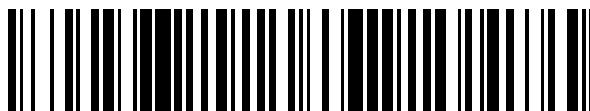


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 338**

51 Int. Cl.:

A01N 65/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2008 E 08169837 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2189062**

54 Título: **Extractos vegetales para su uso como fitoquímicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2013

73 Titular/es:

**INDENA S.P.A. (100.0%)
VIA ORTLES, 12
20139 MILANO, IT**

72 Inventor/es:

MAIREL, FRANCOIS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 431 338 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

Extractos vegetales para su uso como fitoquímicos

La presente invención se refiere al uso de extractos de semillas de uva (*Vitis vinifera*) como agentes para el tratamiento y la prevención de enfermedades de plantas causadas por agentes patógenos, particularmente por hongos y oomicetos.

Antecedentes de la invención

Se conocen varias enfermedades de plantas causadas por agentes patógenos tales como hongos, mohos, oomicetos, bacterias y virus. Muchas de ellas, habitualmente relacionadas con condiciones climáticas que favorecen su aparición y difusión, tienen consecuencias dramáticas, provocando pérdidas de rendimientos de cultivos que pueden tener un impacto profundo y algunas veces catastrófico sobre la economía agrícola, especialmente cuando la enfermedad asume el estado de epidemia.

Un ejemplo históricamente notable de una enfermedad de planta que provoca consecuencias devastadoras es la infección de patata (tizón tardío) por *Phytophthora infestans* responsable de la gran hambruna irlandesa a finales de la década de 1840.

Otro oomiceto, *Plasmopara viticola*, es responsable del denominado mildiú veloso, una de las infecciones más ampliamente extendidas que afecta y provoca daños enormes a los productores de vino y cultivadores de uva, influyendo negativamente sobre el rendimiento así como también sobre la calidad de la producción.

Una enfermedad de la vid similar, denominada mildiú pulverulento, está causada por el hongo *Erysiphe necator*, también conocido como *Uncinula necator*.

Infecciones similares afectan otras plantas tales como soja, girasol, lechuga, tomate, patata, robles, plantas ornamentales, plantas frutales, tabaco y cucurbitáceas.

Una revisión exhaustiva acerca de enfermedades de plantas se informa en el European Handbook of Plant Diseases, ed. por I. M. Smith y col., 1988, Blackwell Scientific Publications.

Se han propuesto y están disponibles varios agentes naturales y sintéticos para tratar las enfermedades de plantas mencionadas anteriormente.

Además de las sales o complejos de azufre y cobre, los fungicidas sintéticos para uso agroquímico pertenecen a clases químicas muy amplias y diferentes (fenilamidas, derivados de bencimidazol, dicarboximidas, carbamatos, carbanilatos, ditiocarbamatos, dinitroanilinas, etc.). El uso de dichos agentes sintéticos está limitado por el fenómeno bien conocido de resistencia así como también por los efectos tóxicos que pueden inducir dichos agentes en seres humanos y animales y por su potencial de contaminación ambiental.

Por lo tanto, se están realizando esfuerzos de investigación para desarrollar fungicidas más respetuosos del medio ambiente, posiblemente de origen natural, que puedan sustituir posiblemente los fungicidas sintéticos conocidos o que al menos puedan usarse en combinación con los mismos con el fin de reducir el fenómeno de resistencia y/o su impacto ambiental.

Varios aceites tales como aceite esencial de canela, aceite de romero y aceite de neem se conocen como fungicidas eficaces.

El documento US 6.174.920 divulga adicionalmente el uso de cera de jojoba para controlar infecciones por mildiú pulverulento.

El extracto de jojoba también se ha informado como un tratamiento previo para evitar la infección por mildiú pulverulento en plantas de uva en el documento CA 2.103.014 mientras que el documento US 2007/0071831 divulga un producto para la prevención y/o el tratamiento de infecciones obtenido mediante la neutralización parcial o total de los posos derivados de los procedimientos de elaboración de vino.

El documento WO 2006/006878 divulga una composición fungicida que comprende grasa de leche anhidra opcionalmente en combinación con uno o más de aceite de soja, aceite de oliva y aceite de coco.

Descripción de la invención

Ahora se ha observado que los extractos de semillas de *Vitis vinifera* u orujos que contienen semillas son eficaces en el control de agentes patógenos de plantas, particularmente de hongos y oomicetos.

La invención, por consiguiente, proporciona el uso de composiciones fitofarmacéuticas que comprenden un extracto de semillas de *Vitis vinifera* u orujos que contienen semillas como el ingrediente activo, en el tratamiento y/o prevención de infecciones por organismos patógenos de plantas.

La invención tiene un interés muy profundo en la economía a nivel mundial debido al nuevo aprovechamiento dado por la reutilización de desechos de bodegas antes de aprovechamientos existentes adicionales como recuperación de aceite, destilación, producción de calor mediante la combustión de biomasa o de compostaje que siempre son posibles después de la extracción.

- 5 Las composiciones son útiles para el tratamiento y/o prevención de infecciones por organismos patógenos de plantas incluyendo la vid y otras plantas de cultivo susceptibles de infectarse por dichos patógenos.

La invención también se refiere a un procedimiento para prevenir o tratar infecciones de plantas por hongos u oomicetos que comprende la aplicación de una cantidad eficaz de semillas de *Vitis vinifera* u orujos que contienen extractos de semillas en la planta a tratar.

- 10 Ensayos experimentales indicados más adelante han demostrado una actividad extraordinaria de los extractos de semilla de *Vitis vinifera* frente a dos de los patógenos más comunes de la vid, específicamente *Plasmopara viticola* y *Erysiphe necator*. Sin embargo, se ha de comprender que la invención no está limitada al tratamiento de infecciones de vid por estos dos patógenos únicamente, sino que más bien es aplicable a una diversidad de hongos y oomicetos diferentes que afectan a otras plantas de interés.

- 15 La siguiente es una lista de patógenos ejemplares que afectan plantas de interés.

1 - Oidio

Erysiphe necator = *Uncinula necator* (Uva)
Erysiphe graminis (Cereales)
Podosphaera leucotricha (cultivos de árboles, árboles Frutales)
Sphaerotheca pannosa (Plantas de rosa)

20

2 - Mildiús

Plasmopara viticola (Uva)
Plasmopara helianthi (Girasol)
Phytophthora infestans (Patata)
Phytophthora parasitica (Tomate)

25

3 - Sarna de árboles frutales

Venturia inaequalis (manzano)
Venturia pirina (peral)

4 - Enrollamiento de la hoja del durazno

- 30 *Taphrina deformans*

5 - Septoriosis

Septoria nodorum y *Septoria tritici* (Cereales)
Septoria sp. (Colza)

6 - Royas

- 35 *Puccinia graminis*, *Puccinia recondita* y *Puccinia striiformis* (Cereales)

7 – Enfermedad del tizón

Ustilago tritici (Trigo)
Ustilago maydis (Maíz)
Ustilago hordei (Cebada)

- 40 **8 - Añublo**

Tilletia tritici, *Tilletia caries* y *Tilletia foetida* (Cereales)

9 – Podredumbre del cuello

Phoma lingam (Crucíferas, Colza)
Rhizoctonia solani (Patata)
Sclerotinia sclerotiorum (Tomate)

45

10 - Antracnosis

Colletotrichum gloeosporioides (Guisante)
Colletotrichum lindemuthianum (Frijol)

11 - Moho gris

5 *Botrytis cinerea* (Uva)

Es particularmente interesante el efecto de los extractos de la invención frente a los patógenos enumerados en 1, 2, 3, 4, 9, 10 y 11.

10 Un ejemplo de otro agente patógeno que puede controlarse de forma eficaz mediante el extracto de *Vitis vinifera* es, por ejemplo, *Phytophthora infestans*, que infecta diversos miembros de las Solanáceas, tales como patata, tomate y algunas ornamentales.

Los extractos de semillas de *Vitis vinifera* u orujos que contienen semillas de acuerdo con la invención se pueden preparar extrayendo y purificando las semillas frescas o secas u orujos que contienen semillas con diferentes disolventes tales como agua, acetona, acetato de etilo, etanol, butanol o mezclas de los mismos, bajo diferentes parámetros de extracción y tecnologías.

15 Se conocen muchos extractos y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, un extracto de semilla de uva obtenido mediante extracción con una mezcla de agua-etanol se divulga en los documentos WO 2007/017037, WO 2005/036988, EP 0 348 781.

20 El uso de disolventes tales como agua y etanol es, por supuesto, preferible en vista del bajo coste y la baja toxicidad de estos disolventes. También se ha observado que un extracto particularmente adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención se puede obtener mediante un procedimiento que comprende:

- extracción de semillas de uva con agua caliente;
- eliminación de la fracción insoluble en agua;
- purificación en columna de resina de adsorción;
- concentración;
- 25 - secado por pulverización.

El extracto que se puede obtener mediante dicho procedimiento tiene un contenido de catequina y epicatequina desde el 5 hasta el 30% (HPLC), un contenido total de polifenoles que varía desde el 90 hasta el 110% (procedimiento espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu). Dicho extracto es nuevo y es un objeto adicional de la invención.

30 Los extractos de semillas de *Vitis vinifera* se pueden usar como tales, disueltos de forma adecuada o suspendidos en un vehículo adecuado para aplicación en la planta o los mismos se pueden formular en combinación con excipientes adecuados o con otros ingredientes activos, por ejemplo, fungicidas conocidos, compuestos de cobre, aceites y similares.

35 La cantidad de extracto de semilla de *V. vinifera* en la composición puede variar desde 5 hasta 25 g/litro pero este intervalo se puede ajustar dependiendo de dicha composición, el patógeno a tratar, la planta a proteger y la tecnología de tratamiento.

40 La composición se puede administrar a la planta mediante cualquier técnica adecuada, por ejemplo mediante pulverización con dispositivos convencionales y el tratamiento se puede llevar a cabo semanalmente o de acuerdo con una secuencia temporal que la puede decidir el agricultor dependiendo de factores diversos tales como condiciones climáticas, alcance de la infección, virulencia del organismo infeccioso, uso de otros fitoquímicos y similares.

45 Como un ejemplo, en el caso de estar afectada por mildiú veloso, el extracto de semilla de *Vitis vinifera* se pulverizará típicamente sobre y por debajo de las hojas en una cantidad que varía desde 0,1 hasta 10 gramos por planta y por tratamiento, cada una a tres semanas, desde el inicio de la primavera hasta el final del verano, incluso hasta el periodo de cosecha. La cantidad exacta, por supuesto, dependerá de la densidad de planta que es muy variable dependiendo del área geográfica y de la variedad de vino: por ejemplo aproximadamente 3000 plantas/ha en Toscana, aproximadamente 7500 plantas/ha en Champagne o aproximadamente 10000 plantas/ha en Borgoña. Además, el volumen de solución "lista para usar" total pulverizada sobre las plantas podría variar dependiendo del producto y de la tecnología: de 300 a 750 litros/ha, equivalente a 5 g/l x 300 l/ha/10000 plantas/ha = 0,15 g/planta

50 hasta un máximo de 25 g/l x 750 l/ha equivalente a 3000 plantas/ha = 6,25 g/planta.

La invención se ilustra con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 – Preparación de un extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera*: VITIVAC

1000 g de semillas de uva secas se cubren con agua caliente a 75° C. Durante 4 horas en un percolador estático con camisa o en un reactor con camisa provisto de agitador.

5 Después la biomasa se percola con agua caliente a 75° C, el percolado recuperado se descarga en continuo hasta un volumen total de 7,5 litros. El flujo de percolación es idealmente aproximadamente 1 litro por hora.

Los percolados recuperados totales se enfrían a 20° C y se filtran para eliminar partículas finas con un filtro de 50 micrómetros.

10 La solución de agua después se carga en continuo por la parte superior de una columna de cromatografía que contiene 1 litro de Rhom y resina Haas AMBERLITE® XAD 7HP o equivalente regenerada previamente y llena de agua. La conductividad del agua que sale por la parte inferior de la columna se sigue.

Al final de la etapa de fijación, la resina se enjuaga de forma ideal con 4 litros de agua y después se eluye en continuo de forma ideal con 4 litros de etanol al 70% v/v y de forma consecutiva se enjuaga nuevamente con 4 litros de agua. Se observa la conductividad del agua que sale por la parte inferior de la columna.

La solución etanólica resultante se recoge, se concentra en vacío y se lava con agua para eliminar el etanol.

15 La solución después se concentra en vacío y se seca por pulverización a temperatura por debajo de 85° C.

El polvo obtenido se mezcla, se controla y se envasa en bolsas herméticas y opacas.

El rendimiento convencional es 93 g correspondiente a un rendimiento en el material de partida del 9,30% p/p. Pero este rendimiento podría variar en función de la biomasa usada.

20 Este producto tiene un contenido HPLC de catequina (catequina + epicatequina) del 8,5% y un contenido de polifenoles totales del 98%.

Ejemplo 2 – Actividad fungicida del extracto de semillas de *Vitis vinifera*: VITIVAC**Plantas**

25 Se usaron plantas de *Vitis vinifera* cv. Chardonnay para estudiar el efecto de fungicidas sobre el mildiú vellosa. Las plantas se cultivaron a partir de las semillas (una planta por 0,1-1 maceta) y se colocaron en una cámara de crecimiento (23° C día/19° C noche, 100-120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16 h de luz por día). Las plántulas se fertilizaron dos veces a la semana con 0,1 litro de un fertilizante de 0,2 g/l de N-P-K (20-20-20). Las plántulas de ocho semanas de edad con al menos cuatro hojas completamente desarrolladas se usaron para estudiar la actividad biológica de VITIVAC.

Patógeno

30 Un aislado de *Plasmopara viticola* Pvl, obtenido en 2007 a partir de plantas infectadas en un viñedo localizado en la región de Champagne, Francia, se mantuvo en hojas de superficie desinfectada desprendidas de "Chardonnay". Las hojas se colocaron en placas de Petri y se pusieron en una cámara de crecimiento (23° C día/19° C noche, 100-120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16 h de luz por día). El inóculo se obtuvo a partir de hojas de esporulación reciente 8-12 días después de la inoculación. Los esporangios se suspendieron en agua destilada a 4° C y se ajustaron con la ayuda de un hemocitómetro hasta una concentración de 5×10^5 esporangios. ml^{-1} de agua.

35 Tratamientos fungicidas

El producto natural, preparado como se ha descrito en el ejemplo 1 (VITIVAC), se usó a una tasa de 25 g/l durante todo el experimento. La eficacia de VITIVAC se comparó con la de la mezcla fungicida de referencia de Fosetyl-Al (500 g/kg) + Folpel (250 g/kg) usada a un índice de 4,0 kg de producto formulado/ha (Mikal Flash WG, Bayer CropScience).

40 Las hojas de superficie desinfectada de "Chardonnay" se colocaron, con el lado del envés hacia arriba, en placas de Petri de plástico de 14 cm de diámetro que contenía cada una un papel de filtro, humedecido con 8 ml de agua. Las hojas se pulverizaron usando un pulverizador de laboratorio (Euro-Pulvé) provisto de una boquilla cónica (Teejet XR 110015 VS) con una presión de aire de 2 bar. Las preparaciones fungicidas se aplicaron en un volumen de 400 y 720 l. ha^{-1} para Mikal Flash y VITIVAC, respectivamente. Cada ensayo se repitió 3 veces. Los datos se analizaron estadísticamente usando el ensayo de Newman-Keuls (XLS-Stat, Addinsoft).

45 Hojas tratadas se colocaron bajo flujo laminar durante 30 min con el fin de secar el fungicida aplicado en la cara del envés de las hojas. Después del secado, las placas de Petri que contenían hojas tratadas o no tratadas (control) se mantuvieron en una cámara de crecimiento (23° C día/19° C noche, 100-120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16 h de luz por día) durante 24 horas.

Inoculación con *Plasmopara viticola*

- 5 Diez discos de hoja (cada uno de 10 mm de diámetro) se cortaron con un sacabocados a partir de cada hoja tratada o no tratada (control) y se colocaron, con el lado del envés hacia arriba, en placas de Petri de plástico de 9 cm de diámetro que contienen papel de filtro, humedecido con 4 ml de agua destilada estéril. Los discos se inocularon colocando una gota (20 µl) de inóculo (5×10^5 esporangios.ml⁻¹). Después de la inoculación, las placas de Petri que contienen 10 discos de hoja se incubaron a 19° C durante 24 h en oscuridad y se mantuvieron posteriormente en una cámara de crecimiento (23° C día/19° C noche, 100-120 µE.m⁻².s⁻¹, 16 h de luz por día) para desarrollo de enfermedad. Al final del experimento, las placas de Petri se mantuvieron a 19° C durante 24 h en oscuridad, para inducir la esporulación.
- 10 Diez días después de la inoculación, se determinó el número de discos de hoja que muestran desarrollo de mildiú veloso para cada modalidad ensayada (frecuencia de infección). Después, las lesiones de mildiú veloso acompañadas por esporangios blanquecinos se calificaron de acuerdo con una escala de 0-4, como se ha descrito previamente por Reuveni (Relationship between leaf age, peroxidase and b 1-3 glucanase activity and resistance to downy mildew en s, 1998. Journal of Phytopathology 146, 525-530): 0, sin lesiones; 1, 1-10% del área del disco de hoja infectado y en esporulación; 2, 11-25%; 3, 26-50%; y 4, >50% (intensidad de la infección). Se estimó el número de esporangios producidos en los discos de hoja. Los esporangios se lavaron a partir de 10 discos de hoja en un volumen conocido de agua destilada estéril que contenía Tween 80 al 0,01% y se contaron con la ayuda de un hemocitómetro (seis recuentos por 10 discos de hoja). Se calculó el número de esporangios producidos por centímetro cuadrado de área de disco de hoja (intensidad de la esporulación). El experimento se condujo una vez,
- 15
- 20 con tres placas de Petri para cada tratamiento.

***Plasmopara viticola* (1)**

Observación 10 días después de inoculación

Términos del tratamiento	Frecuencia de infección ^a (% de efectividad de Tc)	Intensidad de infección ^b (% de efectividad de Tc)	Intensidad de esporulación (esporocistos/cm ²) (% de efectividad de Tc)
Solución de Referencia	1 +/- 0	2,6 +/- 0	3,22.10 ⁵ +/- 0,60.10 ⁵
ITV1	0,5 +/- 0,1 (50%)	1,1 +/- 0,2 (58%)	0,75.10 ⁵ +/- 0,30.10 ⁵ (77%)
ITV2	0,5 +/- 0 (50%)	0,65 +/- 0,05 (75%)	1,21.10 ⁵ +/- 0,03.10 ⁵ (62%)
Extracto de acuerdo con el documento US 2007/0071831	0,7 +/- 0 (30%)	1,4 +/- 0,1 (46%)	1,84.10 ⁵ +/- 0,33.10 ⁵ (43%)
Lieboost	0,7 +/- 0,1 (30%)	1,25 +/- 0,15 (52%)	1,07.10 ⁵ +/- 0,14.10 ⁵ (67%)
VITIVAC	0 +/- 0 (100%)	0 +/- 0 (100%)	0 +/- 0 (100%)
Mikal	0 +/- 0 (100%)	0 +/- 0 (100%)	0 +/- 0 (100%)

^aFrecuencia de infección: número de discos inoculados contaminados/número total de discos (10).

25 ^bIntensidad de infección: escala arbitraria (de 0 a 4) ilustrativa de intensidad de infección de cada disco de hoja.

Los resultados se indican en la siguiente Tabla.

30 Resultados favorables similares se obtuvieron tratando las hojas infectadas por *Erysiphe necator*. El procedimiento fue sustancialmente el mismo, con la excepción de que la infección por *Erysiphe necator* se indujo mediante agitación de hojas contaminadas sobre placas de Petri. En este caso, el tratamiento de la invención demostró ser particularmente eficaz para reducir la intensidad de esporulación, definida como el número de conidias (*P. viticola*) por unidad de superficie (cm²).

REIVINDICACIONES

1. Uso de composiciones fitofarmacéuticas que comprenden un extracto de semillas de *Vitis vinifera* u orujos que contienen semillas como el ingrediente activo, en el tratamiento y/o prevención de infecciones por organismos patógenos de plantas.
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el extracto es agua/etanol o un extracto acuoso.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, comprendiendo además otros ingredientes activos que tienen actividad fungicida.
4. Un procedimiento para prevenir o tratar infecciones de plantas por hongos u oomicetos que comprende la aplicación de una cantidad eficaz de extracto de semillas de *Vitis vinifera* sobre la planta a tratar.
- 10 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la planta es *Vitis vinifera*.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el patógeno es *Plasmopara viticola*.