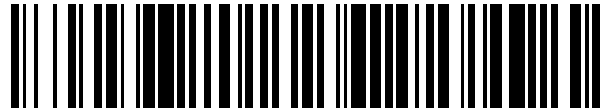


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 585**

51 Int. Cl.:

A01N 43/54 (2006.01)
A01N 43/90 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
A01N 3/00 (2006.01)
A23B 7/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2012 E 12702287 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2672824**

54 Título: **Nuevas composiciones antifúngicas**

30 Prioridad:

09.02.2011 EP 11153831

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

17.03.2015

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**STARK, JACOBUS y
RIJK, DE, ANGELIQUE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 531 585 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

Nuevas composiciones antifúngicas

Campo de la invención

5 La presente invención describe nuevas composiciones antimicrobianas para reprimir enfermedades de las plantas y para prevenir el deterioro microbiano de los cultivos.

Antecedentes de la invención

10 Se estima que alrededor del 25% de la producción mundial de cultivos se pierde debido al deterioro microbiano, del cual el deterioro por hongos es con mucho la causa más importante. No sólo desde un punto de vista económico, sino también desde un punto de vista humano es de gran importancia evitar el deterioro de productos alimenticios. Después de todo, en muchas partes del mundo las personas padecen hambruna.

El éxito en la lucha contra enfermedades de las plantas y los cultivos y en la reducción del daño que causan a las cosechas y la calidad depende, en gran medida, de la aplicación oportuna de fungicidas. El uso prolongado y frecuente de muchos fungicidas tales como, p. ej., benzamidazoles, ha contribuido a reducir su eficacia gracias al desarrollo de fenómenos de resistencia.

15 Recientemente, se han vuelto comercialmente disponibles nuevos fungicidas de otras familias químicas tales como, p. ej., anilino pirimidinas (véanse los documentos WO 03/011030, FR 2 828 065 A1 y WO 2005/074684). A pesar de que estos fungicidas han mostrado actividad frente a los hongos, todavía se producen problemas de deterioro. Además de ello, varios estudios han demostrado que más y más hongos adquieren resistencia también frente a estos fungicidas (véase Moyano *et al.* (2004), Kanetis *et al.* (2008), Xiao *et al.* (2011)). Además, muchos de los
20 fungicidas utilizados actualmente tienen la desventaja de ser peligrosos para la salud de las personas expuestas y el medio ambiente.

Durante muchas décadas, los fungicidas se han utilizado también para prevenir el crecimiento de hongos en productos alimenticios tales como quesos y embutidos. El documento EP 0 986 965 A1 describe el uso de sulfato de imazalilo para tratar quesos y embutidos y protegerlos frente al crecimiento de hongos. El documento FR2828065
25 describe una composición fungicida que comprende una anilino pirimidina e imazalilo, a utilizar en productos agrícolas para protegerlos frente a los hongos.

El documento US 5.597.598 describe el tratamiento combinado de productos alimenticios con dos ácidos y el macrólido de polieno natamicina antimicótica. Este conservante natural, el cual es producido por fermentación utilizando *Streptomyces natalensis*, es ampliamente utilizado en todo el mundo como conservante de alimentos y
30 tiene un largo historial de uso seguro en la industria alimentaria. Es muy eficaz frente a todos los hongos conocidos de deterioro de los alimentos. A pesar de que la natamicina se ha aplicado durante muchos años, p. ej., en la industria quesera, hasta ahora nunca se ha observado el desarrollo de especies de hongos resistentes.

Por consiguiente, se puede concluir que existe una necesidad seria de composiciones antimicrobianas más eficaces, menos nocivas para el medio ambiente, de menor toxicidad y menos dañinas, p. ej. composiciones antifúngicas,
35 para el tratamiento del crecimiento de hongos en y sobre plantas y cultivos.

Descripción de la invención

La presente invención resuelve el problema proporcionando una nueva composición antimicrobiana sinérgica, p. ej., antifúngica, que comprende el compuesto antifúngico de polieno natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "sinérgico" significa que el efecto
40 combinado de los compuestos antifúngicos cuando se utilizan en combinación es mayor que sus efectos aditivos cuando se utilizan individualmente.

En general, la actividad sinérgica de dos ingredientes activos se puede someter a ensayo, por ejemplo, en el análisis del modelo de varianza utilizando la interacción de tratamiento por estrato (véase Slinker, 1998). La eficacia relativa se puede calcular por medio de la siguiente fórmula: ((valor de estado de evolución de control no tratado - valor de estado de evolución de composición) / (valor de estado de evolución del control sin tratar)) * 100. Un coeficiente de interacción se puede calcular por medio de la siguiente fórmula: ((eficacia relativa de la combinación compuesto A + compuesto B) / (eficacia relativa de compuesto A + eficacia relativa de compuesto B)) * 100. Un coeficiente de interacción mayor que 100 indica sinergia entre los compuestos.
45

Alternativamente, la sinergia se puede calcular como sigue: la actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales se puede determinar calculando la reducción en el crecimiento de moho observado en productos tratados con los ingredientes activos en comparación con el crecimiento de moho en productos tratados con una composición control. La actividad antifúngica esperado (E en %) de la composición antifúngica combinada que comprende ambos ingredientes activos se puede calcular según la ecuación de Colby (Colby, 1967): $E = X + Y -$
50

$[(X \cdot Y) / 100]$, en donde X e Y son las actividades antifúngicas observadas (en %) de los ingredientes activos individuales X e Y, respectivamente. Si la actividad antifúngica observada (O en %) de la combinación supera la actividad antifúngica esperada (E en %) de la combinación y el factor de sinergia O/E es, por lo tanto, $> 1,0$, la aplicación combinada de los ingredientes activos conduce a un efecto antifúngico sinérgico.

5 En una realización de la invención, el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas se selecciona del grupo que consiste en ciprodinil, mepanipirim y pirimetanil. En una realización, las composiciones pueden contener también dos o más compuestos antifúngicos diferentes de la familia de las anilino pirimidinas. Ha de entenderse que derivados de compuestos antifúngicos de la familia de las anilino pirimidinas incluyen, pero no se limitan a sales o solvatos de compuestos antifúngicos de la familia de las anilino pirimidinas o formas modificadas de
10 compuestos antifúngicos de la familia de las anilino pirimidinas también se pueden aplicar en las composiciones de la invención. Ejemplos de productos comerciales que contienen anilino pirimidinas tal como pirimetanilo son los productos con la marca Mythos® (pirimetanil), Scala® (pirimetanil), Siganax® (pirimetanil) o Walabi® (pirimetanil y clortalonil). Dichos productos comerciales se pueden incorporar en la presente invención.

15 En una realización preferida, el compuesto antifúngico de polieno es natamicina. En una realización, las composiciones pueden contener también dos o más compuestos antifúngicos de polieno diferentes.

Ejemplos de productos comerciales que contienen natamicina son los productos con la marca Delvolid®. Tales productos son producidos por DSM Food Specialties (Países Bajos) y pueden ser sólidos que contienen, p. ej., 50% (p/p) de natamicina, o líquidos que comprenden entre, p. ej., 2-50% (p/v) de natamicina. Dichos productos comerciales se pueden incorporar en las composiciones de la invención.

20 La composición de la presente invención comprende generalmente de 0,005 g/l a 100 g/l y preferiblemente de 0,01 g/l a 50 g/l de natamicina. Preferiblemente, la cantidad es de 0,01 g/l a 3 g/l.

La composición de la presente invención comprende generalmente de 0,0001 g/l a 2000 g/l y preferiblemente de 0,0005 g/l a 1500 g/l de un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas. Más preferiblemente, la cantidad es de 0,001 g/l a 1000 g/l.

25 En una realización, la composición de la presente invención comprende, además, al menos un compuesto adicional seleccionado del grupo que consiste en un agente de pegajosidad, un soporte, un agente colorante, un coloide protector, un adhesivo, un herbicida, un fertilizante, un agente espesante, un agente secuestrante, un agente tixotrópico, un tensioactivo, un compuesto antimicrobiano adicional, un detergente, un conservante, un agente de extensión, una carga, un aceite de pulverización, un aditivo de flujo, una sustancia mineral, un disolvente, un dispersante, un emulsionante, un agente humectante, un estabilizador, un agente antiespumante, un agente tampón,
30 un absorbedor UV y un antioxidante. Un compuesto antifúngico antimicrobiano adicional puede ser un compuesto antifúngico (p. ej., imazalil, tiabendazol o clortalonil) o un compuesto para combatir insectos, nematodos, ácaros y/o bacterias. Naturalmente, las composiciones de acuerdo con la invención también pueden comprender dos o más de cualquiera de los compuestos adicionales anteriores. Cualquiera de los compuestos adicionales mencionados
35 anteriormente también se pueden combinar con el compuesto antifúngico de polieno y/o el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas en el caso de que los compuestos antifúngicos se apliquen por separado. En una realización, los compuestos adicionales son aditivos aceptables para el uso específico, p. ej., alimentos, piensos, medicamentos, cosméticos o la agricultura. Compuestos adicionales adecuados para uso en alimentos, piensos, medicinas, cosméticos o la agricultura son conocidos por la persona experta en la técnica.

40 En una realización específica, el compuesto antimicrobiano adicional es un compuesto de protección de cultivos naturales pertenecientes al grupo de los fosfitos, p. ej., KH_2PO_3 o K_2HPO_3 o una mezcla de las dos sales de fosfito. Compuestos con contenido en fosfitos, tal como se utiliza en esta memoria, significan compuestos que comprenden un grupo fosfito, es decir, PO_3 (en forma de, p. ej., H_2PO_3^- , $\text{H}_2\text{PO}_3^{2-}$ o PO_3^{3-}) o cualquier compuesto que permita la liberación de un ion fosfito, incluidos compuestos tales como ácido fosforoso y ácido fosfónico, así como sus derivados tales como ésteres y/o sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos de los mismos. En el caso de que las composiciones de la presente invención comprendan natamicina y al menos un compuesto que contiene fosfito, comprenden preferiblemente 0,1 g o menos de lignosulfonato, más preferiblemente 0,1 g o menos de polifenol por gramo de compuesto antifúngico de polieno. Preferiblemente, comprenden 0,01 g o menos de lignosulfonato, más preferiblemente 0,01 g o menos de polifenol por gramo de compuesto antifúngico de polieno. En particular, están exentas de lignosulfonato y preferiblemente exentas de polifenol. Ejemplos adecuados de compuestos que contienen fosfito son ácido fosforoso y sus sales (de metales alcalinos o alcalinotérreos) tales como fosfitos de potasio, p. ej., KH_2PO_3 y K_2HPO_3 , fosfitos de sodio y fosfitos de amonio, y ésteres alquílicos ($\text{C}_1\text{-C}_4$) de ácido fosforoso y sus sales tales como etil-fosfito de aluminio (fosetil-Al), etil-fosfito de calcio, isopropil-fosfito de magnesio, isobutil-fosfito de magnesio, sec-butil-fosfito de magnesio y N-butil-fosfito de aluminio. Naturalmente,
55 también se incluyen mezclas de compuestos que contienen fosfitos. Una mezcla de, p. ej., KH_2PO_3 y K_2HPO_3 puede obtenerse fácilmente añadiendo, p. ej. KOH o K_2CO_3 a un pH final de 5,0 - 6,0 a una disolución de KH_2PO_3 . Como se ha indicado anteriormente, también pueden incluirse en las composiciones de la presente invención compuestos de tipo precursor que en el cultivo o la planta se metabolizan en compuestos de fosfito. Ejemplos son los fosfonatos tales como el complejo de fosetil-aluminio. P. ej., en un cultivo o planta la parte de etil-fosfonato de esta molécula se metaboliza en un fosfito. Un ejemplo de un compuesto de este tipo en el producto comercial hidrógeno-fosfonato de
60

etilo denominado Aliette® (Bayer, Alemania). La relación de fosfito a natamicina (en peso) en las composiciones está en general entre 2:1 y 500:1 (p/p), preferiblemente entre 3:1 y 300:1 (p/p) y más preferiblemente entre 5:1 y 200:1 (p/p).

5 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden tener un pH de 1 a 10, preferiblemente de 2 a 9, más preferiblemente de 3 a 8 y lo más preferiblemente de 4 a 7. Pueden ser sólidas, p. ej., composiciones en polvo, o pueden ser líquidas. Las composiciones de la presente invención pueden ser composiciones acuosas o no acuosas listas para el uso, pero también pueden ser composiciones/suspensiones concentradas, acuosas o no acuosas, o composiciones, suspensiones y/o disoluciones madre que antes de su uso han de ser diluidas con un diluyente adecuado tal como agua o un sistema tampón. Alternativamente, las composiciones de la invención también pueden ser utilizadas para preparar emulsiones de revestimiento. Las composiciones de la presente invención también pueden tener la forma de productos secos concentrados tales como, p. ej., polvos, granulados y comprimidos. Se pueden utilizar para preparar composiciones para inmersión o pulverización de productos tales como productos agrícolas, incluyendo plantas, cultivos, verduras y/o frutas. Naturalmente, lo anterior también es aplicable cuando natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas se aplican como composiciones separadas.

20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas. Natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas pueden estar presentes en dos paquetes separados, p. ej., recipientes. Los componentes del kit pueden estar en forma seca o en forma líquida en el paquete. Si es necesario, el kit puede comprender instrucciones para disolver los compuestos. Además, el kit puede contener instrucciones para aplicar los compuestos.

25 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para proteger un producto frente a los hongos mediante el tratamiento del producto agrícola con natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas. Además, el producto puede ser tratado con otros compuestos antifúngicos/antimicrobianos ya sea antes de, junto con o después del tratamiento de los productos con natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas. El producto puede ser tratado por aplicación secuencial de natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas o viceversa. Alternativamente, el producto puede ser tratado mediante la aplicación simultánea del compuesto antifúngico de polieno natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas. En caso de aplicación simultánea, los compuestos pueden estar presentes en diferentes composiciones que se aplican de forma simultánea o los compuestos pueden estar presentes en una sola composición. En aún otra realización, el producto puede ser tratado por modos de aplicación de los compuestos antifúngicos separados o alternativos. En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de productos mediante la aplicación a los productos de natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas. Al aplicar los compuestos se puede prevenir el crecimiento de hongos sobre o en los productos. En otras palabras, los compuestos protegen los productos frente al crecimiento de hongos y/o a una infección por hongos y/o al deterioro por hongos. Los compuestos también pueden utilizarse para tratar productos que han sido infectados con un hongo. Mediante la aplicación de los compuestos puede ralentizarse, detenerse el desarrollo de la enfermedad debida a los hongos sobre o dentro de estos productos, o los productos pueden incluso ser curados de la enfermedad. En una realización de la invención, los productos son tratados con una composición o kit de acuerdo con la invención. En una realización, el producto es un alimento, pienso, producto farmacéutico, cosmético o producto agrícola. En una realización preferida, el producto es un producto agrícola.

45 Natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas, las composiciones de acuerdo con la invención y los kits de acuerdo con la invención se pueden aplicar a los productos por pulverización. Otros métodos adecuados para aplicar estos compuestos, composiciones y kits en forma líquida a los productos son también una parte de la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, inmersión, riego, empapamiento, introducción en un tanque basculante, vaporización, atomización, nebulización, fumigación, pintura, cepillado, eliminación de polvo, formación de espuma, dispersión, empaquetado y revestimiento (p. ej., por medio de cera o electrostáticamente). Además, los compuestos antifúngicos también se pueden inyectar en el suelo. Es conocido que aplicaciones de pulverización utilizando sistemas automáticos reducen los costos laborales y son rentables. Pueden utilizarse para ese propósito métodos y equipos bien conocidos para una persona experta en la técnica. Las composiciones de acuerdo con la invención se pueden pulverizar regularmente cuando el riesgo de infección es alto. Cuando el riesgo de infección es bajo, los intervalos de pulverización pueden ser más largos. Dependiendo del tipo de aplicación, la cantidad de natamicina aplicada puede variar de 5 ppm a 10.000 ppm, preferiblemente de 10 ppm a 5.000 ppm y lo más preferiblemente de 20 a 1.000 ppm. Dependiendo del tipo de aplicación, la cantidad del al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas aplicadas puede variar de 10 ppm a 5.000 ppm, preferiblemente de 20 ppm a 3.000 ppm y lo más preferiblemente de 50 a 1.000 ppm.

60 En una realización específica del producto agrícola puede ser tratado después de la cosecha. Mediante el uso de natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas se consigue el control de enfermedades post-cosecha y/o de almacenamiento durante un largo período de tiempo para permitir el transporte del producto agrícola cosechado a lo largo de largas distancias y bajo diversas condiciones de almacenamiento, con diferentes sistemas de atmósfera controlada con respecto a la temperatura y la humedad. Alteraciones de

almacenamiento después de la cosecha son, p. ej., manchas lenticulares, chamuscamiento, descomposición senescente, mancha amarga, quemadura, corazón acuoso, pardeamiento, descomposición vascular, lesiones por CO₂, deficiencia de CO₂ u O₂, y ablandamiento. Enfermedades provocadas por hongos pueden ser provocadas, por ejemplo, por los siguientes hongos: *Mycosphaerella spp*, *Mycosphaerella musae*, *Mycosphaerella fragariae*, *Mycosphaerella citri*; *Mucor spp.*, p. ej., *Mucor piriformis*; *Monilinia spp.*, p. ej., *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*; *Phomopsis spp*, *Phomopsis natalensis*; *Colletotrichum spp.*, p. ej., *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum coccodes*; *Verticillium spp.*, p. ej., *Verticillium theobromae*; *Nigrospora spp.*; *Botrytis spp.*, p. ej., *Botrytis cinerea*; *Diplodia spp.*, p. ej., *Diplodia citri*; *Pezizula spp.*; *Alternaria spp.*, p. ej., *Alternaria citri*, *Alternaria alternata*; *Septoria spp.*, p. ej., *Septoria depressa*; *Venturia spp.*, p. ej., *Venturia inaequalis*, *Venturia pyrina*; *Rhizopus spp.*, p. ej., *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*; *Glomerella spp.*, p. ej., *Glomerella cingulata*; *Sclerotinia spp.*, p. ej., *Sclerotinia fructicola*; *Ceratocystis spp.*, p. ej., *Ceratocystis paradoxa*; *Fusarium spp.*, p. ej., *Fusarium semitectum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*; *Cladosporium spp.*, p. ej., *Cladosporium fulvum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium cucumerinum*, *Cladosporium musae*; *Penicillium spp.*, p. ej., *Penicillium funiculosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*; *Phytophthora spp.*, p. ej., *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora fragariae*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora parasitica*; *Phacydiopycnis spp.*, p. ej., *Phacydiopycnis malirum*; *Gloeosporium spp.*, p. ej., *Gloeosporium album*, *Gloeosporium perennans*, *Gloeosporium fructigenum*, *Gloeosporium singulata*; *Geotrichum spp.*, p. ej., *Geotrichum candidum*; *Phlyctaena spp.*, p. ej., *Phlyctaena vagabunda*; *Cylindrocarpon spp.*, p. ej., *Cylindrocarpon mail*; *Stemphyllium spp.*, p. ej., *Stemphyllium vesica um*; *Thielaviopsis spp.*, p. ej., *Thielaviopsis paradoxy*; *Aspergillus spp.*, p. ej., *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*; *Nectria spp.*, p. ej., *Nectria galligena*; *Cercospora spp.*, p. ej., *Cercospora angreci*, *Cercospora apii*, *Cercospora atrofilliformis*, *Cercospora musae*, *Cercospora zae-maydis*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de natamicina y de al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas para proteger un producto frente a los hongos. Como se indicó anteriormente, se pueden utilizar los compuestos, p. ej., aplicar, secuencial o simultáneamente. En una realización, la invención se refiere a un uso, en donde una composición o kit de acuerdo con la invención se aplica al producto. En una realización, el producto es un alimento, pienso, producto farmacéutico, cosmético o producto agrícola. En una realización preferida, el producto es un producto agrícola.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un producto tratado con un compuesto antifúngico de polieno natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas. En una realización, el producto se trata con una composición o kit de acuerdo con la invención. Por lo tanto, la invención se dirige a un producto que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas. Los productos tratados pueden comprender natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas en su superficie y/o dentro del producto. Alternativamente, los productos tratados pueden comprender un revestimiento que comprende estos compuestos. En una realización, los productos tratados comprenden de 0,000001 a 200 mg/dm², preferiblemente 0,00001 a 100 mg/dm² y más preferiblemente de 0,00005 a 10 mg/dm² del natamicina en su superficie. En una realización adicional, comprenden de 0,000001 a 200 mg/dm², preferiblemente 0,00001 a 100 mg/dm², más preferiblemente de 0,00005 a 10 mg/dm² del al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas en su superficie. En una realización, el producto es un alimento, pienso, producto farmacéutico, cosmético o producto agrícola. En una realización preferida, el producto es un producto agrícola.

La expresión "productos alimenticios", tal como se utiliza en esta memoria, debe entenderse en un sentido muy amplio e incluye, pero no se limita a: queso, queso para untar, queso rallado, requesón, queso procesado, nata agria, producto cárnico fermentado seco, incluyendo salamis y otros embutidos, vino, cerveza, yogur, zumos y otras bebidas, aliños para ensaladas, aderezo para requesón, salsas, productos de panadería y rellenos de panadería, esmaltes de superficie y la formación de hielo, productos para untar, coberturas de pizzas, confitería y rellenos de pastelería, aceitunas, salmuera de oliva, aceite de oliva, zumos, purés de tomate y pasta, condimentos, y pulpa de la fruta, y productos alimenticios similares.

La expresión "productos de piensos", tal como se utiliza en esta memoria, también debe entenderse en un sentido muy amplio e incluye, pero no se limita a alimentos para mascotas, piensos para pollos de engorde, etc.

La expresión "producto farmacéutico", tal como se utiliza en esta memoria, también debe entenderse en un sentido muy amplio e incluye productos que comprenden una molécula activa tal como un fármaco, agente o compuesto farmacéutico y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable, es decir, cualquier sustancia inerte que se combina con la molécula activa para preparar una forma de dosificación agradable o conveniente.

La expresión "producto cosmético", tal como se utiliza en esta memoria, también debe entenderse en un sentido muy amplio e incluye productos que se utilizan para proteger o tratar tejidos rugosos tales como la piel y los labios, el cabello y las uñas frente al secado mediante la prevención de la transpiración de la humedad de los mismos y, además, el acondicionamiento de los tejidos, así como el proporcionar un buen aspecto a estos tejidos. Productos contemplados por la expresión "producto cosmético" incluyen, pero no se limitan a, cremas hidratantes, productos de limpieza personales, parches de suministro de fármacos oclusivos, esmalte de uñas, polvos, toallitas, acondicionadores para el cabello, emulsiones para el tratamiento de la piel, cremas de afeitado y similares.

La expresión "productos agrícolas", tal como se utiliza en esta memoria, también debe entenderse en un sentido muy amplio e incluye, pero no se limita a cereales, p. ej., trigo, cebada, centeno, avena, arroz, sorgo y similares; remolachas, p. ej., remolacha azucarera y forrajera; frutas con pepitas y frutas con hueso y bayas, p. ej., manzanas, peras, ciruelas, albaricoques, melocotones, almendras, cerezas, fresas, frambuesas y moras; plantas leguminosas, p. ej., habas, lentejas, guisantes, habas de soja; plantas oleaginosas, p. ej., colza, mostaza, amapola, oliva, girasol, coco, planta del aceite de ricino, cacao, cacahuetes; cucurbitáceas, p. ej., calabazas, pepinillos, melones, pepinos, calabazas, berenjenas; plantas fibrosas, p. ej., algodón, lino, cáñamo, yute; cítricos, p. ej., naranjas, limones, pomelos, mandarinas, limas; frutas tropicales, p. ej., papayas, fruta de la pasión, mangos, carambolas, piñas tropicales, plátanos, kiwis; verduras, p. ej., espinaca, lechuga, espárragos, crucíferas tales como coles y nabos, zanahorias, cebollas, tomates, patatas, patatas de siembra, chile picante y pimientos morrones; plantas similares al laurel, p. ej., aguacate, canela, alcanforero; o productos tales como maíz, tabaco, nueces, café, caña de azúcar, té, vides, lúpulo, plantas de caucho, así como plantas ornamentales, p. ej., flores cortadas, rosas, tulipanes, lirios, narcisos, jacintos, azafranes, dalias, gerbera, claveles, crisantemos, fucsias y bulbos de flores, arbustos, árboles de hoja caduca y árboles de hoja perenne tales como coníferas, plantas y árboles de invernaderos. Incluye, pero no se limita a plantas y sus partes, frutas, semillas, esquejes, cultivares, injertos, bulbos, tubérculos, tubérculos radicales, rizomas, flores cortadas y hortalizas.

Un método para preparar una composición según se describe en esta memoria es otro aspecto de la presente invención. El método comprende añadir natamicina a al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilino pirimidinas. Los compuestos pueden añadirse, por ejemplo, por separado a una composición acuosa y mezclarse, seguido, si es necesario, del ajuste del pH, viscosidad, etc. Si se añaden por separado, algunos o todos los compuestos separados pueden estar en forma de polvo, pero, alternativamente, algunos o todos pueden estar también en forma líquida. Los compuestos pueden añadirse, por ejemplo, también el uno al otro en forma de polvo y mezclarse para obtener una composición en polvo. La composición en polvo puede entonces añadirse a una composición acuosa.

25 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Aplicación antes de la cosecha

Hojas de las plantas de banano son inoculadas con hongos. Como control también se incluyen hojas no inoculadas. A continuación, una parte definida de las hojas se trata con la composición 1 (natamicina), la composición 2 (pirimetanil) o la composición 3 (natamicina + pirimetanil). Cada una de las composiciones se aplica por pulverización. Se incluyen también hojas no tratadas (control no tratado).

Los resultados obtenidos demuestran que las composiciones de la presente invención protegen las plantas de banano frente al crecimiento de hongos y, además, demuestran que las composiciones de la presente invención muestran una actividad sinérgicamente reforzada en comparación con la actividad de los compuestos activos aplicados individualmente.

Ejemplo 2

Aplicación post-cosecha

Los plátanos son lesionados de acuerdo con el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Los plátanos son heridos mediante un taladracorchos, seguido de la contaminación con esporas de hongos. Después de la incubación durante varias horas a temperatura ambiente, los plátanos se sumergen en una de las siguientes composiciones: a) sin tratamiento (control 1), b) sumergido en agua (control 2), c) sumergido en natamicina, d) sumergido en pirimetanil, e) sumergido en natamicina + pirimetanil. Después de este tratamiento, las bananas se incubaron en cajas cerradas a 21°C a una humedad elevada. Cada día los plátanos son juzgados visualmente en cuanto al desarrollo de hongos.

Los resultados demuestran que la composición que comprende natamicina y pirimetanil protege plátanos mejor frente a los hongos que la natamicina o pirimetanil solo. Sorprendentemente, la aplicación combinada de natamicina y pirimetanil conduce a una fuerte reducción sinérgica en la infección.

Ejemplo 3

Tratamiento de bananas

Por tratamiento se utilizaron cuatro bananas (verdes) orgánicas. La piel de cada una de las bananas fue lesionada tres veces utilizando un taladracorchos de acuerdo con el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Subsiguientemente, cada una de las lesiones se inoculó con 15 µl de una suspensión de *Fusarium proliferatum* que contenía 1×10^5 esporas/ml. Después de la incubación durante 4 horas a 20°C, cada una de las lesiones de las bananas se trató con 100 µl de una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 1000 ppm ciprodinil o ambos.

Además, las composiciones antifúngicas comprendían 1,00% (p/p) de metilhidroxietilcelulosa (MHEC), 0,40% (p/p) de goma xantano, 0,20% (p/p) de agente antiespumante, 0,30% (p/p) de ácido cítrico, 0,39% (p/p) de ácido láctico y 0,11% (p/p) de sorbato de potasio. Como control se utilizó una composición sin natamicina ni ciprodinil. Las bananas verdes tratadas se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C y una humedad relativa del aire del 95%, que se obtuvo en presencia de una disolución acuosa saturada de Na₂HPO₄. Durante los primeros 20 días de incubación, se incluyó una banana madura (amarilla) en la caja cerrada para elevar el nivel de gas de etileno y, así, para inducir la maduración de las bananas verdes tratadas.

Durante la incubación, se evaluó de dos maneras el grado de desarrollo de moho en las bananas: (i) se contó el número de lesiones por mohos por un total de 12 lesiones; y (ii) se determinó la actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales calculando la reducción en el desarrollo de moho observado en las lesiones de bananas tratadas con la composición antifúngica en comparación con el desarrollo de moho en las lesiones de bananas tratadas con la composición de control. La actividad antifúngica esperada (E en %) de la composición antifúngica combinada que comprende los dos ingredientes activos se calculó de acuerdo con la ecuación de Colby (Colby, 1967):

$$E = X + Y - [(X \cdot Y) / 100]$$

en donde X e Y son las actividades antifúngicas observadas (en %) de los ingredientes activos individuales X e Y, respectivamente. Si la actividad antifúngica observada (O en %) de la combinación excede de la actividad antifúngica esperada (E en %) de la combinación y el factor de sinergia O/E es, por lo tanto, > 1,0, la aplicación combinada de los ingredientes activos conduce a un efecto antifúngico sinérgico.

Los resultados de la Tabla 1 (número de lesiones por mohos por un total de 12 lesiones) y en la Tabla 2 (actividad antifúngica) demuestran claramente que la composición antifúngica que comprende 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de ciprodinil protegía mejor a las bananas frente al desarrollo de moho que natamicina o ciprodinil solo.

Después de 23 días de incubación, todas las 12 lesiones tratadas con la composición de control o con ciprodinil solo mostraron el desarrollo de moho, mientras que 9 de las 12 lesiones tratadas con natamicina sola tenían moho. Sin embargo, se observó el desarrollo de moho sólo para 6 de las 12 lesiones tratadas con la composición que comprende tanto natamicina como ciprodinil (véase la Tabla 1).

Después de 27 días de incubación, todas las 12 lesiones tratadas con la composición de control, natamicina sola o ciprodinil solo mostraron el desarrollo de moho. Sin embargo, se observó el desarrollo de moho sólo para 7 de las 12 lesiones tratadas con la composición que comprende tanto natamicina como ciprodinil (véase la Tabla 1). Además de ello, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como ciprodinil era un 13% más alta que la actividad antifúngica esperada y se obtuvo un factor de sinergia de > 1,0 (véase la Tabla 2).

Después de 39 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como ciprodinil era un 6% superior a la actividad antifúngica esperada y se obtuvo un factor de sinergia de > 1,0 (véase la Tabla 2).

Por lo tanto, la combinación de 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de ciprodinil tiene actividad antifúngica sinérgica sobre las bananas.

Ejemplo 4

Tratamiento de bananas

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada una de las lesiones de las bananas inoculadas se trató con 100 µl de una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 500 ppm de ciprodinil o ambos. El grado de desarrollo de moho en las lesiones de las bananas se evaluó de acuerdo con los dos métodos descritos en el Ejemplo 3.

Los resultados de la Tabla 3 (número de lesiones por mohos por un total de 12 lesiones) y en la Tabla 4 (actividad antifúngica) revelan que la composición antifúngica que comprende 250 ppm de natamicina, así como 500 ppm de ciprodinil era superior a las composiciones que comprenden natamicina sola o ciprodinil solo en la reducción del desarrollo de moho en las bananas.

Después de 18 y 21 días de incubación, todas las 12 lesiones tratadas con la composición de control, natamicina sola o ciprodinil solo mostraron desarrollo de moho. Sin embargo, cuando se trata con la composición que comprende tanto natamicina como ciprodinil, sólo 6 de las 12 lesiones tenían moho después de 18 días y 7 de las 12 lesiones tenían moho después de 21 días (véase la Tabla 3).

Además de ello, después de 21 días de incubación, la actividad antifúngica realmente observada de la composición que comprende tanto natamicina como ciprodinil era un 23% más alta que la actividad antifúngica esperada, lo que resultó en un factor de sinergia de 1,5 (véase la Tabla 4).

Además, después de 32 y 34 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como ciprodinil era $\geq 30\%$ más alta que la actividad antifúngica esperada. Por consiguiente, los factores de sinergia excedieron en mucho 1,0 (véase la Tabla 4).

5 En conclusión, los resultados de este ejemplo demuestran claramente que la actividad antifúngica de la combinación de 250 ppm de natamicina y 500 ppm de ciprodinil cuando se aplica sobre bananas es altamente sinérgica.

Ejemplo 5

Tratamiento de bananas

10 El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada una de las lesiones de las bananas inoculadas se trató con 100 μl de una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 50 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 250 ppm de ciprodinil o ambos. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados en las lesiones de las bananas se determinó de acuerdo con el método descritos en el Ejemplo 3.

15 Los resultados (véase la Tabla 5) demuestran que la composición antifúngica que comprende 50 ppm de natamicina y 250 ppm de ciprodinil protegía a las bananas más eficazmente frente al desarrollo de moho que las composiciones que comprendían natamicina o ciprodinil solo.

Después de 23, 29, 32 y 36 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como ciprodinil era un 10 a un 21% más alta que la actividad antifúngica esperada. El factor de sinergia varió de 2,3 a > 10 después de 23 y 36 días de incubación, respectivamente.

20 Por lo tanto, la aplicación combinada de 50 ppm de natamicina y 250 ppm de ciprodinil conduce a una reducción sinérgica sorprendentemente fuerte en el desarrollo de moho sobre las bananas.

Ejemplo 6

Tratamiento de bananas

25 El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada una de las lesiones de las bananas inoculadas se trató con 100 μl de una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 500 ppm de pirimetanil o ambos. Como control se utilizó una composición sin natamicina ni pirimetanil. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados en las lesiones de las bananas se determinó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3.

30 Los resultados (véase la Tabla 6) demuestran claramente que la composición antifúngica combinada que comprende 250 ppm de natamicina y 500 ppm pirimetanil tenía una actividad antifúngica mucho más fuerte sobre las bananas que las composiciones que comprendían natamicina o pirimetanil solo.

Después de 23, 29, 32 y 34 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como pirimetanil era un 4 a 11% superior a la actividad antifúngica esperada. Como resultado, todos los factores de sinergia excedieron de 1,0 y aumentaron de 1,5 el día 23 a > 11 el día 34.

35 Por lo tanto, la actividad antifúngica de la combinación de 250 ppm de natamicina y 500 ppm de pirimetanil es fuertemente sinérgica cuando se aplica sobre bananas.

Ejemplo 7

Tratamiento de fresas

40 Por tratamiento se utilizaron doce fresas frescas, orgánicas. Cada una de las fresas fue lesionada con un corte de 0,5 mm de longitud y cada una de las lesiones se inoculó con 10 μl de una suspensión de *Botrytis cinerea* que contiene 1×10^5 esporas/ml. Después de un período de incubación de 2 horas a 20°C, cada una de las fresas se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 500 ppm pirimetanil o ambos. La composición antifúngica también comprendía 1,00% (p/p) de metilhidroxietilcelulosa (MHEC), 0,40% (p/p) de goma xantano, 0,20% (p/p) de agente antiespumante, 0,30% (p/p) de ácido cítrico, 0,39 % (p/p) de ácido láctico y 0,11% (p/p) de sorbato de potasio. Como control se utilizó una composición sin natamicina ni pirimetanil.

50 Las fresas tratadas se incubaron durante tres días en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C y se evaluaron diariamente en cuanto al desarrollo de moho. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales se determinó calculando la reducción en el desarrollo de moho observada en las fresas tratadas con la composición antifúngica en comparación con el desarrollo de moho en las fresas tratadas con la composición de control. La actividad antifúngica esperada (E en %) de la composición antifúngica combinada que comprende los dos ingredientes activos se calculó de acuerdo con la ecuación de Colby (Colby, 1967):

ES 2 531 585 T3

$$E = X + Y - [(X \cdot Y) / 100]$$

en donde X e Y son las actividades antifúngicas observadas (en %) de los ingredientes activos individuales X e Y, respectivamente. Si la actividad antifúngica observada (O en %) de la combinación excede de la actividad antifúngica esperada (E en %) de la combinación y el factor de sinergia O/E es, por lo tanto, > 1,0, la aplicación combinada de los ingredientes activos conduce a un efecto antifúngico sinérgico.

Los resultados (véase la Tabla 7) demuestran que la composición antifúngica que comprende 250 ppm de natamicina y 500 ppm de pirimetanil protegía a las fresas mucho mejor frente al desarrollo de moho que natamicina o pirimetanil solo.

Después de 1, 2 y 3 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición combinada que comprende natamicina y pirimetanil era, respectivamente, 25, 21 y 14% superior a la actividad antifúngica esperada. Los factores de sinergia correspondientes oscilaban entre 1,6 y 2,0.

Por lo tanto, la aplicación combinada de 250 ppm de natamicina y 500 ppm de pirimetanil conduce a una reducción sinérgica en el desarrollo de moho en las fresas.

Ejemplo 8

Tratamiento de mandarinas

Por tratamiento se utilizaron diez mandarinas frescas, orgánicas. La cáscara de cada una de las mandarinas fue lesionada una vez utilizando un taladracorchos de acuerdo con el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Subsiguientemente, cada una de las lesiones se inoculó con 10 µl de una suspensión de *Penicillium italicum* que contenía 1×10^4 esporas/ml. Después de incubación durante 2 horas a 20°C, las mandarinas se sumergieron individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 500 ppm de ciprodinil o ambos. Además, la composición antifúngica comprendía 3,1% (p/p) de cera de abejas, 0,76% (p/p) de glicerol, 0,66% (p/p) de monoestearato de polioxietileno-sorbitán (Tween 60), 0,03% (p/p) de metilhidroxietilcelulosa (MHEC), 0,02% (p/p) de goma xantano, 0,02% (p/p) de agente anti-espumante, 0,15% (p/p) de ácido cítrico y 0,01% (p/p) de sorbato de potasio. Como control se utilizó una composición sin natamicina ni ciprodinil.

Las mandarinas tratadas se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C y se evaluaron en el desarrollo de moho después de 16, 19, 22 y 26 días de incubación. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales se determinó mediante el cálculo de la reducción en el desarrollo de moho en las mandarinas observadas tratadas con la composición antifúngica en comparación con el desarrollo de moho en las mandarinas tratadas con la composición de control. La actividad antifúngica esperada (E en %) de la composición antifúngica combinada que comprende los dos ingredientes activos se calculó de acuerdo con la ecuación de Colby (Colby, 1967):

$$E = X + Y - [(X \cdot Y) / 100]$$

en donde X e Y son las actividades antifúngicas observadas (en %) de los ingredientes activos individuales X e Y, respectivamente. Si la actividad antifúngica observada (O en %) de la combinación excede de la actividad antifúngica esperada (E en %) de la combinación y el factor de sinergia O/E es, por lo tanto > 1,0, la aplicación combinada de los ingredientes activos conduce a un efecto antifúngico sinérgico.

Los resultados (véase la Tabla 8) demuestran claramente que la composición antifúngica que comprende 250 ppm de natamicina y 500 ppm de ciprodinil era superior a las composiciones que comprenden natamicina o ciprodinil solo en la prevención del desarrollo de moho en las mandarinas.

Después de 16, 19, 22 y 26 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como ciprodinil era un 31 a 62% más alta que la actividad antifúngica esperada. Por consiguiente, todos los factores de sinergia excedían de 1,0 y aumentaban de 1,5 el día 16 a 4,3 el día 26.

Por lo tanto, los resultados de este ejemplo demuestran claramente la actividad antifúngica sinérgica entre 250 ppm de natamicina y 500 ppm de ciprodinil en mandarinas.

Ejemplo 9

Tratamiento de las mandarinas

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 8, excepto por el hecho de que cada una de las mandarinas lesionadas inoculadas se sumergió de forma individual durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprende 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 1000 ppm de pirimetanil o ambos. Como control se utilizó una composición sin natamicina ni pirimetanil. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados en las lesiones de bananas se evaluó después de 22 y 26 días de incubación de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 8.

Los resultados en la Tabla 9 demuestran que la composición antifúngica que comprende 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de pirimetanil reducía el desarrollo de moho en las mandarinas de una manera más eficaz que la natamicina o pirimetanil solo.

- 5 Después de 22 y 26 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como pirimetanil excedió la actividad antifúngica esperada con respectivamente 11 y 13% y se obtuvieron factores de sinergia > 1.0.

Por lo tanto, puede concluirse que la aplicación combinada de 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de pirimetanil conduce a una reducción sinérgica en el desarrollo de moho en las mandarinas.

Ejemplo 10

10 *Tratamiento de mandarinas*

15 El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 8, excepto por el hecho de que cada una de las mandarinas lesionadas inoculadas se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 500 ppm de pirimetanil o ambos. Como control se utilizó una composición sin natamicina ni pirimetanil. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados en las lesiones de bananas se evaluó después de 19, 22 y 26 días de incubación de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 8.

Los resultados (véase la Tabla 10) revelan que la composición antifúngica que comprende 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de pirimetanil tenía una actividad antifúngica sobre las mandarinas mayor que las composiciones que comprenden natamicina o pirimetanil solo.

- 20 Después de 19, 22 y 26 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como pirimetanil excedió de la actividad antifúngica esperada con 15, 21 y 29%, respectivamente, y se obtuvieron factores de sinergia > 1,0.

En conclusión, la actividad antifúngica de la combinación de ingrediente activo de 250 ppm de natamicina y 500 ppm de pirimetanil es sinérgica cuando se aplica sobre mandarinas.

25 **Ejemplo 11**

Actividad antifúngica in vitro

Para demostrar la actividad sinérgica de la combinación de natamicina con ciprodinil o pirimetanil, se realizó un ensayo *in vitro* utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos. Se sometieron a ensayo las siguientes composiciones:

- 30 - Control (sin ingrediente activo),
 - 0,63 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos),
 - 1,25 ppm de natamicina,
 - 10 ppm de ciprodinil,
 - 20 ppm de ciprodinil,
 35 - 17,5 ppm de pirimetanil,
 - 30 ppm de pirimetanil,
 - 0,63 ppm de natamicina + 20 ppm de ciprodinil,
 - 0,63 ppm de natamicina + 30 ppm de pirimetanil,
 - 1,25 ppm de natamicina + 10 ppm de ciprodinil,
 40 - 1,25 ppm de natamicina + 17,5 ppm de pirimetanil.

45 Después de llenar cada uno de los pocillos con 92 µl de medio PCB, se añadieron natamicina y ciprodinil o pirimetanil a partir de soluciones madre separadas, preparadas en medio PCB o metanol, lo que resultó en un volumen intermedio de 100 µl por pocillo. Subsiguientemente, se utilizaron 100 µl de una suspensión de *Botrytis cinerea*, preparada en medio PCB, para inocular cada uno de los pocillos con $2,5 \times 10^3$ esporas/ml. Cada pocillo contenía, por lo tanto, un volumen final de 200 µl y < 1% de metanol, que no afectaba al desarrollo de hongos (datos no mostrados).

Después de la incubación de las placas de microtitulación durante 5 días a 25°C, se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* (%) de los ingredientes activos individuales calculando la reducción en el desarrollo de moho observada en presencia del ingrediente activo en comparación con el desarrollo de moho observado en ausencia del ingrediente activo. La actividad antifúngica esperada (E en %) de la combinación de ingredientes activos se calculó de acuerdo con la ecuación de Colby (Colby, 1967):

$$E = X + Y - [(X \cdot Y) / 100]$$

en donde X e Y son las actividades antifúngicas observadas (en %) de los ingredientes activos individuales X e Y, respectivamente. Si la actividad antifúngica observada (O en %) de la combinación excede la actividad antifúngica esperada (E en %) de la combinación y el factor de sinergia resultante O/E es, por lo tanto, > 1,0, la aplicación combinada de los ingredientes activos conduce a un efecto antifúngico sinérgico.

Los resultados (véase la Tabla 11) demuestran que las combinaciones de natamicina + ciprodinil y natamicina + pirimetanil tenían actividades antifúngicas mucho más fuertes frente a *Botrytis cinerea* que natamicina, ciprodinil y pirimetanilo individualmente. Además de ello, las actividades antifúngicas observadas de las combinaciones de natamicina + ciprodinil y natamicina + pirimetanil eran un 50 a 100% mayores que las actividades antifúngicas esperadas, lo que resulta en factores de sinergia muy por encima de 1,0.

Por lo tanto, la aplicación combinada de natamicina y ciprodinil, así como la aplicación combinada de natamicina y pirimetanil inhiben sinérgicamente el desarrollo de *Botrytis cinerea*.

Ejemplo 12

Actividad antifúngica in vitro

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 11, excepto por el hecho de que se sometieron a ensayo las siguientes composiciones:

- Control (sin ingrediente activo),
- 1,25 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos),
- 125 ppm de ciprodinil,
- 1,25 ppm de natamicina + 125 ppm de ciprodinil,
- 2,5 ppm de natamicina,
- 275 ppm de pirimetanil,
- 2,5 ppm de natamicina + 275 ppm de pirimetanil.

Además, para la inoculación se utilizó *Fusarium proliferatum*. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados se determinó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 11.

Los resultados (véase la Tabla 12) revelan que las combinaciones de ingredientes activos natamicina + ciprodinil y natamicina + pirimetanil inhiben el desarrollo de *Fusarium proliferatum* más eficazmente que natamicina, ciprodinil y pirimetanil individualmente. Además de ello, las actividades antifúngicas observadas de combinaciones de ingrediente activo de natamicina + ciprodinil y natamicina + pirimetanil eran 100% más altas que las actividades antifúngicas esperadas, lo que resulta en factores de sinergia muy por encima de 1,0.

Por lo tanto, la aplicación combinada de natamicina y ciprodinil y la aplicación combinada de natamicina y pirimetanil conducen ambas a una fuerte reducción sinérgica en el desarrollo de *Fusarium proliferatum*.

Tabla 1. Número de lesiones por mohos en bananas incubadas a 20°C después de tratamiento con composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de ciprodinil o ambos.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Número de lesiones por mohos/número total de 12 lesiones
Control	23	12/12
Natamicina 500 ppm		9/12
Ciprodinil 1000 ppm		12/12
Natamicina 500 ppm + ciprodinil 1000 ppm		6/12
Control	27	12/12
Natamicina 500 ppm		12/12
Ciprodinil 1000 ppm		12/12

Natamicina 500 ppm + ciprodinil 1000 ppm		7/12
--	--	------

Tabla 2. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 1000 ppm de ciprodinil o ambos en bananas incubadas a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	27	0	-	-
Natamicina 500 ppm		63	-	-
Ciprodinil 1000 ppm		18	-	-
Natamicina 500 ppm + ciprodinil 1000 ppm		83	70	1,2
Control	39	0	-	-
Natamicina 500 ppm		11	-	-
Ciprodinil 1000 ppm		0	-	-
Natamicina 500 ppm + ciprodinil 1000 ppm		17	11	1,6

5

Tabla 3. Número de lesiones por mohos en bananas incubadas a 20°C después de tratamiento con composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de ciprodinil o ambos.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Número de lesiones por mohos/número total de 12 lesiones
Control	18	12/12
Natamicina 250 ppm		12/12
Ciprodinil 500 ppm		12/12
Natamicina 250 ppm + ciprodinil 500 ppm		6/12
Control	21	12/12
Natamicina 250 ppm		12/12
Ciprodinil 500 ppm		12/12
Natamicina 250 ppm + ciprodinil 500 ppm		7/12

10 Tabla 4. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de ciprodinil o ambos en bananas incubadas a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	21	0	-	-
Natamicina 250 ppm		10	-	-
Ciprodinil 500 ppm		35	-	-
Natamicina 250 ppm + ciprodinil 500 ppm		64	41	1,5
Control	32	0	-	-
Natamicina 250 ppm		2	-	-
Ciprodinil 500 ppm		3	-	-
Natamicina 250 ppm + ciprodinil 500 ppm		36	5	7,0
Control	34	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Ciprodinil 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + ciprodinil 500 ppm		30	0	> 30

15 Tabla 5. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 50 ppm de natamicina, 250 ppm ciprodinil o ambos en bananas incubadas a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	23	0	-	-
Natamicina 50 ppm		12	-	-
Ciprodinil 250 ppm		0	-	-
Natamicina 50 ppm + ciprodinil 250 ppm		28	12	2,3
Control	29	0	-	-
Natamicina 50 ppm		4	-	-
Ciprodinil 250 ppm		0	-	-
Natamicina 50 ppm + ciprodinil 250 ppm		25	4	6,3
Control	32	0	-	-
Natamicina 50 ppm		1	-	-
Ciprodinil 250 ppm		0	-	-
Natamicina 50 ppm + ciprodinil 250 ppm		19	1	19
Control	36	0	-	-
Natamicina 50 ppm		0	-	-
Ciprodinil 250 ppm		0	-	-
Natamicina 50 ppm + ciprodinil 250 ppm		10	0	> 10

Tabla 6. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de pirimetanil o ambos en bananas incubadas a 20°C.

5

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	23	0	-	-
Natamicina 250 ppm		19	-	-
Pirimetanil 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + pirimetanil 500 ppm		28	19	1,5
Control	29	0	-	-
Natamicina 250 ppm		9	-	-
Pirimetanil 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + pirimetanil 500 ppm		13	9	1,5
Control	32	0	-	-
Natamicina 250 ppm		2	-	-
Pirimetanil 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + pirimetanil 500 ppm		10	2	5,0
Control	34	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Pirimetanil 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + pirimetanil 500 ppm		11	0	> 11

Tabla 7. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de pirimetanil o ambos en fresas incubadas a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	1	0	-	-
Natamicina 250 ppm		25	-	-
Pirimetanil 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + pirimetanil 500 ppm		50	25	2,0

Control	2	0	-	-
Natamicina 250 ppm		31	-	-
Pirimetaniil 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + pirimetaniil 500 ppm		52	31	1,7
Control	3	0	-	-
Natamicina 250 ppm		24	-	-
Pirimetaniil 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + pirimetaniil 500 ppm		38	24	1,6

Tabla 8. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de ciprodinil o ambos en mandarinas incubadas a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	16	0	-	-
Natamicina 250 ppm		15	-	-
Ciprodinil 500 ppm		60	-	-
Natamicina 250 ppm + ciprodinil 500 ppm		97	66	1,5
Control	19	0	-	-
Natamicina 250 ppm		5	-	-
Ciprodinil 500 ppm		38	-	-
Natamicina 250 ppm + ciprodinil 500 ppm		92	41	2,3
Control	22	0	-	-
Natamicina 250 ppm		5	-	-
Ciprodinil 500 ppm		20	-	-
Natamicina 250 ppm + ciprodinil 500 ppm		86	24	3,5
Control	26	0	-	-
Natamicina 250 ppm		5	-	-
Ciprodinil 500 ppm		13	-	-
Natamicina 250 ppm + ciprodinil 500 ppm		73	17	4,3

5

Tabla 9. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 1000 ppm de pirimetaniil o ambos en mandarinas incubadas a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	22	0	-	-
Natamicina 500 ppm		37	-	-
Pirimetaniil 1000 ppm		82	-	-
Natamicina 500 ppm + pirimetaniil 1000 ppm		100	89	1,1
Control	26	0	-	-
Natamicina 500 ppm		30	-	-
Pirimetaniil 1000 ppm		79	-	-
Natamicina 500 ppm + pirimetaniil 1000 ppm		98	85	1,1

10

Tabla 10. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de pirimetanil o ambos en mandarinas incubadas a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	19	0	-	-
Natamicina 250 ppm		5	-	-
Pirimetanil 500 ppm		84	-	-
Natamicina 250 ppm + pirimetanil 500 ppm		100	85	1,2
Control	22	0	-	-
Natamicina 250 ppm		5	-	-
Pirimetanil 500 ppm		74	-	-
Natamicina 250 ppm + pirimetanil 500 ppm		96	75	1,3
Control	26	0	-	-
Natamicina 250 ppm		5	-	-
Pirimetanil 500 ppm		65	-	-
Natamicina 250 ppm + pirimetanil 500 ppm		96	67	1,4

5 Tabla 11. Actividad antifúngica *in vitro* (%) de natamicina en combinación con ciprodinil o pirimetanil frente a *Botrytis cinerea* después de 5 días de incubación a 25°C.

Composición antifúngica	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	0	-	-
Natamicina 0,63 ppm	0	-	-
Ciprodinil 20 ppm	0	-	-
Pirimetanil 30 ppm	50	-	-
Natamicina 0,63 ppm + ciprodinil 20 ppm	100	0	> 100
Natamicina 0,63 ppm + pirimetanil 30 ppm	100	50	2
Control	0	-	-
Natamicina 1,25 ppm	0	-	-
Ciprodinil 10 ppm	0	-	-
Pirimetanil 17,5 ppm	50	-	-
Natamicina 1,25 ppm + pirimetanil 10 ppm	100	0	> 100
Natamicina 1,25 ppm + pirimetanil 17,5 ppm	100	50	2

10 Tabla 12. Actividad antifúngica *in vitro* (%) de natamicina en combinación con ciprodinil o pirimetanil frente a *Fusarium proliferatum* después de 5 días de incubación a 25°C.

Composición antifúngica	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	0	-	-
Natamicina 1,25 ppm	0	-	-
Ciprodinil 125 ppm	0	-	-
Natamicina 1,25 ppm + ciprodinil 125 ppm	100	0	> 100
Control	0	-	-
Natamicina 2,5 ppm	0	-	-
Pirimetanil 275 ppm	0	-	-
Natamicina 2,5 ppm + pirimetanil 275 ppm	100	0	> 100

REFERENCIAS

- Colby SR (1967), Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combination. *Weeds* 15: 20-22.
- 5 Kanetis L, Forster H, Jones CA, Borkovich KA and Adaskaveg JE (2008), Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* 98: 2005-214.
- Lapeyre de Bellaire de L and Dubois C (1987), Distribution of Thiabendazole-Resistant *Colletotrichum musae* Isolates from Guadeloupe Banana Plantations. *Plant disease* 81:1378-1383.
- 10 Moyano C, Gomez V and Melgarejo P (2004), Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *J. Phytopathology* 152: 484-490.
- Slinker BK (1998), The Statistics of Synergism. *Journal of Mol. and Cell. Cardiology* 30:723-731.
- Xiao CL, Kim YK and Boal RJ (2011), First report of occurrence of pyrimethanil resistance in *Penicillium expansum*, from stored apples in Washington State. *Plant Disease* 95: 72.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilinopirimidinas.
- 5 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilinopirimidinas se selecciona del grupo que consiste en ciprodinil, mepanipirim y pirimetanil.
- 10 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la composición comprende, además, al menos un compuesto adicional seleccionado del grupo que consiste en un agente de pegajosidad, un soporte, un agente colorante, un coloide protector, un adhesivo, un herbicida, un fertilizante, un agente espesante, un agente secuestrante, un agente tixotrópico, un tensioactivo, un compuesto antimicrobiano adicional, un detergente, un conservante, un agente de extensión, una carga, un aceite de pulverización, un aditivo de flujo, una sustancia mineral, un disolvente, un dispersante, un emulsionante, un agente humectante, un estabilizador, un agente antiespumante, un agente tampón, un absorbedor UV y un antioxidante.
- 15 4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cantidad de natamicina está en el intervalo de 0,005 g/l a 100 g/l y la cantidad de al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilinopirimidinas está en el intervalo de 0,0001 g/l a 2000 g/l.
5. Un kit que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de anilinopirimidinas.
6. Un método para proteger a un producto frente a los hongos, tratando el producto con natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de anilinopirimidinas.
- 20 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el producto se trata con una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un kit de acuerdo con la reivindicación 5.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en el que el producto se selecciona del grupo que consiste en un producto alimenticio, un producto de pienso, un producto farmacéutico, un producto cosmético y un producto agrícola.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el producto es un producto agrícola.
- 25 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el producto se trata después de la cosecha.
11. Un producto que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de las anilinopirimidinas.
- 30 12. Un producto de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el producto se selecciona del grupo que consiste en un producto alimenticio, un producto de pienso, un producto farmacéutico, un producto cosmético y un producto agrícola.
13. Un producto de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el producto es un producto agrícola.