

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 516**

21 Número de solicitud: 201431276

51 Int. Cl.:

**A01N 43/28** (2006.01)

**A01N 63/04** (2006.01)

**C07D 317/34** (2006.01)

**C12P 17/04** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**01.09.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**05.04.2016**

Fecha de la concesión:

**10.01.2017**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**17.01.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2015/070641**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (70.0%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid (Madrid) ES y  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (30.0%)**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ COLOMA, Azucena;  
DÍAZ HERNÁNDEZ, Carmen Elisa;  
ANDRÉS YEYES, Mª Fe;  
FRAGA GONZÁLEZ, Braulio M.;  
BOLAÑOS GONZÁLEZ, Patricia;  
CABRERA PÉREZ, Raimundo y  
GIMÉNEZ MARIÑO, Cristina**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **PRODUCTOS BIOCIDAS Y SU USO PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS  
Y ORGANISMOS PLAGA QUE AFECTAN A PLANTAS**

57 Resumen:

Productos biocidas y su uso para el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas.

Las enfermedades y plagas constituyen un importante problema en el campo de la agricultura. La presente invención propone un nuevo compuesto de fórmula (I) con actividad biocida, aislado a partir del producto de fermentación de hongos endófitos del género *Guignardia* sp. La invención también se refiere al método de obtención del compuesto de fórmula (I), a un producto de fermentación que lo comprende junto a otros compuestos conocidos que comparten estructura y actividad biocida con el compuesto de fórmula (I) y al uso de dichos compuestos como biocidas, y especialmente como nematocidas, bien directamente o a través de una composición, constituyendo de este modo un efectivo método de control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas.

ES 2 565 516 B1

## DESCRIPCIÓN

Productos biocidas y su uso para el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas

5

### SECTOR DE LA INVENCION

La invención se sitúa dentro del campo de la agricultura, y más concretamente, en el sector de los biocidas que comprenden sustancias producidas o extraídas de microorganismos. Se propone un nuevo compuesto de fórmula (I) con actividad biocida aislado a partir de un producto de fermentación de hongos endófitos del género *Guignardia sp.* La invención también se refiere a un método de obtención de dicho compuesto que utiliza hongos endófitos del género *Guignardia sp.* y a un producto de fermentación que lo comprende junto a otros compuestos conocidos de fórmula general (II) que comparten estructura y actividad biocida con el compuesto de fórmula (I). Los compuestos que se incluyen en el ámbito de la presente invención se relacionan por primera vez con actividad biocida, y especialmente con actividad nematicida, por lo que la invención también tiene que ver con el uso de dichos compuestos como biocidas, tanto de forma aislada como a través de una composición biocida que los comprenda. En último lugar, la invención también se refiere a un método de control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas y que utiliza a la composición biocida, al producto de fermentación, o a los compuestos incluidos en la invención.

### ESTADO DE LA TECNICA

Los hongos endófitos representan una fuente alternativa de productos naturales interesantes desde el punto de vista biológico. Estos hongos son microorganismos que colonizan los espacios intersticiales de las plantas sin llegar a ser patógenos para ellas y que establecen una interacción endófito-planta que mejora la adaptación ecológica de la planta al ecosistema en el que habita, aumentando su tolerancia al estrés, a cambios de temperatura y salinidad, y su resistencia frente a enfermedades, herbívoros, insectos, nematodos, bacterias y hongos (Aly et al. 2010. *Fungal Divers* 41, 1–16).

35

El género *Guignardia* (Ascomycetes) y su género anamorfo *Phyllosticta* es un grupo de hongos microscópicos que comprenden importantes fitopatógenos que afectan a un amplio rango de especies vegetales. Algunas especies de este género provocan manchas negras en las hojas y enfermedades de cultivos y plantas ornamentales con gran importancia económica, como cítricos, plátanos, manzanas, uvas, arándanos y orquídeas (Wikee et al. 2011. *Fungal Divers* 51, 43–61). Especies del género *Phyllosticta* son también fuente de nuevos metabolitos bioactivos como fillostina y fillostoxina, que se han considerado agentes potenciales para el control de plagas por su actividad fitotóxica (Evidente et al. 2008. *J. Agric. Food Chem.* 56, 884–888). En el cultivo del hongo *G. bidwelli* se han identificado nuevos compuestos fitotóxicos como el ácido penguignárdico y otros siete metabolitos secundarios: ácido alaguignárdico y las guignardianonas A-E (Molitor et al. 2012. *J. Nat. Prod.* 75, 1265–1269; Buckel et al. 2013. *Phytochemistry* 89, 96–103), estructuralmente relacionados con el ácido guignárdico (Rodrigues-Heerklotz et al. 2001. *Helv. Chim. Acta.* 84, 3766-3772).

Se ha descrito una reducida capacidad biocida contra hongos, insectos y parásitos de algunos extractos de *Guignardia manguiferae* aislados de distintos huéspedes (Giménez, C. 2006. Productos bioactivos de plantas canarias y sus hongos endófitos: detección de actividad y utilización en el control de plagas y enfermedades agrícolas Universidad de la Laguna. Tesis de doctorado.); y también un moderado nivel de actividad fungicida contra la enfermedad *Sclerotinia* del garbanzo de un extracto de etilacetato obtenido a partir del hongo endófito *Guignardia cammillae* aislado de *J. curcus* (Susheel et al. 2013. *Plos One* 8 (2), e56202).

Por su parte y dentro de la literatura patente, el documento W02002/017937 A1 se refiere, a extractos acuosos u orgánicos obtenidos a partir de la fermentación de hongos de *Guignardia* sp. aislados de las hojas del árbol *Spondias mombin*; a fracciones con actividad biológica obtenidas a partir del extracto; y al ácido guignárdico identificado en dicho extracto y que son efectivos contra bacterias, levaduras y hongos.

La *G. manguiferae* se ha aislado como endófito de especies como *Ilex cornuta*. En su fermentación en medio líquido se han obtenido los compuestos meroterpénicos guignardonas A-C (Yuan et al. 2010. *Eur. J. Org. Chem.* 6348–6353). En el cultivo de *G. manguiferae* aislado de *Garcinia hombroniana* se han identificado las guignareronas A-D (Sommart et al. 2012. *Phytochemistry Letters* 5,139–143). Además,

del extracto del endófito *G. manguiferae* aislado de *Smilax glabra* se han identificado los compuestos: 15-hidroxitricicloalternareno, guignardiaenos D y C, guignardonas A y B, ácido 3-(4-metilfenoxi)-propanoico, nonano-2, 4-diol, ergosterol, tirosol y p-hidroxibenzaldehido (Liang et al. 2012. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 43, 856-860).

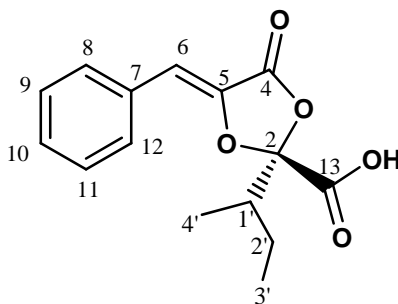
Tradicionalmente el método habitual para el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas ha sido la aplicación de productos químicos de síntesis, que además de su alto precio económico implica un grave coste ambiental. Sin embargo, el nuevo entorno regulatorio, véase por ejemplo tanto a nivel nacional como europeo el Reglamento (CE) N° 1107/2009, ha limitado drásticamente el número de materias activas y la disponibilidad de los productos fitosanitarios destinados al control de las enfermedades causadas por estos patógenos. Por todo ello actualmente existe una necesidad clara de búsqueda y desarrollo de nuevas compuestos activos alternativos eficaces y menos tóxicos entre los que los productos naturales procedentes del metabolismo secundario de microorganismos pueden presentar un gran potencial.

## EXPLICACION DE LA INVENCION

20

### Breve descripción

La presente invención se relaciona en un primer aspecto con un compuesto con actividad biocida aislado a partir de un producto de fermentación de hongos endófitos del género *Guignardia*, de fórmula (I):



(I)

30

o un isómero, una sal o un solvato del mismo.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento de obtención del compuesto de fórmula (I) que comprende las siguientes etapas:

5 a) cultivar micelio de un hongo del género *Guignardia sp.* en un medio de cultivo hasta conseguir un producto fermentado y

b) aislar al compuesto de fórmula (I) a partir del producto fermentado de la etapa anterior.

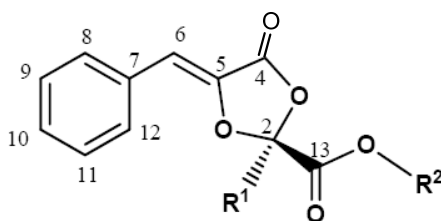
10

Preferentemente el hongo del género *Guignardia sp.* es un hongo de la especie *G. manguiiferae*, y más preferentemente, la cepa YCC4 aislada de hojas de *Persea indica* depositado en la CECT con número de acceso 20914 en fecha 2 julio de 2014.

15 En un tercer aspecto, la invención se relaciona con el producto fermentado que se obtiene tras la etapa (a) del procedimiento obtención y que comprende al compuesto de fórmula (I) y actividad biocida.

Adicionalmente, el producto fermentado comprende un compuesto de fórmula general (II):

20



(II)

donde R1 se selecciona entre metiletil y metilfenil y R2 se selecciona de entre CH<sub>3</sub>, etilfenil y H,

25

o un isómero, una sal o un solvato del mismo.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso para el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas, y preferentemente para el

control de nematodos, del compuesto de fórmula (I) o del compuesto de fórmula general (II), ya sea de forma aislada o en combinación, o del producto fermentado.

5 En un quinto aspecto, la invención se relaciona con una composición biocida que comprende al compuesto de fórmula (I) o al compuesto de fórmula general (II), ya sea de forma aislada o en combinación, o al producto fermentado.

10 En un sexto aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición biocida para el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas, y preferentemente para el control de nematodos.

15 En un último aspecto, la invención se relaciona con un método de control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas, y preferentemente de nematodos, que comprende administrar una dosis eficaz del compuesto de fórmula (I) o del compuesto de fórmula general (II), ya sea de forma aislada o en combinación, o del producto fermentado, o de la composición biocida.

### **Descripción detallada de la invención**

20 El problema técnico que resuelve la presente invención es la búsqueda de nuevos principios activos naturales, que tienen su origen en extractos obtenidos de la fermentación con hongos endófitos, y que por su actividad biocida puedan ser utilizados en el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas, y especialmente de nematodos, de una forma efectiva y respetuosa con el medio  
25 ambiente.

Se ha descubierto que un compuesto de fórmula (I) obtenido a partir de un producto de fermentación de una cepa de hongo *Guignardia mangiferae* aislada de las hojas de *Persea indica* (ver ejemplos 1 a 4), presenta actividad biocida (ver ejemplos 5 y 6), y  
30 que ésta, es especialmente considerable contra nematodos (ver ejemplo 7).

Las principales ventajas técnicas de los compuestos que se incluyen dentro del ámbito de la invención, de su procedimiento de obtención, así como de su uso para el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas se enumeran a  
35 continuación:

-se obtienen de fuentes naturales, por procedimientos sencillos y económicos,

-se pueden obtener a gran escala por fermentación del microorganismo en biorreactores y las condiciones de fermentación se pueden manipular para aumentar la  
5 producción de componentes activos,

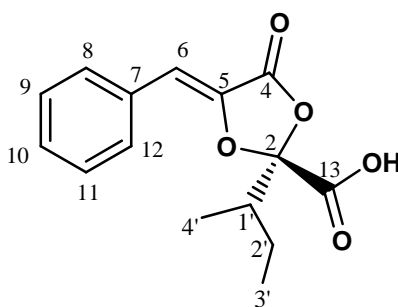
-son efectivos simultáneamente contra varios patógenos,

-son singularmente efectivos contra nematodos, alcanzando en este caso una  
10 efectividad superior al 99%, muy por encima, por ejemplo, del producto Abamectina (AVICTA®) que presenta un valor de en torno al 35 % en condiciones experimentales similares.

Los inventores de la presente invención han identificado, por primera vez, un  
15 compuesto bioactivo con actividad biocida obtenido a partir de una fermentación con hongos endófitos del género *Guignardia sp.*, gracias a su caracterización en base a datos físicos y espectroscópicos, y por comparación de los mismos con los publicados en la bibliografía.

20 Adicionalmente al compuesto de fórmula (I) se han identificado otros compuestos conocidos como son el ácido guignárdico (Rodrigues-Heerklotza et al. 2001. *Helv. Chim. Acta* 84, 3766-3772), el metil ester del ácido penguignardico (Andernach et al. 2013. *European Journal of Organic Chemistry* 26, 5946-5951), las guignardonas A y B (Yuan et al. 2010. *Eur. J. Org. Chem.* 6348-6353), las guignarenonas B y C (Sommart et al. 2012. *Phytochemistry Lett.* 5, 139-143), las guignardianonas A, C (1) y D (2) y E  
25 (Buckel et al. 2013. *Phytochemistry* 89, 96-103) y el ácido 3,4 dihidroxibenzoico.

En un aspecto, la invención se relaciona con un compuesto con actividad biocida que se aísla a partir de un producto de fermentación con hongos endófitos del género  
30 *Guignardia sp.* y de fórmula (I), en adelante compuesto de la invención,



(I)

o un isómero, una sal o un solvato del mismo.

- 5 En el ámbito de la invención se utilizan indistintamente los términos compuesto de fórmula (I) o ácido metguignárdico.

De forma general, todos los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran las sales y solvatos aceptables de todos los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención o de cualquier otro compuesto que, cuando se aplica a un fitopatógeno o a un organismo plaga que afecta a plantas, es capaz de proporcionar (directamente o indirectamente) un compuesto según se describe en el presente documento.

Los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. Los métodos de solvatación se conocen generalmente dentro de la técnica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento de obtención del compuesto de la invención, en adelante procedimiento de obtención de la invención, que comprende las siguientes etapas:



a) cultivar micelio de un hongo del género *Guignardia sp.* con capacidad para producir el compuesto de fórmula (I) en un medio de cultivo hasta conseguir un producto fermentado y

5

b) aislar al compuesto de fórmula (I) a partir del producto fermentado de la etapa anterior.

No todos los hongos del género *Guignardia sp.* presentan la capacidad de producir el compuesto de la invención. Es la interacción endófito-planta hospedadora la que confiere al hongo unas características determinadas que posibilitan la producción de determinados compuestos. Por este motivo, en la presente invención por hongo del género *Guignardia sp.* con capacidad para producir el compuesto de la invención se entiende cualquier cepa de un hongo del género *Guignardia sp.* que debido a su interacción con la planta hospedadora ha desarrollado las características necesarias para producir los compuestos de la invención. Preferentemente la cepa del hongo del género *Guignardia sp.* pertenece a la especie *G. manguiferae*. Más preferentemente, la cepa del hongo de la especie *Guignardia manguiferae* es la cepa YCC4 de *G. manguiferae* aislada de hojas de *Persea indica* depositada en fecha 2 julio de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT 20914, siguiendo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

Ejemplos de medios de cultivo que permiten la fermentación de los hongos del género *Guignardia sp.* son PDB (*potato dextrose broth*); los medios citados en las referencias Molitor et al (2012. *J. Nat. Prod.* 75, 1265–1269) y Buckel et al (2013. *Phytochemistry* 89, 96–103); los que se citan en el documento W02002017937 A1 o cualquier otro medio de cultivo comercial para hongos fitopatógenos.

En una realización particular, la cepa YCC4 de *G. manguiferae* aislada de hojas de *Persea indica* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT 20914 en fecha 2 julio de 2014 se cultiva utilizando un medio líquido Czapek-Dox modificado.

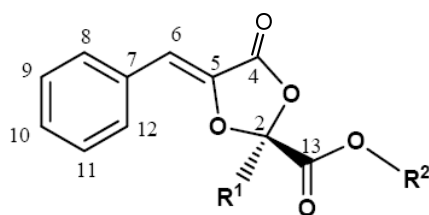
Por “producto fermentado” se entiende un producto que es el resultado de la acción del hongo endófito sobre el medio de cultivo y que comprende al compuesto de la

invención. El producto fermentado puede ser un extracto seco obtenido por extracción con solvente orgánico previa filtración, o un liofilizado.

Ejemplos de solventes orgánicos que se utilizan en el ámbito de la invención son  
5 diclorometano, eter etílico y, preferentemente, acetato de etilo.

En el ámbito de la presente invención, también se incluye el producto fermentado que se obtiene tras la etapa (a) del procedimiento de la invención que cuenta con actividad biocida y que comprende al compuesto de la invención, en adelante producto  
10 fermentado de la invención.

Adicionalmente, el producto fermentado de la invención comprende a un compuesto de fórmula general (II),



15 (II)

donde R1 se selecciona de entre metiletil y metilfenil y R2 se selecciona de entre CH<sub>3</sub>, etilfenil y H,

o un isómero, una sal o un solvato del mismo.

20

En una realización particular, en el compuesto de fórmula general (II) R1 es metiletil y R2 es CH<sub>3</sub> y es la Guignardianona C.

En otra realización particular, en el compuesto de fórmula general (II) R1 es metilfenil y  
25 R2 es etilfenil y es la Guignardianona D.

En otra realización particular, en el compuesto de fórmula general (II) R1 es metilfenil y R2 es CH<sub>3</sub> y es el metil éster del ácido penguignárdico.

En otra realización particular, en el compuesto de fórmula general (II) R1 es metiletil y R2 es H y es el ácido guignárdico.

5 Los compuestos de fórmula general (II) que se incluyen en el ámbito de esta invención comparten estructura y actividad biocida con el compuesto de la invención y además tienen el mismo origen.

El aislamiento de los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención partiendo del producto fermentado se realiza por técnicas de fraccionamiento.

10

Técnicas de fraccionamiento conocidas por cualquier experto en el estado de la técnica, y que permiten obtener a los compuestos incluidos en el ámbito de la invención, son por ejemplo y sin limitarse, cromatografía líquida de vacío (VLC-1), cromatografía en columna (CC), cromatografía en columna (CC) empleando  
15 diferentes fases sólidas (Gel de Sílice, Sephadex LH-20) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), eluyéndose con distintos gradientes de polaridad mediante diferentes combinaciones de disolventes orgánicos.

20

El producto fermentado de la invención es el producto crudo que se obtiene tras la etapa (a) del procedimiento de la invención, pero también cualquier fracción o subfracción sucesiva obtenida a partir de dicho producto y que se obtiene por las técnicas de fraccionamiento que se recogen en la descripción.

25

Por "actividad biocida" se entiende la capacidad de controlar al menos un fitopatógeno u organismo plaga que afecte a plantas a través de diferentes mecanismos de acción. Dicho control comprende la prevención de la acción o la destrucción directa de dichos organismos perjudiciales para la salud pública y también para la agricultura durante la producción, pero también se extiende al almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de productos agrícolas y sus derivados. Ejemplos de fitopatógenos y  
30 organismos plaga que afectan a plantas y que se incluyen en la presente invención son aunque sin limitarse, nematodos, hongos e insectos plaga.

35

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso para el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas, y preferentemente para el control de nematodos, del compuesto de la invención, o del compuesto de fórmula general (II), ya sea de forma aislada o en combinación, o del producto fermentado de la invención.

La actividad contra insectos plaga se puede determinar mediante diferentes tipos de bioensayos que incluyen actividad antialimentaria (inhibición de la alimentación y/o asentamiento en el caso de áfidos), repelente o tóxica, entre otras (ver ejemplo 5).

5

Los insectos contra los que es efectivo el compuesto de la invención, el producto fermentado de la invención y el compuesto de fórmula general (II) son principalmente insectos-plaga herbívoros con diferentes adaptaciones tróficas, ya sean masticadores o chupadores, y que pueden presentar una alta incidencia sobre cultivos hortícolas provocando graves pérdidas económicas, desarrollar resistencias a insecticidas de síntesis y presentar capacidad de transmisión de virus. Ejemplos, a título ilustrativo y no limitativo, de órdenes y especies de insectos-plaga herbívoros con diferentes adaptaciones tróficas, masticadores o chupadores son Lepidoptera, Homoptera y *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, respectivamente.

10

15

En una realización particular, el compuesto de la invención y el producto fermentado de la invención comprenden una actividad bioinsecticida contra los insectos *Spodoptera littoralis* y *Myzus persicae*, superior al 80%.

20

En otra realización particular, la guignardianona C y el ácido guignárdico comprenden una actividad bioinsecticida contra al menos un insecto seleccionado de entre *Spodoptera littoralis* y *Myzus persicae*, superior al 80%.

25

La actividad contra hongos se determina mediante ensayos de inhibición del crecimiento del micelio en placa. Ejemplos de hongos contra los que es efectivo el producto fermentado de la invención son *Fusarium* y *Botrytis*.

30

La actividad contra nematodos se relaciona con la toxicidad, es decir, capacidad para interrumpir una fase concreta del ciclo de vida del nematodo impidiendo su desarrollo.

35

En el ámbito de la invención, la actividad nematocida se determina por ejemplo a través de la determinación del porcentaje de juveniles infectivos (J2) muertos tras 24, 48 y 72 horas posteriores a la aplicación del extracto (ver ejemplo 7), así como a través de la determinación de los efectos del tratamiento sobre la eclosión de los huevos tras 5 días de tratamiento de las masas de huevos y por la determinación de los efectos de concentraciones subletales sobre la capacidad de infección de los juveniles en las raíces de plántulas de tomate.

Los nematodos contra los que son efectivos el compuesto de la invención, el producto fermentado de la invención y el compuesto de fórmula general (II), preferentemente son nematodos formadores de nódulos de las raíces (*Meloidogyne* sp). Un ejemplo de nematodo formador de nódulos es la especie *Meloidogyne javanica*, polífaga, con capacidad de parasitar más de 3.000 especies de plantas de cultivo, que incluyen cultivos extensivos, hortícolas y frutales, afectando gravemente la producción (Agrios. 2005. *Plant Pathology*, Fifth edition, Elsevier/Academic, Amsterdam), y causando pérdidas económicas anuales de miles de millones de euros (Singh et al. 2013. *OEPP/EPPO Bulletin* 43 (2), 334–374).

En otra realización particular, el compuesto de la invención o el producto fermentado de la invención comprenden una actividad nematicida preferentemente de hasta el 85%, más preferentemente de hasta el 95% y todavía más preferentemente de hasta el 100% cuando se utilizan en una concentración de 0.5 mg/ml y 1 mg/ml respectivamente a 24, 48 y 72 horas de tratamiento.

En otra realización particular, el producto fermentado de la invención comprende una actividad nematicida manifestada por la inhibición, preferentemente de un 98% de la eclosión de huevos después de 72 horas de tratamiento cuando se utiliza a la concentración de 1 mg/ml y la supresión preferentemente de un 60% de la capacidad infectiva cuando se utiliza a una concentración del 0,5 mg/ml.

En otra realización particular, la guignardianona D y el metil éster del ácido penguignárdico comprenden una actividad nematicida preferentemente de hasta el 90%, más preferentemente de hasta el 95% y todavía más preferentemente de hasta el 100% cuando se utiliza en una concentración de 0,5 mg/ml.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición biocida que comprende al compuesto de fórmula (I), o al compuesto de fórmula general (II), ya sea de forma aislada o en combinación, o al producto fermentado, en adelante composición biocida de la invención.

La composición biocida de la invención adicionalmente puede comprender diversos vehículos y agentes que faciliten su conservación, manejo y aplicación.

Como el experto en el estado de la técnica conocerá en la aplicación de fitosanitarios, habitualmente se utilizan vehículos sólidos, vehículos líquidos, vehículos gaseosos, etc., y, si es necesario, agentes tensioactivos y agentes auxiliares para la formulación de composiciones fitosanitarias como, por ejemplo, un aditivo para formular formas  
5 tales como concentrados emulsionables, polvos humectables, líquidos fluibles, (v.g., suspensión en agua, emulsión en agua, etc.), polvos, aerosoles, ULV y similares.

Ejemplos de vehículo sólido que se incluyen en el ámbito del uso de la invención son polvos finos o gránulos de arcillas (v.g. arcilla de caolín, tierra de diatomeas, óxido de  
10 silicio hidratado sintético, bentonita, arcilla Fubasami, arcilla ácida, etc.), talcos, cerámicas y otros minerales inorgánicos (v.g., sericita, cuarzo, azufre, carbono activo, carbonato cálcico, sílice hidratada, etc.), fertilizantes comerciales (v.g., sulfato amónico, fosfato amónico, nitrato amónico, urea, cloruro amónico, etc.) y similares.

Ejemplos de vehículo líquido que se incluyen en el ámbito del uso de la invención son agua, alcoholes (v.g., metanol, etanol, etc.), cetonas (v.g., acetona, metil etil cetona, etc.), hidrocarburos aromáticos (v.g. benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, metilnaftaleno, etc.), hidrocarburos alifáticos (v.g. hexano, ciclohexano, kerosina, gas  
15 oil, etc), ésteres (v.g., acetato de etilo, acetato de butilo, etc.), nitrilos (v.g. acetonitrilo, isobutironitrilo, etc.), éteres (v.g. éter diisopropílico, dioxano etc.), amidas de ácido (v.g. N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, etc.), hidrocarburos halogenados (v.g., dicloroetano, tricloroetano, tetracloruro de carbono, etc. ), sulfóxido de dimetilo, aceites vegetales (v. g., aceite de soja, aceite de semilla de algodón, etc.) y similares.

Ejemplos de vehículo gaseoso que se incluyen en el ámbito del uso de la invención son agente de pulverizado, incluyendo gas flon, gas butano, LPG (gas de petróleo  
25 liquificado), éter dimetílico, gas de dióxido de carbono y similares.

Ejemplos de agente tensioactivo que se incluyen en el ámbito del uso de la invención  
30 son sulfatos de alquilo, sales de sulfonato de alquilo, alquil aril sulfonatos, ésteres alquil arílicos, compuestos de polioxietileno de los mismos, ésteres polietilen glicólicos, ésteres de alcohol polihidroxílico, derivados de alcohol de azúcar y similares.

Ejemplos de agente auxiliar para la formulación como agente de fijación y agente de  
35 dispersión que se incluyen en el uso de la invención son caseína, gelatina, polisacáridos (v.g., polvo de almidón, goma arábica, derivado de celulosa, ácido

algínico, etc.), derivados de lignina, bentonita, azúcares, polímeros hidrosolubles sintéticos (v.g., polialcohol vinílico, polipirrolidona de vinilo, poliácidos acrílicos, etc.) y similares.

- 5 Ejemplos de estabilizantes que se incluyen en el ámbito del uso de la invención son PAP (fosfato de ácido isopropílico), BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol), BHA (mezcla de 2-terc-butil-4-metoxifenol y 3-terc-butil-4-metoxifenol), aceites vegetales, aceites minerales, agentes tensioactivos, ácidos grasos o ésteres de los mismos y similares.
- 10 El compuesto de la invención, el compuesto de fórmula general (II), el producto fermentado de la invención y la composición biocida de la invención se pueden utilizar conjuntamente con al menos otro ingrediente activo adicional. Ejemplos de ingrediente activo adicional son nematicidas, insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, reguladores del crecimiento de la planta, sinérgicos, fertilizantes, acondicionadores del
- 15 suelo y cebos para animales.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición biocida de la invención para el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas, y preferentemente para el control de nematodos.

- 20 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas, y preferentemente para el control de nematodos, que comprende administrar una dosis eficaz del compuesto de la invención, o del compuesto de fórmula general (II), ya sea de forma aislada o en
- 25 combinación, o del producto fermentado de la invención o de la composición biocida de la invención.

La aplicación puede ser directamente por rociado sobre el organismo plaga, o sobre el sustrato en el que se encuentren los fitopatógenos.

- 30 La "dosis eficaz" puede aumentar o disminuir opcionalmente según si se utiliza el compuesto de la invención, el compuesto de fórmula general (II), el producto fermentado de la invención, o la composición biocida de la invención, del tipo de formulación, del tiempo, del lugar y del método de aplicación, del tipo de fitopatógeno u
- 35 organismo plaga que afecta a la planta y del grado de daño.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## **MODOS DE REALIZACION DE LA INVENCION**

### **10 A) OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOCIDA**

#### **Ejemplo 1. Aislamiento e identificación del hongo YCC4**

15 El hongo endófito *G. manguiferae* fue aislado de hojas del árbol *Persea indica*, recolectadas en el Parque Rural de Anaga (Las Mercedes, Tenerife). Dicho hongo fue depositado en la CECT en fecha 2 de julio de 2014 y con el número de acceso 20914 siguiendo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes. El material vegetal fresco se esterilizó superficialmente con hipoclorito de sodio (65%), etanol 20 (75%) y agua destilada estéril. Pequeñas muestras de explantos (hojas) se colocaron en placas Petri con medio PDA y se incubaron a 27°C. El cultivo puro se obtuvo aislando individualmente una colonia crecida en este medio y se replicó periódicamente para su mantenimiento. El hongo se identificó a nivel molecular en base a la amplificación (PCR) y secuenciación de la región ITS ribosomal del ADNr 25 extraído de una muestra del micelio (Arenal et al. 2000. Mycological Research 104, 2000, 301–303). El hongo se identificó como *G. manguiferae* por comparación de la secuencia ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr con las depositadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (número de acceso GenBank 30 gi255068992).

#### **Ejemplo 2. Fermentación con el hongo YCC4**

YCC4 se cultivó en medio PDA en placas Petri durante 15 días a una temperatura de 35 27° C. Se le añadió 10 ml de agua destilada estéril y la superficie del micelio se raspó suavemente con una espátula. Esta suspensión del micelio se vertió en un erlermeyer



(250ml) con 100 ml medio líquido Czapek-Dox-Levadura [Cz-L: NaNO<sub>3</sub> (2 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5 g/l), MgSO<sub>4</sub> (0.5 g/l), FeSO<sub>4</sub> (0.01 g/l), ZnSO<sub>4</sub> (0.003 g/l), extracto de levadura (1 g/l) y glucosa (60 g/l)] y se cultivó a una temperatura de 25°C en continua agitación (120 r.p.m.) durante 4 días. Transcurrido este tiempo, 5 ml del cultivo se inocularon en cada uno de los 100 erlenmeyers (250ml) con 100 ml de medio fresco. Después de 20 días de fermentación en las mismas condiciones, el medio de cultivo se separó del micelio por filtración en un büchner y se extrajo con un volumen igual de acetato de etilo obteniendo el extracto crudo de la invención. Posteriormente, el disolvente se secó sobre SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> y se llevó a sequedad a vacío a presión reducida, obteniendo 10.5 g de extracto crudo seco. El micelio se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó para su conservación.

### **Ejemplo 3. Aislamiento de los compuestos con actividad biocida**

El extracto crudo seco (10.5 g) obtenido según el ejemplo 2 se fraccionó mediante una cromatografía líquida de vacío (VLC) utilizando como eluyente mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo y acetato de etilo/metanol dando lugar a 9 fracciones. La fracción 1 (n-hexano/acetato de etilo 25%) fue cromatografiada en una columna flash de media presión empleando como sistema de elución n-hexano/acetato de etilo en orden de polaridad creciente. De las fracciones menos polares (n-hex/acet, 10%) se aislaron la guignardianona A (Buckel et al. 2013. *Phytochemistry* 89, 96–103) (23.0 mg) y la guignardianona C (96.1 mg), empleando una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (n-hex/ AcOEt 3%). La fracción posterior obtenida con n-hex/AcOEt 15% fue cromatografiada en columna de media de presión de gel de sílice y, posteriormente, mediante HPLC (n-hex/ AcOEt 3%), y se obtuvo la guignardianona D (89 mg) y el metil éster del ácido penguignárdico (36.5 mg). De la fracción eluida en n-hex/acet 20%, después de una cromatografía en HPLC (n-hex/ AcOEt 15%) se obtuvo la guignardona A (Yuan et al. 2010. *Eur. J. Org. Chem.* 6348–6353) (78.3 mg). En la fracción más polar (n-hex/ AcOEt 50%) de la cromatografía de esta fracción 1 se aisló el ácido metguignárdico (204 mg).

La fracción 2 del extracto fue cromatografiada en una columna de media presión con gel de sílice con mezclas de polaridad creciente de n-hex/ AcOEt y AcOEt / MeOH y se aislaron de nuevo la guignardianona A (430 mg), la guignardona A (80 mg), que se habían obtenido anteriormente en la fracción 1 del extracto. En las fracciones eluidas con AcOEt 100% se aisló la guignardona B (Yuan et al. 2010. *Eur. J. Org. Chem.*

6348–6353) (13.6 mg) y de las más polares obtenidas con MeOH 100%, se obtuvieron los ácidos metguignárdico (30 mg) y guignárdico (117.8 mg), empleando una cromatografía en HPLC con n-Hex/ AcOEt /MeOH 30/64/6.

- 5 En la fracción 3 obtenida con n-hex/ AcOEt 50% después de sucesivas cromatografías en columna a media presión y/o HPLC se aislaron en orden de polaridad la guignardianona C (49 mg), el metil éster del ácido penguignárdico (2.4 mg), la guignardianona E (Buckel et al. 2013. *Phytochemistry* 89, 96–103) (1.5 mg), la guignarenona C (Sommat et al. 2012. *Phytochemistry Lett.* 5, 139-143) (8.8 mg) y la  
10 guignardona B (13.6 mg).

Del fraccionamiento cromatográfico de las fracciones más polares del extracto, 4, 5 y 6, se aislaron nuevamente la guignarenona C (5.8 mg), la guignardona B (5.6 mg), la guignarenona B (Sommat et al. 2012. *Phytochemistry Lett.* 5, 139-143) (2.2 mg) y el  
15 ácido 3,4 dihidroxibenzoico (34.3 mg).

#### **Ejemplo 4. Caracterización de los compuestos con actividad biocida**

##### *Técnicas experimentales*

20

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los compuestos con actividad biocida se realizaron en espectrómetros Bruker Advance y AMX-500, a 400 y 500 MHz para el  $^1\text{H}$  y a 100 y 125 MHz para el  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

25

Como patrón interno de referencia se empleó el tetrametilsilano (TMS) y como disolvente se usó el deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ). Los experimentos de 2D con correlación homo y heteronuclear, COSY, HSQC, HMBC y NOESY, fueron realizados con programas de la firma Bruker. Los espectros de masas de alta y de baja resolución se registraron en un espectrómetro Micromass Autospec®, con introducción

30

directa de las muestras mediante una sonda de sólidos. La técnica empleada fue el impacto electrónico (IE) con un potencial de ionización de 70 eV y una temperatura de la fuente de 230 °C. Las señales se describen en unidades de relación masa/carga ( $m/z$ ) y entre paréntesis se indica la intensidad relativa (int. rel.) de cada señal respecto al pico base (100%). Para cada compuesto se indican solamente los picos

35

estructuralmente más significativos y/o de mayor intensidad relativa. Las cromatografías se realizaron sobre gel de sílice (0.015-0.040 mm Ø, Merck) mediante

una cromatografía líquida de vacío (VLC) o en columnas cromatográficas acopladas a una bomba de media presión (Fluid Metering Inc). La elución se realizó en gradientes de polaridad creciente, empleando como disolventes mezclas de n-hexano/acetato de etilo (AcOEt) o diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)/metanol (MeOH). Posteriores purificaciones de los compuestos se llevaron a cabo en un equipo de cromatografía líquida de alta presión (Beckman 125P®) acoplado a un detector fotodiodo, controlado por la aplicación informática Beckman 32-Karat. Las separaciones se llevaron a cabo en columnas de fase normal con un tamaño de partícula de 5 μ, sílica Inertsil de 20.0 x 250 mm (preparativa) o sílica Ultrasphere de 10.0 x 250 mm (semipreparativa), dependiendo del peso de la muestra a cromatografiar. El desarrollo de las cromatografías en columna se siguió por cromatografía en capa fina, visualizando las placas a la luz UV (254 y 360 nm) y calentando a 100-130 °C las placas pulverizadas con *oleum* (disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4%) y ácido acético (80%) en agua destilada).

#### 15 Guignardianona C

[α]<sub>D</sub>: -10.2 ° (c 0.25, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.68 (2 H, d, J= 7.1 Hz, H-8 y H-12), 7.41 (2 H, m, H-9 y H-11), 7.35 (1 H, m, H-10), 6.50 (1 H, s, H-6), 3.85 (3 H, s, -OCH<sub>3</sub>), 2.69 (1 H, sept, J= 6.9 Hz, H-1'), 1.07 (6 H, d, J= 6.9 Hz, H-2' y H-3'); EM a *m/z*: 276 [M<sup>+</sup>] (5), 118 (100), 90 (39), 71 (13); EMAR [M<sup>+</sup>] a *m/z*: 276.0999 calculado para C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>, 276.0998.

#### Guignardianona D

25 [α]<sub>D</sub>: +40.3 ° (c 0.25, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.63 (2 H, d, J= 7.2 Hz, H-8 y H-12), 7.41 (2 H, m, H-9 y H-11), 7.35 (1 H, m, H-10); 7.24 (5 H, s ancho, H-3', H-4', H-5', H-6' y H-7'), 7.21 (1 H, m, H-6''), 7.19 (2 H, m, H-5'' y H-7''), 7.15 (2 H, m, H-4'' y H-8''), 6.30 (1 H, s, H-6), 4.45 (2 H, m, H-1''), 3.52 y 3.46 (1 H cada uno, d, J= 14.6 Hz, H-1'), 2.96 (2 H, t, J= 6.6 Hz, H-2''); EIMS a *m/z*: 414 [M<sup>+</sup>] (4), 265 (11), 118 (100), 105 (27), 91 (84); EMAR [M<sup>+</sup>] a *m/z*: 414.1465 calculado para C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>, 414.1467.

#### Metil éster del ácido penguignárdico

35 [α]<sub>D</sub>: +47.6 ° (c 0.14, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.63 (2 H, d, J= 7.2 Hz, H-8 y H-12), 7.40 (2 H, m, H-9 y H-11), 7.36 (1 H, m, H-10), 7.28 (2 H, m, H-3' y H-7'), 7.24 (3 H, m, H-4', H-5' y H-6'), 6.30 (1 H, s, H-6), 3.85 (3 H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.58 (1 H, d, J=

14.8 Hz, H-1'b), 3.52 (1 H, d, J= 14.8 Hz, H-1'a); EIMS a  $m/z$ : 324 [ $M^+$ ] (2), 264 (2), 118 (100), 91 (29), 90 (17), 65 (3); EMAR [ $M^+$ ] a  $m/z$ : 324.0987 calculado para  $C_{19}H_{16}O_5$ , 324.0998.

## 5 Ácido metguignárdico

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: -54.7 ° (c 0.3,  $CHCl_3$ ).  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.67 (2 H, dd, J= 7.1 y 1.5 Hz, H-8 y H-12), 7.40 (2 H, m, H-9 y H-11), 7.35 (1 H, m, H-10), 6.52 (1 H, s, H-6), 2.43 (1 H, dcd, J= 10.2, 6.9 y 3.3 Hz, H-1'), 1.66 y 1.29 (1 H cada uno, m, H-2'), 1.07 (3 H, d, J= 6.9 Hz, H-3'), 0.99 (3 H, t, J=7.4 Hz, H-4'); EIMS a  $m/z$ : 276 [ $M^+$ ] (6), 118 (100), 90 (54), 85 (7), 63 (5), 57 (25); EMAR [ $M^+$ ] a  $m/z$ : 276.1001, calculado para  $C_{15}H_{16}O_5$ , 276.0998.

## Acido guignárdico

15

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: -26.7 ° (c 0.25,  $CHCl_3$ ).  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.66 (2 H, d, J= 7.1 Hz, H-8 y H-12), 7.40 (2 H, m, H-9 y H-11), 7.35 (1 H, m, H-10), 6.53 (1 H, s, H-6), 2.68 (1 H, sept. J= 6.9 Hz, H-1'), 1.09 y 1.08 (3 H cada uno, d, J = 6.9, H-2' y H-3'); EIMS a  $m/z$ : 262 [ $M^+$ ] (5), 118 (100), 90 (38), 71 (9); EMAR [ $M^+$ ] a  $m/z$ : 262.0853 calculado para  $C_{14}H_{14}O_5$ , 262.0841.

20

Tabla 1. RMN de  $^{13}C$  de los compuestos con actividad biocida

	Guignardianona C	Guignardianona D	Metil éster del ácido penguignárdi co	Ácido metguignárdico	Acido guignárdico
2	108.5	105.2	105.2	108.3	109.6
4	162.8	162.3	162.3	162.7	163.4
5	135.8	135.2	135.2	135.3	135.9
6	109.6	109.5	109.6	110.1	109.4
7	132.3	132.2	132.2	132.1	132.2
8/12	129.9	129.8	129.8	129.9	129.8
9/11	128.8	128.8	128.7	128.8	128.7
10	129.1	129.0	129.0	129.2	129.0
13	166.0	165.1	165.8	169.5	169.4
1'	33.0	40.6	40.8	39.3	33.0

2'	14.5	130.6	130.5	11.0	14.4
3'	15.2	131.0	131.0	22.4	15.2
4'		128.5	128.4	11.5	
5'		127.8	127.8		
6'		128.5	128.4		
7'		131.0	131.0		
1"		67.3			
2"		34.7			
3"		136.8			
4"/8"		128.7			
5"/7"		128.4			
6"		126.7			
-(CO)OCH <sub>3</sub>	53.3		53.6		

## B) ACTIVIDAD BIOCIDA

### Ejemplo 5. Actividad antialimentaria contra insectos-plaga

5

La cría y mantenimiento de los insectos se llevó a cabo en una cámara de temperatura controlada a 24+1°C, 60-70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16:8 horas (luz:oscuridad). Las larvas de *S. littoralis* se mantuvieron con una dieta semisintética (Poitout y Bues . 1970. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 2, 79-91) y los áfidos sobre sus plantas huésped, pimiento (*Capsicum annum* L.) para *M. persicae*.

10

Los ensayos de actividad alimentaria se realizaron con larvas recién emergidas de sexto estadio de *S. littoralis* y pulgones adultos ápteros. La superficie superior de discos de hoja (1,0 cm<sup>2</sup>) de pimiento (*Capsicum annum* L.), fueron tratados con 10 µl de la muestra. Cada ensayo consistió en 5 placas *Petri* con dos larvas por placa (*S. littoralis*) o veinte cajas (2x2 cm) con diez áfidos de *M. persicae* incubados en una cámara de crecimiento en las mismas condiciones descritas para la cría de los insectos. Una vez consumido el 75% de la superficie de los discos control (*S. littoralis*) o después de 24 h (áfidos) se calculó el índice de consumo (%FI) o de asentamiento (% de SI), respectivamente. % FI = [1 - (T / C) x 100], donde T y C son el consumo de discos de hojas tratadas y control; % de SI = [1 - (% T / C %)], donde % C y % T son el porcentaje de áfidos asentados en los discos de hojas control y tratadas (Burgueño et al. 2008. *J. Chem. Ecol.* 34, 766-771). Los compuestos con un FI / SI > 70 % se

15

20

ensayaron en un experimento de dosis - respuesta para calcular su potencia relativa (EC<sub>50</sub>, es la dosis efectiva para una reducción de un 50 % de la alimentación).

5 Tabla 2. Actividad antialimentaria de los compuestos con actividad biocida y del extracto crudo seco contra insectos-plaga, aplicados en una concentración de 50 µg/cm<sup>2</sup>

	mg/l cultivo	µg/cm <sup>2</sup>	<i>S.littoralis</i> %FI <sup>a</sup> ± SE (n=6)	<i>M. persicae</i> %SI <sup>b</sup> ± SE (n=20)
Extracto	1g/l	100	81.79 ± 5.06	78.15 ± 6.45
		50		70.14 ± 8.69
		20	50.52 ± 15.05	41.17±6.99
		4	41.35 ± 5.46	33.41±7.17
		EC <sub>50</sub>	9.77 (4.13-23.16)	17.2 (0.85-26.5)
Guignardianona C	15.5	50	50.32 ± 17.92	82.87 ± 3.69
		10		62.22 ± 6.14
		2		54.48 ± 8.63
		0.4		30.76 ± 7.80
		EC <sub>50</sub>		1.74 (0.88-3.42)
Guignardianona D	9.8	50	28.26 ± 14.11	50.70 ± 7.68
Metil éster del ácido penguignárdico	4.3	50	20.03 ± 8.82	64.47 ± 7.87
Ácido metguignárdico	23.1	50	94.48 ± 1.94	86.59 ± 3.52
		25		57.78 ± 9.81
		10	84.53 ± 6.70	34.33 ± 7.58
		5	31.0 ± 8.8	
		2	10.59 ± 6.71	29.70 ± 7.59
		EC <sub>50</sub>	7.53 (5.43-10.44)	11.45 (8.29-15.83)
Acido guignárdico	11.8	50	84.42 ± 4.93	82.02 ± 5.06
		25	62.55 ± 7.69	73.05 ± 6.76
		12.5	51.72 ± 9.49	62.06 ± 8.75

	2	26.96 ± 12.74	46.89 ± 9.29
	EC <sub>50</sub>	9.65 (5.31-17.53)	2.87 (1.02-7.87)

<sup>a</sup> %FI Porcentaje de inhibición de la alimentación

<sup>b</sup> % SI Porcentaje de inhibición de asentamiento

EC<sub>50</sub>, dosis efectiva para producir un 50% de inhibición de la alimentación/asentamiento

5

### Ejemplo 6. Actividad antifúngica

Los hongos fitopatógenos *Fusarium moniliforme* (Sheldon) [CECT2152], *F. oxysporum* *fs.lycopersici* (Escalda) [CECT2715] y *F. solani* (Mart) [CECT2199] proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CET). La cepa de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (B05.10) es una donación del Departamento de Bioquímica de la Universidad de La Laguna (ULL). Para su mantenimiento las cepas se cultivaron en medio sólido comercial PDA a 25°C (*Fusarium*) o temperatura ambiente (*Botrytis*), y posterior conservación a -30°C en viales con glicerol al 18%.

15

Para determinar la actividad antifúngica se empleó el método de dilución en agar (Murabayashi et al. 1991. *J. Pesticide Sci.* 16, 419-427). Muestras del extracto crudo seco obtenido según el ejemplo 2 se incorporaron en el medio de cultivo (5 ml) a 5 concentraciones diferentes (1, 0,5, 0,1, 0,05 y 0,01 mg/ml). De forma paralela, se prepararon controles con etanol a una concentración del 2 %. La siembra de los organismos diana se realizó por picadura (*Fusarium*) o con discos de 5 mm de diámetro (*B. cinerea*). Las colonias cultivadas en placas de Petri e incubadas durante 48 h fueron digitalizadas y se midieron empleando el programa ImageJ 1.43.

25 El porcentaje de inhibición (% I) se calculó como:  $\% I = (C-T/C) \times 100$ , donde C es el diámetro de las colonias del control y T de las colonias de las muestras ensayadas. La dosis efectiva de inhibición de crecimiento (EC<sub>50</sub>) se determinó por análisis de regresión lineal (% de inhibición del log de la dosis).

30 Tabla 3. Actividad fungicida del extracto crudo seco

	<i>F.oxysporum</i>	<i>F.moniliforme</i>	<i>F.solani</i>	<i>B. cinerea</i>
1 mg/ml	65.14 ± 2.86	56.37 ± 5.44	74.01 ± 7.92	51.58 ± 2.76

EC <sub>50</sub> mg/ml	0.67 (0.37 - 0.97)	0.79 (0.47 - 1.11)	0.63 (0.32 - 0.94)	0.86 (0.18 - 1.52)
------------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

El extracto crudo seco obtenido según el ejemplo 2 mostró tener una moderada actividad antifúngica frente a *F.solani* y *F. oxysporum* y *B. cinerea*.

## 5 Ejemplo 7. Actividad nematocida

La población de nematodos (*Meloidogyne javanica*) se mantuvo en cámaras de crecimiento sobre plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* (var. Marmande) a 25 °C y una humedad relativa del 70%. Los ensayos se realizaron según la metodología descrita para *M. javanica* (Andres et al. 2012. *Phytochem. Rev.* 11, 371-390) utilizando la fase biológica de juveniles infectivos (J2). La actividad del extracto crudo seco obtenido según el ejemplo 2 y de los compuestos con actividad biocida se cuantificó a una concentración final por pocillo de 1.0/ 0.5 mg/ml, respectivamente. Cada tratamiento se repitió cuatro veces y la actividad nematocida se determinó a partir del porcentaje de juveniles infectivos muertos después de 72h. En los casos en los que se determinó una tasa de mortalidad > 99% se realizaron experimentos de dosis-respuesta para determinar LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad nematocida de los compuestos con actividad biocida y del extracto crudo seco

	Mortalidad de juveniles infectivos de <i>M. javanica</i> (%)				
	24 h	48 h	72 h	LC <sub>50</sub> mg/mL <sup>b</sup> (95% CL <sup>c</sup> )	LC <sub>90</sub> mg/mL <sup>b</sup> (95% CL <sup>c</sup> )
Extracto	95.96 ± 2.15	97.54 ± 0.54	100.0 ± 0.0	0,440 (0,415-0,467)	0,953 (0,901-1,013)
Guignardianona D	94.23 ± 3.59	100 ± 0.00	100.0 ± 0.0	0,112 (0,107-0,116))	0,194 (0,185-0,204)
Metil éster del ácido penguignárdico	40.98 ± 2.54	97.13 ± 0.51	100.0 ± 0.0	0,230 (0,220-0,241)	0,432 (0,412-0,455)
Ácido metguignárdico	86.68 ± 0.95	88.30 2.51	100.0 ± 0.0	0,240 (0,229-0,251)	0,406 (0,389-0,426)



Acido guignárdico			60.98±3.42		

La actividad del extracto crudo seco obtenido según el ejemplo 2 sobre la eclosión de los huevos se cuantificó a una concentración final por pocillo de 1.0mg/ml. El tratamiento se repitió cuatro veces y la actividad de supresión de la eclosión se determinó a partir del porcentaje de juveniles eclosionados de las masas de huevos en dos tiempos: inmediatamente después de 5 días de tratamiento y a los 28 días posteriores en inmersión en agua (Tabla 5). La actividad del extracto crudo seco obtenido según el ejemplo 2 sobre la capacidad de infección de los juveniles se cuantificó a una concentración final por pocillo de 0,5 mg/ml y la actividad de inhibición de la capacidad infectiva se determinó a partir del porcentaje de juveniles tratados durante 72 h que han penetrado en las raíces de plántulas de tomate (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad extracto crudo seco sobre la eclosión de huevos de *M. javanica* después de 5 días de tratamiento y sobre la capacidad infectiva de juveniles (J2) de *M. javanica* en raíces de plántulas de tomate

Concentración	<i>M. javanica</i>	
	Inhibición de la eclosión de huevos (%)	Supresión de la capacidad infectiva de J2 (%)
1 mg/ml	98	60
0.5 µm/µl		

**Ejemplo 8. Actividad fitotóxica**

La actividad fitotóxica del extracto crudo seco obtenido según el ejemplo 2 fue evaluado frente a semillas de *Lactuca sativa* Teresa (Fito, España), *Lolium perenne* y *Lycopersicon esculentum*. Los experimentos se realizaron en placas de 12 pocillos (Falcon), aplicando 20 µl (10µg/µl) sobre discos de papel de 2,5 cm de diámetro colocados en el fondo de cada pocillo. Se le añadió 500 µl de agua destilada, 10/5 semillas, y las placas se incubaron en una cámara de crecimiento a 25 °C, 70% humedad relativa y un fotoperiodo 16:08 L: O. La germinación de las semillas se

contabilizó durante seis días y la elongación de las raíces al final del experimento. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Como control positivo de la inhibición de la germinación se empleó la juglona (5 µg/µl).

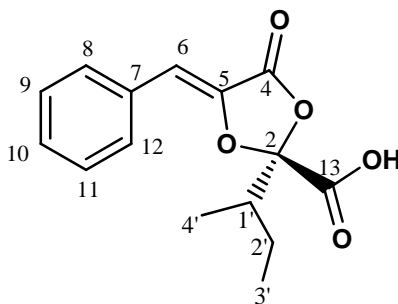
- 5 No se observaron efectos significativos en la germinación de *L. perenne*, *L. sativa* y *L. esculentum*, aunque presenta una ligera inhibición de la germinación de la monocotiledónea *L. perenne* y reduce su crecimiento sin afectar a las dicotiledóneas *L. sativa* y *L. esculentum* (Tabla 6).

10 Tabla 6. Actividad fitotóxica del extracto crudo seco

<i>Lolium perenne</i>			<i>Latua sativa</i>		<i>Lycopersicon esculentum</i>	
Germinación	Hoja	Raíz	Germinación	Raíz	Germinación	Raíz
85.7±21.4	65.8±7.8	74.4±7.1	100.0±0.0	155.6±22.9	96.7±11.8	107.7± 13.1

**REIVINDICACIONES**

1.- Compuesto de fórmula (I):



5

(I)

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

2.- Procedimiento de obtención del compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

10

a) cultivar micelio de un hongo del género *Guignardia sp.* en un medio de cultivo hasta conseguir un producto fermentado y

b) aislar al compuesto de fórmula (I) a partir del producto fermentado de la etapa anterior.

15

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que el hongo que se utiliza en la etapa (a) es un hongo de la especie *G. mangiferae*.

20

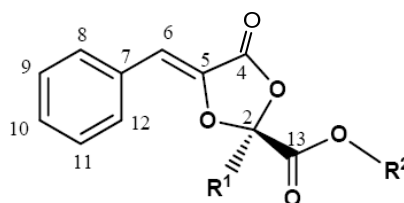
4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que el hongo de la especie *G. mangiferae* es la cepa YCC4, aislada de hojas de *Persea indica* y depositada en la CECT con número de acceso 20914 en fecha 2 de julio de 2014.

5.- Producto fermentado que se obtiene tras la etapa (a) del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado por que comprende al compuesto según la reivindicación 1.

25

6.- Producto fermentado según la reivindicación 5, caracterizado por que adicionalmente comprende a un compuesto de fórmula general (II):

30



(II)

- 5 donde R1 se selecciona de entre metiletil y metilfenil y R2 se selecciona de entre CH<sub>3</sub>, etilfenil y H, o un isómero, una sal o un solvato del mismo.
- 7.- Producto fermentado según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, caracterizado por que comprende actividad biocida.
- 10 8.- Producto fermentado según la reivindicación 7, caracterizado por que la actividad biocida es actividad nematocida.
- 15 9.- Uso del compuesto según la reivindicación 1, o de un compuesto de fórmula general (II) según se describe en la reivindicación 6, ya sea de forma aislada o en combinación, o del producto fermentado según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas.
- 20 10.- Uso según la reivindicación 9 para el control de nematodos.
- 11.- Composición biocida que comprende al compuesto según la reivindicación 1, o a un compuesto de fórmula general (II) según se define en la reivindicación 6, ya sea de forma aislada o en combinación, o al producto fermentado según una cualquiera de las
- 25 reivindicaciones 5 a 8.
- 12.- Uso de la composición biocida según la reivindicación 11 para el control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas.
- 30 13.- Uso según la reivindicación 12 para el control de nematodos.

14.- Método de control de fitopatógenos y organismos plaga que afectan a plantas, que comprende administrar una dosis eficaz del compuesto según la reivindicación 1, o de un compuesto de fórmula general (II) tal y como se describe en la reivindicación 5 6, ya sea de forma aislada o en combinación, o del producto fermentado según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, o de la composición biocida según la reivindicación 10.

15.- Método de control según la reivindicación 14 para el control de nematodos.

10