápsulas es el HPMC y no el quitosano.

La presente invención divulga un método de coacervación u obtención de coacervados en el que el componente principal es un biopolímero, preferentemente quitosano el cual se utiliza como matriz para encapsular esporas (conidios y clamidosporas) de *Pochonia chlamydosporia*, un hongo empleado para el control biológico de plagas agrícolas, preferentemente un hongo nematófago usado como agente de control biológico de nematodos fitopatógenos y promotor del desarrollo y defensas de cultivos.

DESCRIPCIÓN

En la presente invención se entiende por coacervado la formación de una capa protectora o creación de una partícula con al menos un polímero y una o varias células o esporas.

En la presente memoria los términos “células” y “esporas” son sinónimos y se emplean de forma intercambiable.

La coacervación se usa principalmente para la liberación controlada de compuestos. Este proceso se basa en la disminución de solubilidad del polímero que forma la capa, mediante la adición de otro compuesto a la solución, cambiando el pH o la temperatura y con ello se consigue la precipitación del polímero.

- 5 La presente invención divulga un método de obtención de coacervados que comprende la encapsulación de esporas (conidios y clamidosporas) de un hongo empleado para el control biológico en agricultura en un polímero, preferentemente quitosano para su posterior aplicación en cultivos.

10 En la presente memoria los términos “polímero” y “biopolímero” son sinónimos y se emplean de forma intercambiable. Un biopolímero es aquel que se ha observado por primera vez en la naturaleza, aunque luego se obtenga por métodos artificiales.

En la presente memoria las expresiones “como agente de control biológico en agricultura” y “para el control biológico de plagas agrícolas” son sinónimas y se emplean de forma intercambiable.

- 15 Un primer objeto de la invención se refiere a un método de obtención de coacervados a partir de:

- un polímero catiónico lineal que comprende al menos un monómero que es un amino monosacárido y
 - esporas de al menos un hongo empleado como agente de control biológico en agricultura
- 20

que comprende las siguientes etapas:

- disolución de dicho polímero catiónico lineal en una solución tampón de ácido débil,
 - adición de esporas de al menos un hongo empleado como agente de control biológico en agricultura a la solución de la etapa anterior, y agitar para obtener una dispersión homogénea
 - añadir la dispersión homogénea de la etapa anterior a una solución acuosa a pH básico.
- 25

obteniéndose partículas sólidas de un coacervado formado por el polímero y las esporas.

30

En una realización particular el amino monosacárido tiene al menos 5 carbonos, preferentemente 5 o 6 carbonos.

En otra realización particular el monómero se selecciona entre glucosamina, N-acetil-glucosamina, galactosamina, ácido siálico, N-acetil-galactosamina, y N-acetil-manosamina.

En otra realización particular el polímero catiónico lineal comprende al menos 2 monómeros diferentes, preferentemente 2 monómeros diferentes.

En otra realización particular los 2 monómeros diferentes son glucosamina y N-acetil-glucosamina.

10 En otra realización particular el polímero catiónico lineal es quitosano.

En la presente memoria un polímero catiónico lineal es aquel que no tiene cadenas laterales más allá de los átomos o grupos funcionales que formen parte del o los monómeros del polímero o bien, las cadenas laterales son, cada una, igual o menor a 50 átomos, preferentemente igual o menor a 40 átomos, más preferentemente igual o menor a 30 átomos, aún más preferentemente igual o menos a 25 átomos, o 20 átomos, o 15 átomos, o 10 átomos o 5 átomos.

En otra realización particular al menos el 90% de partículas de quitosano tienen un tamaño de partícula inferior a 1 mm, preferentemente inferior a 0.8 mm, más preferentemente inferior a 0.5 mm. Es conveniente que el contenido en cenizas y de metales pesados sea lo más bajo posible, en una realización preferida el contenido en cenizas es inferior a 0.5 % y la concentración de metales pesados inferior a 100 ppm.

En otra realización adicional el quitosano presenta un grado de desacetilación de entre el 60% y el 100%, preferentemente, entre el 70% y el 100%, más preferentemente entre el 80% y el 100% aún más preferentemente entre el 90% y el 100%. A mayor grado de desacetilación menos grupos acetilo hay de la quitina y hay más grupos amino libres del quitosano que es lo que le aporta el carácter catiónico, obteniéndose así una mayor estabilidad del coacervado. Debido a que los iones catiónicos se enlazan con los aniónicos de la solución acuosa a pH básico proporcionando una red de enlaces mayor y por tanto más estables en el formulado o coacervado.

30 Los hongos agentes de control biológico en agricultura son capaces de degradar el

coacervado de polímero, preferentemente quitosano obteniendo de él el sustrato necesario para poder desarrollarse y crecer, colonizando el suelo y las raíces de los cultivos en los que se hayan tratado con los coacervados de la invención. Además, se puede añadir una mayor concentración de biopolímero, preferentemente quitosano, ya que al estar en forma de coacervados tienen una liberación más lenta de este biopolímero reduciendo de esta manera las posibles reacciones fitotóxicas hacia los cultivos a dosis altas como ocurre cuando se añade en forma líquida (Lopez-Moya *et al.*, 2017. *Induction of auxin biosynthesis and WOX5 repression mediate changes in root development in Arabidopsis exposed to chitosan. Scientific reports*, 7(1), 16813).

La solución tampón en la que se disuelve el polímero catiónico lineal puede ser una solución de ácido débil, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido cítrico y otras soluciones de ácido débil que un experto en la materia sabría identificar. Preferentemente la solución tampón de ácido débil comprende ácido acético glacial y acetato de sodio anhidro en agua, ya que cuando se disuelve el polímero catiónico lineal, esta solución queda más viscosa/densa que al disolverse en la solución tampón de otros ácidos débiles en los que se queda una solución prácticamente líquida. El incremento en la viscosidad/densidad facilita la obtención de los coacervados.

El pH de la solución tampón está comprendido entre 3 y 6,5, preferentemente entre 3,5 y 6, más preferentemente entre 4 y 6, aún más preferentemente alrededor de 5.

La concentración del biopolímero en la solución tampón es entre el 0.5% y el 20% en peso/volumen (p/v), preferentemente entre 1% y 15% p/v, más preferentemente entre el 2% y el 10% p/v, aún más preferentemente entre el 2.5% y el 5% p/v.

Cuando el polímero es quitosano, la concentración máxima que se puede emplear es de alrededor de 5 mg/ml de la solución tampón, preferentemente alrededor de 4 mg/ml de la solución tampón, más preferentemente alrededor de 3 mg/ml de la solución tampón.

En otra realización particular las esporas pueden ser conidios y/o clamidosporas.

En otra realización particular el hongo empleado como agente de control biológico en agricultura se selecciona entre hongos entomopatógenos, hongos nematófago y combinaciones de los anteriores.

En otra realización particular el hongo empleado para el control biológico de plagas agrícolas es un hongo que sea resistente a la concentración de quitosano empleada en el

objeto de la invención y sea capaz de degradarlo.

En una realización particular, las esporas del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* se seleccionan entre esporas de la cepa Pc123, IMI SD 187, Pc10, Pc104, Pc133, Pc147, Pc190, Pc280, Pc392, Pc400, Pc69, Pc399, Pc4624, Pc75, Pc21, PcCat, Pc132 y
5 combinaciones de los anteriores, preferentemente Pc123. Así como de otros hongos agentes de control biológico.

Las esporas del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* se pueden obtener de cualquier fuente, preferentemente aisladas de huevos de *Heterodera avenae*, en Sevilla (ATCC No. MYA-4875; CECT No. 20929). La obtención de esporas (conidios y/o
10 clamidosporas) se puede obtener mediante cualquier protocolo habitual en el área de la técnica, por ejemplo, según se ha descrito en el artículo científico: Güerri-Agulló, B., López-Follana, R., Asensio, L., Barranco, P., & Lopez-Llorca, L. V. (2011). *Use of a solid formulation of Beauveria bassiana for biocontrol of the red palm weevil (Rhynchophorus ferrugineus)(Coleoptera: Dryophthoridae) under field conditions in SE Spain*. Florida
15 Entomologist, 737-747.

La mezcla para obtener una dispersión homogénea puede ser en agitación durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 min y 10 horas. En una realización particular la concentración de esporas en la dispersión homogénea está comprendida entre $1 \cdot 10^4$ esporas/ml y $1 \cdot 10^8$ esporas/ml, preferentemente $1 \cdot 10^5$ esporas/ml y $1 \cdot 10^7$ esporas/ml, más
20 preferentemente $5 \cdot 10^5$ esporas/ml y $5 \cdot 10^6$ esporas/ml.

La adición de la dispersión homogénea a la solución acuosa a pH básico se realiza mediante goteo, cayendo por gravedad, de la primera sobre la segunda, por ejemplo, mediante el empleo de un inyector de entre 0,5 mm y 6mm de diámetro, preferentemente entre 1 mm y 5 mm de diámetro, más preferentemente entre 2 y 4 mm de diámetro, aún
25 más preferentemente alrededor de 3 mm de diámetro.

Más del 90% de los coacervados obtenidos por el método descrito anteriormente tienen un volumen por coacervado de entre $0,0001 \text{ mm}^3$ y $0,05 \text{ mm}^3$, preferentemente entre $0,001 \text{ mm}^3$ y $0,01 \text{ mm}^3$, más preferentemente entre $0,014 \text{ mm}^3$ y $0,005 \text{ mm}^3$. El diámetro del inyector empleado está directamente relacionado con el diámetro de los coacervados
30 obtenidos. Si el inyector que produce la gota tiene un diámetro de salida más grande se obtendrán coacervados más grandes.

Es importante que la solución acuosa sea a pH básico porque es lo que hace que se forme

el coacervado o matriz cuando reacciona con el quitosano. La reacción de una base fuerte con el quitosano provoca una disminución de los grupos amino libres de este último, lo que provoca que interaccionen de forma iónica con la base, obteniendo una mayor eficiencia de gelificación y mayor grado de entrecruzamiento que simplemente añadiendo esporas de un hongo y un polímero en una solución acuosa.

En una realización particular la solución acuosa a pH básico se selecciona entre una solución de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o una solución básica de tripolifosfato de sodio, preferentemente hidróxido de sodio.

En la presente memoria, pH básico significa un pH superior a 7, preferentemente, superior a 8, más preferentemente superior a 9, aún más preferentemente superior a 10, hasta 14, el pH máximo.

La solución acuosa a pH básico, preferentemente de hidróxido de sodio, puede ser entre el 0.05% p/v y 20% p/v, preferentemente entre 0,5% y 10% p/v, más preferentemente entre el 1% y el 8% p/v, aún más preferentemente entre el 1,5% y el 5% p/v.

En una realización en particular, el quitosano se disuelve en una solución tampón, después se añaden conidios y clamidosporas de *Pochonia chlamydosporia*. Se mantiene la mezcla en agitación durante al menos una hora para una dispersión homogénea de las esporas. Se gotea la mezcla en la solución de hidróxido de Sodio (NaOH) al 2% p/v, al hacerlo se generan partículas sólidas de un coacervado formado por el polímero y las esporas del hongo.

En una realización preferida el método de la invención comprende gotear una dispersión homogénea de quitosano con esporas (conidios y clamidosporas) del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (cepa 123), en una solución básica de hidróxido sódico de alrededor del 2% p/v.

La ventaja del método de la invención, concretamente la combinación de esporas de un hongo empleado para el control biológico de plagas agrícolas, preferentemente *Pochonia chlamydosporia* con un biopolímero, preferentemente quitosano en coacervados es que si dicho hongo coloniza la raíz de las plantas evita que otros hongos fitopatógenos puedan hacerlo. Además, el quitosano añadido al suelo favorece el crecimiento de este hongo y también produce que la planta active sus sistemas de defensa lo que se une a la acción del agente de control biológico. Por otro lado, el quitosano favorece el crecimiento de cultivos a bajas dosis. Añadir el quitosano en forma de coacervados provoca una liberación

lenta de este biopolímero y se pueden aplicar dosis más altas de concentración, de hasta 5 mg/ml, preferentemente alrededor de 2 mg/ml que no serían perjudiciales para las plantas como es el caso de añadirlo de forma líquida. Además, *Pochonia chlamydosporia* es capaz de degradar este sustrato y alimentarse de él dándole una ventaja frente a otros hongos para crecer y poder colonizar el suelo y/o raíces de los cultivos. También provoca que al liberar el compuesto a partir del coacervado produzca toxicidad a otros microorganismos sensibles a quitosano.

Adicionalmente, el método de la invención comprende lavar los coacervados obtenidos hasta que el pH disminuya por debajo de 10, preferentemente alrededor de 8,5. Se puede emplear cualquier solución apropiada para disminuir el pH, preferentemente agua destilada autoclavada.

Una vez disminuido el pH es necesario secar los coacervados en condiciones anéxicas durante al menos 6 h, preferentemente 24 h. Los coacervados se pueden secar por ejemplo en una cabina de flujo laminar.

A continuación, se pueden almacenar en contenedores estériles con una humedad inferior al 30%.

Un objeto adicional de la invención se refiere a coacervados obtenidos según el método de la invención anteriormente descrita.

En una realización particular los coacervados están compuestos por quitosano y esporas del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia*.

Otro objeto adicional de la invención se refiere a una formulación que comprende los coacervados descritos anteriormente y una o más sustancias inertes empleadas en agricultura. Por ejemplo, emulsionantes, disolventes, compuestos vehículos de los conidios, propulsores en aerosol, fragancias y colorantes. Pueden estar presentes en una proporción, por ejemplo, de entre 0 y 10 % en volumen respecto al volumen total de la composición. Todas estas sustancias son convencionales y conocidas en el estado de la técnica para este tipo de composiciones (Shinoda y Saito, Journal of Colloid and Interface Science, 1969).

En una realización adicional las sustancias inertes se seleccionan del grupo que consiste en: tripolifosfato de sodio, fosfato monopotásico, fosfato monoamónico, arcilla, talco, nitrato potásico, sulfato amónico, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos carboxílicos, tales

como ácidos dicarboxílicos, ácido cítrico, ácido ascórbico, glutamatos, acetatos, humatos, carbonato potásico, sorbato potásico, malato potásico, malato de citrulina, urea, cloruro potásico, gel de sílice, oxalato, zeolita, extractos de algas, alginatos, tierra de diatomeas, goma xantana, goma arábica, metilcelulosa, agarosa, acrilamida, geles, lignina, pectina, lignosulfonatos, molibdatos, fosfato biamónico, mica, caolín, fructosa, sacarosa, quitosano, hidróxido de calcio, arena de cuarzo, bicarbonato sódico, suero (por ejemplo lactosuero) o mezclas de ellas.

La sustancia o sustancias inertes cumplen una función importante, como es la de mejorar la formulación en aspectos como solubilidad, estabilidad, ejercer un efecto antiapelmazante, antihumectante y/o colorante. Algunas de estas propiedades son también esenciales para poder comercializar el producto en buenas condiciones de conservación, y en buenas condiciones para su uso.

En el caso de que alguna de las sustancias inertes mencionadas anteriormente, pudiera tener actividad biológica por sí misma, esto es ejercer una función adicional que las indicadas en el párrafo anterior, se entenderá que la concentración de dichas sustancias inertes en el formulado deberá ser inferior a la necesaria para mostrar la actividad biológica.

Otro objeto adicional de la invención se refiere al uso de los coacervados anteriormente descritos y/o producidos por el método anteriormente descrito en agricultura.

En una realización particular, el uso en agricultura comprende el control de plagas y/o enfermedades en cultivos agrícolas.

En una realización particular, el quitosano en forma de coacervado provoca una liberación lenta de este biopolímero y se pueden aplicar concentraciones más elevadas, por ejemplo, de hasta 5 mg/ml, preferentemente alrededor de 2 mg/ml que no serían perjudiciales para las plantas.

En otra realización particular las plagas y/o enfermedades están provocadas por un patógeno seleccionado entre nematodos, insectos y combinaciones de los anteriores.

Otro objeto adicional de la invención se refiere al uso de los coacervados anteriormente descritos y/o producidos por el método anteriormente descritos como biofertilizantes bioestimulantes y/o inductor de mecanismos de defensa en cultivos agrícolas.

Otro objeto adicional de la invención se refiere a los coacervados anteriormente descritos

y/o producidos por el método anteriormente descrito para su uso en veterinaria, preferentemente para su uso en el tratamiento de nematodos intestinales en animales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1:** Germinación de *Pochonia chlamydosporia* a partir de coacervados (n=10) de quitosano con un grado de desacetilación del 90,1%, a 2% de NaOH en un periodo de incubación de 19 días sobre agar agua.

10 **Figura 2:** Desarrollo de *Pochonia chlamydosporia* a partir de un coacervado de quitosano con un grado de desacetilación del 90,1%, a 2% de NaOH en un periodo de incubación de 19 días en medio de crecimiento agar agua.

15 **Figura 3:** Coacervados de quitosano y esporas de *Pochonia chlamydosporia* obtenidos con un 2% de NaOH en fresco.

Figura 4: Coacervados de quitosano y esporas de *Pochonia chlamydosporia* obtenidos con un 2% de NaOH en seco.

20 **Figura 5:** Coacervado de quitosano y esporas del hongo *Pochonia chlamydosporia* transformado con GFP (*Green fluorescent protein*), obtenidos con un 2% de NaOH vista al microscopio Confocal. En la imagen se ve la matriz del coacervado (autofluorescencia verde oscuro) de quitosano y en su interior se ven las hifas del hongo *Pochonia chlamydosporia* GFP creciendo (fluorescencia verde).

25 EJEMPLOS

Hongo

30 Se ha utilizado una especie de hongo nematófago (*Pochonia chlamydosporia*). El hongo *Pochonia chlamydosporia* cepa 123 (*Pc123*), *Pc123* se aisló de huevos de *Heterodera avenae*, en Sevilla (ATCC No. MYA-4875; CECT No. 20929). Los cultivos del hongo se mantuvieron en oscuridad a 4°C en agar harina de maíz (CMA; BBL Sparks, MD).

35 Para el uso del hongo *Pc123* para realizar los coacervados de quitosano se prepararon formulaciones sólidas del mismo a partir de sustrato de arroz (*Oryza sativa*) según Güerri-Agulló, B., López-Follana, R., Asensio, L., Barranco, P., & Lopez-Llorca, L. V. (2011). Use

of a solid formulation of Beauveria bassiana for biocontrol of the red palm weevil (Rhynchophorus ferrugineus)(Coleoptera: Dryophthoridae) under field conditions in SE Spain. Florida Entomologist, 737-747. Se utilizaron matraces de 250 ml a los que se agregaron como sustrato 75 g de arroz. A partir de estos matraces se obtuvo una solución de conidios y clamidosporas mediante el uso de agua destilada estéril, una vez extraído el inóculo se hizo el recuento de estos en una cámara Neubauer. También se puede seguir el procedimiento de obtención de esporas de hongos descrito en la patente P201931071.

Polímero

Como polímero empleado para formar los coacervados se empleó un biopolímero, concretamente el quitosano, más concretamente quitosano T8 (Chitosan 90/60/A1) con un tamaño de partícula menor a 0.5 mm, con una pérdida por desecación de 5.2%, con un contenido de cenizas del 0.1%, viscosidad dinámica 20 °C ($\pm 5\%$) (1% sol. En 1% ácido acético sol.) de 69.0 mPa.s (milipascuales), información proporcionada por el fabricante comercial del biopolímero, un grado de desacetilación del 90.1% y una concentración de metales pesados inferior a 50 ppm.

Preparación de coacervados

Para disolver el quitosano se sigue el siguiente protocolo desarrollado por la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Para preparar la disolución Tampón donde se va a disolver el quitosano en polvo, en primer término, preparamos dos soluciones stock de ácido acético glacial (3M; pH 2,09) y acetato de sodio anhidro (2M; pH 8,62), añadiendo 25,7 ml de ácido acético glacial y 24,61 g de acetato de sodio anhidro en un volumen final de 150 ml ajustado con agua destilada respectivamente.

A partir de estas disoluciones, preparamos otra a la que añadimos 10 ml de ácido acético glacial y 10 ml de acetato de sodio anhidro de las soluciones preparadas según el párrafo anterior y enrasamos hasta 100 ml con agua destilada, obteniendo una disolución a 0,3M y 0,2M de cada compuesto. Se ajusta el pH a 5 la disolución final con el stock de acetato de sodio anhidro 2M. Al mezclar las soluciones se queda un pH de alrededor de 4,2 como el ácido acético glacial es más ácido, es necesario añadir acetato de sodio es para subir el pH hasta alrededor de 5, ya que es más básico. La solución tampón resultante se autoclava.

Una vez realizada la disolución Tampón se toman 100 ml de ésta y añadimos quitosano al 3% (3 g en 100 ml) y agitamos la mezcla durante 24 horas, en un agitador magnético.

Se prepara, una disolución de NaOH 2% p/v, para la cual, se añaden 20 g de NaOH (1M) en 1 L de agua destilada y se autoclava para que este estéril.

Se prepara material estéril, agua destilada (7 L), vaso de precipitados de 1 L, un colador de acero inoxidable (tamaño de poro de 2 mm) y papel de filtro.

- 5 Tras las 24 h de agitación, se hace el recuento de conidios como se ha explicado anteriormente en una cámara Neubauer y se añade el volumen necesario para obtener una concentración final de 1×10^6 conidios/ml. La suspensión final de conidios, mezclada con quitosano se mantiene en agitación durante una hora para obtener una mezcla homogénea. Después goteamos dicha mezcla sobre la disolución de NaOH al 2% con una
10 jeringuilla de 20 ml. (Se obtienen aproximadamente 20 gotas de 50 micro litros cada una por ml, generándose coacervados sólidos con un volumen por coacervado de $0,0025 \text{ mm}^3$).

- El cálculo del volumen de las gotas se hizo de la siguiente manera: Se cogió la disolución de quitosano con una jeringuilla y se midió cuantas gotas caían en un mililitro de disolución, esto se repitió 3 veces y se hizo la media. El resultado fue que cada gota contenía 50 micro
15 litros de disolución y a partir de ahí se calculó el volumen en milímetros cúbicos.

- Una vez finalizado el proceso de formación de los coacervados, estos se retiran de la solución de NaOH al 2% y se lavan con agua destilada estéril hasta reducir el pH del agua de lavado a alrededor de 8,5. El valor inicial suele ser pH 12. Cuando los coacervados alcanzan el pH indicado se colocan en papel de filtro estéril para su secado en la campana
20 de flujo laminar vertical (TELSTAR BV- 100) durante por lo menos 24 horas. Pasado este tiempo se recogen y guardan a temperatura ambiente en recipientes estériles.

Germinación de los coacervados de la invención

- Una vez secos, se dispone un coacervado de quitosano en una placa Petri de 90 mm con Agar Bacteriológico Tipo Europeo (WA; PanReac). Se mira la placa todos los días hasta
25 que el hongo germina a partir del coacervado con esporas de *Pochonia chlamydosporia*. (Figuras 1-4).

- En el medio de agar-agua no hay nutrientes disponibles para el desarrollo del hongo, este experimento demuestra que *Pochonia* degrada el quitosano del coacervado y lo usa para su crecimiento, el tiempo es el mismo que tarda en hongo en crecer en un medio normal
30 de cultivo (Figura 2).

En la Figura 3 se muestran coacervados frescos recién hechos y lavados con agua

destilada a pH neutro. En la Figura 4 se muestra coacervados secos después de 24 horas de secado al aire. Son secos y no deshidratados porque si les añades agua no vuelven a quedarse como en el estado inicial antes del secado (fresco). Al secar los coacervados se tiene la ventaja de que aumenta el tiempo de conservación en condiciones óptimas para su aplicación.

5

En la Figura 5 se muestran coacervados obtenidos con esporas del mismo hongo pero que expresan la proteína GFP, lo que permite ver en el microscopio confocal el crecimiento de las hifas del hongo en el interior del coacervado mediante fluorescencia. Como se puede observar el hongo se desarrolla correctamente en el coacervado y su inclusión dentro del coacervado de quitosano no afecta a su función biológica de control de plagas.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método de obtención de coacervados para control biológico en agricultura de:

- Quitosano con un grado de desacetilación de entre el 90.1% y el 100% y
- 5 - esporas de *Pochonia chlamydosporia*,

que comprende las siguientes etapas:

- disolución de quitosano en una solución tampón de ácido débil, teniendo el quitosano un grado de desacetilación de entre el 90.1% y el 100%
- adición de esporas de *Pochonia chlamydosporia* a la solución de la etapa anterior, y agitar para obtener una dispersión homogénea,
- 10 - añadir la dispersión homogénea de la etapa anterior a una solución acuosa a pH básico seleccionada entre hidróxido de sodio o hidróxido de potasio
- la adición de la dispersión homogénea a la solución acuosa de pH básico se realiza mediante goteo de la primera sobre la segunda,
- 15 - lavar las partículas sólidas de coacervados hasta que el pH disminuya por debajo de 10 y
- secar las partículas sólidas de coacervados en condiciones axénicas durante al menos 6h

20 obteniéndose partículas sólidas de un coacervado formado por quitosano y las esporas de *Pochonia chlamydosporia*.

2. Método según la reivindicación anterior, donde la concentración máxima de quitosano en la solución tampón es de 5 mg/ml.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución tampón, es una solución de ácido acético glacial y acetato de sodio anhidro en agua a un pH comprendido entre 3 y 6,5.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* es la cepa CECT No. 20929.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de esporas en la dispersión homogénea está comprendida entre $1 \cdot 10^4$ esporas/ml y $1 \cdot 10^8$ esporas/ml.

6. Método según la reivindicación 1, en el que la solución de hidróxido de sodio es entre el 0,05% y 20% p/v.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las partículas sólidas de coacervados tienen un volumen por coacervado de entre 0,0001 mm³ y 0,05 mm³.
8. Coacervados de quitosano y esporas de *Pochonia chlamydosporia* obtenidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Formulación que comprende coacervados según la reivindicación 8 u obtenidos según el método descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y una o más sustancias inertes empleadas en agricultura seleccionadas entre: tripolifosfato de sodio, fosfato monopotásico, fosfato monoamónico, arcilla, talco, nitrato potásico, sulfato amónico, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos carboxílicos, tales como ácidos dicarboxílicos, ácido cítrico, ácido ascórbico, glutamatos, acetatos, humatos, carbonato potásico, sorbato potásico, malato potásico, malato de citrulina, urea, cloruro potásico, gel de sílice, oxalato, zeolita, extractos de algas, alginatos, tierra de diatomeas, goma xantana, goma arábica, metilcelulosa, agarosa, acrilamida, geles, lignina, pectina, lignosulfonatos, molibdatos, fosfato biamónico, mica, caolín, fructosa, sacarosa, quitosano, hidróxido de calcio, arena de cuarzo, bicarbonato sódico, suero y mezclas de ellas.
10. Uso de la formulación descrita en la reivindicación 9, o los coacervados según la reivindicación 8 u obtenidos según el método descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en agricultura.
11. Uso según la reivindicación anterior, donde agricultura comprende el control de plagas y/o enfermedades en cultivos agrícolas.
12. Uso según la reivindicación 11, como biofertilizantes, bioestimulantes y/o inductor de mecanismos de defensa en cultivos agrícolas.

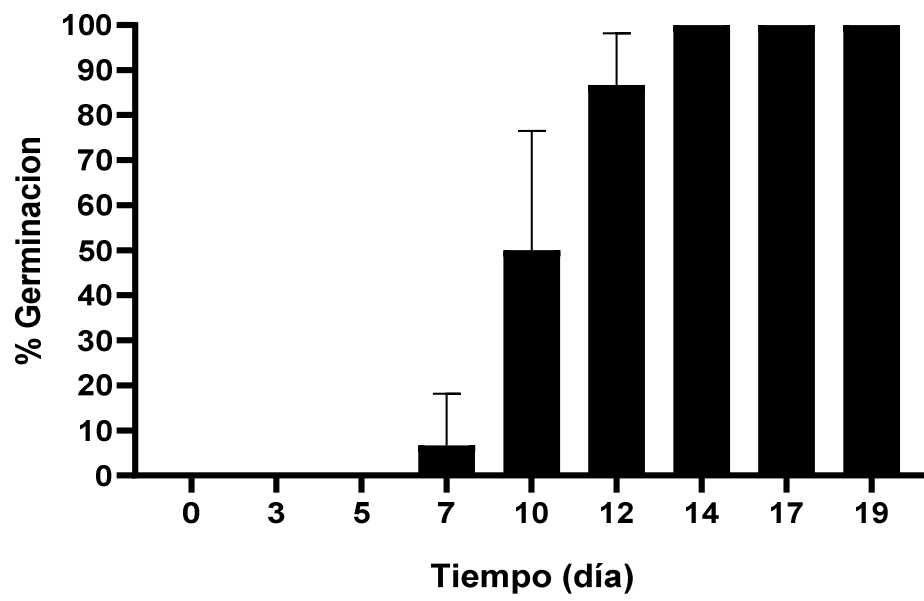


Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4

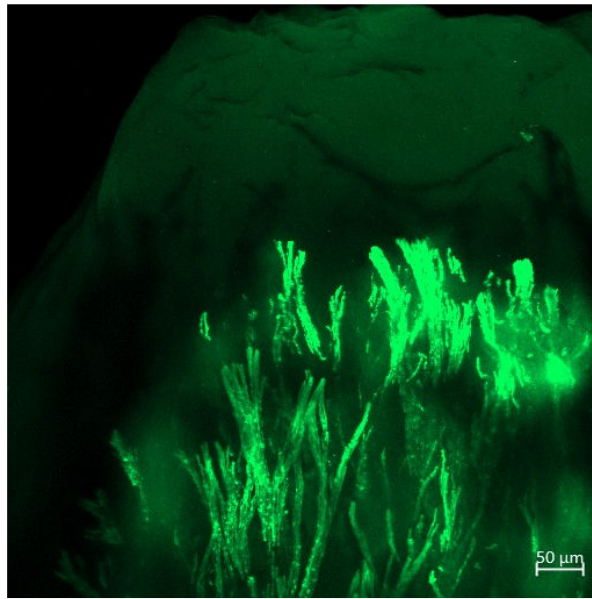


Fig. 5