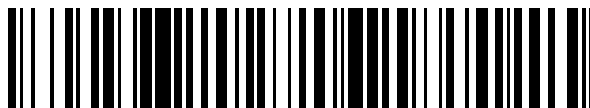


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 186**

21 Número de solicitud: 201531527

51 Int. Cl.:

A01N 63/04	(2006.01)	A01N 35/06	(2006.01)
A01N 31/06	(2006.01)		
A01N 31/16	(2006.01)		
A01P 1/00	(2006.01)		
A01P 3/00	(2006.01)		
A01P 5/00	(2006.01)		
A01P 7/04	(2006.01)		

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:
23.10.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:
26.04.2017

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:
15.09.2017

Fecha de concesión:
30.08.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:
06.09.2018

73 Titular/es:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (60.0%)
C/ SERRANO 117
28006 MADRID (Madrid) ES;
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (35.0%) y
THE ENERGY AND RESOURCES INSTITUTE (TERI) (5.0%)**

72 Inventor/es:
**GONZALEZ COLOMA, Azucena;
ANDRES YEVES, M. Fe;
DIAZ HERNANDEZ, Carmen Elisa;
REINA ARTILES, Matias;
LACRET PIMIENTA, Rodney;
CABRERA PEREZ, Raimundo;
GIMENEZ MARIÑO, Cristina y
KAUSHIK, Nutan**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **BIOCIDAS NATURALES DE AMPLIO ESPECTRO PROCEDENTES DEL HONGO ENDÓFITO STEMPHYLIUM SOLANI**

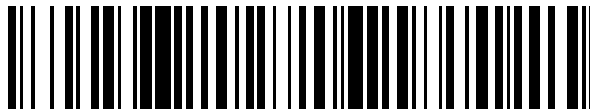
ES 2 610 186 B1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 186**

21 Número de solicitud: 201531527

57 Resúmen:

Biocidas naturales de amplio espectro procedentes del hongo endófito *stempylum solani*.

En el campo de la agricultura los organismos perjudiciales para la vegetación constituyen un importante problema en relación con la productividad de las cosechas. La presente invención se relaciona con un producto de fermentación obtenido a partir de hongos endófitos de la familia *Sthemphyllum solani*, que puede comprender un nuevo compuesto de fórmula (I) y un segundo compuesto conocido de fórmula (II), y que presenta actividad biocida simultáneamente contra más de una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas y que preferentemente se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos. Tanto el producto de fermentación, como los compuestos incluidos en el ámbito de la invención, se usan en la elaboración de una composición biocida de amplio espectro. Finalmente, la invención también incluye el procedimiento de obtención del producto de fermentación y el nuevo compuesto de fórmula (I).

ES 2 610 186 B1

BIOCIDAS NATURALES DE AMPLIO ESPECTRO PROCEDENTES DEL HONGO
ENDÓFITO *STEMPHYLIUM SOLANI*

DESCRIPCIÓN

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 producto de fermentación con actividad biocida de amplio espectro y un método de obtención del mismo a partir de hongos endófitos de la especie *Stemphylium solani*. El producto de fermentación se caracteriza por comprender al menos un nuevo compuesto de fórmula (I), que también se reivindica, y al compuesto de fórmula (II) que dotan al producto de fermentación de su característica actividad biocida. Finalmente, la invención también se refiere al uso del producto de fermentación, o de los compuestos que se incluyen en el ámbito de este documento, ya sea directamente o a través de una composición biocida que los comprenda y a un método de amplio espectro para el control de organismos perjudiciales para las plantas.

20 **ESTADO DE LA TECNICA**

Los hongos endófitos son un grupo polifilético con un alto grado de diversidad que se caracteriza funcionalmente por su capacidad para habitar en los tejidos de las plantas sin causar daños aparentes. La colonización por hongos endófitos puede contribuir a la adaptación de la planta huésped a situaciones de estrés y en muchos casos se ha correlacionado la tolerancia de la planta huésped a estrés biótico con la presencia de productos naturales fúngicos (Aly et al. 2010. *Fungal Diversity* 41, 1–16).

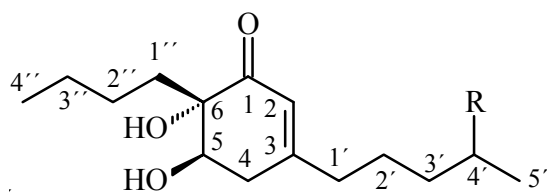
El género *Stemphylium* está compuesto por hongos filamentosos y saprofitos del grupo Hifomicetes que se distribuyen ampliamente en todo el mundo, asociados a vegetación en descomposición. En agricultura, las especies de *Stemphylium* son responsables de enfermedades en muchos cultivos, a los que causan daños foliares, y se dispersan a través de las semillas.

- A partir de los metabolitos producidos por las especies de *Stemphylium* de mayor importancia fitopatogénica: *S. botryosum*, *S. herbarum*, *S. alfalfae*, *S. sarciniforme*, se han identificado cinco compuestos mayoritarios, stemfilina, stemfiloxina II, stemfiperilenol, stemfol y un compuesto relacionado (Barash et al. 1975. *Plant Physiol.* 55, 646-651;
- 5 Andersen et al. 1995. *Mycol. Res.* 99, 672-676; Solfrizzo et al. 1994. *Nat. Toxins* 2, 14-18). Por otro lado, se ha descrito la producción de taxol por una especie de *Stemphylium* sp. aislada como endófito de *Taxus baccata* (Mirjalili et al. 2012. *FEMS Microbiol. Lett.* 328, 122-9).
- 10 Más concretamente, *S. solani* se ha aislado como endófito en *Menthapulegium* (Debbab et al. 2009. *J. Nat. Prod.* 72, 626-31), *Arabidopsis thaliana* (García et al. 2012. *Fungal Diversity*. DOI :10.1007/s13225-012-0219-0), *Vitis vinifera* (González y Tello. 2011. *Fungal Diversity* 47:29–42) y en la planta endémica australiana *Eremophila longifolia* (Zaferanloo et al. 2013. *World J Microbiol. Biotechnol.* 29, 335–345). A partir de los extractos de *S. solani*
- 15 procedentes de *M. pulegium* se han identificado los compuestos: alterporriol G y su isómero terporriol H, altersolanol, altersolanol L, stemfipirona, 6-metoxilaternina, macrosporina, altersolanol A, alterporriol E, alterporriol D, alterporriol A, alterporriol B y altersolanol J.
- De entre los compuestos anteriormente referidos, se conoce que la mezcla de alterporriol G
- 20 y H se relaciona con actividad citotóxica en células L5178Y, y que los compuestos 6-metoxilaternina, macrosporina, altersolanol A, así como nuevamente la mezcla de alterporriol G y H, inducen una fuerte inhibición de la actividad de la proteína quinasa (Debbab et al. 2009. *J. Nat. Prod.* 72, 626-31).
- 25 La agricultura se enfrenta constantemente a serios problemas relacionados con la incidencia de plagas y ataques de organismos patógenos con la consiguiente reducción de la productividad. Aunque tradicionalmente el método habitual para el control de organismos perjudiciales 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, el nuevo entorno
- 30 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 organismos perjudiciales.

Dentro de este escenario, la búsqueda de compuestos activos, alternativos y eficaces a dosis muy bajas, que tengan poca persistencia en el medio, que reduzcan la aparición de resistencias cruzadas, que no presenten efectos citotóxicos asociados y que tengan su origen en por ejemplos, hongos endófitos, parece ser una buena alternativa. Adicionalmente, sería altamente deseable que estos compuestos fuesen de amplio espectro, es decir, fuesen activos contra diferentes organismos perjudiciales de forma simultánea.

EXPLICACION DE LA INVENCION

- 10 La presente invención se relaciona en un primer aspecto con un producto de fermentación de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* con actividad biocida de amplio espectro, caracterizado por que comprende un compuesto de fórmula (I):

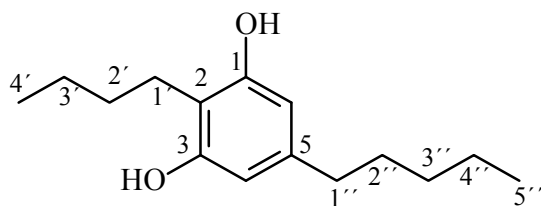


- 15 (I)

donde R se selecciona entre H y OH,

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

- 20 Preferentemente, el producto de fermentación puede comprender de forma simultánea un compuesto de fórmula (I) donde R es H y otro compuesto de fórmula (I) donde R es OH. Todavía más preferentemente, el producto de fermentación también comprende otro compuesto con actividad biocida de amplio espectro de fórmula (II):



- 25 (II)

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

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con el nuevo compuesto de fórmula (I) que está comprendido en el producto de fermentación.

5 En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento de obtención del producto de fermentación que comprende cultivar micelio de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* en un medio de cultivo.

10 Preferentemente, el hongo endófito que se utiliza en el procedimiento de obtención es la cepa Aa22 de *S. solani* con número de depósito CECT 20941.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso del producto de fermentación, o de los compuestos de fórmulas (I) o (II), aislados o en combinación, para elaborar una composición biocida de amplio espectro.

15 En un quinto aspecto, la invención se relaciona con la composición biocida de amplio espectro que comprende el producto de fermentación, o los compuestos de fórmulas (I) o (II), aislados o en combinación.

20 En un sexto aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición biocida como agente biocida de amplio espectro para el control de al menos una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas, y que se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos, preferentemente todos ellos de forma simultánea.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 El problema técnico que resuelve la presente invención es la búsqueda de nuevos productos biocidas naturales que sean efectivos simultáneamente contra varios organismos perjudiciales que afectan a las plantas, y que representen de ese modo, una alternativa efectiva a los biocidas químicos de síntesis.

30 La presente invención se fundamenta en el descubrimiento de un producto de fermentación de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani*, que preferentemente es la cepa Aa22 de *S. solani* con CECT 20941 y que puede comprender simultáneamente al menos un compuesto de fórmula (I) y un compuesto de fórmula (II), que le dotan de una

sorprendente actividad biocida de amplio espectro contra hongos fitopatógenos, insectos-plaga y el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne javanica* (ver Ejemplos 4 a 6).

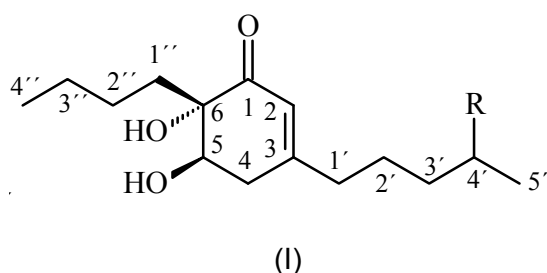
Las principales ventajas técnicas del producto de fermentación, de su uso para el control de organismos perjudiciales que afectan a plantas y de su procedimiento de obtención, se enumeran a continuación:

-es de amplio espectro, actuando simultáneamente de forma efectiva contra insectos-plaga, hongos y nematodos,

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

-se puede obtener a gran escala por fermentación del hongo en biorreactores, pudiéndose manipular las condiciones de fermentación para aumentar la producción de componentes activos.

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un producto de fermentación de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani*, con actividad biocida de amplio espectro, en adelante producto de fermentación de la invención, que comprende al menos un compuesto de fórmula (I):



donde R se selecciona entre H y OH,

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

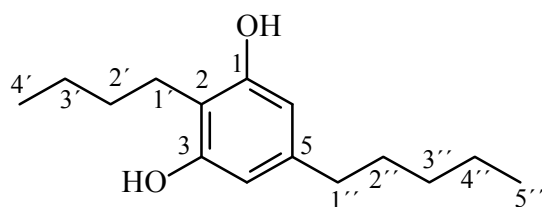
Por "producto de fermentación" se entiende un producto que es el resultado de la acción de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani*, que al crecer sobre un medio de cultivo tiene la capacidad de sintetizar al menos un compuesto de fórmula (I). Preferentemente el hongo endófito es la cepa Aa22 de *S. solani* con CECT 20941. El producto de fermentación

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

5 En una realización particular, el producto de fermentación de la invención comprende simultáneamente un compuesto de fórmula (I) donde R es H y otro compuesto de fórmula (I) donde R es OH, o un isómero, o una sal o un solvato de los mismos.

En otra realización más particular de la anterior, el producto de fermentación de la invención, comprende otro compuesto de fórmula (II):

10



(II)

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

15 Aunque tanto los compuestos de fórmula (I) y fórmula (II) de forma aislada presentan actividad biocida de amplio espectro, su presencia combinada dentro del producto de fermentación de la invención, le proporciona al mismo una actividad manifiestamente mejorada (ver Ejemplos 4 a 6).

20 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
 25 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.

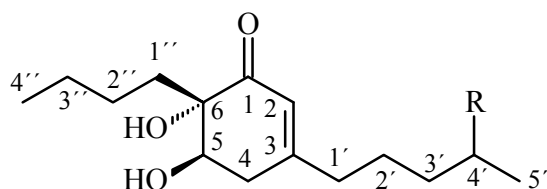
30 Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran las sales y solvatos aceptables de todos los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención o de

cualquier otro compuesto que, cuando se aplica a un organismo perjudicial para las plantas, es capaz de proporcionar (directamente o indirectamente) un compuesto según se describe en el presente documento.

- 5 En otra realización particular, el producto de fermentación de la invención puede estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. Los métodos de solvatación se conocen generalmente dentro de la técnica.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):

10



(I)

donde R se selecciona entre H y OH,

- 15 o un isómero, una sal o un solvato del mismo, que cuenta con actividad biocida de amplio espectro, en adelante compuesto de la invención, y que está comprendido en el producto de fermentación de la invención, ya sea solo o combinado con al menos el compuesto de fórmula (II) según se define en este documento.

- 20 En el ámbito de la presente invención, las expresiones “compuesto de fórmula (I) donde R=H” y “*Stemfolona A*” se utilizan indistintamente; del mismo modo “compuesto de fórmula (I) donde R=OH” y “*Stemfolona B*” se utilizan indistintamente; del mismo modo “compuesto de fórmula (II)” y “*Stemfol*” se utilizan indistintamente.

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

- 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), cromatografía en columna (CC), cromatografía en columna (CC) empleando diferentes fases sólidas (Gel de Sílice,
- 30

Sephadex LH-20) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), eluyéndose con distintos gradientes de polaridad mediante diferentes combinaciones de disolventes orgánicos.

5 En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento de obtención del producto de fermentación de la invención, en adelante procedimiento de obtención de la invención, que comprende:

10 a) cultivar micelio de un hongo de la especie *Stemphyllum solani* en un medio de cultivo hasta sintetizar un producto fermentado que comprende al menos un compuesto de fórmula (I).

15 En una realización particular, el procedimiento de la invención permite que el producto de fermentación de la invención comprenda un compuesto de fórmula (I) donde R es H y otro compuesto de fórmula (I) donde R es OH, o un isómero, o una sal o un solvato de los mismos.

20 En otra realización más particular de la anterior, el procedimiento de la invención consigue que adicionalmente, el producto de fermentación de la invención comprenda el compuesto de fórmula (II).

25 No todos los hongos del género *Stemphyllum* presentan la capacidad de producir el producto de fermentación de la invención. Es fundamentalmente el tipo hongo y su interacción con la planta hospedadora la que confiere unas características determinadas que posibilitan la producción de determinados compuestos. Por este motivo, en la presente invención se prefieren cepas de hongos de la especie *Stemphyllum solani* que debido a su interacción con la planta hospedadora han desarrollado las características necesarias para producir los compuestos de la invención. Preferentemente es la cepa Aa22 de *S. solani* aislada de hojas de *Artemisia absinthium* depositada en fecha 25 de septiembre de 2015 en la Colección
30 Española de Cultivos Tipo con CECT 20941, siguiendo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

El procedimiento de la invención, puede incluir una etapa adicional o etapa b) de secado del producto de fermentación de la invención a través de extracción con solvente orgánico previa filtración, o bien a través de liofilización.

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

En una realización particular, el hongo endófito es la cepa Aa22 de *Stemphyllum solani* aislada de material vegetal de *Artemisia absinthium* depositada en la Colección Española de
10 Cultivos Tipo con CECT 20941 en fecha 25 de septiembre de 2015 se cultiva utilizando un YMB.

Sin embargo, se pueden aislar cepas de *S. solani* en otras plantas como por ejemplo, *Mentha pulegium*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinífera* y en *Eremophilia longifolia*.

15 Ejemplos de medios de cultivo que permiten la fermentación por parte de los hongos del especie *Stemphyllum solani* son YMB (caldo extracto de levadura y extracto de malta), 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
20 A1 o cualquier otro medio de cultivo comercial para hongos fitopatógenos.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso del producto de fermentación de la invención, o del compuesto de la invención, o de un compuesto de fórmula (II) ya sea de forma aislada o en combinación, para elaborar una composición con actividad biocida de
25 amplio espectro.

Por “actividad biocida de amplio espectro” se entiende la capacidad de controlar simultáneamente a más de una categoría distinta de organismos perjudiciales para las plantas. Dicho control comprende la prevención de la acción o la destrucción directa de
30 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 categorías de organismos perjudiciales para las plantas, incluyen sin limitarse,
35 insectos-plaga, hongos o nematodos.

Preferentemente, los insectos-plaga que se incluyen en el ámbito de esta invención, son insectos-plaga herbívoros con diferentes adaptaciones tróficas, ya sean masticadores o chupadores (áfidos), 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 insectos-plaga herbívoros con diferentes adaptaciones tróficas, son *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*.

La actividad contra estos insectos-plaga herbívoros 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.

Preferentemente, los hongos pertenecen a especies de hongos fitopatógenos. Ejemplos, a título ilustrativo y no limitativo, de hongos contra los que es efectivo el producto fermentado de la invención son *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani* y *Botrytis cinérea*.

La actividad contra hongos se puede determinar, por ejemplo, mediante ensayos de inhibición del crecimiento del micelio en placa.

Preferentemente, los nematodos que se incluyen en el ámbito de la invención 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).

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. En el ámbito de la invención, la actividad nematicida se puede determinar, por ejemplo, a través de la determinación del porcentaje de juveniles infectivos (J2) muertos tras las 72 horas posteriores a la aplicación del extracto.

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

5

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

10 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 tales como concentrados emulsionables, polvos humectables, líquidos fluidos, (v.g., suspensión en agua, emulsión en agua, etc.), polvos, aerosoles, ULV y similares.

15

Ejemplos de vehículo sólido que se incluyen en el ámbito de la invención son polvos finos o gránulos de arcillas (v.g. arcilla de caolín, tierra de diatomeas, óxido de 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, 20 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 de la invención son agua, alcoholes (v.g., metanol, etanol, etc.), cetonas (v.g., acetona, metil etil cetona, etc.), 25 hidrocarburos aromáticos (v.g. benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, metilnaftaleno, etc.), hidrocarburos alifáticos (v.g. hexano, ciclohexano, kerosina, gas 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, 30 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 de la invención son agente de pulverizado, incluyendo gas flon, gas butano, LPG (gas de petróleo liquificado), éter 35 dimetílico, gas de dióxido de carbono y similares.

Ejemplos de agente tensioactivo que se incluyen en el ámbito de la invención 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.

5

Ejemplos de agente auxiliar para la formulación como agente de fijación y agente de dispersión que se incluyen en la invención son caseína, gelatina, polisacáridos (v.g., polvo de almidón, goma arábiga, 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.

10

Ejemplos de estabilizantes que se incluyen en el ámbito 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.

15

El producto de fermentación de la invención, el compuesto de la invención, el compuesto de fórmula general (II) y la composición biocida de la invención se pueden utilizar conjuntamente con al menos otro ingrediente activo adicional. Ejemplos de ingrediente activo adicional son nematocidas, insectocidas, acarocidas, fungicidas, herbicidas, reguladores del crecimiento de la planta, sinérgicos, fertilizantes, acondicionadores del suelo y cebos para animales.

20

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con el uso como agente biocida de amplio espectro para el control de organismos perjudiciales, que afectan a plantas, en adelante uso de la invención, del producto de fermentación de la invención, o del compuesto de la invención, o de un compuesto de fórmula (II) ya sea de forma aislada o en combinación. Preferentemente, el uso de la invención es efectivo simultáneamente contra más de una categoría de organismos perjudiciales, que se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo.

30

En una realización particular, el uso de la invención como agente biocida de amplio espectro comprende el producto de fermentación de la invención y es activo simultáneamente contra al menos, insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo.

35

En otra realización particular, el uso de la invención comprende al menos un compuesto de fórmula (I) y es activo simultáneamente contra insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo.

- 5 En otra realización particular, el uso de la invención comprende el compuesto de fórmula (II) y es activo simultáneamente contra insectos-plaga y hongos.

En un último aspecto, la invención se relaciona con un método de control de amplio espectro de organismos perjudiciales que afectan a plantas, en adelante método de control de la
10 invención, que comprende administrar una dosis eficaz de la composición biocida de la invención, o del producto de fermentación de la invención, o del compuesto de la invención, o de un compuesto de fórmula (II) ya sea de forma aislada o en combinación. Preferentemente, el método de control de la invención es efectivo simultáneamente contra
15 hongos y al menos un nematodo.

En una realización particular, el método de control de la invención es activo simultáneamente contra al menos, insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo.

- 20 La aplicación puede ser directamente por rociado sobre los organismos perjudiciales, o sobre el sustrato en el que se encuentren.

La “dosis eficaz” puede aumentar o disminuir opcionalmente según si se utiliza la composición biocida de la invención, o el producto de fermentación de la invención, o el
25 compuesto de la invención, o un compuesto de fórmula (II) ya sea de forma aislada o en combinación, o de del tipo de formulación, del tiempo, del lugar y del método de aplicación, del tipo de organismo perjudicial 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
30 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.

35

MODOS DE REALIZACION DE LA INVENCION**A) OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO DE FERMENTACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOCIDA**

5

Ejemplo 1. Aislamiento e identificación de la cepa Aa22 del hongo endófito *S. solani*

La cepa Aa22 del hongo endófito *S. solani* fue aislada de hojas de *Artemisia absinthium* recolectadas en Terceira (Islas Azores, región Macaronesia). El material vegetal fresco se esterilizó superficialmente con hipoclorito de sodio (65%), etanol (75%) y agua destilada estéril. Pequeñas muestras de explantos (hojas y tallos) se incubaron a 27°C en oscuridad en dos medios de cultivo (PDA y YMB) en placas petri con 50 mg/l de antibiótico para prevenir su contaminación. La cepa pura Aa22 de *S. solani* se obtuvo aislando individualmente una colonia crecida en medio YMB y se replicó en las mismas condiciones para su mantenimiento.

La identificación morfológica de la cepa del hongo se realizó en un microscopio atendiendo a las características del micelio, esporas y estructuras reproductivas, tiñendo pequeñas muestras de las colonias aisladas con azul de metileno. Así mismo, se llevó a cabo su identificación a nivel molecular con la amplificación (PCR) y secuenciación de la región ITS ribosomal del ADNr extraído de una muestra del micelio (Arenal et al. 2000. *Mycological Research* 104, 2000, 301–303; Giménez. 2006. Productos bioactivos de plantas canarias y sus hongos endófitos: detección de actividad y utilización en el control de plagas y enfermedades agrícolas. Tesis doctoral, Universidad de La Laguna). Se comparó la secuencia ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr con las publicadas en las bases de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (número de acceso GenBank JF913269.1). Una vez identificada la cepa Aa22 del hongo endófito *S. solani*, esta fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en fecha 25 de septiembre de 2015 correspondiéndole el número de acceso CECT 20941, siguiendo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

Ejemplo 2. Obtención del producto de fermentación de la cepa Aa22 de *S. solani*

De un cultivo de dos semanas en medio YMB (caldo extracto de levadura y extracto de malta) en placa petri de la cepa Aa22 de *S. solani*, se tomaron seis muestras de fragmentos (2.5x2.5 cm) de micelio fresco y se inocularon en doce erlenmeyers esterilizados, con 100 g de arroz y 30 ml de agua destilada (para prevenir la deshidratación del arroz). Después de tres semanas de incubación en oscuridad a 25°C, el cultivo se extrajo tres veces con acetato de etilo y el producto de fermentación obtenido (de aquí en adelante extracto crudo) se concentró a vacío (4.58 g).

10 **Ejemplo 3. Aislamiento y caracterización de los compuestos con actividad biocida del extracto crudo**

Técnicas experimentales

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos identificados en las distintas fracciones del extracto crudo se registraron en espectrómetros Bruker Advance y AMX-500, a 400 y 500 MHz para el ^1H y a 100 y 125 MHz para el ^{13}C , respectivamente. Los productos se disolvieron en deuterocloroformo (CDCl_3) que contenía tetrametilsilano (TMS) como patrón interno de referencia. La multiplicidad de las señales de ^{13}C se determinaron con experimentos de desacoplamiento de banda ancha (DEPT, *Delay enhancement of polarization transfer*). Los programas bidimensionales (2D) usados en los experimentos de RMN (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) fueron los proporcionados por la firma Bruker. Los espectros de masas de alta y de baja resolución se registraron en un espectrómetro Micromass Autospec® utilizando la técnica de impacto electrónico (IE-MS) a 70 eV y una temperatura de 220°C. Las cromatografías preparativas y semipreparativas se llevaron a cabo en un equipo de cromatografía líquida flash (Flash Master Personal, Jones Chromatography) sobre columnas de sílica (*Isolute flash silica*, 20 g/70 mL, International Sorbent Technology Ltd. Tucson, USA). En las cromatografías líquidas a vacío (VLC) y en columna (CC) se utilizó gel de sílice 0.025-0.04 y 0.040-0.015 mm (Macherey-Nagel GmbH&Co.KG, Düren, Germany) y como soporte en las cromatografías de exclusión molecular Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals). La visualización de los compuestos en las cromatografías en capa fina (TLC) se realizó con una disolución de H_2SO_4 (5%) y vainillina (5%) en EtOH.

Por su parte, el extracto crudo se analizó por LC-MS.

35

3.A. Aislamiento de compuestos con actividad biocida a partir del extracto crudo

La fracción soluble en metanol (4.09 g) del extracto crudo (4.58 g) obtenida según el Ejemplo 2, fue cromatografiada en sílica gel (0.3 kg) mediante una cromatografía líquida de vacío (VLC) utilizando como eluyente mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo, acetona y metanol/ agua dando lugar a 8 fracciones: H1-H2-H3-H4-H5-H6 y H8.

La fracción H2 (n-hexano/ AcOEt, 5:1, 0.575 g) fue cromatografiada en columna (CC) con gel de sílice empleando mezclas de n-hexano/acetona. De la fracción más polar se obtuvieron 42 mg de **stemfol** (Stodola et al.1973. *Phytochemistry* 12, 1797-1798, Marumo et al. 1985. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1521-1522). Las otras fracciones se reunieron en 6 fracciones (H2A–H2F). La fracción H2E (0.053 g) fue nuevamente cromatografiada sobre una columna de gel de sílice usando mezclas de n-hexano/diclorometano. En las fracciones de polaridad media se obtuvieron 21 mg del stemfol.

De la fracción H3 (n-hexano/ AcOEt, 4:1, 107 mg) mediante cromatografía en Sephadex LH-20 con una mezcla de n-hexano/diclorometano/metanol (2:1:1) se aisló de nuevo el stemfol (74.3 mg).

La fracción H6 (acetona, 0,452 g) se cromatografió sobre una CC de sílica gel eluída con mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo. En las fracciones menos polares obtenidas a partir de esta fracción 6 se aisló la **stemfolona A** (19 mg) y de las más polares se obtuvieron 11 mg de la **stemfolona B** mediante cromatografía en Sephadex LH-20 con n-hexano/diclorometano/metanol (2:1:1).

3.B. Caracterización de los compuestos con actividad biocida

Stemfol

El stemfol se aisló a partir del extracto crudo como un sólido blanco. El espectro de masas de alta resolución mostró un ión molecular a 236.1772 *m/z* (calcd. 236.1776) que estaba de acuerdo con la fórmula molecular C₁₅H₂₄O₂. Las bandas de absorción en el espectro de IR a 3300 y 1630 cm⁻¹ indicaban la presencia de grupos hidroxilos y dobles enlaces, respectivamente. Su espectro de RMN de ¹H presentaba señales características de dos cadenas alquílicas (butilo y n-pentilo), la señal de un singulete que integraba por dos

protones a δ 6.22 (H-4, H-6) y dos grupos hidroxílicos a δ 4.62 (2H, s, OH). El desplazamiento químico y la multiplicidad sugerían la presencia de un anillo 1,3-dihidroxifenilo-2,5-tetrasustituido. Esta propuesta fue confirmada por la similitud de sus datos espectroscópicos con los publicados para compuestos análogos (Pohanka et al. 2006. *J Nat Prod.* 69, 654-657).

El espectro de RMN ^{13}C mostró doce señales correspondientes a un grupo metilo, siete metilenos, un grupo metino y tres carbonos cuaternarios, que estaban de acuerdo con las correlaciones observadas en el experimento HSQC. Las señales a δ 108.1, 114.1, 142.1 y 154.4 debidas a carbonos aromáticos confirmaban la presencia del grupo fenilo 1,3-dihidroxi-2,5-tetrasustituido.

La posición relativa de los sustituyentes fue confirmada en el experimento HMBC, con las correlaciones observadas entre los protones a δ 2.58 (H-1') y δ 6.22 (H-4, H-6) con las señales a δ 154.4 (C-1, C-3) y δ 112.5 (C-2), y del protón a δ 2.44 (H-1'') con δ 108.1 (C-4, C-6) y δ 142.2 (C-5) (ver Figura 1).

Estos datos están de acuerdo con el stemfol, compuesto aislado anteriormente de los hongos *S. majusculum* (Stodola et al. 1973. *Phytochemistry* 12, 1797-1798) y *S. botryosum* (Marumo et al. 1985. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1521-1522). Sus datos espectroscópicos de RMN 2D permitieron asignar todas las señales de protones y carbonos presentes en la molécula (ver Tabla 1) e identificar su estructura como la 5-butil-2-pentilresorcina.

Stemfol. IR (film) ν_{max} , 3300, 2850 1630 1588, 1430, 1270 cm^{-1} ; para datos ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) ver Tabla 1; para datos ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) ver Tabla 1; HREIMS m/z 236.1771 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$, 236.1776); EIMS 70 eV m/z (rel. int.): 236 $[\text{M}^+]$ (16), 194 (16), 193 (100), 180 (45), 137 (7), 123 (11), 91 (3), 77 (4).

Tabla 1. Datos espectroscópicos de ^1H NMR y ^{13}C NMR del stemfol

H/C	^1H NMR	^{13}C NMR
1	----	154.4 s
2	----	112.5 s
3	----	154.4 s

4	6.22 s	108.1 d
5	----	142.2s
6	6.22 s	108.1 d
1'	2.58 t ($J = 8.0$ Hz)	22.8t
2'	1.51 m	31.4t
3'	1.40 m	22.7t
4'	0.93 t ($J = 7.0$ Hz)	13.9q
1''	2.44 t ($J = 8.0$ Hz)	35.5t
2''	1.51 m	30.7t
3''	1.51 m	31.5t
4''	1.31 m	22.5t
5''	0.88 t ($J = 7.0$ Hz)	13.9q

Stemfolona A

- 5 La stemfolona A fue aislada a partir del extracto crudo como un sólido amorfo de color marrón. Su fórmula molecular se determinó como $C_{15}H_{26}O_3$ ($[M]^+$, m/z 254.1888) (calcd. 254.1882) por espectrometría de masas de alta resolución. El espectro de IR mostro bandas de absorción a 3443, 1673 y 1650 cm^{-1} atribuibles a grupos hidroxilos, grupo carbonilo y dobles enlaces, respectivamente.
- 10 En el espectro de 1H -RMN se observaron señales de dos cadenas alifáticas que integraban por un total de veinte protones, un grupo metileno a δ 2.47 (1H, *dd*, $J = 18.0$ Hz, $J = 10$ Hz, H-4ax) y δ 2.61 (1H, *dd*, $J = 18.0$ Hz, $J = 6.0$ Hz, H-4ec), y un metino unido a un átomo de oxígeno a δ 3.98 (1H, *dd*, $J = 10.0$ Hz, $J = 6.0$ Hz, H-5). Asimismo, se observó a campo bajo la señal de un protón olefínico a δ 5.89 (1H, *bs*, H-2), sugiriendo la presencia de un doble
- 15 enlace trisustituido. El espectro de RMN de 1H -2D-COSY mostraba, como en el stemfol, la presencia de fragmentos alifáticos butilo y pentilo que se determinaron por las correlaciones observadas en los sistemas spin entre H-1''-H₃-4'' y H-1'- H₃-5', respectivamente. Otra serie de correlaciones que aparecen en este espectro estaban de acuerdo con un agrupamiento –CH=C–CH₂–CH–(O)–. Así, el sistema geminal a δ 2.47 (H-4'ax) y δ 2.61 (H-4 ec) mostraba
- 20 un acoplamiento con las señales a δ 3.98 (H-5) y δ 5.89 (H-2).

- El espectro de RMN de ^{13}C mostró la presencia de quince señales que se asignaron a dos metilos, ocho metilenos, dos metinos y tres carbonos cuaternarios, de acuerdo con un experimento HSQC. Las resonancias a δ 73.9 (C-5) y δ 79.6 (C-6) indicaron la existencia de dos átomos de carbono unidos al oxígeno. Destacan también en este espectro los desplazamientos químicos a δ 122.5(C-2) y 164.2 (C-3) debido a carbonos de un doble enlace unido a un grupo aceptor de electrones y la señal a δ 201.3 (C-1) de un grupo carbonilo.
- 10 La localización de los distintos grupos funcionales se estableció en base a las correlaciones mostradas en el experimento HMBC. Así, se observaron conectividades entre H-2 (δ 5.89), H-4 (δ 2.47 y 2.61 δ) y H-5 (δ 3.98) con C-6 (δ 79.6), de H-1" (δ 1.95) con C-1 (δ 200.1) y C-6 (δ 79.6), y de H-1' (δ 2.23) con C-2 (δ 122.5) y C-3 (δ 164.5) (ver Figura 2).
- 15 Las correlaciones de los experimentos HMBC y RMN-2D-COSY de ^1H sugerían la presencia de un esqueleto 6-butil-3-pentilciclohexeno. La estereoquímica de C-5 y C-6 se dedujo por los efectos NOE observados en la irradiación de H-4ax con H-1" y de H-4ec con H-5. La posición relativa de las cadenas alquílicas butilo y pentilo fue confirmada por los efectos NOE observados entre los protones H-2 y H-1', H-4 y H-1". Estos datos espectroscópicos permitieron determinar la estructura de un compuesto como el 6-butil-5,6-dihidroxi-3-pentylcyclohex-2-en-1-ona, no descrito anteriormente en la bibliografía y al que hemos denominado stemfolona A.

Stemfolona A. $[\alpha]_{\text{D}} +4.4$ (c 0.08, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3443, 2957, 2930, 2861, 1673, 1650, 1626, 1467, 1378, 1257, 1142, 1075 cm^{-1} ; para datos ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) ver Tabla 3; para datos ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) ver Tabla 3; HREIMS m/z 254.1888 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$, 254.1882); EIMS 70 eV m/z (rel. int.): 254 $[\text{M}]^+$ (5), 198 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8]^+$ (35), 179 (8), 169 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8-\text{C}_2\text{H}_5]^+$ (33), 151 (21), 139 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2]^+$ fragmentación retro-Diels Alder (100), 124 (22), 116 (58), 95 (20), 85 (54), 74 (55).

30

Stemfolona B

La stemfolona B se aisló a partir del extracto crudo como un sólido amorfo de color marrón. La fórmula molecular se determinó como $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_4$ a partir del ion molecular am/z 270.1833 (calcd. 270.1831) en el espectro de masas de alta resolución. Las absorciones del espectro

35

de infrarrojo a 3418, 1673, 1651 cm^{-1} indicaron la presencia de grupos hidroxilo, grupo carbonilo y dobles enlaces, respectivamente. En su espectro de RMN de ^1H se observaron señales similares a las de la stemfolona A. La diferencia más significativa entre los dos espectros fue la presencia de una señal a δ 3.81 (1H, *td*, $J = 12.0$ Hz, $J = 6.0$ Hz, H-4') que sugería la presencia de un grupo hidroxilo adicional que podría estar situado en C-3 o C-4. La correlación observada en el experimento HMBC entre los grupos metilo en δ 1.19 (3H, *d*, H-5') y la señal en δ 67.7 confirma la posición del grupo hidroxilo en C-4. Por otro lado, el efecto NOE entre H-1 y H-4, así como las constantes de acoplamiento de H-3 permitió determinar la estereoquímica relativa en C-2 y C-3. En base a los datos anteriores la estructura de este compuesto fue asignada como 6-butil-5,6-dihidroxi-3-(4-hidroxipentil)ciclohex-2-en-1-ona. Es la primera vez que este compuesto se aísla como producto natural y lo denominamos stemfolona B.

Stemfolona B. $[\alpha]_D +12.5$ (c 0.056, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3418, 295, 2931, 2872, 1673, 1667, 1651, 1626, 1433, 1377, 1260, 1138, 1076 cm^{-1} ; para datos ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) ver Tabla 3; para datos ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) ver Tabla 3; HREIMS m/z 270.1833 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_4$, 270.1831); EIMS 70 eV m/z (rel. int.): 270 $[\text{M}^+]$ (7), 252 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (14), 197 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-2\text{C}_2\text{H}_4]^+$ (35), 179 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-2\text{C}_2\text{H}_4]^+$ (12), 167 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-2\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}_4\text{H}_9]^+$ (33), 155 (17), 149 (26), 137 (21), 125 (10), 116 $[\text{M}-\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_3]^+$ fragmentación retro-Diels Alder (100), 109(28), 95 (54), 85 (85), 74 (96).

Tabla 2. Datos espectroscópicos de ^1H NMR y ^{13}C NMR de la stemfolona A y B.

Stemfolona A			Stemfolona B	
H/C	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR
1	----	201.3 s	----	201.3 s
2	5.89bs	122.5 d	5.89 bs	122.6 d
3	----	164.2 s	----	163.6 s
4	2.61 dd ($J = 18.0, 6.0$ Hz)	36.1 t	2.63 dd ($J = 19.0, 6.0$ Hz)	36.0 t
	2.47 dd ($J = 18.0, 10.0$ Hz)		2.47 dd ($J = 19.0, 10.0$ Hz)	
5	3.98dd ($J = 10.0, 6.0$ Hz)	73.9 d	3.98dd ($J = 10.0, 6.0$ Hz)	73.8 d
6	----	79.6 s	----	79.6 s

1'	2.23dd(J = 7.0, 3.0 Hz)	37.7 t	2.23 m	37.6 t
2'	1.45 m	26.7 t	1.45 m	23.1 t
3'	1.30 m	31.3 t	1.30 m	38.6 t
4'	1.28 m	22.4 t	3.81 td (J = 12.0, 6.0 Hz)	67.7 d
5'	0.88 t (J = 7.0 Hz)	13.9 q	1.19 d (J = 6.0 Hz)	23.8 q
1"	1.95dd (J = 13.0, 6.0 Hz)	29.3 t	1.95dd (J = 10.0, 6.0 Hz)	29.3 t
	1.45 m		1.45 m	
2"	1.28 m	24.5 t	1.28 m	24.5 t
3"	1.32 m	23.1 t	1.28 m	23.2 t
4"	0.85 t (J = 7.0 Hz)	13.9 q	0.85 t (J = 7.0 Hz)	13.9 q

B) ACTIVIDAD BIOCIDA

Ejemplo 4. Actividad 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 (Poitut y Bues. 1970. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 2, 79-91) y los áfidos *M. persicae* y *Rhopalosiphum padi* sobre sus plantas huésped, pimiento -*Capsicum annum* L.- y cebada -*Hordeum vulgare* L.- respectivamente. Los ensayos de actividad anti-alimentaria se realizaron con larvas recién emergidas del sexto estadio de *S. littoralis* y pulgones adultos ápteros. La superficie superior de discos de hoja (1.0 cm²) de pimiento (*Capsicum annum* L.), fueron tratados con

10

10 µl de una solución (10 mg/ml para extractos y 5 mg/ml para productos puros). 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* o *R. padi* 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 (*M. persicae* o *R. padi*) se

15

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

20

con un FI / SI > 70 % se ensayaron en un experimento de dosis - respuesta para calcular su potencia relativa (EC_{50} , es la dosis efectiva para una reducción de un 50 % de la alimentación).

5 Tabla 3. Actividad contra insectos-plaga del extracto crudo ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), de las fracciones H1-H8 [$100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$] y de los compuestos con actividad biocida ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Extracto crudo/fracción/ compuesto	<i>S. littoralis</i>	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>
	% FI	% SI	
Extracto crudo	97.21 ± 1.58	97.23 ± 1.27	40.02 ± 6.79
H1	57.70 ± 8.81	50.29 ± 10.21	55.16 ± 6.27
H2	65.22 ± 9.64	92.76 ± 2.59	72.57 ± 6.20
H3	34.54 ± 11.70	91.51 ± 3.28	86.57 ± 3.11
H4	32.83 ± 16.81	83.91 ± 4.06	38.17 ± 7.70
H5	54.27 ± 11.78	47.54 ± 10.06	68.36 ± 6.41
H6	78.51 ± 9.56	74.88 ± 6.77	34.29 ± 6.90
H7	98.22 ± 1.44	93.18 ± 2.15	95.46 ± 2.11
H8	79.98 ± 7.93	72.04 ± 5.65	59.68 ± 6.51
Stemfol	60.44 ± 8.7	85.35 ± 5.36 0.05 (0.01-0.301)*	72.41 ± 5.61
Stemfolona A	41.8 ± 7.9	81.42±5.61 0.15 (0.06-0.36)*	na
Stemfolona B	52.9 ± 5.9	83.87±6.89 0.02 (0.003-0.15)*	45.13 ± 9.09

* EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Ejemplo 5. Actividad antifúngica

10

Los hongos fitopatógenos *Fusarium moniliforme* (Sheldon) [CECT 2152], *F. oxysporum* *fs. lycopersici* (Escalda) [CECT 2715] y *F. solani* (Mart) [CECT 2199] 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

15 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%. 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. El porcentaje de inhibición (% I) se calculó como: % I = (C-T/C) x 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 (EC₅₀) se determinó por análisis de regresión lineal (% de inhibición del log de la dosis).

Tabla 4. Actividad antifúngica del extracto crudo, de las fracciones H1-H8 y de los compuestos (utilizando 0.5 mg/ml). ^aEnsayado a 0.1 mg/ml.

Extracto crudo/fracción/ compuesto	Actividad antifúngica (0.5 mg/ml) EC ₅₀ mg/ml (95% CL)			
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
Extracto crudo	85.5±0.89 0.144 (0.113-0.183)	80.921±1.674 0.196 (0.195-0.196)	77.78±1.09 0.08 (0.07-0.08)	61.176±3.793 0.30 (0.31-0.30)
H1	10.90±2.59	3.52±0.78	1.126±1.625	9.61±3.66
H2	50.44±9.40 0.464(0.069-0.952)	32.79±1.72	46.79±6.89	9.44±3.77 ^a
H3	69.38±1.17 0.179 (0.147-0.218)	56.26±1.69 ^a	82.55±2.9 ^a	54.82±1.97 ^a
H4	3.61±1.18	0	15.262±2.782	1.03±1.13
H5	12.79±1.84	12.87±2.86	15.328±3.006	16.03±2.30
H6	22.68±2.62	22.93±3.48	36.459±3.545	22.83±2.72
H7	0	0	4.629±1.937 ^a	0.24±2.67
H8	0.23±1.65	0	4.585±2.432	3.87±2.81
Stemfol	70.22±2.04 0.01 (0.005-0.024)	67.35±2.05 0.02 (0.020-0.021)	47.093±3.578	44.74±1.35 0.53 (0.53-0.54)
Stemfolona	na	na	na	56.21±1.50

A2				0.43 (0.42-0.43)
Stemfolona B	----	4.20±1.14 ^a	49.94±4.40 ^a 0.21 (0.21-0.22)	11.88±3.67

Ejemplo 6. Actividad nematocida

La población de nematodos (*M. 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, de sus fracciones y de los compuestos con actividad biocida se cuantificó a una concentración final por pocillo de 1.0/0.5 y 0.25 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 LC₅₀ y LC₉₀.

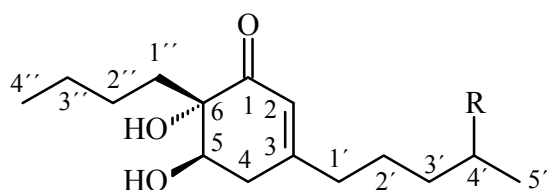
Tabla 5. Actividad nematocida del extracto crudo, de las fracciones H1-H8 y de los compuestos

Extracto crudo/fracción/ compuesto	mg/ml	<i>M. javanica</i> % paralyzed
Extracto crudo	1	94.82 ± 0.75
H1	1	0.41 ± 1.60
H2	1	7.46 ± 1.79
H3	1	0.00 ± 0.00
H4	1	0.00 ± 0.00
H5	1	10.39 ± 1.87
H6	1	11.14 ± 3.23
H7	1	0.98 ± 1.42
H8	1	1.80 ± 0.65
Stemfol	0,5	1.24 ± 0.68

Stemfolona A	0,5	83.05 ± 3.15
	0,25	2.8 ± 0.5
Stemfolona B	0,5	1.24 ± 0.9

REIVINDICACIONES

1.- Producto de fermentación de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* con actividad biocida de amplio espectro, caracterizado por que comprende un compuesto de fórmula (I):



(I)

donde R se selecciona entre H y OH,

10

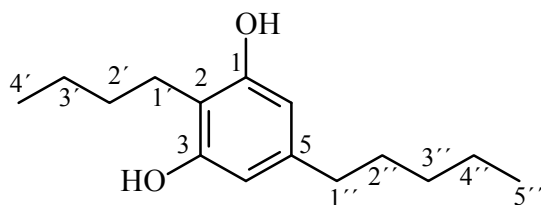
o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

2.- Producto de fermentación según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende simultáneamente un compuesto de fórmula (I) donde R es H, y otro compuesto de fórmula (I) donde R es OH, o un isómero, o una sal o un solvato de los mismos.

15

3.- Producto de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que adicionalmente comprende otro compuesto con actividad biocida de amplio espectro de fórmula (II):

20

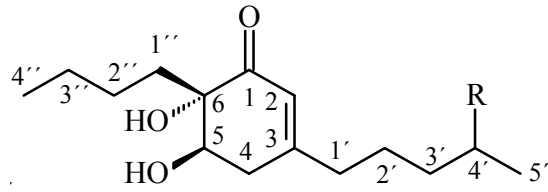


(II)

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

25

4.-Compuesto de fórmula (I):



(I)

donde R se selecciona entre H y OH,

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

5.- Procedimiento de obtención del producto de fermentación definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende cultivar micelio de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* en un medio de cultivo.

10

6.- Procedimiento de obtención según la reivindicación 5, caracterizado por que adicionalmente comprende una etapa de secado que utiliza una técnica que se selecciona entre extracción con solvente orgánico previa filtración o bien liofilización.

15

7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que el hongo endófito es la cepa Aa22 de *Stemphylium solani* con número de depósito CECT 20941.

8.- Uso de un producto de fermentación tal y como se define según las reivindicaciones 1 a 3, de un compuesto de fórmula general (I) según se define en la reivindicación 4, o de un compuesto de fórmula (II) tal y como se define en la reivindicación 3 para elaborar una composición biocida de amplio espectro.

20

9.- Composición biocida de amplio espectro que comprende un producto de fermentación tal y como se define según las reivindicaciones 1 a 3, o un compuesto de fórmula general (I) según se define en la reivindicación 4, o un compuesto de fórmula (II) tal y como se define en la reivindicación 3.

25

10.- Uso de la composición biocida según la reivindicación 9 como agente biocida de amplio espectro para el control simultáneo de más de una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas.

30

- 11.- Uso según la reivindicación 10, caracterizado por que las categorías de organismos perjudiciales que afectan a las plantas se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos.
- 5 12.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, caracterizado por que las categorías de organismos perjudiciales son simultáneamente insectos-plaga, hongos y nematodos.
- 10 13.- Método para el control simultáneo de más de una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas, que comprende administrar una dosis eficaz de un producto de fermentación tal y como se define según las reivindicaciones 1 a 3, o de un compuesto de fórmula general (I) según se define en la reivindicación 4, o de un compuesto de fórmula (II) tal y como se define en la reivindicación 3.
- 15 14.- Método de control según la reivindicación 13, caracterizado por que las categorías de organismos perjudiciales que afectan a las plantas se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos.
- 20 15.- Método de control según cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, caracterizado por que las categorías de organismos perjudiciales son simultáneamente insectos-plaga, hongos y nematodos.



- ②① N.º solicitud: 201531527
②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.10.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Andersen Birgitte et al. METABOLITE PROFILES OF COMMON STEMPHYLIUM SPECIES. 30/11/1994, Vol. 99, Páginas 672-676, ISSN 0953-7562, <DOI: DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80526-1>. Todo el documento, en especial página 675, figura 3, compuesto D, párrafo "Stemphol related compound". Todo el documento, en especial página 675, figura 3, compuesto D, párrafo "Stemphol related compound".	1-15
A	MARUMO S et al. STEMPHOL FROM PLEOSPORA-HERBARUM AS A SELF-INHIBITOR. 30/11/1984, Vol. 49, Páginas 1521-1522, ISSN 0002-1369, <DOI: DOI: 10.1271/bbb1961.49.1521>. Todo el documento, figura 1 Todo el documento, figura 1	1-15
A	Solfrizzo Michele et al. PRODUCTION OF A TOXIN STEMPHOL BY STEMPHYLIUM SPECIES. 30/11/1993, Vol. 2, Páginas 14-18, ISSN 1056-9014, <DOI: DOI: 10.1002/nt.2620020104 >. Todo el documento, en especial página 15, figura 1. Todo el documento, en especial página 15, figura 1.	1-15

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 nº:

Fecha de realización del informe
06.09.2017

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N63/04 (2006.01)

A01N31/06 (2006.01)

A01N31/16 (2006.01)

A01P1/00 (2006.01)

A01P3/00 (2006.01)

A01P5/00 (2006.01)

A01P7/04 (2006.01)

A01N35/06 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, A01P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, CA, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.09.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Andersen Birgitte et al. METABOLITE PROFILES OF COMMON STEMPHYLIUM SPECIES. Vol. 99, Páginas 672-676, ISSN 0953-7562, <DOI: DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80526-1>	30.11.1994
D02	MARUMO S et al. STEMPHOL FROM PLEOSPORA-HERBARUM AS A SELF-INHIBITOR. Vol. 49, Páginas 1521-1522, ISSN 0002-1369, <DOI: DOI: 10.1271/bbb1961.49.1521>	30.11.1984
D03	Solfrizzo Michele et al. PRODUCTION OF A TOXIN STEMPHOL BY STEMPHYLIUM SPECIES. Vol. 2, Páginas 14-18, ISSN 1056-9014, <DOI: DOI: 10.1002/nt.2620020104 >	30.11.1993

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un producto de fermentación de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* con actividad biocida que comprende además del compuesto de fórmula II conocido como Stemfol, un compuesto de fórmula I, donde R puede ser H o OH.

La invención también se refiere a estos productos de fórmula I como tal, al procedimiento de obtención del producto de fermentación, a su uso como biocida en plantas, incluyendo fungicida, insecticida y nematocida, a la composición biocida que lo comprende, y a su uso como biocida en plantas.

En el documento D01 se analizan 33 aislados de diferentes especies de *Stemphylium*, sin estar entre ellas la especie *Stemphylium solani* a la que se refiere la solicitud de patente. Entre los metabolitos detectados se encuentra el compuesto conocido como Stemfol con RN 70680-20-5 (pagina 675, figura 3, compuesto de fórmula D) que corresponde al compuesto de fórmula (II) de la reivindicación 3.

En la página 675 de este documento también se menciona el compuesto denominado "Stemphol related compound, descrito como un stemfol desconocido, aislado de *S. botryosum* y cuya estructura no ha podido esclarecerse debido a que se encuentra pequeñas cantidades, con espectro UV idéntico a stemfol, y otras características que le hacen muy semejante. Estos datos no permiten afirmar de forma clara e inequívoca que este compuesto pueda identificarse con los dos productos de fórmula I de la solicitud.

El documento D02 describe el compuesto stemfol (figura 1, página 1521) con actividad biocida frente a bacterias, levaduras y hongos, que corresponde al compuesto de fórmula (II) de la reivindicación 3.

El documento D03 describe el compuesto descrito como fitotoxina, stemfol (figura 1, página 15) con actividad biocida frente a bacterias y hongos, que corresponde al compuesto de fórmula (II) de la reivindicación 3.

La interpretación de las reivindicaciones 8 a 15 de la solicitud se ha hecho considerando que el producto de fermentación o la composición biocida comprende siempre un compuesto de fórmula (I) y que puede tener adicionalmente un compuesto de fórmula (II), en consonancia con el espíritu de la invención. Este extremo debería estar claro en la redacción de estas reivindicaciones (Art. 25 LP 11/1986).

A la vista de los documentos descritos del estado de la técnica, no se han encontrado divulgados los compuestos de fórmula (I) de la solicitud, por lo tanto estos productos serían nuevos. También sería nuevo el producto de fermentación del hongo endófito *Stemphylium solani* que contiene los compuestos de fórmula (I), su actividad biocida en plantas y la composición biocida que los contiene, su procedimiento de obtención y su uso biocida en plantas. Ninguno de los documentos citados se refiere a la especie *Stemphylium solani*. En consecuencia las reivindicaciones 1 a 15 de la solicitud tienen novedad e implican actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Claridad: Las reivindicaciones 8 y 9 deberían especificar que se trata de biocidas para plantas (Art. 25 LP 11/1986).