



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 088 817**

② Número de solicitud: 9302532

⑤ Int. Cl.⁶: A01N 43/08

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **02.12.93**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.96**

Fecha de concesión: **01.04.97**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.08.97**

⑯ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.08.97

⑰ Titular/es: **Universidad de La Laguna
c/ Astrofísico Fco. Sánchez 2, La Laguna
Sta. Cruz de Tenerife, Tenerife, ES**

⑱ Inventor/es: **González Pérez, José Antonio;
Estévez Braun, Ana;
Gutiérrez Ravelo, Angel y
Estévez Reyes, Rafael**

⑳ Agente: **No consta**

② Título: **Control de nematodos fitoparásitos con lignanos tipo dibencil-butirolactonas.**

④ Resumen:

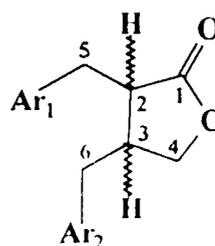
Los lignanos tipo dibencil-butirolactonas son metabolitos secundarios cuyo esqueleto deriva de la unión por los carbonos β de su cadena lateral, de dos unidades de 1-fenilpropano con un puente éter adicional. Estos compuestos se caracterizan por presentar la fórmula estructural mostrada en la fórmula I.

Se ha encontrado que cuando estas moléculas presentan una estereoquímica 2R, 3R y unos determinados grupos funcionales (hidroxi, metilendioxi o metoxi) en las posiciones 3', 4' y 3'', 4'' de los anillos aromáticos, tienen una potente acción nematostática para nematodos fitoparásitos.

Es objeto de la invención el definir unas sustancias previamente no descritas para el control de nematodos fitoparásitos.

También es objeto de la invención el dar nuevos usos a los lignanos tipo dibencil-butirolactonas con las características antes definidas, como agentes nematostáticos (inhiben la eclosión de 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 estos lignanos pueden obtenerse tanto por síntesis química como directamente de plantas.



Fórmula I

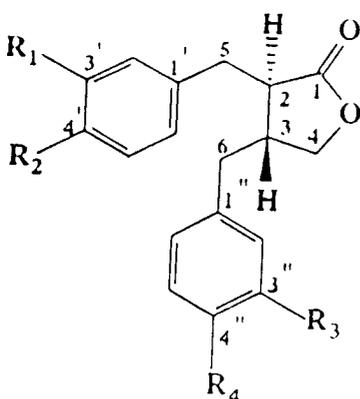
Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Descripción de la invención

Se refiere a la utilización como agentes nematostáticos de lignanos tipo dibencil-butirolactonas. Estos son metabolitos secundarios cuyo esqueleto deriva de la unión, por los carbonos β de su cadena lateral, de dos unidades de 1-fenilpropano con un puente éter adicional.

Estos compuestos se caracterizan por presentar la fórmula estructural mostrada en la fórmula I. Se ha encontrado que cuando estas moléculas presentan una estereoquímica 2R, 3R y unos determinados grupos funcionales (hidoxi, metiléndioxi o metoxi) en las posiciones 3', 4' y 3'', 4'' de los anillos aromáticos (fórmula II), tienen una potente acción nematostática para nematodos fitoparásitos.



Donde R₁, R₂, R₃ y R₄ pueden seleccionarse entre:

- OMe
- OH
- OCH₂O-

Fórmula II.- Fórmula estructural de los lignanos tipo dibencil-butirolactonas mostrando los radicales relevantes en su actividad nematostática.

A modo de ejemplo, los lignanos tipo dibencil-butirolactonas pueden obtenerse a partir de extractos vegetales ya que se encuentran de forma natural principalmente en plantas de las familias Hernandiaceae, Oleaceae, Pinaceae y Umbelliferae. Así mismo, pueden ser sintetizados en el laboratorio, entre otros métodos, mediante los procedimientos descritos por Mahalanabis et al, 1982. (*Tetrahedron Lett.* 23: 3971-4) y Moritani et al, 1990. (*Tetrahedron Lett.* 31: 3615).

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 y largo plazo problemas de contaminación y deterioro ambiental.

Un producto nematostático debe tener una alta especificidad, esto es, cuando es altamente tóxico para el nematodo (acción nematocida) 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 los lignanos tipo dibencil-butirolactonas con las características descritas anteriormente, tienen una potente acción nematostática para los nematodos fitoparásitos.

Desde un punto de vista práctico, las formulaciones comerciales de las sustancias nematostáticas 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. Los lignanos tipo dibencil-butirolactonas, son solubles en dimetil sulfoxido, acetona, etanol, metanol, benceno etc. 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 estos lignanos puros o casi puros. 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 los lignanos tipo dibencil-butirolactonas producidos sintéticamente.

Debido al elevado poder nematostático de los lignanos tipo dibencil-butirolactonas, estos deberán ser aplicados con una sustancia portadora o vehículo inerte aceptable agrónomicamente. Ejemplos de sustancias portadoras que pueden utilizarse son: alcoholes, acetona, soluciones acuosas con un 1% de dimetil sulfoxido y mezclas acuosas con surfactantes. Dependiendo del tipo de suelo, la especie vegetal, la especie de nematodo, modo de aplicación y del tipo de respuesta deseada, la concentración de lignanos tipo dibencil-butirolactonas 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 lignanos en la composición final del preparado.

Dependiendo de la especie de nematodo, concentración, forma y momento de aplicación, los lignanos tipo dibencil-butirolactonas descritos anteriormente, actúan controlando nematodos mediante la inhibición de la eclosión de estadios juveniles. De esta forma, la cantidad de sustancia activa a administrar debe ser efectiva para inducir dicha respuesta y se determinará mediante pruebas de rutina. El resultado final es la inhibición de la eclosión. Se deben realizar entonces experimentos para establecer la cantidad efectiva de lignanos que se define como aquella que provoca una reducción de la eclosión signifi-

cativamente mayor que la observada en un grupo sin tratar. La cantidad efectiva de lignanos puede variar con las especies de nematodo, estado de desarrollo, naturaleza del sustrato, el periodo de tratamiento, el momento del tratamiento, el vehiculo o portador utilizado y con otros factores relacionados.

Para que sean efectivos, los lignanos tipo dibencil-butirolactonas deben aplicarse en los alrededores del nematodo a controlar. Los preparados conteniendo dichas sustancias podrían aplicarse directamente por rociado sobre el parásito o en el sustrato que se supone podría estar en contacto con el parásito.

Los lignanos tipo dibencil-butirolactonas con las características mencionadas anteriormente, son efectivos 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*, son vulnerables a la acción de estos lignanos.

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 nematostática de lignanos tipo dibencil-butirolactonas.

Se realizó un experimento para ver el efecto de lignanos tipo dibencil-butirolactonas 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 2cc de una solución 10 mM ZnSO₄ como agente inductor de la eclosión y una concentración de 50 ppm de los lignanos 1. Burserhenina (R₁=R₂=-OMe, R₃, R₄=-OCH₂O-), 2. Matairesinol (R₁=R₄=-OMe, R₂=R₃=-OH), 3. Guayarol (R₁=R₂=-OMe, R₃=R₄=-OH), 4. Siringaresinol (lignano tipo bis-epoxi), 5. Buplerol (R₁=R₂=R₄=-OMe, R₃=-OH) y 6. Triacetato de Nortrachelogenina (R₁=R₄=-OMe, R₂=R₃ =-OAc y en C-2 un grupo -OAc en lugar de -H con igual esteoquímica que este). El lignano 4 se seleccionó para ver la influencia del anillo lactónico típico

de los lignanos dibencil-butirolactonas y ausente en este compuesto; el lignano 6 se seleccionó para ver el efecto del bloqueo en C-2 provocado por la presencia de un grupo voluminoso como el -OAc. Asimismo se dispusieron los controles C1 (agua + disolvente) y C2 (10 mM ZnSO₄ + disolvente). Los juveniles eclosionados en los cuatro replicados por tratamiento y en los controles se contaron periódicamente durante 14 días.

La pauta de eclosión de *Globodera spp.* a lo largo del tiempo en presencia y ausencia de lignanos puede verse en la Fig. 1. El análisis de la varianza mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre tratamientos, tiempo y en la interacción tratamiento x tiempo.

El test de rango múltiple de Duncan ordena las medias del experimento en grupos no significativamente diferentes Fig. 2. Después de 14 días, todos los tratamientos eclosionaron mas juveniles que el control con agua destilada (C1). El número de juveniles eclosionados cuando los lignanos (1) y (2) estaban presentes fué significativamente inferior a los del control (C2) y redujeron la eclosión en un 69.96% (1) y 55.14% (2).

La actividad nematostática se ve favorecida cuando R₃=R₄= -OCH₂O-, cuanto mayor el número de grupos -OH y con la no sustitución en C-2.

Ejemplo 2

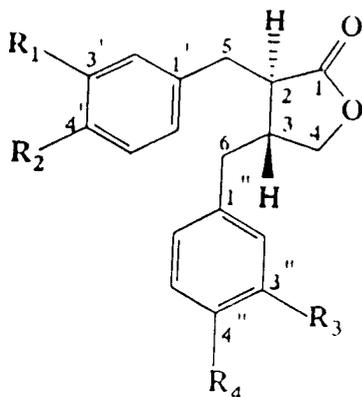
Estimación de la inhibición de la eclosión de Globodera spp por el lignano burserhenina.

Se estudió el efecto de diferentes dosis del lignano que mostró una mayor actividad en la inhibición de la eclosión de *Globodera spp.* Para ello, se pusieron 10 quistes de una población mezcla de *G. rostochiensis* y *G. pallida* en viales con 2cc de una solución 10 mM ZnSO₄ como agente inductor de eclosión y una concentración variable de burserhenina (0, 5, 25, 50 ppm). Se dispusieron cuatro replicados por tratamiento.

De la curva de regresión que mejor explicaba los resultados del experimento, se estimó que la presencia de sólo 16.42 ppm del lignano tipo dibencil-butirolactona burserhenina durante 15 días era suficiente para reducir la eclosión a la mitad (fig. 3).

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 de compuestos con fórmula estructural



Donde R₁, R₂, R₃ y R₄ pueden seleccionarse entre:

-OMe
-OH
-OCH₂O-

2. El método según la reivindicación 1 cuando R₁, R₂, R₃, R₄ son -OMe, -OH, o -OCH₂O-.

3. El método según la reivindicación 1 cuando el compuesto es burserhenina (R₁=R₂=-OMe, R₃, R₄=-OCH₂O-).

4. El método según la reivindicación 1 cuando el compuesto es matairesinol (R₁=R₄=-OMe, R₂=R₃=-OH).

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

6. El método según la reivindicación 1 cuando dichos compuestos forman parte de una mezcla de sustancias.

7. El método según la reivindicación 1 cuando dichos compuestos se aplican al sustrato en combinación con una sustancia vehículo o portador apropiado.

FIGURAS

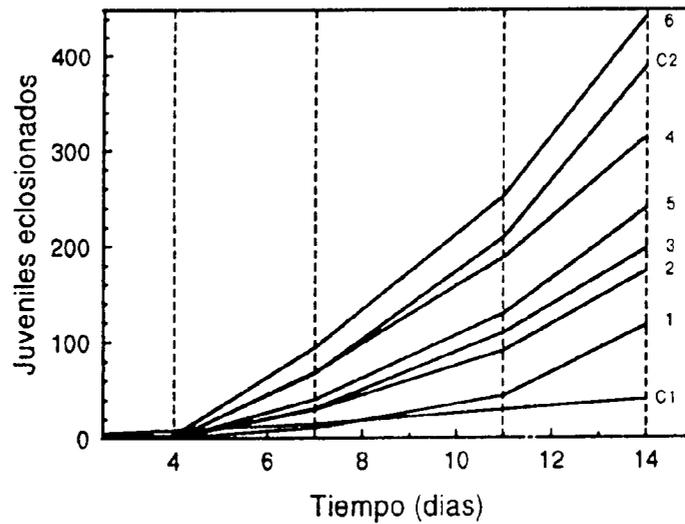


Fig. 1.- Efecto de la presencia de los lignanos seleccionados en la eclosión de *Globodera* spp.

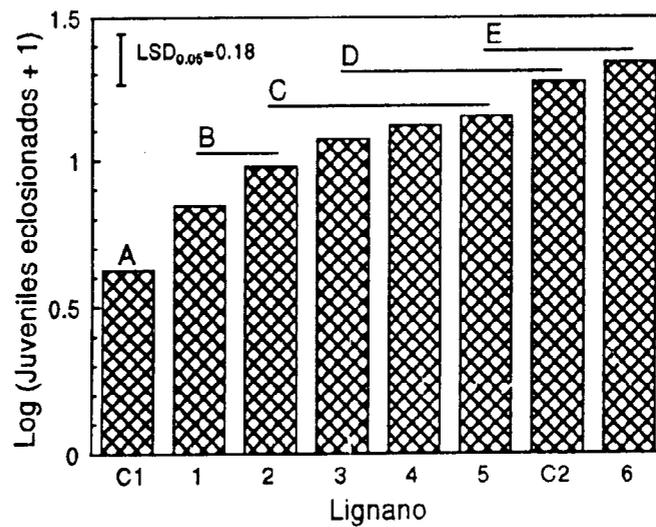


Fig. 2.- Valores medios ($\log(1 + \text{media})$) de eclosión de *Globodera* spp agrupados según un test de rango múltiple de Duncan. Las medias con igual letra no son significativamente diferentes.

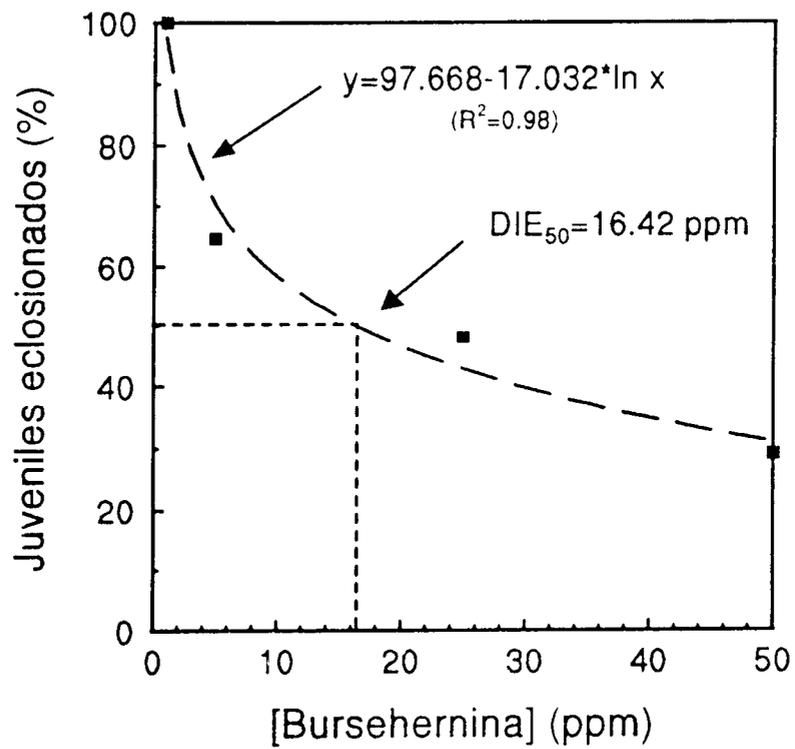


Fig.3: Dosis Inhibitoria de eclosión 50 (DIE₅₀) a los 15 días de la aplicación del lignano burserhenina.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① ES 2 088 817
② N.º solicitud: 9302532
③ Fecha de presentación de la solicitud: 02.12.93
④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: A01N 43/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP-237271-A (KYOWA HAKKO) (16.09.87)	1-7
A	ES-8304114-A (CHEVRON) (20.12.82)	1-7

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.º:

Fecha de realización del informe

09.07.96

Examinador

M. Ojanguren Fernández

Página

1/1