



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 N.º de publicación: **ES 2 088 353**

21 Número de solicitud: 9302534

51 Int. Cl.⁶: A01N 35/04

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **02.12.93**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.96**

Fecha de concesión: **17.01.97**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.97**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:
16.03.97

73 Titular/es: **Universidad de La Laguna
C/ Astrofísico Fco. Sánchez, 2
38206 La Laguna, Tenerife, ES**

72 Inventor/es: **González Pérez, José Antonio;
Estévez Braun, Ana;
Gutiérrez Ravelo, Angel y
Estévez Reyes, Rafael**

74 Agente: **No consta**

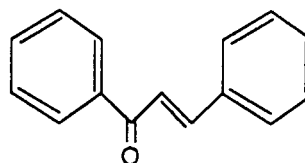
54 Título: **Control de nematodos fitoparásitos con trans-chalcona.**

57 Resumen:

La trans-chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) es un producto derivado biogenéticamente del fenil propano caracterizado por tener dos anillos aromáticos unidos por una cadena con un sistema carbonílico α , β insaturado. Se ha encontrado que esta molécula tiene una potente acción nematicida y nematostática para los nematodos fitoparásitos (Fórmula I). Es objeto de la invención el definir una sustancia previamente no descrita para el control de nematodos fitoparásitos.

También es objeto de la invención el dar nuevos usos a la trans-chalcona como nematicida y nematostático (inhibe de forma irreversible la eclosión de los juveniles de segundo estadio de los nematodos de quiste). Dichos usos no resultan evidentes del estado de la técnica.

El objeto de la invención es susceptible de aplicación industrial ya que puede obtenerse tanto por síntesis química como directamente de plantas.



Fórmula I

ES 2 088 353 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Se refiere a la utilización de la trans-chalcona (Formula I) para el control de nematodos fitoparásitos.

La trans-chalcona (1,3-difenil- 2-propen- 1-ona) es un producto derivado biogénicamente del fenil propano caracterizado por tener dos anillos aromáticos unidos por una cadena con un sistema carbonílico α , β insaturado.

A modo de ejemplo, la trans-chalcona puede obtenerse a partir de extractos vegetales ya que se encuentra de forma natural principalmente en las plantas compuestas, oxalidáceas, escrofulariáceas, gesneriáceas, acantáceas y liliáceas, y puede ser sintetizada en el laboratorio, entre otros métodos, mediante la acción de NaOH en una solución alcohólica de benzaldehído y acetofenona.

Durante los últimos 50 años, el control químico de los nematodos fitoparásitos se ha fundamentado en el uso de productos con alta toxicidad y baja especificidad (biocidas) tales como hidrocarburos halogenados, organofosfatos y carbamatos que son neurotóxicos. La aplicación de estos compuestos provocan a medio plazo problemas de contaminación y deterioro ambiental.

Una buen nematicida debe tener una alta especificidad. Un nematicida es específico cuando es altamente tóxico para el nematodo (acción nematicida) pero no lo es para otros organismos y/o si dicha sustancia es capaz de interrumpir una fase concreta del ciclo de vida del nematodo impidiendo su desarrollo (acción nematostática).

Se ha encontrado que la trans-chalcona tiene una potente acción nematicida y nematostática para los nematodos fitoparásitos, no es fitotóxica a las dosis empleadas para el control de nematodos y tiene una toxicidad aguda en ratón muy baja (Tabla I).

TABLA I:

Toxicidad de la trans-chalcona comparada con otros nematicidas.

Sustancia	Código R.T.E.C.S.*	DL ₅₀ **
Trans-Chalcona	FL6900000	1492* * *
Aldicarb	UE2275000	0.3
Carbofurano	FB9450000	2
Dazomet	XI2800000	180
Etoprofos	TE4025000	34
Fenamifos	TB3675000	22.7
Fonofos	TA5950000	3
Oxamilo	RP2300000	2.3

*: Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, US Public Health Service.

** : mg/Kg

*** : Calculado por nosotros (Ejemplo 3).

Desde un punto de vista práctico, las formulaciones comerciales del nematicida objeto de la patente podrían prepararse directamente a partir de extractos de plantas o de fracciones de dichos extractos, evitándose de esta forma la necesidad de aislar el compuesto en forma pura. La trans-chalcona es soluble en dimetil sulfóxido, éter, bisulfuro de carbono, benzeno y poco soluble en

alcohol. Otros posibles disolventes pueden ser determinados por un técnico especialista. Para las aplicaciones que requieran un alto grado de especificidad, esto es, un alto nivel de predicción de la respuesta esperada entre nematodos y otros organismos, normalmente será deseable preparar las formulaciones a partir de trans-chalcona pura o cuasi pura. Por ejemplo, es posible que sustancias extrañas en el material vegetal natural pudiesen ejercer efectos no deseados enmascarando o actuando como antagonistas de la actividad deseada, o ejercer un efecto tóxico para otros organismos. Estas mismas consideraciones de pureza deben tenerse en cuenta para la trans-chalcona producida sintéticamente.

Debido al elevado poder nematicida de la trans-chalcona, ésta deberá ser aplicada con una sustancia portadora o vehículo inerte aceptable agronómicamente. Ejemplos de sustancias portadoras que pueden utilizarse son alcoholes, acetona, cloroformo, soluciones acuosas con un 1% de dimetil sulfóxido y mezclas acuosas con surfactantes. Dependiendo del tipo de suelo, la especie vegetal, la especie de nematodos, modo de aplicación y del tipo de respuesta deseada, la concentración de trans-chalcona en la composición final puede variar considerablemente, pero típicamente deberá ser de al menos 0.00001% (0.1 p.p.m.). Factores tales como fitotoxicidad hacia la planta tratada y tolerancia de otras especies que pudiesen ser afectadas por la sustancia, pueden determinarse por un técnico especialista que determine el nivel máximo de trans-chalcona en la composición final del preparado.

Dependiendo de la especie de nematodo, concentración, forma y momento de aplicación, la trans-chalcona actúa controlando nematodos mediante dos mecanismos, inducción de muerte e inhibición irreversible de la eclosión de estadios juveniles, de esta forma, la cantidad de sustancia activa a administrar debe ser efectiva para inducir una u otra respuesta y se determinará mediante pruebas de rutina. El resultado final es la muerte de nematodos o la inhibición de eclosión. Se deben realizar entonces experimentos para establecer la cantidad efectiva de trans-chalcona que se define como aquella que provoca una mortalidad o una reducción de la eclosión significativamente mayor que la observada en un grupo sin tratar. La cantidad efectiva de trans-chalcona puede variar con la especie de nematodo, estado de desarrollo, naturaleza del sustrato, el período de tratamiento, el momento del tratamiento, el vehículo o portador utilizado y con otros factores relacionados.

Para que sea efectiva, la trans-chalcona debe aplicarse en los alrededores del nematodo a controlar. Los preparados conteniendo trans-chalcona podrían aplicarse directamente sobre las hojas, incorporarse de forma sistémica en la planta, por rociado directo sobre el parásito o en el sustrato que se supone podría estar en contacto con el parásito.

La trans-chalcona es efectiva en el control de nematodos fitoparásitos. Sin el ánimo de limitar los objetivos de la patente, hemos encontrado que los nematodos fitoparásitos formadores de quistes de la papa *Globodera pallida* y *G. rostochiensis*, y

los nematodos agalladores *Meloidogyne javanica*, son vulnerables a la trans-chalcona.

Los siguientes ejemplos tienen como fin el ilustrar la invención y en modo alguno limitan las posibilidades de la invención que se definen en las reivindicaciones.

Ejemplo 1.

Actividad nematocida de la trans-chalcona.

1.1.- *DL50 para nematodos.*

Se calculó la DL50 (concentración necesaria para causar la muerte del 50% de nematodos a las 24h) de la trans-chalcona en juveniles de segundo estadio de nematodos fitoparásitos. Los juveniles que se utilizaron se obtuvieron por inmersión de los quistes de una población mezcla de las especies *Globodera rostochiensis* y *G. pallida* en una solución 10 mM de ZnSO₄ que induce la eclosión de los huevos contenidos en los quistes. De 25 a 50 juveniles se colocaron en viales de vidrio con concentraciones variables de trans-chalcona (0,0.001, 0.005, 0.01, 0.05 mM). Se dispusieron cuatro replicados por tratamiento y los controles adecuados. A las 24 h se contaron los juveniles muertos y se calculó el porcentaje respecto al control (agua + disolvente).

Los datos se sometieron a un análisis de regresión calculándose la ecuación de la curva que mejor explicaba los resultados del experimento. A partir de ésta curva se calculó la dosis letal 50 teórica que resultó ser 0.033 mM de trans-chalcona (Fig. 1).

A una concentración de 0.05 mM de trans-chalcona, no sobrevivió ningún nematodo a las 24h, por lo que la dosis letal cien (concentración de trans-chalcona necesaria para causar la muerte del 100% de nematodos a las 24h) es inferior a esta concentración.

1.2.- *Actividad en campo en platanera frente a Meloidogyne javanica*

Se prepararon 3000 litros de una solución de trans-chalcona 0.05 mM y se aplicaron al suelo con el agua de riego en un invernadero de platanera que presentaba un ataque del nematodo fitoparásito *Meloidogyne javanica*. Tres días más tarde se tomaron muestras de suelo de la parcela tratada y se comprobó que en las extracciones de nematodos por el método de centrifugación en azúcar (extrae tanto nematodos vivos como muertos) había sólo un 25% de larvas de *M. javanica* vivas, por lo que el tratamiento con trans-chalcona tuvo una efectividad próxima al 75%.

1.3.- *Índices de agallamiento en tomate.*

Se sembraron plantas de tomate de una variedad comercial susceptibles a *M. javanica* alrededor de las plantas de platanera tratadas y no tratadas con trans-chalcona del experimento 1.2. El índice de agallamiento en las raíces de tomate nos da una idea muy aproximada del nivel de infección de nematodos de los nódulos radiculares en campo (Bridge y Page, 1980. Tropical Pest Management, 26: 296-298). Para clasificar los ataques de nematodos en las raíces de tomate, se establecieron índices de agallamiento de 0 a 5. Las plantas que crecieron en suelo tratado con trans-chalcona tuvieron un índice medio de agallamiento (ima) significativamente inferior (ima=3) a las que crecieron en suelo sin tratar (ima=4.33).

Ejemplo 2.

Actividad nematostática de la trans-chalcona.

Se realizó un experimento para ver el efecto de la trans-chalcona en la eclosión de *Globodera* spp. Se colocaron 10 quistes de una población mezcla de las especies *Globodera rostochiensis* y *G. pallida* en viales con 2 cc de una solución que contenía 10 mM ZnSO₄ como agente inductor de la eclosión y una concentración variable de trans-chalcona (0.05, 0.04, 0.03, 0.01 y 0.005 mM). Los juveniles eclosionados en los cuatro replicados por tratamiento y en los controles, se contaron periódicamente durante 15 días. De la curva de regresión que mejor explicaba los resultados del experimento, se estimó que la presencia de sólo 0.007 mM de trans-chalcona durante 15 días era suficiente para reducir la eclosión a la mitad de la del control. A concentraciones de 0.03 mM de trans-chalcona y superiores, la eclosión se inhibe por completo (Fig. 2).

Posteriormente, y a fin de ver si la inhibición de la eclosión era irreversible, se retiraron los quistes, se lavaron con agua destilada y se colocaron en viales nuevos con 2 cc de una solución que contenía sólo el agente inductor de eclosión (10 mM ZnSO₄). Se comprueba que el efecto inhibitorio de la eclosión de la trans-chalcona es irreversible a las dosis mayores de 0.03 mM. La eclosión ocurrida a la dosis de 0.01 mM fue muy inferior a la del control (37.28%) en los primeros 15 días y prácticamente nula (sólo eclosionaron un 4.6% respecto al control) después de retirar la trans-chalcona a los 15 días de iniciado el experimento (Fig. 3).

Ejemplo 3.

Toxicidad para ratón Albino-Swiss.

Se estudió la toxicidad en ratón "Albino-Swiss" macho mediante la aplicación intraperitoneal (i.p.) de dosis variables de trans-chalcona en 10 ratones por tratamiento. Se valoró el número de animales muertos a las 24 horas de la aplicación y se calculó la ecuación de la curva de regresión que mejor explica los resultados del experimento. A partir de las ecuaciones de regresión se estimaron las DL50 y DL0 (dosis de trans-chalcona sin efecto aparente) a las 24h. También se estimó el potencial de toxicidad (pT) (Luckey y Venugopal, 1977. J. Toxicol. & Environ. Health. 2:633.).

La DL50 se estimó en 1494 mg/Kg a las 24h (Fig. 4). De estos datos se deduce que la trans-chalcona es una sustancia ligeramente tóxica con DL50 comprendido entre 0.5 y 5 g/Kg (Loomis, 1982. Ed Acribia. Zaragoza, 33-43). El efecto letal cero para la trans-chalcona a las 24 horas fue de DL0= 653.85 mg/Kg.

El potencial de toxicidad se estimó en pT50=2.14. Según la escala de toxicidad de Repeto (Repeto, M., 1981. Ed. Científico Médica. Barcelona, 28), la trans-chalcona es una sustancia con muy poco potencial tóxico y se encuentra entre el ácido pantoténico (pT50=2.39) y el CdCl₂ (pT50=2.13), en esta escala se acerca bastante al potencial de toxicidad del CINa (pT50=1.35).

Ejemplo 4.

Citotoxicidad, ensayo con Artemia salina "Brine shrimp Assay".

Los análisis de toxicidad de una sustancia para

el camarón de la salmuera *Artemia salina* (Brine shrimp), dan una idea muy aproximada de la actividad biológica de un producto y mas en concreto de su citotoxicidad.

El experimento se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Mayer *et al.*, 1982. (*Planta Med.* 45: 31-34) calculandose la DL50 a las 24h para los camarones. Se usaron cuatro replicados de cada una de las concentraciones de trans-chalcona (0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 mM) y los controles adecuados. La DL50 estimada fue de 0.0247 mM, dosis que coincide aproximadamente con la calculada para las larvas de segundo estadio de nematodos de quiste (DL50=0.033).

Ejemplo 5.

Fitotoxicidad de la trans-chalcona.

5.1. *Efecto sobre la Germinación de berro y tomate.*

Se estudia el efecto de la trans-chalcona en la germinación y elongación de semillas de tomate (*Lycopersicum esculentum* var. marglobe) y berro (*Nasturtium officinale*).

Para tomate se pusieron 10 semillas sobre un papel de filtro impregnado con una solución de trans-chalcona o del control (agua + disolvente) en placas de Petri en un germinador a 28°C. Para berro, se ponen igualmente 10 semillas en viales con 5 ml de la solución de trans-chalcona o del control y se hace el experimento en un germinador a 25°C. Se dispusieron cuatro replicados por tratamiento (0.05 y 0.5 mM) y controles. Pasados siete días se registró el porcentaje de semillas germinadas y la longitud del hipocótilo emitido en tomate y la longitud de la raíz primaria emitida en berro.

La tasa de germinación (% germinado respecto al control) no varió en tomate mientras que en berro se observó una ligera inhibición de la germinación para una dosis de trans-chalcona de 0.5 mM.

La tasa de elongación (% elongado respecto al control) no varió significativamente en tomate, mientras que en berro se observó una fuerte inhibición de la raíz primaria a la dosis de 0.5 mM. (Tabla II).

TABLA II:

Efecto de la trans-chalcona en la germinación de tomate y berro

[trans-chalcona] (mM)	Tomate		Berro	
	TG	TE	TG	TE
0.05	102.77	104.9	78.38	97.87
0.5	100	89.15	86.49	18.36

TG: Tasa de germinación;

TE: Tasa de elongación.

Sólo se observan efectos de inhibición del crecimiento y germinación de semillas a dosis muy por encima de las dosis activas como nematocidas (< 0.05 mM) o nematostáticas (< 0.03 mM).

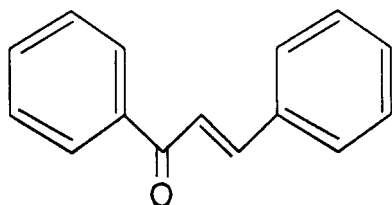
5.2. *Efecto sobre el desarrollo de plantas.*

La fitotoxicidad de la trans-chalcona se estudió en laboratorio usando plantas de *Vinca major* (8 plantas), *Adiantum capillus-veneris* (2 plantas), *Begonia rex* (2 plantas) y *Hedera helix* (2 plantas) obtenidas localmente y que se cultivaron en una cámara a 25°C, 80% de humedad relativa y 13 h de luz al día. La mitad de las plantas se trataron con una dosis de trans-chalcona de 0.05 mM aplicada en un riego a capacidad de campo. Se siguió el desarrollo de las plantas durante 50 días no observándose diferencias en el crecimiento ni en el aspecto general entre las plantas tratadas y no tratadas.

Se estudió igualmente la fitotoxicidad de la trans-chalcona para plantas de platanera (*Musa* spp. cv Cavendish "Gran enano"). Plataneras de tres meses de edad procedentes de cultivo *in vitro*, se plantaron en macetas de 5 l de capacidad con un sustrato 1:1:1 (turba: arena: lapilli) y se dispusieron al azar en un invernadero. Para este experimento se dispusieron 10 replicados por tratamiento y 5 para los controles. No se observó efecto alguno de la trans-chalcona después de 3 meses de ser aplicada a las concentraciones de 0.05 y 0,5 mM con el agua de riego hasta capacidad de campo. Tampoco se observó ningún efecto después de 6 meses de la aplicación de trans-chalcona en las plantas de platanera tratadas en invernadero del ejemplo 1.2.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el control de nematodos fitoparásitos que implica la aplicación directa sobre ellos o al sustrato que se supone podría entrar en contacto con ellos, de una cantidad efectiva del compuesto con fórmula estructural:



2. El método según la reivindicación 1 cuando el compuesto es trans-chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona).

3. El método según la reivindicación 1 cuando la plaga son nematodos fitoparásitos.

4. El método según la reivindicación 1 cuando dicho compuesto forma parte de una mezcla de sustancias.

5. El método según la reivindicación 1 cuando dicho compuesto se aplica al sustrato en combinación con una sustancia vehículo o portador apropiado.

FIGURAS

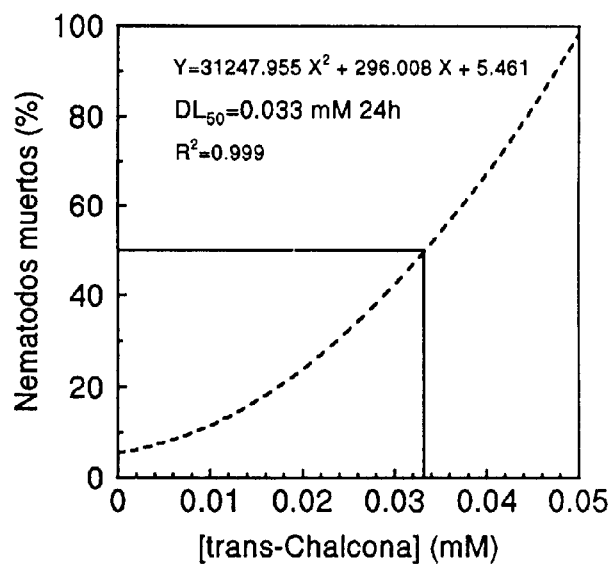


Fig. 1: Dosis letal 50 (24h) de la trans-chalcona para juveniles de segundo estadio de *Globodera* spp.

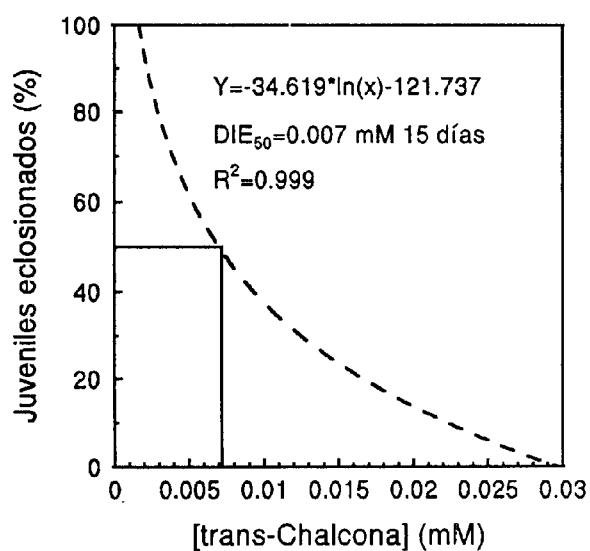


Fig.2: Dosis inhibitoria de la eclosión 50 (15 días) de la trans-chalcona para juveniles de segundo estadio de *Globodera* spp.

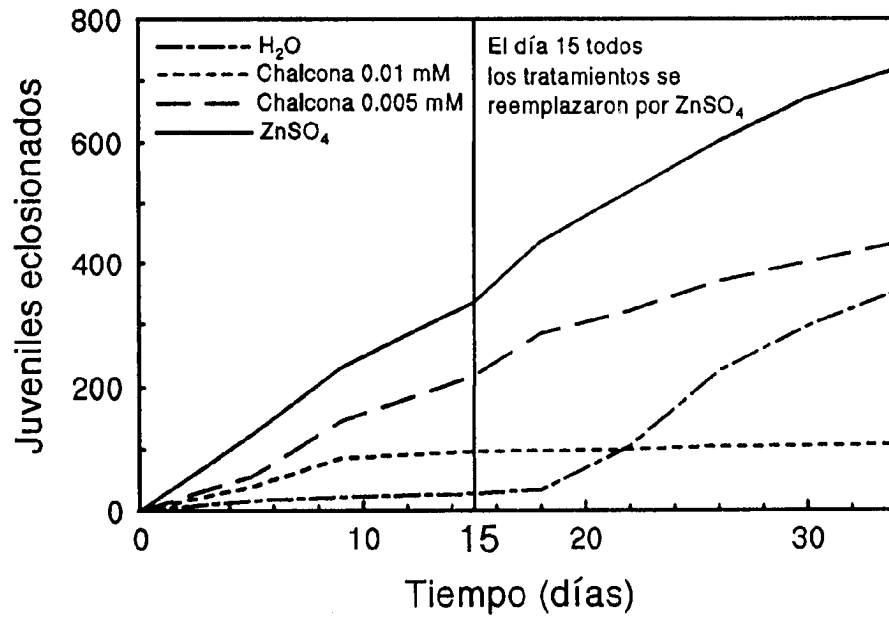


Fig.3: Efecto de concentraciones variables de trans-chalcona durante la eclosión de *Globodera* spp.

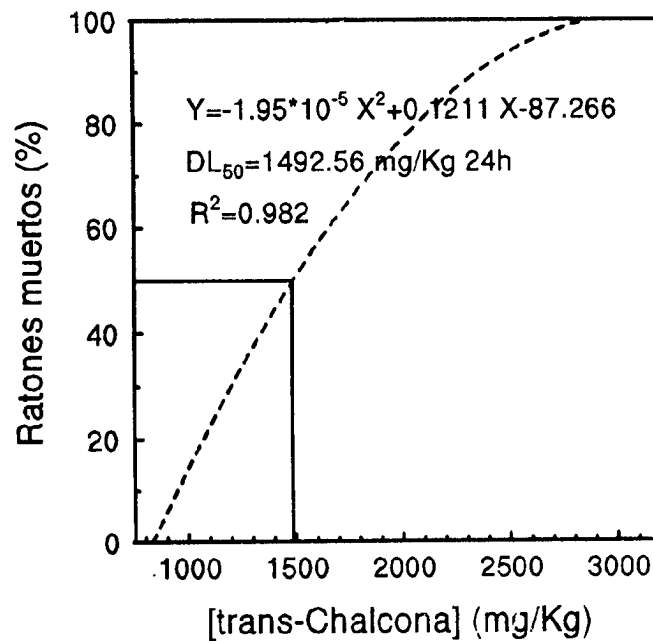


Fig.4: Dosis letal 50 en ratón a las 24 horas de la aplicación intraperitoneal de trans-trans-chalcona.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: A01N 35/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	N. AKAO. In vivo assesment of morbidity of Toxocara canis larvae using a dye exclusion assay. Biological Abstracts (1993), Vol. 95, n° 12, Abs. n° 128488	1-5
X	LALIBERTE R. Anthelmintic activities of chalcones and related compounds. Can. J. Pharm. Sci (1967) Vol. 2 n° 2, páginas 37-43	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

28.05.96

Examinador

M. Ojanguren Fernández

Página

1/1