

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 510 841**

21 Número de solicitud: 201300355

51 Int. Cl.:

A01N 65/42 (2009.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

17.04.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.10.2014

Fecha de la concesión:

04.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

11.03.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**PINTOS LÓPEZ, Beatriz;
GÓMEZ GARAY, Aránzazu;
ESTEBAN CARRASCO, Alberto;
MARTÍN CALVARRO, Luisa y
PÉREZ-URRIA CARRIL, Elena**

74 Agente/Representante:

PLUMET ORTEGA, Joaquín

54 Título: **Utilización de extracto fenólico de residuo de Aloe vera en el control de hongos fitopatógenos**

57 Resumen:

Utilización de extracto fenólico de residuo de Aloe vera en el control de hongos fitopatógenos. La presente invención se refiere a un método para obtener un extracto fenólico a partir del residuo agro-industrial que se obtiene de la corteza de la hoja (estructura externa de la hoja) de Aloe vera y comprende una mezcla de compuestos en donde predominan compuestos de naturaleza fenólica. También se refiere al extracto fenólico y a su uso como producto fitosanitario para la prevención contra enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. La invención es de gran interés en el sector agrario ya que se refiere a una nueva aplicación del Aloe vera como producto de origen natural para el control biológico de las infecciones de hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas económicamente importantes.

ES 2 510 841 B2

DESCRIPCIÓN

Utilización de extracto fenólico de residuo de *Aloe vera* en el control de hongos fitopatógenos.

5

Sector de la Técnica

La presente invención se encuadra dentro del sector agrario en el campo del control de infección por hongos en plantas y, especialmente se refiere a una nueva aplicación del *Aloe vera* como producto de origen natural para el control biológico de hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas. Está relacionada con los sectores de la Fitopatología y la Industria agroalimentaria; Fungicidas de amplio espectro; Fungicidas selectivos; Patógenos de plantas.

15 **Estado de la técnica**

Los cultivos vegetales son atacados por una amplia variedad de hongos que les producen enfermedades y podredumbres y que son la causa de pérdidas considerables de calidad y rendimiento de estos cultivos. En la naturaleza existen aproximadamente 100.000 especies de hongos, de las cuales casi 8.000 son fitopatógenas y causan unas 80.000 enfermedades. Sus efectos destructivos en los cultivos se deben a que estos hongos tienen un crecimiento muy rápido, una reproducción explosiva, fácil dispersión y alta tasa de supervivencia a través de sus estructuras de resistencia. El daño que ocasionan estos hongos fitopatógenos no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos. Hoy en día, las pérdidas económicas debidas al ataque de estos hongos superan los US\$ 200.000 millones anuales, y se invierten anualmente cerca de US\$ 6.000 millones en protección de cultivos contra enfermedades fúngicas.

En la agricultura comercial contemporánea, el combate de plagas y enfermedades sigue siendo una cuestión muy importante; esta actividad llega a representar hasta un 20 por ciento o más del costo de producción, dependiendo de la severidad del daño. Las pérdidas de productos agrícolas relacionadas con el ataque de plagas y enfermedades durante las etapas de pre y post-cosecha pueden llegar hasta un 50 por ciento.

Uno de los métodos más utilizados para contribuir al aumento de la calidad del producto y contrarrestar las pérdidas en cultivos agrícolas por organismos o plagas causantes de enfermedades es el uso de pesticidas o plaguicidas químicos, debido en gran parte al fuerte apoyo que ha recibido la investigación y desarrollo de la industria agroquímica. Sin embargo, el uso excesivo de estas sustancias químicas tiene muchas limitaciones y es por tanto susceptible de mejora. Entre dichas limitaciones destacan la aparición de resistencias en los hongos fitopatógenos, efectos negativos sobre el ecosistema ya que afectan también a los enemigos naturales de los organismos nocivos causándoles la muerte o reduciendo las poblaciones de especies que les sirven de alimento, no discriminan entre la especie patógena que se desea eliminar u otra beneficiosa, persistencia ambiental de residuos químicos tóxicos, contaminación de alimentos, suelos y recursos hídricos y efectos perniciosos sobre la salud humana.

Todos estos factores junto con el hecho de que en la regulación venidera de la Unión Europea se espera que se prohíban algunas de estas sustancias químicas, hacen que actualmente se imponga la tendencia en el área agroindustrial de disminuir la presencia de residuos de pesticidas o plaguicidas químicos en los productos agrícolas e implantar y desarrollar tecnologías y estrategias de producción de nuevos agentes antifúngicos (fungicidas naturales) que respeten el medio ambiente y sean efectivos para el control biológico de los organismos fitopatógenos que ocasionan plagas y enfermedades en los vegetales.

El control biológico se ha convertido hoy en día en uno de los componentes principales de la protección de cultivos en todo el mundo. Estos antifúngicos naturales utilizados en el control biológico son de naturaleza muy variada, desde sustancias biológicamente activas de origen marino, exudados de raíz y, los más comunes, productos procedentes de la totalidad de la planta o de partes de una planta fresca o seca como son los extractos vegetales, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes y que están siendo muy utilizados en agroecología para combatir organismos fitopatógenos sin recurrir a sustancias químicas y sin contaminar los suelos y aguas. Actualmente, se han aislado alrededor de 12.000 compuestos de origen vegetal con algún tipo de actividad biológica, de los cuales un porcentaje importante posee actividad frente a determinados microorganismos. Entre estos productos procedentes de plantas nos encontramos compuestos fenólicos sencillos (hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos), aceites esenciales, alcoholes, terpenoides, aldehídos, heterósidos, quinonas, taninos, cumarinas, isoflavonoides, saponinas, cromenos, benzofuranos, flavonas y alcaloides.

Por otra parte, entre las distintas especies vegetales cuyo uso más se ha extendido en los últimos años con distintas finalidades está el Aloe. El Aloe es una planta perenne, xerófita, de la familia de las Aloeáceas, con hojas largas, duras y carnosas, dispuestas en rosetones o alternadamente, con forma de lanza y una espina en el vértice y varias en los bordes. Las hojas están compuestas de tres capas: una protección coriácea exterior, debajo de ésta una capa fibrosa donde se concentra la aloína, consistente en una mezcla de principios activos que incluye uno o más alcaloides y cuyo gusto amargo sirve a la planta como protección contra los predadores, y un corazón gelatinoso donde almacena sus reservas de agua y que contiene una gran cantidad de polisacáridos entre los que se encuentran los acemananos y con el que se preparan gran cantidad de productos farmacéuticos.

Existen más de 400 especies de Aloe distribuidas en Asia, África, América y Europa, pero solo unas pocas contienen principios con propiedades curativas. La variedad más utilizada es el *Aloe vera* L. (también denominada por Miller como *Aloe barbadensis* Mill.) debido a sus amplias cualidades curativas de amplio espectro, las cuales varían en función de sus componentes: enzimas, monosacáridos, polisacáridos, antraquinonas, aminoácidos, minerales y vitaminas (Capasso y col., 1998). Aunque la composición principal del Aloe es agua y representa un 99–99.5% del total de la planta, el resto, entre el 0.5–1%, consiste en una elevada concentración de azúcares (hasta un 60% de la materia seca), vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, C), proteínas y aminoácidos (valina, metionina, fenilalanina, lisina y leucina), ácidos orgánicos, compuestos de naturaleza fenólica, minerales (yodo, cobre, hierro, cinc, fósforo, sodio, potasio, manganeso, azufre, magnesio, calcio y germanio), entre los que se encuentran más de 150 componentes distintos que teóricamente podrían tener una actividad potencial, de los cuales, 75 son compuestos biológicamente activos. Muchos de sus principios activos han sido identificados (Byeon y col., 1998; Yagi y col., 1999) y se han utilizado contra enfermedades como la diabetes, heridas debidas a quemaduras o cortes, e incluso como paliativo de los efectos de la radiación UV.

20

Las actividades más destacables atribuidas a *Aloe vera* son, entre otras: regenerador celular, actividad antifúngica, antiviral y antimicrobiana, antioxidante, etc... En todos los casos estos efectos son producidos por extractos vegetales procedentes tanto del exudado de la hoja, rico en aloeresinas, aloesinas, aloínas, emodina y antraquinonas, como de la pulpa o gel que es una sustancia mucilaginosa incolora que proviene del parénquima no clorofílico.

25

Ejemplos de esta actividad antimicrobiana se describen en los trabajos de Ferro et al., (2003) que demostraron que el gel de la hoja de *Aloe vera* puede inhibir el crecimiento de dos bacterias gram positivas: *Shigella flexneri* y *Streptococcus*. Suleyman & Sema, (2009) demostraron la actividad

30

antimicrobiana del jugo de *Aloe vera* contra *Mycobacterium smegmatis*, *Klebisella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, y *Bacillus sphricus*. Renisheya et al., (2012) demostraron que el gel de *Aloe vera* inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*,
5 *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris* y *Candida albicans*. En cuanto a la actividad antifúngica atribuida a *Aloe vera* cabe destacar el trabajo de Casian et al., (2007) en el que muestran como los extractos hidroalcohólicos de hojas frescas de *Aloe vera* tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *Botrytis gladiolorum*, *Fusarium oxysporum*, *Heterosporium pruneti* y
10 *Penicillium gladioli*. Jasso de Rodríguez et al., (2005) también evaluaron la actividad antifúngica de la pulpa y de la fracción líquida de *Aloe vera* en el desarrollo de micelio de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* & *Collectotrichum coccocde*, obteniendo una inhibición del crecimiento del mismo entre un 22-38%. Trabajos más recientes como el de Castillo et al., (2010),
15 Sitara and Nassen, (2011), Nidiry et al., (2011) y el de Renisheya et al., (2012) también demuestran la actividad antifúngica positiva tanto del gel como del extracto de hojas de *Aloe vera* sobre distintos hongos fitopatógenos (*Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Alternaria alternata*, *Drechslera hawaiiensis*, *Penicillium digitatum*, *Volletotrichum*
20 *gloeosporioides*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*).

Existen múltiples patentes relacionadas con el *Aloe vera*, en su mayoría relativas a las distintas aplicaciones de esta planta en el campo de la
25 cosmética, farmacéutica y de la alimentación. Por otro lado, existen líneas de investigación en la lucha biológica contra hongos fitopatógenos que se han dirigido a la obtención de extractos de *Aloe vera* a partir del gel y el parénquima no clorofilico (Jasso de Rodríguez et al., (2005); Sitara and Nassen, (2011); Rosca-Casian et al. (2007)). Todas estas actividades,
30 producen unos residuos industriales a los que, hasta el momento, no se da utilidad. Así, no hay ninguna descripción de la utilización de la corteza de la hoja (residuo industrial) para obtener un extracto fenólico de *Aloe vera* con

utilidad como inhibidor del crecimiento micelial y la proliferación de hongos fitopatógenos.

Bibliografía citada:

- 5 Byeon, SW., Pelley, RP., Ullrich, SE., Waller, TA., Bucana, CD., Strickland, FM. 1998. *Aloe barbadensis* extracts reduce the production of Interleukin-10 after exposure to Ultraviolet radiation. *J. Invest. Dermatol.* 110: 811-817.
- Casian, O.R., Parvu, M., Vlase, L., Tamas, M.. 2007. Antifungal activity of *Aloe vera* leaves. *Fitoterapia.* 78(3): 219-222.
- 10 Capasso, F., Borrelli, F., Capasso, R., Di Carlo, G., Izzo, A.A., Pinto, L., Mascolo, N., Castaldo, S., Longo, R. 1998. Aloe and its therapeutic use. *Phytotherapy Research.* 12: S48-S52.
- Castillo, S., Navarro, D., Zapata, P.J., Guillén, F., Valero, D., Serrano, M., Martínez-Romero, D. 2010. Antifungal efficacy of *Aloe vera in vitro* and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. *Postharvest Biology and Technology.* 57: 183-188.
- 15 Ferro, V.A., F. Bradbury, P. Cameron, E. Shakir, S.R. Rahman, W.H. Stimson. 2003. *In vitro* susceptibilities of *Shigella flexneri* and *Streptococcus pyogenes* to inner gel of *Aloe barbadensis* Miller. *Antimicrobial agent and*
- 20 *Chemotherapy:* Mar: 1137-1139.
- Jasso de Rodríguez, D., Hernández-Castillo, D., Rodríguez-Gracia, R., Angulo-Sánchez, J.L.. 2005. Antifungal activity *In vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products.* 21(1): 81-87.
- 25 Nidiry, E.S.J., Ganeshan, G., Loksha, A.N. 2011. Antifungal activity of some extractives and constituents of *Aloe vera*. *Research Journal of Medicinal Plant.* 5(2): 196-200.
- Yagi, A., Nakamori, J., Yarnada, T., Iwase, H., Tanaka, T., Kaneo, Y., Qiu, J., Orndorff, S. 1999. *In vivo* Metabolism of Aloemannan. *Planta Medica.* 65: 417
- 30 -420

Renisheya Joy Jeba Malar, T., Johnson, M., Beulah, N., Laju, R., Anupriya, G., Renola Joy Jeba Ethal, T. 2012. International Journal of Biomedical and Advance Research. 03(03).

Sitara, U., Hassan, N., Naseem J. 2011. Antifungal activity of *Aloe vera* gel against plant pathogenic fungi. Pak. J. Bot., 43(4): 2231-2233.

Descripción detallada de la invención

Utilización de extracto fenólico de residuo de *Aloe vera* en el control de hongos fitopatógenos.

Breve descripción de la invención: La presente invención está relacionada con los sectores de la Fitopatología y la Industria agroalimentaria y más concretamente con el sector Agrario en el campo del control de infección por hongos en plantas y se refiere a la utilización de extracto fenólico de *Aloe vera* como inhibidor del crecimiento micelial y la proliferación de hongos fitopatógenos, hongos capaces de infectar plantas de interés económico produciendo enfermedades en las mismas.

Se describe por primera vez la utilización de un residuo agro-industrial generado en el proceso de producción de extractos vegetales tanto del exudado de la hoja, como de la pulpa o gel que proviene del parénquima no clorofílico del *Aloe vera*. Este residuo es la corteza de la hoja (estructura externa de la hoja) de *Aloe vera* de la que se extrae un extracto fenólico que se caracteriza por tener actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos, por ejemplo, frente a los hongos *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fusarium oxysporum* y *Sporisorium scitamineum*.

En la presente invención por "residuo industrial de corteza de la hoja de *Aloe vera*" se entiende la corteza de la hoja de *Aloe vera* (capa externa clorofílica o clorénquima) que queda como residuo una vez se han aprovechado

industrialmente aquellas partes de la hoja de *Aloe vera* de las que se extraen productos con aplicación farmacéutica, cosmética, alimentaria o de otra índole y que son la pulpa o el exudado de la hoja.

- 5 La actividad antifúngica del extracto fenólico se manifiesta con una inhibición o disminución del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos. Esta actividad antifúngica se ha demostrado en condiciones de crecimiento *in vitro* en medio de cultivo.
- 10 La importancia de esta invención va encaminada a la búsqueda de nuevos productos biológicos (fungicidas naturales) que se pueden generar a un menor costo y, lo más importante, que tengan un efecto menos agresivo que los productos químicos en el medio ambiente. Se describe un extracto fenólico extraído del residuo que constituye la corteza de la hoja de *Aloe vera*,
- 15 el método para obtenerlo y su utilización como compuesto fitosanitario natural de utilidad en la prevención y lucha contra las enfermedades de las plantas causadas por hongos. La ventaja de esta opción de control es que se utiliza un residuo procedente de la industria de producción de extractos de *Aloe vera* y además, representa una alternativa ecológica, respetuosa con el medio
- 20 ambiente, no contaminante, y que reduce notablemente los riesgos de resistencia de los patógenos.

Descripción detallada de la invención: Un aspecto de la presente invención se refiere al método para obtener un extracto fenólico de *Aloe vera* a partir del

25 residuo generado en el proceso industrial de producción de extractos vegetales tanto del exudado de la hoja, como de la pulpa o del gel que proviene del parénquima no clorofílico del *Aloe vera*. Este residuo es la corteza de la hoja (estructura externa de la hoja) de la que, mediante la presente invención, se obtiene un extracto que se caracteriza por ser una

30 mezcla de compuestos en donde predominan compuestos de naturaleza fenólica, aunque también pueden encontrarse algunos polisacáridos y proteínas. Así mismo, la invención se refiere al propio extracto fenólico de

Aloe vera que se obtiene mediante dicho procedimiento y a su utilización como inhibidor efectivo del crecimiento micelial y la proliferación de hongos fitopatógenos capaces de infectar plantas produciendo enfermedades en las mismas.

5

El método para obtener un extracto fenólico a partir de la corteza de la hoja de *Aloe vera* como residuo industrial incluye la maceración de la corteza en oscuridad en un medio acuoso y reflujo a una temperatura de entre 55°C y 65°C durante un intervalo de tiempo entre 10 y 15 horas; a continuación, el
10 extracto se filtra a través de filtros que retienen partículas entre 20-25 micras y se centrifuga a una velocidad entre 3000-4000 rpm durante un intervalo de tiempo entre 10-25 minutos.

El extracto fenólico de residuo industrial de la corteza de *Aloe vera*, o
15 composiciones que lo contienen, se utiliza en la presente invención como compuesto fitosanitario antifúngico para la prevención y lucha contra enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. En un ejemplo particular, se describe la utilización de dicho extracto fenólico para la inhibición del crecimiento micelial y la proliferación de los hongos fitopatógenos
20 *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fusarium oxysporum* y *Sporisorium scitamineum*.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el extracto fenólico obtenible a partir de la corteza de la hoja de *Aloe vera* y que se ha utilizado en la
25 presente invención a una concentración entre el 0,315% y el 20% produce un 100% de inhibición de crecimiento micelial en los hongos fitopatógenos *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fusarium oxysporum* y *Sporisorium scitamineum*, mientras que el resto de las concentraciones testadas tienen un efecto fungiestático sobre dichos hongos.

30

Así mismo, el extracto fenólico de la invención, o composiciones que lo contienen, es útil en el tratamiento fungicida, fungiestático o antifúngico,

frente a hongos fitopatógenos, de semillas, de los embalajes que las contienen, de los embalajes que contienen materiales de las plantas cosechadas y/o de la tierra donde se van a cultivar plantas o donde ya se están cultivando.

5

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

10

Hemos evaluado en condiciones *in vitro* la actividad antifúngica de un extracto polifenólico extraído de residuos de hoja (corteza de la hoja de *Aloe vera*) frente a cuatro hongos fitopatógenos: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y *Sporisorium scitamineum* que fueron seleccionados por su importancia económica, ya que infectan plantas de gran valor agronómico causando diversas enfermedades, y que se han utilizado como ejemplos para ilustrar el efecto del extracto sobre los hongos fitopatógenos.

15

20

Phaeomoniella chlamydospora y *Phaeoacremonium aleophilum* causan "enfermedades en la madera" de la vid, cuya característica común consiste en la alteración interna de la madera de la planta, ya sea por necrosis o pudrición. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* produce una importante enfermedad que se transmite por el suelo y que consiste en la pudrición de la raíz de plantas de tomate, con la posibilidad de limitar la productividad en los cultivos de tomate en invernadero y campo y, por último, *Sporisorium scitamineum* es el agente causal del carbón, una de las principales enfermedades que afecta al cultivo de la caña de azúcar a nivel mundial.

25

30

Material vegetal y la extracción de fenoles

Las plantas de *Aloe vera* se compraron en un vivero local y procedían de cultivo ecológico.

- 5 Los compuestos fenólicos se extrajeron de la corteza de las hojas de la planta de Aloe de la siguiente manera: una masa de 150 g de polvo seco se puso en un matraz Erlenmeyer con 750 ml de agua destilada. El matraz se cubrió con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz y se sometió a reflujo a una temperatura 60°C durante 12 horas Después de este proceso, la muestra
10 se filtró usando papel de filtro Whatman nº 41 y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos.

Evaluación de la actividad antifúngica del extracto fenólico

- La evaluación de la bioactividad antifúngica del extracto fenólico obtenido
15 según se ha descrito en el apartado anterior se realizó *in vitro* con cepas de los hongos mencionados anteriormente. Los hongos se mantuvieron en Agar Patata Dextrosa (medio PDA), preparado siguiendo las instrucciones del fabricante, en placas Petri y se incubaron a temperatura óptima (40 ± 2°C para *S. scitaminia*; 22 ± 2°C para *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* y 25 ±
20 2°C para *F. oxysporum*) durante cuatro semanas para permitir el crecimiento del micelio.

- El extracto fenólico se agregó por filtración a través de filtros de 0,2 micras al medio PDA previamente esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 1
25 atm, 121°C y, posteriormente, se dispensaron 6 ml de medio en cada placa Petri estéril de 50 mm. Las concentraciones de extracto fenólico variaron del 0,315% al 20% teniendo en cuenta el volumen final del medio a preparar; el incremento de concentración se obtuvo duplicándola desde el 0,315% hasta alcanzar el 2,5% y, a partir de esta concentración, se fue aumentando un
30 0,5% hasta obtener el 20% de concentración. Con el fin de evitar que las placas con el medio más el extracto fenólico se contaminaran, la mezcla se realizó en una cabina de flujo laminar adicionando lentamente el extracto

fenólico al medio PDA a una temperatura entre 40-45°C para evitar inactivar cualquier componente del principio activo del extracto antifúngico. Por último, se mezcló hasta lograr la homogenización completa del medio más el fungicida, se dejó enfriar y se llevó a refrigeración a 4°C hasta su posterior
5 utilización.

Para la siembra de los distintos hongos fitopatógenos se utilizó un sacabocados estéril de 5 mm de diámetro con el que se cortaron discos de agar con micelio y esporas del frente de crecimiento de colonias de cada uno
10 de los aislados de los hongos fitopatógenos, desarrollados durante un mes sobre medio PDA. Para colocar los discos, con el micelio en contacto con el medio de cultivo en el centro de la placa, se utilizaron pinzas estériles. Posteriormente, las placas se sellaron con Parafilm®, se etiquetaron y se incubaron en oscuridad a la temperatura óptima de crecimiento de cada uno
15 de los hongos fitopatógenos utilizados. Los controles se incubaron de la misma manera descrita anteriormente pero sobre medio PDA sin el extracto fenólico.

Con el fin de determinar la mínima concentración inhibitoria (MIC), cada
20 concentración de extracto fenólico se ensayó por triplicado en cada experimento y los ensayos se repitieron para confirmar los resultados.

El método que se utilizó para evaluar la actividad antifúngica del extracto fenólico fue el procedimiento de crecimiento radial sobre un medio de agar en
25 placa Petri, ya que este bioensayo es el más adecuado para los hongos de rápido crecimiento. Se midió el radio en milímetros del halo del crecimiento del hongo en cuatro direcciones. El crecimiento se comparó con el control siete días después de la inoculación en *Sporisorium scitamineum* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y catorce días después de la inoculación
30 en *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum*. De esta manera, se calculó la tasa de crecimiento de cada uno de los aislados de los

hongos fitopatógenos en cada una de las concentraciones del extracto fenólico.

La inhibición del crecimiento micelial (ICM) se determinó con base en el diámetro del crecimiento radial (medido en mm) del hongo sin el efecto del fungicida (extracto fenólico), menos el diámetro en mm del crecimiento del hongo influenciado por el fungicida, expresado en porcentaje, tal como se especifica en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ICM} = \frac{\text{CML} - \text{CMI}}{\text{CML}} \times 100$$

Donde:

% ICM = Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

CML = Crecimiento micelial libre

CMI = Crecimiento micelial influenciado por el fungicida

Análisis de los datos

Los datos se analizaron usando un análisis unidireccional de la varianza en el nivel de significación de $P < 0,05$ y el test de Duncan. La prueba de Dunnett se utilizó para comparar las medias de los diferentes tratamientos antifúngicos con la media del control y calcular la diferencia mínima entre el control y los medios de tratamiento detectados como estadísticamente significativos.

25

Se calculó también la concentración máxima de extracto fenólico a la que no se observaron efectos adversos (**NOAEC**) y la concentración más baja de extracto fenólico en la que se observaron efectos adversos (**LOEC**).

Resultados

Los resultados obtenidos muestran un fuerte efecto fungicida del extracto fenólico frente al crecimiento de las cuatro cepas de hongos: *Sporisorium*

scitamina, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Para los cuatro hongos fitopatógenos se alcanzó una concentración inhibitoria total, mientras que concentraciones más bajas del extracto mostraron una actividad fungistática.

5 En esta memoria descriptiva, se considera actividad fungicida cuando no se observa crecimiento de hongos en las placas y se considera actividad fungistática cuando el crecimiento de los hongos se retrasa con respecto a los controles.

10 Los efectos de las diferentes concentraciones del extracto fenólico de *Aloe vera* sobre el crecimiento micelial de los cuatro hongos se observan en la tabla 1. Estos resultados muestran que el extracto fenólico de *Aloe vera* obtenido a partir de un residuo industrial (corteza de hoja) tiene un potente efecto inhibitor sobre el crecimiento micelial de *Sporisorium scitamina* con
15 concentraciones superiores al 2,5% (Tabla 2). Se detecta un efecto fungistático (58,2% de inhibición del crecimiento micelial) con una concentración de extracto fenólico del 3% (LOEC, tabla 2), mientras que la inhibición absoluta (100%) se observa a una concentración de extracto de 3,5% (MIC, tabla 2).

20

En los hongos *Phaeomoniella chlamydospora* (PCH) y *Phaeoacremonium aleophilum* (PAL) se observa una inhibición del crecimiento micelial después del tratamiento con el extracto fenólico a concentraciones superiores al 4% y 3%, respectivamente (tabla 2). Para PCH se detecta un efecto fungistático
25 con un 71,65% de inhibición del crecimiento micelial a una concentración de extracto del 4,5% (LOEC, tabla 2), mientras que la inhibición absoluta (100%) se observa a una concentración del extracto del 5% (MIC, tabla 2). Para PAL se detecta un efecto fungistático con un 19,87% de inhibición del crecimiento micelial a una concentración del extracto del 3,5% (LOEC, tabla 2), mientras
30 que la inhibición absoluta (100%) se observa a una concentración del extracto del 9% (MIC, tabla 2).

En el otro hongo fitopatígeno estudiado, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, se detecta un efecto fungistático con un 32,07% de inhibición del crecimiento micelial a una concentración de extracto fenólico del 3% (LOEC, tabla 2), mientras que la inhibición absoluta (100%) se observa a una
5 concentración del extracto del 5,5% (MIC, tabla 2).

Conclusión

Este estudio demuestra la utilidad del extracto fenólico obtenible a partir de la corteza de la hoja de *Aloe vera* (residuo generado en el proceso de
10 producción de extractos vegetales de *Aloe vera*) en la supresión de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos en planta, y proporciona un nuevo uso para estos residuos agro-industriales de *Aloe vera*. La inclusión de este tipo de productos naturales en las estrategias de protección de los cultivos, como alternativa a los fungicidas sintéticos, ayudará a mantener el
15 equilibrio de los agroecosistemas y la seguridad de los productos cosechados.

Tabla 1. Actividad antifúngica del extracto fenólico obtenido a partir de la corteza de hoja de *Aloe vera* frente al crecimiento micelial de cuatro hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, y *Sporisorium scitamineum*).

Concentración %	Inhibición del crecimiento micelial (%)			
	<i>Fusarium oxysporum f.sp. radicis- lycopersici</i>	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	<i>Sporisorium scitamineum</i>
0	0 a	0 a	0 a	0 a
0.315	2.06±3.14 a	2.78±1.60 a	3,61±5.47 a	11.89±4.24 a
0.625	4.58±5.58 a	10.53±5.78 a	2,84±3.01 a	12.11±4.95 a
1.25	1.33±2.04 a	11.46±6.10 a	3,616±0.48 a	23.49±3.05 a
2.5	6.02±1.21 a	10.84±5.33 a	8,62±3.43 ab	45.42±3.78 ab
3	32.07±2.86 b	1.18±1.15 a	9,61±0.49 abc	58.20±2.77 b
3.5	22.09±2.56 b	1.92±2.93 a	19,87±4.10 d	100
4	34.01±0.74 bc	22.62±1.36 a	16,27±0.10 bcd	100
4.5	45.44±2.31 c	71.65±4.31 b	17,64±0.12 bcd	100
5	51.01±8.83 c	100	19,88±0.08 cd	100
5.5	100	100	21,81±6.96 d	100
6	100	100	21,71±1.67 d	100
6.5	100	100	19,03±0.05 bcd	100
7	100	100	25,37±6.30 d	100
7.5	100	100	39,32±7.08 e	100
8	100	100	56,99±3.96 f	100
8.5	100	100	78,34±10.24 g	100
9	100	100	100	100
9.5	100	100	100	100
10	100	100	100	100

En cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan, $P < 0,05$)

Tabla 2. Concentración máxima de extracto fenólico a la que no se observan efectos adversos (**NOAEC**), concentración más baja de extracto fenólico en la que se observan efectos adversos (**LOEC**) y mínima concentración inhibitoria (**MIC**) para el crecimiento micelial de cuatro hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, y *Sporisorium scitamineum*) expuestos *in vitro* al extracto fenólico obtenido a partir de la corteza de la hoja de *Aloe vera* (residuo generado en el proceso de producción de extractos vegetales de *Aloe vera*).

Hongos	NOAEC (%) ^a	LOEC (%) ^a	MIC (%)
<i>Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i>	<2.5	3	5.5
<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	<4	4.5	5
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	<3	3.5	9
<i>Sporisorium scitamineum</i>	<2.5	3	3.5

10 ^a Prueba Dunnett con $p < 0.05$.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de un extracto fenólico de *Aloe vera* que incluye:
 - la maceración en oscuridad y en medio acuoso y el calentamiento a reflujo
- 5 del residuo industrial de corteza de la hoja de *Aloe vera*,
 - el filtrado y la centrifugación del producto obtenido tras el paso anterior.
2. Método según la reivindicación 1 en el que el calentamiento a reflujo se realiza a una temperatura de entre 55°C y 65°C durante un intervalo de
- 10 tiempo entre 10 y 15 horas.
3. Extracto fenólico de *Aloe vera* obtenible mediante el método definido en las reivindicaciones 1-2.
- 15 4. Extracto fenólico de residuo industrial de corteza de *Aloe vera* con actividad fungicida, fungiestática y/o antifúngica.
5. Composición con actividad fungicida, fungiestática y/o antifúngica que incluye el extracto fenólico definido en cualquiera de las reivindicaciones 3-4.
- 20 6. Uso de la composición de la reivindicación 5 en el tratamiento fungicida, fungiestático y/o antifúngico de semillas y/o plantas cosechadas, frente a hongos fitopatógenos.
- 25 7. Uso de la composición de la reivindicación 5 en el tratamiento fungicida, fungiestático y/o antifúngico de embalajes para semillas y/o materiales de plantas cosechadas, frente a hongos fitopatógenos.
- 30 8. Uso de la composición de la reivindicación 5 en el tratamiento fungicida, fungiestático y/o antifúngico de la tierra en la que las plantas están creciendo o crecerán, frente a hongos fitopatógenos.

9. Uso de la composición de la reivindicación 5 en la elaboración de productos fitosanitarios.

10. Uso de la composición de la reivindicación 5 para tratar enfermedades
5 producidas por hongos fitopatógenos



②① N.º solicitud: 201300355

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.04.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N65/42** (2009.01)
A01P3/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	OSORIO, E. et al. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (<i>Carya illinoensis</i>), pomegranate husk (<i>Punica granatum</i>) and creosote bush leaves (<i>Larrea tridentata</i> Cov.) against plant pathogenic fungi. <i>Industrial Crops and Products</i> , 2010. Vol. 31, nº 1, páginas 153-157. ISSN 0926 6690. Doi: 10.1016/j.indcrop.2009.09.017.	1,2
A	JASSO DE RODRIGUEZ, D. et al. Antifungal activity in vitro of <i>Aloe vera</i> pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. <i>Industrial Crops and Products</i> , 2005. Vol. 21, nº 1, páginas 81-87. ISSN 0926 6690. Doi:10.1016/j.indcrop.2004.01.002.	1,6-10
A	SAKS, Y. BARKAI-GOLAN, R. <i>Aloe vera</i> gel activity against plant pathogenic fungi. <i>Postharvest Biology and Technology</i> , 1995, Vol. 6, nº 1-2, páginas 159-165. ISSN 0925 5214.	6-10
A	CASTILLO, S. et al. Antifungal efficacy of <i>Aloe vera</i> in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. <i>Postharvest Biology and Technology</i> , 2010. Vol. 57, nº 3, páginas 183-188. ISSN 0925 5214. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.04.006.	6-10
A	ROSCA-CASIAN, O. et al. Antifungal activity of <i>Aloe vera</i> leaves. <i>Fitoterapia</i> , 2007. Vol. 78, nº 3, páginas 219-222. ISSN 0367 326X. Doi: 10.1016/j.fitote.2006.11.008.	6-10
A	SITARA, U. et al. Antifungal activity of <i>Aloe vera</i> gel against plant pathogenic fungi. <i>Pak. J. Bot.</i> , 2011. Vol. 43, nº 4, páginas 2231-2233.	6-10
A	NIDIRY, E. S. J. et al. Antifungal activity of some extractives and constituents of <i>Aloe vera</i> . <i>Research Journal of Medicinal Plant</i> , 2011. Vol. 5, nº 2, páginas 196-200. ISSN 1819 3455. DOI: 10.3923/rjmp.2011.196.200.	6-10

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
29.10.2013

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/5

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, X-FULL, NPL, CAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1 - 10	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.

Consideraciones:

La presente invención tiene por objeto un método de obtención de un extracto fenólico de *Aloe vera* que incluye (reivindicación 1):

- la maceración en oscuridad y en medio acuoso y el calentamiento a reflujo del residuo industrial de corteza de la hoja de *Aloe vera*,
- el filtrado y la centrifugación del producto obtenido.

El calentamiento a reflujo se realiza a una temperatura entre 55 y 65°C durante 10 a 15 horas (reiv. 2).

Asimismo, es objeto de protección el extracto fenólico de *Aloe vera* obtenido por el método reivindicado (reiv. 3), procedente de residuo industrial con actividad fungicida, fungiestática y/o antifúngica (reiv. 4) y la composición con actividad fungicida, fungiestática y/o antifúngica que incluye el extracto fenólico reivindicado (reiv. 5).

Por último, es objeto de protección el uso de la composición reivindicada en el tratamiento fungicida, fungiestático y/o antifúngico de semillas y/o plantas cosechadas, frente a hongos fitopatógenos (reiv. 6), en el tratamiento de embalajes para semillas y plantas cosechadas (reiv. 7), en el tratamiento de tierra en las que las plantas crecen (reiv. 8), en la elaboración de productos fitosanitarios (reiv. 9) y para tratar enfermedades producidas por hongos fitopatógenos (reiv. 10).

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	OSORIO, E. et al. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (<i>Carya Illinoensis</i>), pomegranate husk (<i>Punica granatum</i>) and creosote bush leaves (<i>Larrea tridentata</i> Cov.) against plant pathogenic fungi. <i>Industrial Crops and Products</i> , 2010. Vol. 31, nº 1, páginas 153-157.	2010
D02	JASSO DE RODRIGUEZ, D. et al. Antifungal activity in vitro of <i>Aloe vera</i> pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. <i>Industrial Crops and Products</i> , 2005. Vol. 21, nº 1, páginas 81-87.	2005
D03	SAKS, Y. BARKAI-GOLAN, R. <i>Aloe vera</i> gel activity against plant pathogenic fungi. <i>Postharvest Biology and Technology</i> , 1995, Vol. 6, nº 1-2, páginas 159-165.	1995
D04	CASTILLO, S. et al. Antifungal efficacy of <i>Aloe vera</i> in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. <i>Postharvest Biology and Technology</i> , 2010. Vol. 57, nº 3, páginas 183-188.	2010
D05	ROSCA-CASIAN, O. et al. Antifungal activity of <i>Aloe vera</i> leaves. <i>Fitoterapia</i> , 2007. Vol. 78, nº 3, páginas 219-222.	2007
D06	SITARA, U. et al. Antifungal activity of <i>Aloe vera</i> gel against plant pathogenic fungi. <i>Pak. J. Bot.</i> , 2011. Vol. 43, nº 4, páginas 2231-2233.	2011
D07	NIDIRY, E. S. J. et al. Antifungal activity of some extractives and constituents of <i>Aloe vera</i> . <i>Research Journal of Medicinal Plant</i> , 2011. Vol. 5, nº 2, páginas 196-200.	2011

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**NOVEDAD**

Los documentos citados **D01** a **D07** se refieren a extractos de plantas con actividad antifúngica pero solo **D01** se refiere a extractos polifenólicos. En efecto,

- **D01** divulga la eficacia biológica de extractos polifenólicos de tres plantas contra hongos patógenos de plantas, *Carya illinoensis*, *Punica granatum* y *Larrea tridentata*. El método de extracción de polifenoles se hace con disolvente en la oscuridad y el calentamiento en reflujo, tras lo cual se filtra y centrifuga (página 154, columna 1, 2.3.) coincidiendo con las etapas reivindicadas en el método de la solicitud de estudio. Sin embargo, en D01 no hace alusión al *Aloe vera*, por ello, no anticipa la solicitud en estudio.

Los documentos citados **D02** a **D06** se refieren a la actividad antifúngica de *Aloe vera* en particular contra hongos patógenos de plantas. Sin embargo, ninguno de estos documento aluden al extracto fenólico de la hoja del *Aloe vera* ni al método del obtención del extracto fenólico, por lo que no anticipan la invención reivindicada.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D07, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 10** son nuevas de acuerdo con el Artículo 6 LP11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El método de obtención de un extracto fenólico de *Aloe vera* objeto de la invención, no resulta obvio para el experto en la técnica a la vista de los documentos citados, siendo el más relevante el **D01**, así:

- **D01** se refiere a la eficacia biológica de extractos polifenólicos de tres plantas dicotiledóneas, *Carya illinoensis*, *Punica granatum* y *Larrea tridentata*, contra hongos patógenos de plantas. El método divulgado de extracción de polifenoles con disolvente en la oscuridad, para evitar la exposición a la luz, y el calentamiento en reflujo a 60°C durante 12 horas, tras lo cual se filtra y centrifuga (página 154, columna 1, 2.3.), coincide con las etapas reivindicadas en el solicitud de estudio, pero el disolvente empleado varía pudiendo ser acetona (*Larrea tridentata*), agua (*Punica granatum*) o metanol (*Carya illinoensis*).

El método descrito en **D01** para plantas dicotiledóneas y con el disolvente variable, según la planta, para obtener extractos polifenólicos, no resulta evidente para el experto en la materia la aplicación de este método en una monocotiledónea como es el *Aloe vera*, tampoco la elección del disolvente adecuado a esta planta, por ello, no afecta a la actividad inventiva de la solicitud en estudio.

Puesto que los otros documentos citados, **D02 a D07**, no hacen alusión al extracto fenólico de *Aloe vera* ni a ningún método de obtención de dicho extracto fenólico tampoco afectan a la actividad inventiva de la invención.

Por ello, a la vista de los documentos citados D01 a D07, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 10** tienen actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.