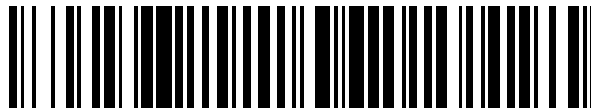


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 799**

51 Int. Cl.:

A01N 65/34 (2009.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2009 E 09156776 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2106698**

54 Título: **Extracto natural para controlar Botrytis cinerea en condiciones previas y posteriores a la recolección**

30 Prioridad:

31.03.2008 CL 9342008

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.11.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE (100.0%)
AVENIDA ALAMEDA LIBERTADOR BERNARDO
O'HIGGINS 3363
SANTIAGO, CL**

72 Inventor/es:

**ZUÑIGA NAVARRO, GUSTAVO;
RIVERA FONSECA, ALEJANDRA y
COTORAS TADIC, MILENA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 429 799 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Extracto natural para controlar *Botrytis cinerea* en condiciones previas y posteriores a la recolección

Campo de aplicación de la invención

5 La presente invención se refiere a la obtención, la producción y el uso de metabolitos con propiedades anti-*Botrytis cinerea* de los extractos naturales de plantas chilenas. El extracto desarrollado se puede usar para controlar los hongos en condiciones previas y posteriores a la recolección.

Técnica anterior

Los fungicidas son compuestos químicos de uso habitual para controlar los hongos que afectan a los cultivos.

10 Muchos de estos compuestos son sustancias orgánicas sintéticas con un amplio abanico de toxicidad y persistentes en el ambiente. Anualmente se aplican en todo el mundo miles de toneladas de fungicidas para controlar varios hongos.

15 El hongo *Botrytis cinerea* es responsable de la podredumbre gris y puede atacar a más de 200 especies de plantas cultivadas, especialmente las que crecen en invernadero. Este es un hongo saprofito que ataca a los tejidos muertos o senescentes, penetra en el tejido y causa la muerte de la planta, lo que da como resultado enormes pérdidas para los agricultores. El control de este hongo se realiza mediante agentes químicos. En la actualidad se usa benomil e iprodiona, que se van a retirar del mercado, ya que han desarrollado resistencia en el hongo.

Un problema adicional con los fungicidas usados en la actualidad es que su concentración debe aumentarse con el fin de controlar el patógeno, que causa problemas en el ambiente y en los organismos en contacto con el agente químico. Por tanto, se necesitan nuevos productos altamente eficaces y que tengan una toxicidad ambiental baja.

20 Como alternativa a los agentes sintéticos, los pesticidas botánicos tienen la ventaja de ser compuestos naturales, por lo que son más seguros para los seres humanos y el medio ambiente. Específicamente, los pesticidas botánicos son menos tóxicos que los pesticidas convencionales y generalmente afectan solo al organismo blanco o a los estrechamente relacionados. Asimismo, se descomponen rápido en el suelo, lo que los convierte en componentes ideales para los programas para la gestión integrada plagas (GIP).

25 El quillay (*Quillaja saponaria* Molina) es un árbol de la familia de las rosáceas, originaria de Chile, y su biomasa contiene moléculas denominadas saponinas, específicamente del tipo triterpenoide. Proporcionan los extractos de este árbol con características únicas que se han usado durante décadas en la mayoría de las industrias, como las alimentarias y de bebidas, minería, agricultura, alimentos animales y tratamiento de vertidos, entre otros.

30 Las propiedades principales de los extractos de quillay son: reducción de la tensión superficial, formación de espuma persistente, emulsificación de grasas y aceites. Existe una gran cantidad de literatura científica que describe el uso de estos extractos para diferentes aplicaciones industriales. La actividad biocida del quillay se ha descrito anteriormente en, por ejemplo, Apablaza et al (Fitopatología, Vol. 39, N° 3, 2004, páginas 144-149, ISSN 0430-6155), en el que se describen experimentos sobre el control del oidio de las cucurbitáceas [*Erysiphe cichoracearum* DC. ex Mérat and *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht ex Fr.) Poll] con los extractos de quillay que contienen saponina (*Quillaja saponaria* Mol.) QL 1000 y QL 30B; dichos experimentos proporcionaron resultados satisfactorios en los pepinos y las calabazas. En las hojas enfermas tratadas con dichos extractos se ha observado un cambio de color, de blanco a marrón. Con la ayuda de una lupa se observó desorganización del micelio en relación con el control. La finalidad de este estudio era demostrar y observar el efecto del extracto QL 1000 sobre el micelio y los conidios de los hongos al microscopio óptico. Las plantas de calabaza infectadas con oidio se trataron con tres dosis del producto. Se recogieron las hojas tratadas y control y se sometieron a raspado de la hoja y a observación al microscopio. Se observaron cortes en el tejido. Los resultados de los experimentos, con la técnica del raspado de la hoja y los cortes de tejido, permitieron observar cadenas completas de los conidios y conidióforo normales del oidio en las hojas control; cadenas parcialmente afectadas y más cortas a la dosis de ppm de saponinas; cadenas y conidios completamente desorganizados en la lisis a la dosis de ppm; y cadenas cortas y parcialmente desorganizadas a la dosis de 200 ppm de saponinas. Estos resultados permitieron demostrar el control del oidio con quillay QL-100, cabe destacar a este respecto que los productos de BASF QL corresponden a un nematocida de extractos a base de quillay natural al 100 %, especialmente indicado para el control de nematodos en viñas y árboles cítricos.

50 En la solicitud de patente EP 1867230 se describe un producto natural que registra el efecto antifúngico y de estimulación del crecimiento para mejorar la productividad de las plantas, que comprende al menos dos principios activos derivados de a) quillay (*Quillaja saponaria*), b) quinoa (*Chenopodium quinoa*), c) té (*Camellia* spp., p. ej., *C. a oleifera*, *C. sinensis*, *C. chekiangoleosa*, *C. drupifera*, *C. reticulata* o *C. japonica*), y d) una saponina contenida en un material vegetal distinto a (a), (b) o (c).

55 En la solicitud internacional WO2007/046680, se describe una mezcla de insecticidas orgánicos para el control de *Aedes aegypti*, que comprende extractos de *Quillaja saponaria*, *Chrysanthemum cinerariaefolium* (piretrinas),

Azadirachta indica, azadiractina y un extracto acuoso de ajo (*Allium spp.*).

La solicitud de patente de EE.UU. US2006/121126 describe una composición que contiene un compuesto generador de peróxido de oxígeno y compuestos de saponina glucósido, que, al combinarse, muestran un incremento de actividad contra insectos, patógenos, algas, mohos y actividad fúngica.

5 El documento WO01/06153 describe un procedimiento de proteger plantas o semillas que comprende poner en contacto una porción con una cantidad protectora de una composición acuosa que consiste en, esencialmente, saponina de Quinoa o Quillaja, para provocar una respuesta protectora contra el hongo en la planta o la semilla, específicamente una planta de patata o un tubérculo. La protección contra la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium solani*, *Phytophthora infestans*, Fusarium y enfermedades virales, incluyendo el virus del aceite de las hojas.

10 El documento US 2003162731 divulga un procedimiento de protección de una planta o semilla frente a enfermedades bacterianas, que comprende aplicar al menos una porción de dicha planta o semilla (específicamente la planta de tomate) una cantidad protectora de una composición de como atomizador foliar, incluyendo una saponina triterpeno derivada de un miembro de un grupo seleccionado que consiste en quinoa y quillaja para provocar una respuesta protectora en la planta o la semilla. La composición incluye ácido oleanólico, hederagenina y ácido fitolaccínico para provocar una respuesta protectora en la planta o la semilla.

Wolters et al. divulga la acción de varias saponinas de hongos (Naturwissenschaften 1966, 53(10):253).

Además, se ha encontrado un gran número de documentos de patente que describen el uso del quillay, cómo se extraen los extractos, y sus aplicaciones, tales como CL 625-1995 , en el que se describe un procedimiento para producir saponinas de color blanco procedentes de la madera del quillay; CL 1203-1998 en el que se divulga un procedimiento de producción de saponina que usa madera de quillay como materia prima empapando y comprimiendo o laminando la madera previamente dimensionada; CL 2573-2002 que proporciona un procedimiento de producción para extracto de quillay de alta pureza a base del uso de la totalidad de la biomasa, que comprende desmenuzar la madera, extraer los sólidos, purificar el extracto, filtrar la mezcla y concentrar el extracto en la etapa de filtración y pasteurización, el documento US2005/074508 describe un producto para el control de los nematodos fitoparasitarios preparados basado en un extracto acuoso de *Quillaja saponaria Molina* (quillay) que contiene tanto la fracción de saponina como la fracción sin saponina; y el procedimiento para controlar los nematodos en el que se aplica en cosechas agrícolas. Estos documentos están dirigidos, principalmente, al uso de saponinas y, en particular, a la fracción acuosa del extracto, siempre de fuentes naturales y de cultivos *in vivo*.

20 El uso de plantas como fuente de sustancias con actividad biológica requiere disponibilidad de biomasa, que no siempre permite mantener el equilibrio entre la producción y el uso, de modo que se producen situaciones de sobreexplotación del producto. Asimismo, la composición química de las plantas se ve fuertemente afectado por el ambiente en el que se desarrollan, suponiendo esto un problema cuando se usan como fuente de la producción de principios activos. Esta es la razón por la cual se necesita desarrollar metodologías que permitan el uso sostenible de fuentes naturales.

El uso de la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales con el fin de obtener extractos activos ya conocidos en la técnica anterior.

La patente de EE.UU. nº 7160706 describe el uso de esta técnica con el fin de obtener material enriquecido en metabolitos. Más específicamente, en esta patente se realiza un trabajo para obtener alcaloides de plantas de *Papaver sp.*

Aunque en la técnica más avanzada se ha descrito el cultivo *in vitro* de quillay a partir de semillas y mediante embriogénesis somática (Vega A y Prehn D (2005) Inducción e inicio de maduración *in vitro* de tejido embriogénico de Quillaja saponaria". Ciencia e Investigación Agraria 32(3):197-207), este es el primer informe en el que se usaron yemas axilares de árboles adultos.

45 **Descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra la secuencia de micropropagación de plantas de quillay. (A) Explantes de micropropagación, (B) Multiplicación de explantes, (C) Incubación de yemas durante 1 mes y un medio de Murashige y Skoog, que se cultivaron en una cámara de cultivo a una temperatura constante de $21 \pm 2^\circ$ en tubos fluorescentes a una intensidad de $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 horas de luz. Para la replicación de las plantas se usaron yemas laterales de plantas cultivadas durante 1 mes.

La figura 2 muestra el efecto de extractos de Quillay en el crecimiento radial de micelos de *B. cinerea* usando el procedimiento de dilución en un medio sólido usando agar de extracto de levadura-malta suave como sustrato. El medio de cultivo con o sin extractos se vertió en placas petri y se inoculó *B. cinerea* en el centro de la placa. Los cultivos se incubaron a 22°C en condiciones de oscuridad. El diámetro del micelio se midió a diario con una regla. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición mediante la fórmula $[(C-T)/C * 100]$, en la que C y T correspondían a la extensión de la hifa (cm) en los cultivos control y tratados, respectivamente. Los extractos se prepararon mediante técnicas de maceración y de difusión. En la primera, el tejido se trituró en nitrógeno líquido usando un mortero y su mano de cerámica antes de la extracción acuosa o hidroalcohólica

(etanol al 85 % v/v) frío durante 15 minutos en condiciones de oscuridad. Para la extracción por dilución, el material vegetal cortado en trozos pequeños se mantuvo en contacto con el disolvente frío (4 °C) durante 24 horas en condiciones de oscuridad. Antes de usar, los extractos se filtraron y se homogeneizaron mediante agitación.

La figura 3 muestra el efecto de diferentes concentraciones para el extracto etanólico de las yemas de quillay *in vitro* sobre la germinación de conidios de *B. cinerea Pers.* El disolvente (85 % de etanol) se usó como control; tanto en el control como en los tratamientos la concentración de etanol fue la misma. El ensayo se realizó en el medio de agar de extracto de levadura-malta suave suplementado con extracto etanólico de quillay a concentraciones finales de 0,5; 1,0 y 1,5 % p/v. Se inocularon en el medio de cultivo conidios secos extraídos de un cultivo esporulado. Se incubaron en cámaras de humedad y se incubaron a 22 °C durante 11 horas. La germinación de los conidios se determinó directamente a intervalos de horas observando las muestras con un microscopio óptico. Solo se consideraron germinados los conidios con un tubo germinativo igual o superior al diámetro del conidio (Inyang et al, 1999). Los resultados se expresaron como porcentaje de conidios germinados mediante la fórmula $[(T*(100)/C]$, en la que C y T correspondían al número de conidios germinados en los cultivos control y tratados, respectivamente.

La figura 4 muestra el efecto del extracto etanólico de yemas de quillay *in vitro* sobre la capacidad de *B. cinerea* de hojas de tomate colonizantes. En el gráfico para (A), se representa el área de lesión (cm²) en los frutos tratados como se ha determinado al quinto día de incubación. Los resultados representan la media de 10 determinaciones + DE. Letras diferentes en las barras indican que las medias son significativamente diferentes (Tukey, p < 0,05). Los tratamientos aplicados fueron: (I) Control - BC 1000 (agua destilada); (II) BC 1000 (fungicida orgánico natural); (III) Control - extracto (etanol 8,5 % v/v) y (IV) extracto etanólico de quillay (250 µg ml⁻¹). En las fotografías para (B) se puede observar el crecimiento del patógeno en las hojas tratadas tras una incubación de 7 días.

La figura 5 muestra el efecto del extracto etanólico de yemas de quillay *in vitro* sobre el grado de infección por *B. cinerea* en fresas. En el gráfico para (A), se muestra el porcentaje del área infectada en las frutas tratadas calculado al quinto día de incubación. Los resultados representan la media de 16 determinaciones + DE. Letras diferentes en las barras indican que las medias son significativamente diferentes (Tukey, p < 0,05). En las fotografías para (B) se puede observar el crecimiento *B. cinerea* en frutas tratadas tras 5 días de incubación. Los tratamientos aplicados fueron: (I) Control - BC 1000 (agua destilada); (II) BC 1000; (III) Control - extracto (etanol 8,5 % v/v) y (IV) extracto etanólico de quillay de yemas *in vitro* (250 µg ml⁻¹).

La figura 6 muestra el efecto de extractos de quillay *in vitro* e *in vivo* sobre el crecimiento del micelio de *B. cinerea Pers.* Los extractos (acuoso y etanólico) se evaluaron a concentraciones finales de 1,0 % p/v. Se usaron plantas *in vitro* tras 2 meses de subcultivo y plantas *in vivo* de al menos 3 años. Los respectivos disolventes se usaron como control. Los porcentajes de inhibición se calcularon al quinto día de incubación. Cada barra representa la media de tres experimentos independientes + DE. Letras diferentes en las barras indican que las medias son significativamente diferentes (Tukey, p < 0,05).

La figura 7 muestra una evaluación de la concentración relativa de saponina en extractos de yemas *in vitro* y en yemas de quillay *in vivo*. Los extractos, acuoso (barras negras) y etanólico (barras grises), se evaluaron a una concentración del 10 % p/v. Cada barra representa la media de tres repeticiones + DE. Letras diferentes en las barras indican que las medias son significativamente diferentes (Tukey, p < 0,05).

La figura 8 muestra cromatografías HPLC para el extracto etanólico de yemas cultivadas *in vitro* de quillay. El extracto se inyectó con una concentración al 10 % en p/v. La presencia de compuestos se detectó a diferentes longitudes de onda: 254, 280, 314 y 340 nm. Lo anterior se añade a la tabla, donde también se indica el tiempo de retención de cada metabolito secundario y la concentración presentada en el extracto.

La figura 9 muestra una comparación entre los extractos etanólicos de quillay cultivados *in vivo* e *in vitro* en relación con la concentración de metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, en los que se puede observar la existencia de una distribución diferente de la misma.

La figura 10 muestra la distribución de saponinas corregida por peso seco en los extractos etanólicos de quillay cultivados tanto *in vivo* como *in vitro*, en los que se puede observar que las concentraciones para este principio activo en las yemas son equivalentes en ambos casos.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un producto biocida que comprende un extracto natural de al menos una planta chilena nativa, preferentemente la invención se refiere a un extracto de Quillay (*Quillaja saponaria*). En una realización preferida de la invención, dicho producto biocida está enriquecido con metabolitos bioactivos de dicha planta, en el que el producto biocida muestra propiedades antifúngicas; preferentemente, el producto biocida es útil para el control de *Botrytis cinerea* antes y después de la recolección.

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para obtener extractos de al menos una planta chilena nativa, preferentemente la invención se refiere a un procedimiento para generar un extracto de Quillay (*Quillaja saponaria*). En una realización, dicho procedimiento permite la obtención de un extracto enriquecido en metabolitos bioactivos de dicha planta.

En una realización adicional de la invención, esto se refiere a un procedimiento para generar plantas enriquecidas en metabolitos bioactivos en comparación con plantas que crecen *in vivo* en condiciones naturales y salvajes, en el que las partes de dicha planta se usan para obtener extractos enriquecidos en metales bioactivos con actividad

antifúngica. Este procedimiento comprende una metodología para la producción de extractos antifúngicos mediante cultivo *in vitro*, sobreproducción de metabolitos bioactivos usando estimulantes de la biosíntesis (agentes inductores, bióticos y abióticos).

5 En una nueva realización, la invención se refiere a un proceso o procedimiento para el tratamiento, antes y después de la recolección, de plantas, frutos, sus derivados, plantaciones, tierras y entorno ambiental contra hongos, preferentemente contra *B. cinerea*.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere a un extracto natural de al menos una planta chilena nativa, preferentemente la invención se refiere a un extracto de quillay (*Quillaja saponaria*). Dichos extractos se obtienen de plantas cultivadas *in vitro*. En una realización preferida de la invención, dichos extractos comprenden una fracción etanólica de dichas plantas, en las que dicho extracto o producto biocida es rico en metabolitos bioactivos de dicha planta. Preferentemente, el producto biocida muestra propiedades antifúngicas y es útil, preferentemente, para el control de *Botrytis cinerea* antes y después de la recolección.

15 Se ha notificado que las saponinas muestran actividad antifúngica (Oleszek et al., 1990; Osbourn et al., 1996; Villegas, 1999; Apablaza et al., 2002; Moya, 2003; Chapagain et al., 2007). Asimismo en la técnica más avanzada se describe que los extractos metabólicos de quillay tienen más de 100 saponinas (Geoffrey C. Kite et al. Metabolic analysis of saponins in crude extracts of Quillaja saponaria by liquid chromatography/mass spectrometry for product authentication. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004; 18: 2859-2870), pero no se da una descripción del perfil de otros metabolitos adicionales a las saponinas como los divulgados en la presente invención y contribuyen con 20 calidades ventajosas a la actividad antifúngica del extracto. De hecho, el extracto de la invención, tiene ventajas cuantitativas, ya que, por un lado, es rico en los metabolitos de interés que no se obtienen a una velocidad equivalente de extractos de plantas salvajes y, por otro, es posible obtener un extracto de un modo continuo, estable y reproducible, sin depender de fuentes naturales, la disponibilidad de la materia prima, la depleción del recurso sujeto a la variabilidad o modificación estacional del perfil del extracto para diversos metabolitos.

25 La presente invención muestra que la concentración relativa de las saponinas en extractos de plantas cultivadas *in vitro* es menor que la de los extractos de la planta *in vivo* (Figura 8); por tanto, si la actividad antifúngica de los extractos fue la consecuencia exclusiva de las saponinas, el cultivo *in vitro* no sería una alternativa interesante. De acuerdo con lo anterior, las pruebas indicadas en la figura 7 muestran que los extractos *in vivo* tienen una inhibición mayor del crecimiento micelar en comparación con los extractos *in vitro*. De acuerdo con lo anterior, los extractos *in vitro* no proporcionan una actividad mejor que los extractos equivalentes *in vivo*. No obstante, debe considerarse que el contenido en materia seca de las yemas *in vitro* es de aproximadamente 11 %, mientras que el contenido en materia seca de las yemas *in vivo* es superior al 35 %. Por consiguiente, se puede concluir que la menor actividad del extracto *in vitro* se debe a que el extracto está más diluido. Corrigiendo con el peso seco del tejido en ambos casos, el extracto *in vitro* es más activo que su equivalente *in vivo*. La conclusión es que el efecto inhibitor se debe a 35 la combinación de diferentes factores metabólicos, siendo las saponinas uno de ellos, pero hay otros metabolitos presentes que proporcionan un suplemento a la actividad antifúngica del extracto y que su obtención es posible gracias a la presente invención. De hecho, las figuras 9 y 10 muestran que aunque la presencia de saponinas en los extractos de las yemas *in vivo* e *in vitro* son equivalentes, existe una diferencia en los metabolitos de naturaleza fenólica a la que se puede atribuir la actividad única anti-botritis de los extractos *in vitro*.

40 El sistema de cultivo *in vitro* posee beneficios adicionales, ya que permite obtener biomasa vegetal productora de extractos anti-botritis durante periodos de tiempo mucho menores que los requeridos en los sistemas de cultivo tradicionales. El procedimiento posibilita disponer de un sistema de producción continua de biomasa de quillay que no depende del medio ambiente, por lo que es muy reproducible en términos de sus propiedades anti-botritis. Asimismo, el procedimiento de cultivo permite reproducir y gestionar mejor las condiciones de la cosecha respecto a 45 la producción de actividad antifúngica.

A pesar de lo anterior y de acuerdo con el alcance de la presente invención, se podría establecer la conclusión de que una combinación de metabolitos bioactivos presentes en el quillay, preferentemente compuestos fenólicos, permite obtener una actividad antifúngica nueva y sobresaliente. Esta destacada actividad antifúngica de las plantas cultivadas *in vitro* puede deberse a la presencia de una serie de metabolitos secundarios (Tabla 1) para los que se ha notificado actividad antifúngica para hongos fitopatogénicos. Dichos analitos se pueden encontrar a 50 concentraciones entre 0,0005 y 2 mg ml⁻¹, preferentemente entre 0,003 y 1 mg ml⁻¹, más preferentemente de acuerdo con los intervalos de concentración que se indican en la tabla 1.

Tabla 1

Metabolito	Intervalo de concentración (mg ml ⁻¹)	Concentración preferida (mg ml ⁻¹)
Ácido shikímico	0,05 - 1,5	0,7985
Ácido clorogénico	0,05 - 0,5	0,2482
Esculetina	0,02 - 0,5	0,135

Ácido cafeico	0,05 - 1,0	0,2901
Rutina	0,002 - 0,03	0,0085
Ácido p-cumárico	0,002 - 0,03	0,0066
Escopoletina	0,05 - 0,8	0,3313
Ácido vinílico	0,05 - 0,5	0,2523
Ácido salicílico	0,05 - 1,5	0,9352
Quercitina	0,002 - 0,03	0,0062
Naringenina	0,002 - 0,03	0,0036

En una realización preferida de la invención, comprende un extracto natural de plantas cultivadas *in vitro* que comprenden una combinación de saponinas y otros metabolitos secundarios, preferentemente entre dichos compuestos fenólicos secundarios se encuentran y preferentemente estos metabolitos secundarios comprenden al menos un metabolito seleccionado del ácido shikímico, ácido clorogénico, esculetina, ácido cafeico, rutina, ácido p-cumárico, escopoletina, ácido vinílico, ácido salicílico, quercitina y naringenina. Después, una realización preferida de la invención comprende un extracto etanólico de plantas cultivadas *in vitro* que comprende las saponinas y todos los compuestos mencionados con anterioridad.

En otra realización, la invención comprende una formulación biocida o producto para uso agrícola, ya que una formulación que puede ser líquida o sólida, lista para usar o para preparar mediante suspensión, dilución, emulsión u otro procedimiento habitual en la técnica. Este producto se puede aplicar mediante aspersión, baño, inmersión, como película u otras realizaciones habituales en la técnica. Este producto se puede aplicar a la planta, sus frutos, su ambiente, la tierra, las semillas, el lugar de almacenamiento o depósitos en los que las plantas y sus frutos se guardan después de recolectarlos.

La presente invención contribuye a la técnica con un extracto con calidades diferentes a las de los extractos obtenidos de la misma especie de plantas que crecen de forma silvestre *in vivo* (Figura 7). De hecho, la presente invención comprende un procedimiento para el cultivo *in vitro* de dichas plantas nativas mediante micropropagación. Lo anterior muestra enormes ventajas ambientales y productivas, ya que la generación del extracto no depende de las fuentes silvestres de las plantas sujetas a variación debido a cambios climáticos, el estado de los nutrientes, la irrigación etc., lo que prevendría la obtención de un extracto con características homogéneas con respecto a sus componentes y actividad, además de someter al recurso natural a una posible depleción y a generar una alternativa biotecnológica y viable para generar un agente agroquímico seguro para el control de *B. cinerea*, ya que muestra calidades mejoradas en relación con ello.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención comprende un procedimiento para obtener extractos con actividad antifúngica de plantas cultivadas *in vitro*. Dicho procedimiento comprende la micropropagación de plantas, el cultivo en condiciones adecuadas para la inducción de metabolitos secundarios de interés, la recolección de yemas y el procesamiento de las mismas para obtener un extracto con las calidades mencionadas anteriormente.

En una realización de micropropagación, las yemas de plantas de aproximadamente un año de edad se desinfectan y transfieren a envases de cultivo con un medio MS (la composición se describe en Murashige & Skoog, 1962) suplementado con bencilaminopurina (0,1 a 0,5 mg/l), kinetina (de 0,1 a 0,5 mg/l), biotina (de 0,01 a 0,5 mg/l) y sacarosa (de 10 a 50 mg/l), con un pH ajustado de 5,7 y se somete a autoclave; después se solidificó con agar 0,8 %. El procedimiento de micropropagación es el habitual; a no obstante, estas modificaciones se han incorporado en relación con un intervalo de temperaturas constante y un fotoperiodo de primavera, por ejemplo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Estas condiciones de cultivo son las que explicarían las diferencias en términos de actividad y el perfil de los metabolitos proporcionado por el extracto *in vivo*.

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un procedimiento para obtener los extractos. La preparación de los extractos se realiza, preferentemente, con yemas jóvenes, preferentemente de no más de 3 meses. En el caso de plantas silvestres se usaron yemas jóvenes para ensayos comparativos. Preferentemente, los extractos se prepararon con algunas modificaciones en relación con la descripción de Inderjit & Dakshini 1995, Ahmad & Beg, 2001. El procedimiento de extracción comprende tratar el material vegetal con volúmenes diferentes de disolvente; específicamente se obtuvo entre 5 y 20 g de tejido fresco y se extrajeron en 100 ml de disolvente (agua o etanol al 85 %) una vez que se han extraído, deberán filtrarse, concentrarse y secarse en un evaporador rotatorio para después almacenar a 4°C en oscuridad. Los extractos se pudieron fraccionar mediante procedimientos cromatográficos preparativos u otros procedimientos conocidos en la técnica con el fin de obtener un extracto enriquecido en metabolitos secundarios bioactivos según la invención.

Los extractos obtenidos según el procedimiento anterior se usaron para generar los productos biocidas de acuerdo con la invención y para los ensayos de actividad antifúngica que se van a realizar. De acuerdo con la invención, los extractos o productos biocidas obtenidos son útiles para tratar o prevenir la infestación por *B. cinerea* en plantas, frutos, sus partes y derivados, la tierra, el lugar de almacenamiento, los dispositivos y medios de transporte; se pueden aplicar mediante aspersión, baño, inmersión, como película u otras realizaciones habituales en la técnica.

Ejemplo 1. Sistema de multiplicación de quillay

a) Multiplicación de las plántulas

5 Se implementó un sistema de cultivo *in vitro* de quillay a partir de yemas de hojas axilares. La optimización de los procedimientos de desinfección para explantes y la formulación del medio de cultivo permitieron un desarrollo adecuado de la etapa de micropropagación de yemas.

10 Los explantes se transplantaron durante 15 días en un sustrato MS al que se añadió lo siguiente: mioinositol (100 mg/l), glicina, tiamina (1 mg/l), PVP (para reducir la formación de compuestos que derivan de la oxidación de fenoles), sacarosa (20 g/l) y agar (7,5 g/l); después, se ajustó el pH hasta un valor de 5,5 usando KOH o HCl 0,1 a 1 N antes de la esterilización en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. El agar se mezcló con el medio de cultivo con el fin de obtener su solidificación y, después, se agitó la suspensión y se calentó hasta una temperatura de aproximadamente 90 °C. Aproximadamente 20 ml del sustrato se transfirieron al interior de frascos de cultivo de 200 ml, se cubrieron con una lámina de aluminio y, después, se esterilizaron en una autoclave a 120 °C durante 20 minutos. La transferencia de cultivos a los envases se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar usando hilos y escalpelos previamente esterilizados en un quemador. Los cultivos se mantuvieron en 15 cámaras de crecimiento con un fotoperiodo de 16/24 horas, una intensidad luminosa de 40 micromoles xm2xsec y a una temperatura de 22-24 °C.

El medio de cultivo fue un medio de cultivo Murashige and Skoog (MS).

Nutriente	mg/litro
NH ₄ NO ₃	1650
H ₃ BO ₃	6,2
CaCL ₂	332,2
CoCL ₂ *6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	37,26
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8
MgSO ₄	180,7
MnSO ₄	16,9
Na ₂ MoO ₄	0,25
KI	0,83
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6
Glicina	2
Mioinositol	100

Nutriente	mg/litro
Ácido nicotínico	0,5
Tiamina*Hcl	0,1
Sacarosa	25000
Agar	8000
PH	5.8

20 Para el cultivo de quillay, el medio de cultivo se suplemento con BAP (0,3 mg/l, bencilamino purina), kinetina (0,3 mg/l) y biotina (0,1 mg/l).

Los cultivos se mantienen en una cámara de cultivo a una temperatura constante de 21 ± 2° en tubos fluorescentes a una intensidad de 65 umol m⁻² s⁻¹ y un fotoperiodo de 16 horas de luz.

25 La metodología usada es eficiente, ya que muestra un índice de multiplicación igual a 5, lo que significa que se obtienen de 1 yema a una media de 5 yemas tras 1 mes de cultivo. Tras un mes de cultivo, se consiguió una producción de las yemas con 6-7 internodos de 7-8 cm de altura con un valor medio de materia seca del 11 % que

se considera adecuado par plantas cultivadas *in vitro*. Para la replicación de las plantas se usaron yemas de 2 a 3 yemas de plantas cultivadas durante un mes.

Ejemplo 2. Obtención de extractos y evaluación de la actividad.

5 Para la obtención de extractos vegetales, se usaron yemas de quillay frescas después de 1 mes de subcultivo *in vitro*, como se describe en el ejemplo 1; para los extractos de plantas en condiciones naturales de crecimiento (condiciones *in vivo*), se usaron hojas nuevas (tejido fresco) de muestras de plantas adultas, obtenidas del Mahuida Parque localizado en el "Precordillera" area, Metropolitan Region, Chile. Los extractos de las yemas *in vitro* se prepararon sumergiendo 5, 10 y 15 g de tejido en 100 ml de disolvente (5, 10 o 15 % p/v), mientras que los extractos de las plantas *in vivo* solo se prepararon a una concentración de 10 % p/v.

10 Los extractos se prepararon mediante técnicas de maceración y de difusión. En la primera, el tejido se trituró en nitrógeno líquido usando un mortero y su mano de cerámica antes de la extracción acuosa o hidroalcohólica (etanol al 85 % v/v) frío durante 15 minutos en condiciones de oscuridad. Para la extracción por difusión, el material vegetal cortado en trozos pequeños se mantuvo en contacto con el disolvente frío (4 °C) durante 24 horas en condiciones de oscuridad. Antes de usar, los extractos se filtraron y se homogeneizaron mediante agitación.

15 *Actividad antifúngica de los extractos de quillay*

El efecto de los extractos sobre el crecimiento radial de micelios usando el procedimiento de dilución en un medio sólido usando agar de extracto de levadura-malta suave como sustrato. Según esto, se añadieron alícuotas de los extractos a concentraciones del 5, 10 y 15 % p/v o el disolvente, como control, en una proporción de 1:10 con el medio de cultivo antes de la gelificación del medio de cultivo. Por tanto, los extractos se evaluaron a las concentraciones finales del 0,5, 1,0 y 1,5 % p/v. La concentración final del disolvente fue idéntica en el control y en los tratamientos. El medio de cultivo con o sin extractos se vertió en placas petri de 9 cm de diámetro. Las placas se introdujeron en una campana de flujo laminar durante 30 minutos para la evaporación del disolvente y se inocularon discos de 0-5 cm de micelios finos de *B. cinerea* tras 72 horas de crecimientos; estos se colocan en el centro de de la placa siguiendo un orden inverso. Los cultivos se incubaron a 22 °C en condiciones de oscuridad. El diámetro del micelio se midió a diario con una regla. La actividad antifúngica se puede observar en las figuras 2 y 3, en las que los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición mediante la fórmula $[(C-T)/C * 100]$, en la que C y T correspondían a la extensión de la hifa (cm) en los cultivos control y tratados, respectivamente.

Ejemplo 3. Efecto de los extractos de quillay sobre la germinación de conidios.

El ensayo se realizó en portaobjetos de microscopio para lo cual se colocaron 5 ml del medio de cultivo agar de extracto de levadura-malta suave como sustrato, suplementado con el extracto etanólico de quillay en yemas *in vitro* a las concentraciones finales de 0,5, 1,0 y 1,5 % p/v y el disolvente como control. Después de la evaporación del disolvente y gelificación del medio de cultivo, en los portaobjetos se inocularon conidios secos con diseminación delicada sobre el medio de cultivo en una pieza de agar tomada del cultivo esporulado tras 10 de días de incubación (22 °C en condiciones de oscuridad). Después de la inoculación, los portaobjetos se introdujeron en cámaras de humedad y se incubaron a 22 °C durante 11 horas. La germinación de los conidios se determinó directamente en los portaobjetos a intervalos de horas observando las muestras con un microscopio óptico. Solo se consideraron germinados los conidios con un tubo germinativo igual o superior al diámetro del conidio (Inyang et al, 1999). Los efectos se muestran en la figura 4, en la que los resultados se expresaron como porcentaje de conidios germinados mediante la fórmula $[(T*(100)/C)]$, en la que C y T correspondían al número de conidios germinados en los cultivos control y tratados, respectivamente.

Ejemplo 4- Actividad antifúngica in vivo en *B. cinerea* de extractos de quillay *in vitro*.

El extracto etanólico (etanol al 85 % v/v) se diluyó 10 veces en agua destilada con el fin de establecer el efecto fungistático del disolvente aparte y se usó a una concentración cercana pero por encima de la DE₅₀ del mismo (de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*). La concentración final del disolvente fue idéntica para el control y para los tratamientos. Como control positivo se usó el fungicida comercial de rigen vegetal BC1000. Para los cálculos se usó el valor medio de 3 experimentos independientes.

Capacidad de B. cinerea para colonizar hojas de tomate (Figura 4).

Hojas de tomate recolectadas (*L. esculentum* Mill.) cv Roma se desinfectaron con 10 % v/v de hipoclorito sódico (10 minutos en agitación), se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se colocaron sobre papel absorbente con el fin de eliminar el exceso de agua y se dispusieron en el centro de placas petri que contiene agar-agar (agar 1 % p/v). Después, sobre la superficie de las horas, con un cepillo se aplicó el extracto etanólico de yemas de quillay *in vitro* (250 µg ml⁻¹) así como etanol al 8,5 % v/v (control negativo del extracto), el fungicida orgánico comercial BC-1000 a la dosis recomendada (control positivo del extracto) o agua destilada (control negativo de BC 1000). Las hojas tratadas después de la evaporación del disolvente se inocularon en el centro con un disco de 0,5 cm de micelio fino de *B. cinerea* de 72 horas de crecimiento.

Las placas se sellaron e incubaron a 22 °C (Cotoras et al., 2004). Después de 5 días de incubación se midió el área de la lesión con una regla. Se realizaron diez repeticiones por tratamiento.

Desarrollo de la infección por B. cinerea en fresas (Figura 5)

5 Las fresas ((*F. chilensis* L.) recolectadas de tamaño uniforme, sin deterioro ni infección se desinfectaron con un 10 % v/v de hipoclorito sódico, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua. Después se realizó una lesión de 0,5 cm en el centro de cada fruta con la ayuda de un escalpelo estéril. Las frutas se rociaron con soluciones de extracto etanólico de yemas de quillay *in vitro* (250 µg ml⁻¹), 8,5 % v/v de etanol (control negativo del extracto), fungicida BC-1000 (control positivo del extracto) o agua
10 destilada (control negativo BC 1000) y se inocularon en la lesión después de la evaporación del disolvente con 30 µl de una suspensión de conidios de 1 x 10⁶ conidios ml⁻¹.

Las frutas inoculadas se incubaron en una cámara de humedad a 22 °C (Bhaskara et al., 1988) y después tras 5 días de incubación, se determinó el porcentaje del área infectada de la fruta. Se realizaron dieciséis repeticiones por tratamiento.

Ejemplo 5. Caracterización de metabolitos secundarios de extracto de quillay

15 El contenido de saponinas en extractos acuosos y etanólicos de yemas *in vitro* y hojas *in vivo* de quillay mostró diferencias. En ambos tipos de extractos, la concentración relativa de saponinas en extractos etanólicos fue superior a la detectada en los extractos acuosos. De acuerdo con esto y los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad fungitóxicas *in vitro*, lo que indica una mayor actividad antifúngica para los extractos etanólicos, la
20 concentración de saponinas y el efecto fungitóxico de los extractos de quillay se correlacionaron positivamente, lo que sugiere que la actividad antifúngica en *B. cinerea* – incluyendo las obtenidas en yemas cultivadas *in vitro*, se explicaría al menos parcialmente por el contenido de saponinas (Figura 6).

De acuerdo con lo anterior, se evaluaron los componentes adicionales presentes en el extracto y se encontró un número abundante de compuestos, que se identificaron mediante HPLC y se muestran en la figura 8.

25 De acuerdo con la invención, la mayor actividad antifúngica de los extractos divulgados en el presente documento se debe a la distribución y la presencia de los metabolitos identificados en la tabla 1 de la figura 8, lo que respaldó las pruebas proporcionadas en la figura 9.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener extractos de quillay con actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, que comprende la generación de plantas mediante micropropagación de yemas axilares de árboles adultos y extracción de yemas jóvenes de no más de 3 meses con un disolvente.
- 5 2. Un extracto de quillay, en donde se le enriquece con metabolitos secundarios bioactivos y se obtiene de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1.
3. Un extracto de quillay de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende saponinas y otros metabolitos secundarios seleccionados de entre compuestos de fenolito.
- 10 4. Un extracto de quillay de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los compuestos de fenolito comprenden ácido shikímico, ácido clorogénico, esculetina, ácido cafeico, rutina, ácido p-cumárico, escopoletina, ácido vinílico, ácido salicílico, quercetina y naringenina.
5. El uso de un extracto de quillay de acuerdo con las reivindicación 2 a 4 para tratar y prevenir la infestación con *B. cinerea* antes y después de la recolección.

15

Figura 1

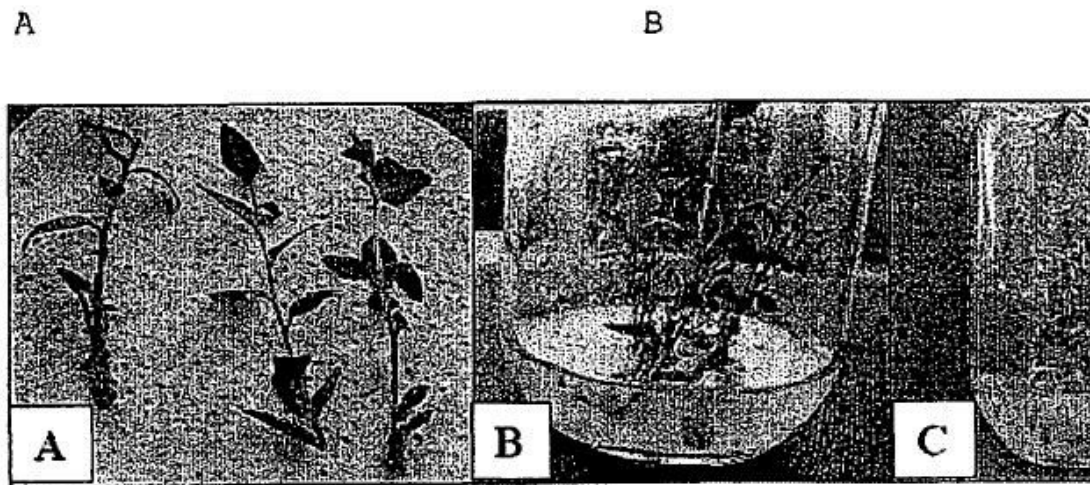


Figura 2

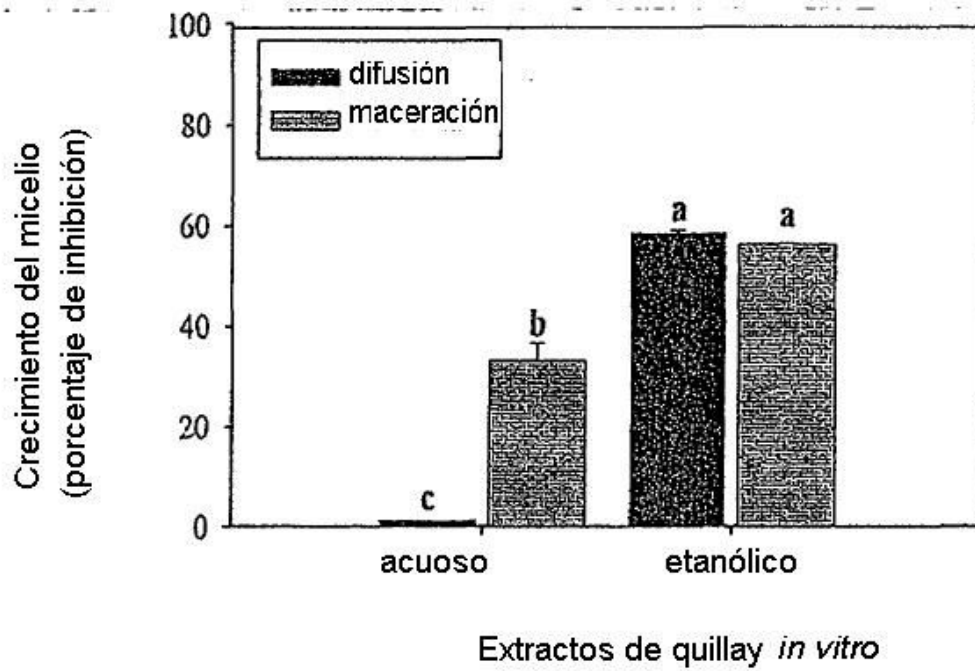


Figura 3

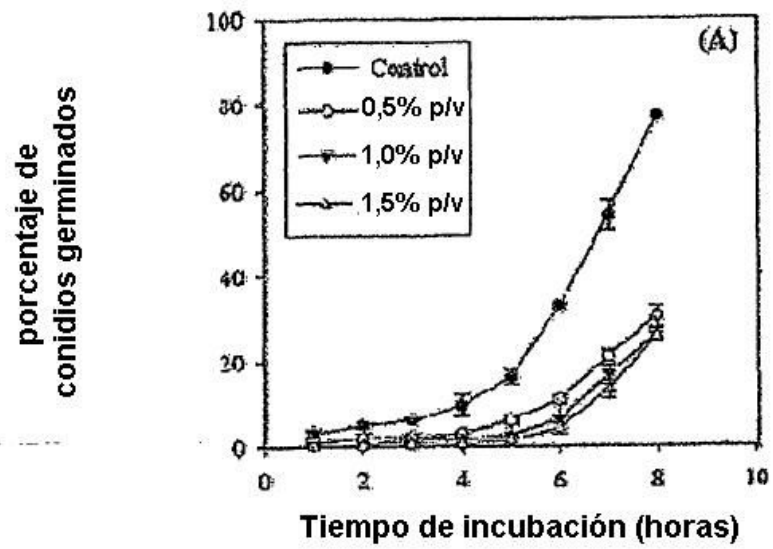


Figura 4

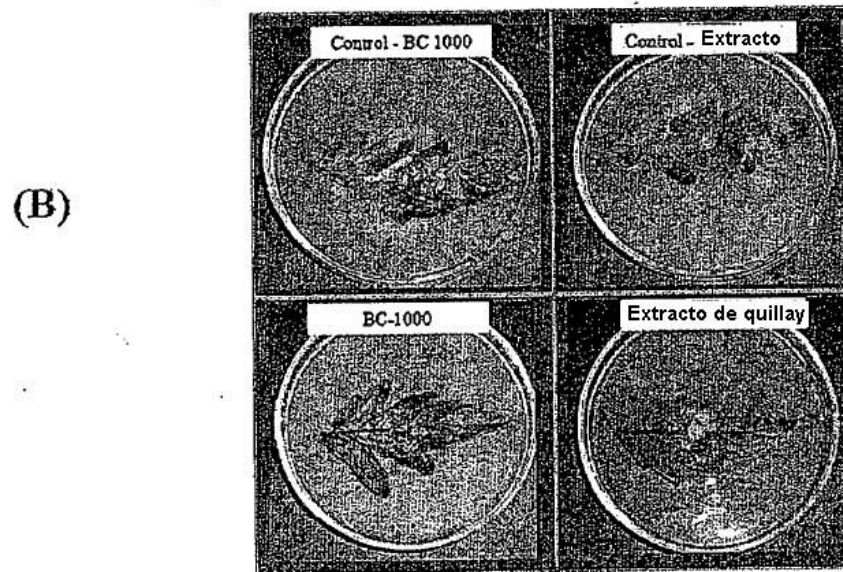
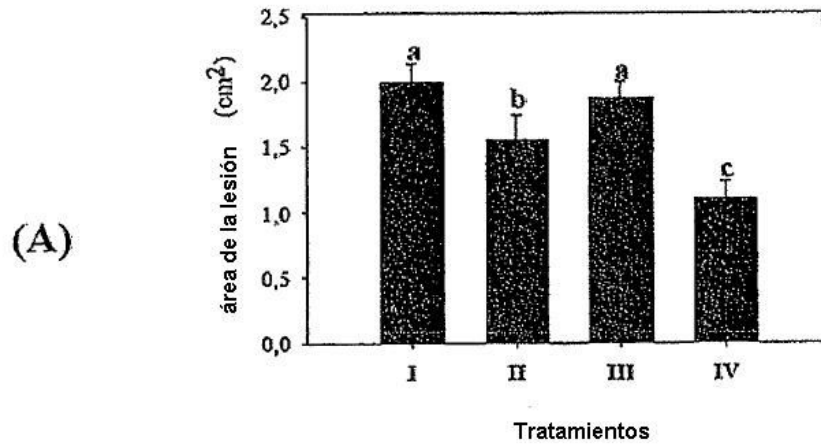
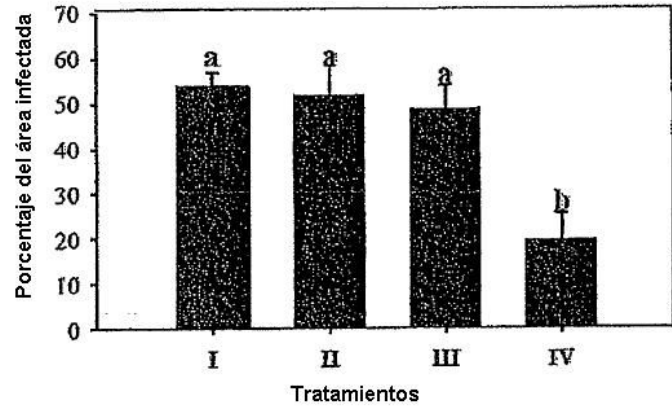


Figura 5

(A)



(B)

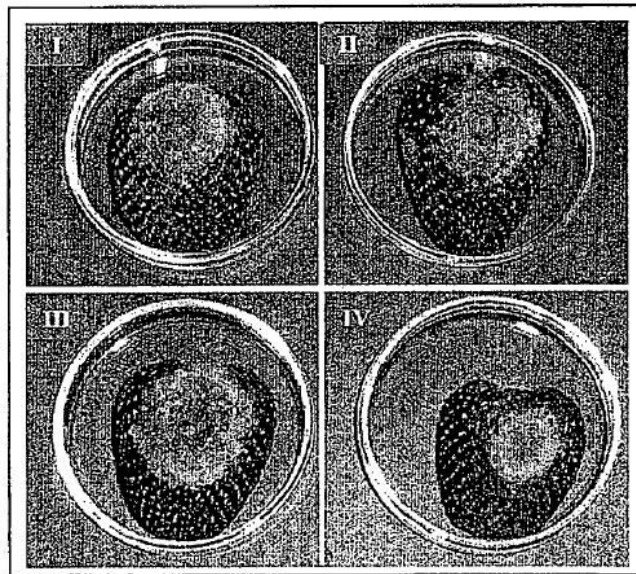


Figura 6

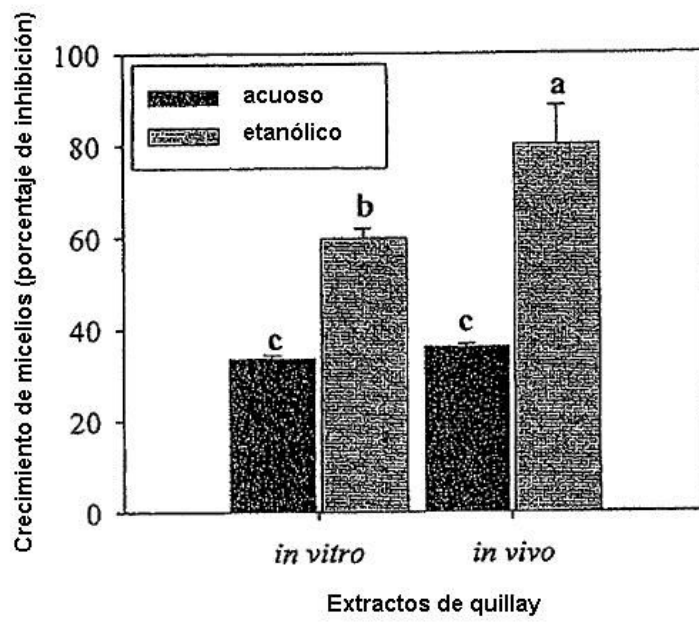


Figura 7

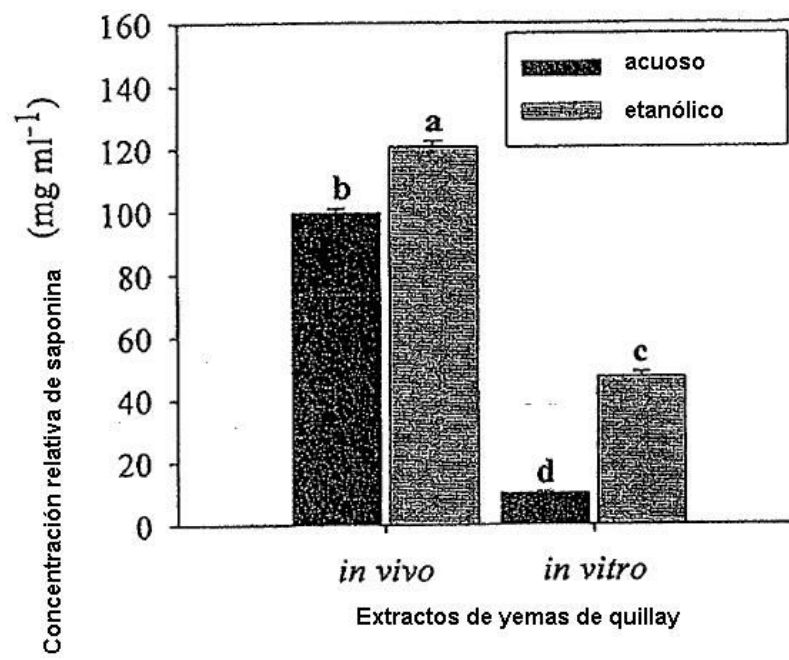
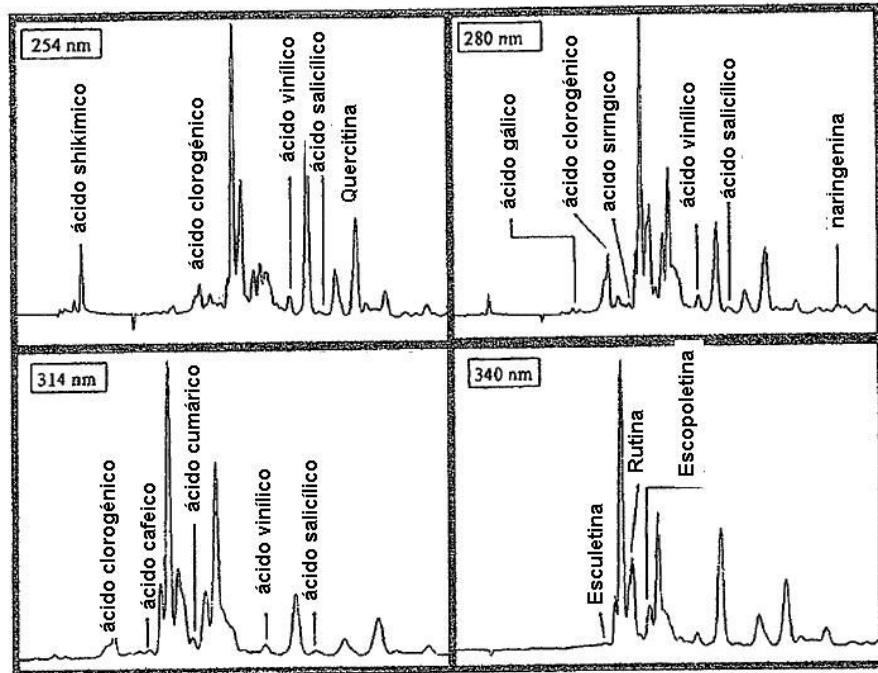


Figura 8



Compuesto	Tiempo de retención (min)	Área (mAu*s)	Concentración (mg ml ⁻¹)
Ácido shikímico	1,926	136,31	0,7985
Acido clorogénico	4,745	363,21	0,2482
Esculetina	5,235	104,75	0,1350
Ácido cafeico	5,240	175,75	0,2901
Rutina	5,713	915,83	0,0085
Acido p-cumárico	5,845	261,87	0,0066
Escopoletina	6,022	354,49	0,3313
Ácido vinílico	6,855	142,58	0,2523
Ácido salicílico	7,536	200,22	0,9352
Quercitina	8,403	479,01	0,0062
Naringenina	10,076	106,67	0,0036
Total			3,0155

Figura 9

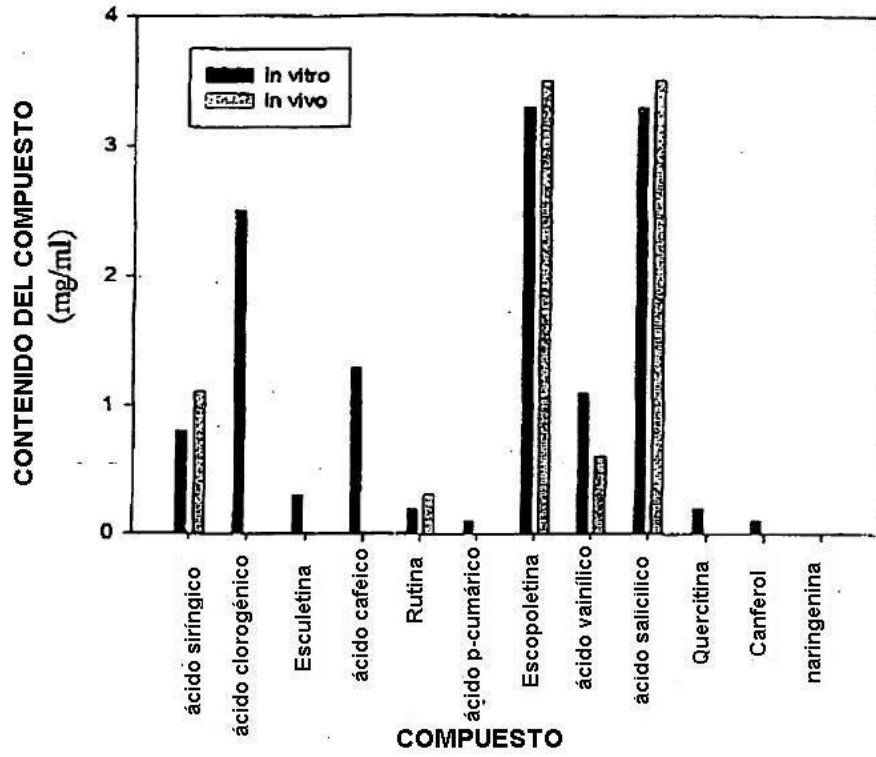


Figura 10

