

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 378**

51 Int. Cl.:

A01N 43/90 (2006.01)
A01N 43/56 (2006.01)
A01N 47/18 (2006.01)
A01N 45/02 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2012 E 12706264 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2680699**

54 Título: **Nuevas composiciones antifúngicas**

30 Prioridad:

03.03.2011 EP 11156788

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

22.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 534 378 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 controlar enfermedades de las plantas y para prevenir la putrefacción microbiana de las cosechas.

Antecedentes de la invención

10 Se estima que alrededor de 25% de la producción mundial de cosechas se pierde debido a putrefacción microbiana, de la cual la putrefacción por hongos es de lejos 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 la putrefacción de productos alimentarios. Después de todo, en muchas partes del mundo las personas sufren hambre.

El éxito a la hora de combatir enfermedades de las plantas y de las cosechas y a la hora de reducir el daño que provocan a los rendimientos y a la calidad depende en gran medida de la aplicación oportuna de fungicidas. El uso prolongado y frecuente de muchos fungicidas, tales como, por ejemplo, bencimidazoles, ha contribuido a reducir su eficacia gracias al desarrollo del fenómeno de resistencia.

15 Una clase importante de fungicidas son los pirazoles. Los fungicidas pirazólicos han atraído la atención de muchas compañías industriales. Esto condujo a la producción comercial de, por ejemplo, furametpir, usado para controlar el añublo de la vaina del arroz, y pentiopirad, que tiene actividad frente a moho gris, oídio, sarna del manzano, royas, *Rhizoctonia* y *Botrytis* (véase, por ejemplo, Vicentini et al. 2007). En el documento WO 2010/091803, se describe el uso de inhibidores de succinato deshidrogenasa, tales como pentiopirad, fluopiram, bixafeno e isopirazam, para prolongar el período de caducidad y la estabilidad del almacenamiento de frutas y vegetales. A pesar de su actual sensibilidad a fungicidas pirazólicos, hay un gran riesgo de que muchos hongos adquirirán resistencia frente a estos fungicidas con el tiempo.

25 Durante muchas décadas, el antimicótico macrólido poliénico natamicina se ha usado para prevenir el crecimiento fúngico en productos alimentarios tales como quesos y embutidos. Este conservante natural, que se produce mediante fermentación usando *Streptomyces natalensis*, se usa ampliamente por todo el mundo como conservante alimentario, y tiene un largo historial de uso seguro en la industria alimentaria. En el documento US 5.597.598, se describe el uso de una composición antifúngica que comprende un compuesto antifúngico poliénico, un compuesto antifúngico ácido, y un ácido orgánico adicional o su sal de metal alcalino o alcalino-térreo, para tratar productos alimentarios y agrícolas. La natamicina es muy eficaz frente a todos los hongos responsables de la putrefacción de los alimentos. Aunque la natamicina se ha aplicado, por ejemplo, en la industria quesera durante muchos años, hasta ahora nunca se ha observado el desarrollo de especies fúngicas resistentes.

30 En consecuencia, se puede concluir que hay una necesidad importante de composiciones antimicrobianas más eficaces, más amigables desde el punto de vista medioambiental, con menor toxicidad y menos dañinas, por ejemplo composiciones antifúngicas, para el tratamiento del crecimiento fúngico en y sobre plantas y cosechas.

35 Descripción de la invención

La presente invención resuelve el problema al proporcionar una nueva composición antimicrobiana, por ejemplo antifúngica, sinérgica que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabezazol y sedaxano. Como se usa aquí, el término "sinérgica" significa que el efecto combinado de los compuestos antifúngicos cuando se usan en combinación es mayor que sus efectos aditivos cuando se usan individualmente.

40 En general, la actividad sinérgica de dos ingredientes activos se puede ensayar, por ejemplo, en el análisis de modelo de varianza usando el estrato de interacción de tratamiento (véase Slinker, 1998). La eficacia relativa se puede calcular por medio de la siguiente fórmula: $((\text{valor del estado de evolución del control no tratado} - \text{valor del estado de evolución de la composición})/(\text{valor del estado de evolución del control no tratado})) * 100$. Entonces se puede calcular un coeficiente de interacción por medio de la siguiente fórmula: $((\text{eficacia relativa de la combinación compuesto A} + \text{ compuesto B})/(\text{eficacia relativa de compuesto A} + \text{ eficacia relativa de compuesto B})) * 100$. Un coeficiente de interacción mayor que 100 indica sinergia entre los compuestos.

50 Como alternativa, 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 del moho observada en productos tratados con los ingredientes activos en comparación con el crecimiento del moho en productos tratados con una composición de control. La actividad antifúngica esperada (E en %) de la composición antifúngica combinada que comprende ambos ingredientes activos se puede calcular según la ecuación de Colby (Colby, 1967): $E = X + Y - [(X \cdot Y)/100]$, en la que 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

55

actividad antifúngica esperada (E en %) de la combinación y el factor de sinergia O/E es de este modo $> 1,0$, la aplicación combinada de los ingredientes activos conduce a un efecto antifúngico sinérgico.

5 El al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos se selecciona del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano. En una realización, las composiciones también pueden contener dos o más compuestos antifúngicos diferentes de la familia de fungicidas pirazólicos. Los ejemplos de productos comerciales que contienen fungicidas pirazólicos, tales como bixafeno, son los productos con los nombres comerciales Aviator® 235 Xpro™ y Siltra® Xpro™. Dichos productos comerciales se pueden incorporar en la presente invención.

10 El compuesto antifúngico poliénico usado en las composiciones de la invención es natamicina. Los ejemplos de productos comerciales que contienen natamicina son los productos con el nombre comercial Delvolid®. Tales productos se producen por DSM Food Specialties (Países Bajos), y pueden ser sólidos que contienen, por ejemplo, 50% (p/p) de natamicina, o líquidos que comprenden, por ejemplo, entre 2-50% (p/v) de natamicina. Dichos productos comerciales se pueden incorporar en las composiciones de la invención.

15 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 fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano. Más preferiblemente, la cantidad es de 0,001 g/l a 1000 g/l.

20 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 vehículo, 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 para la fluidez, una sustancia mineral, un disolvente, un dispersante, un emulsionante, un agente humectante, un estabilizante, un agente antiespumante, un agente tamponante, un absorbente de UV y un antioxidante. Un compuesto antifúngico antimicrobiano adicional puede ser un compuesto antifúngico (por ejemplo imazalilo, tiabendazol o clortalonilo) o un compuesto para combatir insectos, nematodos, ácaros y/o bacterias. Por supuesto, las composiciones según la invención también pueden comprender dos o más de cualquiera de los compuestos adicionales anteriores. Cualquiera de los compuestos adicionales mencionados anteriormente también se puede combinar con natamicina y/o el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano, en el caso de que los compuestos antifúngicos se apliquen separadamente. En una realización, los compuestos adicionales son aditivos aceptables para el uso específico, por ejemplo, alimentos, piensos, medicina, cosmética o agricultura. Los compuestos adicionales adecuados para uso en alimentos, piensos, medicina, cosmética o agricultura son conocidos por la persona experta en la técnica.

40 En una realización específica, el compuesto antimicrobiano adicional es un compuesto natural para la protección de cosechas que pertenece al grupo de fosfitos, por ejemplo KH_2PO_3 o K_2HPO_3 , o una mezcla de ambas sales de fosfito. Compuestos que contienen fosfito, como se usa aquí, significa compuestos que comprenden un grupo fosfito, es decir, PO_3 (en forma de, por ejemplo H_2PO_3^- , HPO_3^{2-} o PO_3^{3-}), o cualquier compuesto que permita la liberación de un ion fosfito, incluyendo compuestos tales como ácido fosforoso y ácido fosfónico, así como sus derivados, tales como ésteres y/o sales de metales alcalinos o de metales alcalino-térreos de los mismos. En el caso de que las composiciones de la presente invención comprendan natamicina y al menos un compuesto que contiene fosfito, preferiblemente comprenden 0,1 g o menos de lignosulfonato, más preferiblemente 0,1 g o menos de polifenol, por gramo de compuesto antifúngico poliénico. Preferiblemente, comprenden 0,01 g o menos de lignosulfonato, más preferiblemente 0,01 g o menos de polifenol, por gramo de natamicina. En particular, están libres de lignosulfonato y preferiblemente libres de polifenol. Los ejemplos adecuados de compuestos que contienen fosfito son ácido fosforoso y sus sales (de metal alcalino o de metal alcalino-térreo), tales como fosfito de potasio, por ejemplo KH_2PO_3 y K_2HPO_3 , fosfitos de sodio y fosfitos de amonio, y ésteres alquílicos de (C₁-C₄) de ácido fosforoso y sus sales, tales como etilfosfito de aluminio (fosetilo-Al), etilfosfito de calcio, isopropilfosfito de magnesio, isobutilfosfito de magnesio, sec-butilfosfito de magnesio y N-butilfosfito de aluminio. Por supuesto, también están englobadas mezclas de compuestos que contienen fosfito. Una mezcla de, por ejemplo, KH_2PO_3 y K_2HPO_3 se puede obtener fácilmente añadiendo, por ejemplo, KOH o K_2CO_3 a un pH final de 5,0-6,0 a una disolución de KH_2PO_3 . Como se indica anteriormente, en las composiciones de la presente invención también se pueden incluir compuestos de tipo precursores, que en la cosecha o planta se metabolizan en compuestos de fosfito. Los ejemplos son fosfonatos tales como complejo de fosetilo-aluminio. Por ejemplo, en una cosecha o planta, la parte de fosfonato de etilo de esta molécula se metaboliza en un fosfito. Un ejemplo de tal compuesto es el producto comercial de hidrogenofosfonato de etilo denominado Aliette® (Bayer, Alemania). La relación de fosfito a natamicina (en peso) en las composiciones está generalmente 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).

Las composiciones según la invención pueden tener un pH de 1 a 10, preferiblemente de 2 a 9, más preferiblemente de 3 a 8, y lo más preferible de 4 a 7. Pueden ser sólidas, por ejemplo 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 del uso se han de diluir con un diluyente adecuado tal como agua o un sistema de tampón. Como alternativa, las composiciones de la invención también se pueden usar para preparar emulsiones de revestimiento. Las composiciones de la presente invención también pueden tener la forma de productos secos concentrados tales como, por ejemplo, polvos, gránulos y comprimidos. Se pueden usar para preparar composiciones para inmersión o pulverización de productos tales como productos agrícolas, incluyendo plantas, cosechas, vegetales y/o frutas. Por supuesto, lo anterior también es aplicable cuando se aplican como composiciones separadas natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos listada anteriormente.

La natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano pueden estar presentes en dos paquetes separados, por ejemplo 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 comprender instrucciones para aplicar los compuestos.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para proteger un producto frente a hongos al tratar el producto agrícola con natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano. Además, el producto se puede tratar con otros compuestos antifúngicos y/o antimicrobianos, ya sea antes de, concomitantemente con o después del tratamiento de los productos con natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano. El producto se puede tratar mediante aplicación secuencial de natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos listada anteriormente, o viceversa. Como alternativa, el producto se puede tratar mediante aplicación simultánea de natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano. En el caso de la aplicación simultánea, los compuestos pueden estar presentes en diferentes composiciones que se aplican simultáneamente, o los compuestos pueden estar presentes en una única composición. En todavía otra realización, el producto se puede tratar mediante modos separados o alternos de aplicación de los compuestos antifúngicos. En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de productos aplicando natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano a los productos. Aplicando los compuestos, se puede prevenir el crecimiento fúngico sobre o en los productos. En otras palabras, los compuestos protegen los productos del crecimiento fúngico y/o de la infección fúngica y/o de la putrefacción fúngica. Los compuestos también se pueden usar para tratar productos que han sido infectados con un hongo. Al aplicar los compuestos, el desarrollo de la enfermedad debida a hongos sobre o en estos productos se puede ralentizar, detener, o los productos incluso se pueden curar de la enfermedad. En una realización de la invención, los productos se tratan con una composición o kit según la invención. En una realización, el producto es un producto alimentario, de pienso, farmacéutico, cosmético o agrícola. En una realización preferida, el producto es un producto agrícola.

La natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano, las composiciones según la invención, y los kits según la invención se pueden aplicar a los productos mediante pulverización. Otros métodos adecuados para aplicar estos compuestos, composiciones y kits en forma líquida a los productos también son una parte de la presente invención. Éstos incluyen, pero no se limitan a, inmersión, riego, inundación, introducción en un tanque de almacenamiento, vaporización, atomización, nebulización, fumigación, pintado, cepillado, espolvoreo, espumación, untado, encapsulación y revestimiento (por medio de cera o electrostáticamente). Además, los compuestos antifúngicos también se pueden inyectar en el suelo. Se sabe que las aplicaciones por pulverización usando sistemas automáticos reducen los costes de trabajo y son eficaces desde el punto de vista del coste. Para ese fin, se pueden usar métodos y equipo bien conocidos por una persona experta en la técnica. Las composiciones según la invención se pueden pulverizar con frecuencia, cuando el riesgo de infección es elevado. Cuando el riesgo de infección es menor, los intervalos de pulverización pueden estar más espaciados. 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 preferible de 20 a 1.000 ppm. Dependiendo del tipo de aplicación, la cantidad del al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos aplicada puede variar de 10 ppm a 5.000 ppm, preferiblemente de 20 ppm a 3.000 ppm, y lo más preferible de 50 a

1.000 ppm.

En una realización específica, el producto agrícola se puede tratar después de cosecharlo. Usando natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxapiraxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano, se puede lograr el control de enfermedades tras la recolección y/o del almacenamiento durante un período de tiempo prolongado, para permitir el transporte del producto agrícola cosechado a largas distancias y en diversas condiciones de almacenamiento con diferentes sistemas de atmósfera controlada con respecto a la temperatura y humedad. Los trastornos del almacenamiento después del cosechado son, por ejemplo, manchas de lenticelas, quemadura, descomposición senescente, depresión amarga, escaldado, corazón acuoso, ennegrecimiento, descomposición vascular, lesión por CO₂, deficiencia de CO₂ o de O₂, y reblandecimiento. Las enfermedades fúngicas pueden estar provocadas, por ejemplo, por los siguientes hongos: *Mycosphaerella spp.*, *Mycosphaerella musae*, *Mycosphaerella fragariae*, *Mycosphaerella citri*; *Mucor spp.*, por ejemplo *Mucor piriformis*; *Monilinia spp.*, por ejemplo *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*; *Phomopsis spp.*, *Phomopsis natalensis*; *Colletotrichum spp.*, por ejemplo *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum coccodes*; *Verticillium spp.*, por ejemplo *Verticillium theobromae*; *Nigrospora spp.*; *Botrytis spp.*, por ejemplo *Botrytis cinerea*; *Diplodia spp.*, por ejemplo *Diplodia citri*; *Pezizula spp.*; *Alternaria spp.*, por ejemplo *Alternaria citri*, *Alternaria alternata*; *Septoria spp.*, por ejemplo *Septoria depressa*; *Venturia spp.*, por ejemplo *Venturia inaequalis*, *Venturia pyrina*; *Rhizopus spp.*, por ejemplo *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*; *Glomerella spp.*, por ejemplo *Glomerella cingulata*; *Sclerotinia spp.*, por ejemplo *Sclerotinia fruticola*; *Ceratocystis spp.*, por ejemplo *Ceratocystis paradoxa*; *Fusarium spp.*, por ejemplo *Fusarium semitectum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*; *Cladosporium spp.*, por ejemplo *Cladosporium fulvum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium cucumerinum*, *Cladosporium musae*; *Penicillium spp.*, por ejemplo *Penicillium funiculosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*; *Phytophthora spp.*, por ejemplo *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora fragariae*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora parasitica*; *Phacydiopycnis spp.*, por ejemplo *Phacydiopycnis malirum*; *Gloeosporium spp.*, por ejemplo *Gloeosporium album*, *Gloeosporium perennans*, *Gloeosporium fructigenum*, *Gloeosporium singulata*; *Geotrichum spp.*, por ejemplo *Geotrichum candidum*; *Phlyctaena spp.*, por ejemplo *Phlyctaena vagabunda*; *Cylindrocarpon spp.*, por ejemplo *Cylindrocarpon mali*; *Stemphyllium spp.*, por ejemplo *Stemphyllium vesicarium*; *Thielaviopsis spp.*, por ejemplo *Thielaviopsis paradoxy*; *Aspergillus spp.*, por ejemplo *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*; *Nectria spp.*, por ejemplo *Nectria galligena*; *Cercospora spp.*, por ejemplo *Cercospora angreci*, *Cercospora apii*, *Cercospora atrofiliiformis*, *Cercospora musae*, *Cercospora zeaemaydis*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxapiraxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano, para proteger un producto frente a los hongos. Como se indica anteriormente, los compuestos se pueden usar, por ejemplo aplicar, secuencial o simultáneamente. En una realización, la invención se refiere a un uso, en el que se aplica al producto una composición o kit según la invención. En una realización, el producto es un producto alimentario, pienso, producto farmacéutico, cosmético o agrícola. En una realización preferida, el producto es un producto agrícola.

En una realización específica, la natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxapiraxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano se pueden usar en medicina, por ejemplo para tratar y/o prevenir enfermedades fúngicas. Por ejemplo, la natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos se pueden usar en forma de una composición farmacéutica. La composición puede comprender además excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos antifúngicos se pueden administrar oral o parenteralmente. El tipo de composición depende de la vía de administración.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un producto tratado con natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxapiraxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano. En una realización, el producto se trata con una composición o kit según la invención. La invención se refiere por lo tanto a un producto que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos listada anteriormente. Los productos tratados pueden comprender natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxapiraxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano sobre su superficie y/o dentro del producto. Como alternativa, 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, más preferiblemente de 0,00005 a 10 mg/dm² de natamicina sobre 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 fungicidas pirazólicos sobre su superficie. En una realización, el producto es un producto alimentario, pienso, producto farmacéutico, cosmético o agrícola. En una realización preferida, el producto es un producto agrícola.

La expresión "productos alimentarios", como se usa aquí, se ha de entender en un sentido muy amplio, e incluye, pero no se limita a, queso, queso crema, queso rallado, requesón, queso procesado, crema agria, producto de carne fermentada seca, incluyendo salamis y otros embutidos, vino, cerveza, yogur, zumo y otras bebidas, aliño de

ensaladas, aliño de requesón, salsas para mojar, productos de panadería y rellenos de panadería, glaseados y capa dulce de superficies, pastas para untar, acabados para pizzas, repostería y rellenos de repostería, aceitunas, salmuera de aceitunas, aceite de oliva, zumos, purés y pastas de tomate, condimentos, y pulpa de frutas y productos alimentarios similares.

- 5 La expresión “productos de piensos”, como se usa aquí, también se ha de entender en un sentido muy amplio, e incluye, pero no se limita a, alimento para mascotas, pienso para pollitos, etc.

La expresión “producto farmacéutico”, como se usa aquí, también se ha de entender en un sentido muy amplio, e incluye productos que comprenden una molécula activa, tal como un fármaco, un 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 y conveniente.

10 La expresión “producto cosmético”, como se usa aquí, también se ha de entender en un sentido muy amplio, e incluye productos que se usan para proteger o tratar tejidos córneos tales como la piel y los labios, pelo y uñas de la sequedad al prevenir la transpiración de su humedad, y además acondicionar los tejidos así como dar un buen aspecto a estos tejidos. Los productos contemplados por la expresión “producto cosmético” incluyen, pero no se limitan a, humectantes, productos de limpieza personal, parches oclusivos para el suministro de fármacos, esmalte de uñas, polvos, toallitas limpiadoras, acondicionadores del cabello, emulsiones para el tratamiento de la piel, cremas de afeitar, y similares.

15 La expresión “productos agrícolas”, como se usa aquí, también se ha de entender en un sentido muy amplio, e incluye, pero no se limita a, cereales, por ejemplo trigo, cebada, centeno, avena, arroz, sorgo, y similares; remolachas, por ejemplo remolacha de azúcar y remolacha forrajera; fruta con pepita y con hueso y bayas, por ejemplo manzanas, peras, ciruelas, albaricoques, melocotones, almendras, cerezas, fresas, frambuesas y moras; plantas leguminosas, por ejemplo habas, lentejas, guisantes, habas de soja; plantas oleaginosas, por ejemplo colza, mostaza, amapola, olivo, girasol, coco, planta de aceite de ricino, cacao, cacahuetes; cucurbitáceas, por ejemplo calabazas, pepinillos, melones, pepinos, calabacines, berenjenas; plantas de fibra, por ejemplo algodón, lino, cáñamo, yute; fruto cítrico, por ejemplo naranjas, limones, uvas, mandarinas, limas; fruta tropical, por ejemplo papayas, fruto de la pasión, mangos, carambolas, piñas, plátanos, kiwis; vegetales, por ejemplo espinaca, lechuga, espárrago, brasicáceas tales como repollos y nabos, zanahorias, cebollas, tomates, patatas de semilla, chile y pimientos dulces; plantas similares al laurel, por ejemplo aguacate, canela, árbol de alcanfor; o productos tales como maíz, tabaco, frutos secos, café, caña de azúcar, té, vides, lúpulos, plantas de caucho, así como plantas ornamentales, por ejemplo flores cortadas, rosas, tulipanes, lirios, narcisos, azafranes, jacintos, dalias, gerbera, claveles, fucsias, crisantemos, y bulbos de flores, arbustos, árboles caducifolios y árboles de hoja perenne tales como coníferas, plantas y árboles en invernaderos. Incluye, pero no se limita a, plantas y sus partes, frutos, semillas, esquejes, variedades de cultivo, injertos, bulbos, tubérculos, tubérculos de raíz, portainjertos, flores cortadas y vegetales.

20 Otro aspecto de la presente invención es un método para preparar una composición como se describe aquí. El método comprende añadir natamicina a al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxaproxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano. Por ejemplo, los compuestos se pueden añadir separadamente a una composición acuosa y se pueden mezclar, seguido, si es necesario, del ajuste del pH, viscosidad, etc. Si se añaden separadamente, 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 también se pueden añadir, por ejemplo, entre sí en forma de polvo y se pueden mezclar para obtener una composición en polvo. La composición en polvo se puede añadir entonces a una composición acuosa.

EJEMPLOS

45 Ejemplo 1

Aplicación previa a la recolección

Se inocularon hojas de plantas de plátano con hongos. Como control, también se incluyeron hojas sin inocular. A continuación, una parte definida de las hojas se trató con composición 1 (natamicina), composición 2 (bixafeno), composición 3 (fenpirazamina), composición 4 (fluxaproxad), composición 5 (furametpir), composición 6 (isopirazam), composición 7 (penflufeno), composición 8 (pentiopirad), composición 9 (rabenzazol), composición 10 (sedaxano), composición 11 (natamicina + bixafeno), composición 12 (natamicina + fenpirazamina), composición 13 (natamicina + fluxaproxad), composición 14 (natamicina + furametpir), composición 15 (natamicina + isopirazam), composición 16 (natamicina + penflufeno), composición 17 (natamicina + pentiopirad), composición 18 (natamicina + rabenzazol), o composición 19 (natamicina + sedaxano). Cada composición se aplicó mediante pulverización. También se incluyeron hojas sin tratar (control no tratado).

Los resultados obtenidos muestran que las composiciones de la presente invención protegen a las plantas de plátano frente al crecimiento fúngico, y demuestran además que las composiciones de la presente invención muestran una actividad sinérgicamente potenciada en comparación con la de los compuestos activos cuando se

aplican individualmente.

Ejemplo 2

Aplicación tras la recolección

5 Los plátanos se lesionaron según el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Los plátanos se lesionaron usando un sacacorchos, seguido de la contaminación con esporas fúngicas. Tras la incubación durante varias horas a temperatura ambiente, los plátanos se sumergieron en una de las siguientes composiciones: a) sin tratamiento (control 1), b) sumergidos en agua (control 2), c) sumergidos en natamicina, d) sumergidos en bixafeno, e) sumergidos en fenpirazamina, f) sumergidos en fluxapiraxad, g) sumergidos en furametpir, h) sumergidos en isopirazam, i) sumergidos en penflufeno, j) sumergidos en pentiopirad, k) sumergidos en rabenzazol, l) sumergidos en sedaxano, m) sumergidos en natamicina + bixafeno, n) sumergidos en natamicina + fenpirazamina, o) sumergidos en natamicina + fluxapiraxad, p) sumergidos en natamicina + furametpir, q) sumergidos en natamicina + isopirazam, r) sumergidos en natamicina + penflufeno, s) sumergidos en natamicina + pentiopirad, t) sumergidos en natamicina + rabenzazol, u) sumergidos en natamicina + sedaxano. Después de este tratamiento, los plátanos se incubaron en cajas cerradas a 21°C a humedad elevada. Cada día, los plátanos se valoraron visualmente con respecto al desarrollo fúngico.

15 Los resultados muestran que la composición que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos protege a los plátanos mejor frente a los hongos que natamicina o al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos solo. Sorprendentemente, la aplicación combinada de natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos conduce a una fuerte reducción sinérgica en la infección.

Ejemplo 3

Tratamiento de fresas

25 Se usaron diez fresas orgánicas, recientes, por tratamiento. Cada fresa se lesionó con un corte de 0,5 mm de longitud, y cada lesión se inoculó con 10 µl de una suspensión de *Botrytis cinerea* que contiene 1 x 10⁵ esporas/ml. Después de un período de incubación de 2 horas a 20°C, cada fresa se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 2000 ppm de bixafeno, o ambos. Las composiciones antifúngicas también comprendían 3,1% (p/p) de cera de abejas, 0,76% (p/p) de glicerol, 0,66% (p/p) de monoestearato de polioxietilén sorbitán (Tween 60), 0,03% (p/p) de metilhidroxietil-celulosa (MHEC), 0,02% (p/p) de goma de xantana, 0,02% (p/p) de agente antiespumante, 0,15% (p/p) de ácido cítrico y 0,01% (p/p) de sorbato potásico. El pH de las composiciones fue 4. Como control, se usó una composición sin natamicina o bixafeno. Las fresas tratadas se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C.

35 Durante la incubación, el crecimiento de moho en las fresas se evaluó de dos maneras: (i) se contó el número total de fresas con moho por total de 10 fresas; y (ii) la actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados se determinó calculando la reducción del crecimiento de moho observada en las fresas tratadas con la composición antifúngica en comparación con el crecimiento de moho en las fresas tratadas con la composición de control. La actividad antifúngica esperada (E en %) de la composición antifúngica combinada que comprende ambos ingredientes activos se calculó según la ecuación de Colby (Colby, 1967):

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

40 en la que 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 O/E es de este modo > 1,0, la aplicación combinada de los ingredientes activos conduce a un efecto antifúngico sinérgico.

45 Los resultados en la Tabla 1 (número de fresas con moho por total de 10 fresas) y Tabla 2 (actividad antifúngica) demuestran claramente que la composición antifúngica que comprende 500 ppm de natamicina y 2000 ppm de bixafeno tuvo un efecto antifúngico mucho más fuerte sobre las fresas que la natamicina o bixafeno solo.

50 Durante 3 a 6 días de incubación, las 10 fresas tratadas con la composición de control o con natamicina sola mostraron crecimiento de moho. Cuando se usó bixafeno para el tratamiento, 8 y 9 de las 10 fresas tenían moho en el día 3 y 4, respectivamente, así como lo tuvieron las 10 fresas en los días 5 y 6. Sin embargo, de las 10 fresas tratadas con la composición que comprende tanto natamicina como bixafeno, se observó crecimiento de moho para solamente 4 fresas en el día 3, 5 fresas en el día 4, y 8 fresas en los días 5 y 6 (véase la Tabla 1). Además, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como bixafeno excede la actividad antifúngica esperada con 15 a 27% entre 3 y 9 días de incubación. El factor de sinergia correspondiente aumentó de 1,2 en el día 3 a 6,0 en el día 9 (véase la Tabla 2).

55 Por tanto, la aplicación combinada de 500 ppm de natamicina y 2000 ppm de bixafeno tiene un efecto antifúngico

sinérgico notablemente fuerte sobre las fresas.

Ejemplo 4

Tratamiento de fresas

5 El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada fresa se lesionó primero, después se incubó durante 2 horas a 20°C, y subsiguientemente se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 1000 ppm de bixafeno, o ambos. Después del tratamiento, cada fresa se inoculó con 10 µl de una suspensión de *Botrytis cinerea* que contiene 1×10^5 esporas/ml. Las fresas tratadas se evaluaron con respecto al crecimiento de moho según los dos métodos descritos en el Ejemplo 3.

10 Los resultados en la Tabla 3 (actividad antifúngica) y Tabla 4 (número de fresas con moho por total de 10 fresas) revelaron que la composición antifúngica que comprende 500 ppm de natamicina así como 1000 ppm de bixafeno fue más exitosa a la hora de limitar el crecimiento de moho en fresas que las composiciones que comprenden natamicina o bixafeno individualmente.

15 Después de 3 días de incubación, la actividad antifúngica observada fue 8% mayor que la actividad antifúngica esperada, lo que dio como resultado un factor de sinergia >1,0 (véase la Tabla 3).

20 Después de 5 días de incubación, las 10 fresas tratadas con la composición de control o con natamicina sola tenían moho, así como lo tenían 8 de las 10 fresas tratadas con bixafeno solo. Sin embargo, cuando la combinación de ingredientes activos de natamicina y bixafeno se aplicó sobre las fresas, se observó crecimiento de moho para solamente 5 de las 10 fresas en el día 5 (véase la Tabla 4). Además, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende natamicina y bixafeno excedió la actividad antifúngica esperada con 16 y 18% en el día 5 y 6, respectivamente. En consecuencia, el factor de sinergia obtenido fue >1,0 en ambos días (véase la Tabla 3).

En conclusión, los resultados de este ejemplo demuestran que la aplicación combinada de 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de bixafeno reduce sinérgicamente el crecimiento de moho en fresas.

Ejemplo 5

25 Tratamiento de fresas

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada fresa lesionada e inoculada se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 500 ppm de bixafeno, o ambos. Las fresas tratadas se evaluaron con respecto al crecimiento de moho. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados se determinó según el método descrito en el Ejemplo 3.

30 Los resultados en la Tabla 5 muestran que la composición antifúngica que comprende 250 ppm de natamicina así como 500 ppm de bixafeno fue superior a las composiciones que comprenden ya sea natamicina sola o bixafeno solo a la hora de reducir el crecimiento de moho en fresas.

35 Después de 4, 6, 7, 9 y 10 días de incubación, la actividad antifúngica observada fue 10 a 20% mayor que la actividad antifúngica esperada, y los factores de sinergia correspondientes aumentaron de 1,2 en el día 4 a >10 en el día 10 (véase la Tabla 5).

De este modo, existe una fuerte actividad sinérgica frente a hongos entre 250 ppm de natamicina y 500 ppm de bixafeno cuando se aplican en combinación en fresas.

Ejemplo 6

40 Tratamiento de fresas

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada fresa lesionada e inoculada se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 250 ppm de bixafeno, o ambos. Las fresas tratadas se incubaron durante una semana y, a partir del día 3, se evaluaron con respecto al crecimiento de moho diariamente según uno o ambos métodos descritos en el Ejemplo 3.

45 Los resultados en la Tabla 6 (número de fresas con moho por total de 10 fresas) y Tabla 7 (actividad antifúngica) demuestran inequívocamente que la composición antifúngica combinada que comprende 250 ppm de natamicina y 250 ppm de bixafeno protegió a las fresas más eficazmente frente al crecimiento de moho que las composiciones que comprenden natamicina o bixafeno individualmente.

50 Después de 3 días de incubación, las 10 fresas tratadas con la composición de control tenían moho, como lo tenían respectivamente 8 de las 10 fresas tratadas con natamicina sola y 9 de las 10 fresas tratadas con bixafeno solo. Sin

embargo, solamente 5 de las 10 fresas tratadas con la composición que comprende natamicina y bixafeno mostraron crecimiento de moho en el día 3 (véase la Tabla 6).

Después de 4 y 5 días de incubación, las 10 fresas tratadas con la composición de control o con natamicina sola tenían moho, como lo tenían respectivamente 9 y 10 de las 10 fresas tratadas con bixafeno, respectivamente. Sin embargo, de las 10 fresas tratadas con la combinación de ingredientes activos de natamicina y bixafeno, se observó crecimiento de moho para solamente 7 fresas en el día 4 y 8 fresas en el día 5 (véase la Tabla 6). Además, la actividad antifúngica observada excedió la actividad antifúngica esperada con 13% a 21% entre 4 y 7 días de incubación. Por lo tanto, el factor de sinergia correspondiente aumentó de 1,3 en el día 4 a 2,3 en el día 7 (véase la Tabla 7).

De este modo, la aplicación combinada de 250 ppm de natamicina y 250 ppm de bixafeno conduce a una reducción sinérgica fuerte en el crecimiento de moho en fresas.

Ejemplo 7

Tratamiento de mandarinas

Se usaron diez mandarinas orgánicas recientes por tratamiento. La piel de cada mandarina se lesionó una vez usando un sacacorchos según el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Subsiguientemente, cada lesión se inoculó con 10 μ l de una suspensión de *Penicillium italicum* que contiene 1×10^5 esporas/ml. Tras la incubación durante 2 horas a 20°C, las mandarinas se sumergieron individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 2000 ppm de bixafeno, o ambos. Además, las composiciones antifúngicas comprendieron 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 de xantana, 0,02% (p/p) de agente antiespumante, 0,15% (p/p) de ácido cítrico y 0,01% (p/p) de sorbato potásico. El pH de las composiciones fue 4. Como control, se usó una composición sin natamicina o bixafeno.

Las mandarinas tratadas se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C y se evaluaron con respecto al crecimiento de moho durante la incubación. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados se determinó calculando la reducción en el crecimiento de moho observada en las mandarinas tratadas con la composición antifúngica en comparación con el crecimiento de moho en las mandarinas tratadas con la composición de control, según el método de Colby (Colby, 1967) descrito en el Ejemplo 3.

Los resultados en la Tabla 8 demuestran que la combinación de ingredientes activos de 500 ppm de natamicina y 2000 ppm de bixafeno tuvo más éxito a la hora de limitar el crecimiento de moho en mandarinas que natamicina o bixafeno individualmente.

Después de 4, 6, 9, 11, 14 y 15 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende natamicina y bixafeno excede la actividad antifúngica esperada con 6 a 13%. El factor de sinergia correspondiente fue $>1,0$ en cada uno de los días mencionados anteriormente, y osciló desde 1,2 en el día 4 hasta 2,8 en el día 15 (véase la Tabla 8).

En conclusión, los resultados de este ejemplo demuestran claramente el efecto antifúngico sinérgico de 500 ppm de natamicina y 2000 ppm de bixafeno cuando se aplican en combinación en mandarinas.

Ejemplo 8

Tratamiento de mandarinas

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 7, excepto por el hecho de que cada mandarina lesionada e inoculada se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 1000 ppm de bixafeno, o ambos. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados en mandarinas se evaluó según el método de Colby (Colby, 1967) descrito en el Ejemplo 3.

Los resultados (véase la Tabla 9) revelan que la composición antifúngica que comprende 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de bixafeno tuvo una actividad antifúngica sobre mandarinas más fuerte que natamicina o bixafeno solos.

Después de 4, 6, 7, 9, 14 y 15 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la combinación de ingredientes activos de natamicina y bixafeno fue entre 7 y 14% mayor que la actividad antifúngica esperada, y el factor de sinergia osciló de 1,2 a 3,0 (véase la Tabla 9).

Por lo tanto, se puede concluir que la aplicación combinada de 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de bixafeno conduce a una reducción sinérgica en el crecimiento de moho en mandarinas.

Ejemplo 9

Tratamiento de mandarinas

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 7, excepto por el hecho de que cada mandarina lesionada e inoculada se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 250 de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 500 ppm de bixafeno, o ambos. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados en mandarinas se evaluó según el método de Colby (Colby, 1967) descrito en el Ejemplo 3.

Los resultados (véase la Tabla 10) demuestran claramente que la combinación de ingredientes activos de 250 ppm de natamicina y 500 ppm de bixafeno tuvo una mayor eficacia frente al crecimiento de moho en mandarinas que natamicina o bixafeno individualmente.

Después de 4, 6, 7, 9, 11, 13 y 15 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende natamicina así como bixafeno excedió la actividad antifúngica esperada con 9 a 26%, lo que dio como resultado un factor de sinergia que varía de 1,2 a 4,3 (véase la Tabla 10).

De este modo, la aplicación combinada de 250 ppm de natamicina y 500 ppm de bixafeno sinérgicamente reduce el crecimiento de moho en mandarinas.

Ejemplo 10

Tratamiento de mandarinas

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 7, excepto por el hecho de que cada mandarina lesionada e inoculada se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 250 ppm de bixafeno, o ambos. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados en mandarinas se evaluó según el método de Colby (Colby, 1967) descrito en el Ejemplo 3.

Los resultados (véase la Tabla 11) demuestran que la composición que comprende 250 ppm de natamicina y 250 ppm de bixafeno fue superior a las composiciones que comprenden ya sea natamicina sola o bixafeno solo a la hora de reducir el crecimiento de moho en mandarinas.

Después de 3, 4, 6, 7 y 9 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende natamicina así como bixafeno fue 10 a 29% mayor que la actividad antifúngica esperada. En consecuencia, el factor de sinergia en cada uno de los días mencionados anteriormente excedió >1,0, y aumentó desde 1,1 en el día 3 hasta 3,3 en el día 9 (véase la Tabla 11).

Por tanto, existe actividad sinérgica frente a hongos entre 250 ppm de natamicina y 250 ppm de bixafeno cuando se aplican en combinación en mandarinas.

Ejemplo 11

Tratamiento de manzanas

Se usaron diez manzanas orgánicas recientes por tratamiento. Cada manzana se lesionó una vez usando un sacacorchos según el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Subsiguientemente, cada lesión se inoculó con 10 μ l de una suspensión de *Penicillium italicum* que contiene 1×10^6 esporas/ml. Tras la incubación durante 2 horas a 20°C, las manzanas se sumergieron individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 2000 ppm de bixafeno, o ambos. Además, las composiciones antifúngicas comprendieron 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 de xantana, 0,02% (p/p) de agente antiespumante, 0,15% (p/p) de ácido cítrico y 0,01% (p/p) de sorbato potásico. El pH de las composiciones fue 4. Como control, se usó una composición sin natamicina o bixafeno. Las manzanas tratadas se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C

Durante la incubación, el crecimiento de moho en las manzanas se evaluó de dos maneras: (i) se contó el número de manzanas con moho por total de 10 manzanas; y (ii) la actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados se determinó calculando la reducción del crecimiento de moho observada en las manzanas tratadas con la composición antifúngica en comparación con el crecimiento de moho en las manzanas tratadas con la composición de control según el método de Colby descrito en el Ejemplo 3 (Colby, 1967).

Los resultados en la Tabla 12 (número de manzanas con moho por total de 10 manzanas) y la Tabla 13 (actividad antifúngica) revelan que la actividad antifúngica de la composición que comprende 500 ppm de natamicina y 2000 ppm de bixafeno fue más fuerte que aquellas de las composiciones que comprenden natamicina o bixafeno solos.

Después de 3 y 4 días de incubación, las 10 manzanas tratadas con la composición de control tenían moho, como lo tenían 9 de las 10 manzanas tratadas con natamicina sola y 5 de las 10 manzanas tratadas con bixafeno solo. Sin

embargo, se observó crecimiento de moho en el día 3 y 4 para solamente 2 de las 10 manzanas tratadas con la composición combinada que comprende natamicina y bixafeno (véase la Tabla 12).

5 Después de 6 y 7 días de incubación, las 10 manzanas tratadas con la composición de control o con natamicina sola mostraron crecimiento de moho, como lo hicieron 8 de las 10 manzanas tratadas con bixafeno solo. Sin embargo, el tratamiento de 10 manzanas con la composición que comprende tanto natamicina como bixafeno dio como resultado solamente 2 y 4 manzanas con moho en el día 6 y 7, respectivamente (véase la Tabla 12).

Durante 9 a 14 días de incubación, todas las manzanas tratadas con la composición de control, con natamicina sola o con bixafeno solo tenían moho, mientras que se observó crecimiento de moho para solamente 6 de las 10 manzanas tratadas con la combinación de ingredientes activos de natamicina y bixafeno (véase la Tabla 12).

10 Además, la actividad antifúngica observada de la combinación de ingredientes activos de natamicina y bixafeno excedió la actividad antifúngica esperada con 14% en el día 3, casi 50% en el día 6 y aproximadamente 30% en el día 9 a 14. Durante este período de incubación de 3 a 14 días, el factor de sinergia siempre excedió $>1,0$, y osciló de 1,2 a 2,1 (véase la Tabla 13).

15 En conclusión, existe una actividad antifúngica sorprendentemente fuerte entre 500 ppm de natamicina y 2000 ppm de bixafeno cuando se aplican en combinación en manzanas.

Ejemplo 12

Tratamiento de manzanas

20 El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 11, excepto por el hecho de que cada manzana lesionada e inoculada se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 1000 ppm de bixafeno, o ambos. Durante la incubación, las manzanas tratadas se evaluaron con respecto al crecimiento de moho según los dos métodos descritos en el Ejemplo 3.

25 Los resultados en la Tabla 14 (número de manzanas con moho por total de 10 manzanas) y Tabla 15 (actividad antifúngica) revelan que la composición antifúngica que comprende 500 ppm de natamicina así 1000 ppm de bixafeno fue más exitosa a la hora de limitar el crecimiento de moho en manzanas que las composiciones que comprenden natamicina o bixafeno individualmente.

30 Después de 3 y 4 días de incubación, las 10 manzanas tratadas con la composición de control tenían moho, como lo tenían 9 de las 10 manzanas tratadas con natamicina sola y 6 de las 10 manzanas tratadas con bixafeno solo. Sin embargo, de las 10 manzanas tratadas con la composición combinada que comprende natamicina y bixafeno, solamente 2 y 3 tenían moho en el día 3 y 4, respectivamente (véase la Tabla 14).

35 Después de 6 y 7 días de incubación, las 10 manzanas tratadas con la composición de control o con natamicina sola mostraron crecimiento de moho, como lo hicieron respectivamente 8 y 9 de las 10 manzanas tratadas con bixafeno solo, respectivamente. Sin embargo, el tratamiento de 10 manzanas con la composición que comprende tanto natamicina como bixafeno dio como resultado solamente 4 manzanas con moho en el día 6 y 5 manzanas con moho en el día 7 (véase la Tabla 14).

Durante 9 a 14 días de incubación, todas las manzanas tratadas con la composición de control, con natamicina sola o con bixafeno solo tenían moho, mientras que se observó crecimiento de moho para solamente 6 de las 10 manzanas tratadas con la combinación de ingredientes activos de natamicina y bixafeno (véase la Tabla 14).

40 Además, la actividad antifúngica observada de la composición combinada que comprende natamicina y bixafeno excedió la actividad antifúngica esperada con 23 a $>30\%$ durante 3 y 14 días de incubación. El factor de sinergia fue continuamente $>1,0$ durante el período de incubación mencionado anteriormente, e incrementó desde 1,4 en el día 3 hasta 1,7 en el día 14 (véase la Tabla 15).

Los resultados de este ejemplo muestran claramente que la aplicación combinada de 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de bixafeno reduce sinérgicamente el crecimiento de moho en manzanas.

45 Ejemplo 13

Tratamiento de manzanas

50 El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 11, excepto por el hecho de que cada manzana lesionada e inoculada se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 250 de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 500 ppm de bixafeno, o ambos. Después de 6, 7 y 9 ppm días de incubación, las manzanas tratadas se evaluaron con respecto al crecimiento de moho según los dos métodos descritos en el Ejemplo 3.

Los resultados en la Tabla 16 (número de manzanas con moho por total de 10 manzanas) y Tabla 17 (actividad

antifúngica) revelan que la composición antifúngica que comprende tanto 250 ppm de natamicina como 500 ppm de bixafeno limitó más eficazmente el crecimiento de moho en manzanas que natamicina o bixafeno solos.

Después de 6, 7 y 9 días de incubación, las 10 manzanas tratadas con la composición de control, con natamicina sola o con bixafeno solo mostraron crecimiento de moho. Sin embargo, de las 10 manzanas tratadas con la combinación de ingredientes activos de natamicina y bixafeno, solamente 5, 6 y 8 tenían moho en el día 6, 7, y 9, respectivamente (véase la Tabla 16). Además, la actividad antifúngica observada de la composición combinada que comprende natamicina y bixafeno excedió la actividad antifúngica esperada con 13% en el día 6, 9% en el día 7 y 12% en el día 9, lo que dio como resultado un factor de sinergia >1,0 en cada uno de estos días (véase la Tabla 17).

Por lo tanto, se puede concluir que la aplicación combinada de 250 ppm de natamicina y 500 ppm de bixafeno conduce a una reducción sinérgica en el crecimiento de moho en manzanas.

Ejemplo 14

Tratamiento de manzanas

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 11, excepto por el hecho de que cada manzana lesionada e inoculada se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 250 ppm de bixafeno, o ambos. Durante la incubación, las manzanas tratadas se evaluaron con respecto al crecimiento de moho según los dos métodos descritos en el Ejemplo 3.

Los resultados en la Tabla 18 (número de manzanas con moho por total de 10 manzanas) y Tabla 19 (actividad antifúngica) demuestran que la actividad de la composición que comprende 250 ppm de natamicina y 250 ppm de bixafeno frente al crecimiento de moho en manzanas fue más fuerte que aquella de las composiciones que comprenden natamicina o bixafeno solos.

Durante 6 a 15 días de incubación, todas las manzanas tratadas con la composición de control, con natamicina sola o con bixafeno solo tuvieron moho. Sin embargo, cuando la composición que comprende tanto bixafeno como natamicina se usó para el tratamiento, 6 de 10 manzanas tenían moho en el día 6 a 9, y 7 de 10 manzanas tenían moho en el día 11 a 15 (véase la Tabla 18). Además, la actividad antifúngica observada de la combinación de ingredientes activos de natamicina y bixafeno excedió la actividad antifúngica esperada con 18% en el día 6, 32% en el día 9, 25% en el día 11, y 20% en el día 14. El factor de sinergia fue >1,0 en cada uno de estos días (véase la Tabla 19).

De este modo, este ejemplo demuestra de forma convincente el efecto antifúngico sinérgico de la aplicación combinada de 250 ppm de natamicina y 250 ppm de bixafeno en manzanas.

Ejemplo 15

Actividad antifúngica *in vitro*

Para demostrar la actividad antifúngica sinérgica de la combinación de natamicina con isopirazam frente a *Botrytis cinerea*, se realizó un ensayo *in vitro* usando placas de microtitulación de 96 pocillos. Se ensayaron las siguientes composiciones:

- Control (sin ingrediente activo),
- 1,25 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos),
- 6,25 ppm de isopirazam,
- 1,25 ppm de natamicina + 6,25 ppm de isopirazam.

Después de llenar cada pocillo de una placa de microtitulación con 84 µl de medio PCB, el ingrediente o ingredientes activos se añadieron a partir de disoluciones madre separadas preparadas en medio PCB o en metanol, lo que dio como resultado un volumen intermedio de 100 µl por pocillo. Subsiguientemente, se usaron 100 µl de una suspensión de *Botrytis cinerea* preparada en medio PCB para inocular cada pocillo con $2,5 \times 10^3$ esporas/ml. De este modo, cada pocillo contenía un volumen final de 200 µl y <1% de metanol, lo que no afectó al crecimiento de *Botrytis cinerea* (dato no mostrado).

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

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

en la que 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 de este modo $> 1,0$, la aplicación combinada de los ingredientes activos conduce a un efecto antifúngico sinérgico.

5 Los resultados revelan que la combinación de ingredientes activos de natamicina e isopirazam (véase la Tabla 20) fue más eficaz inhibiendo el crecimiento de *Botrytis cinerea* que natamicina o isopirazam individualmente. La actividad antifúngica observada de natamicina en combinación con isopirazam fue 100% mayor que la actividad antifúngica esperada. En consecuencia, el factor de sinergia correspondiente fue mucho mayor que 1,0.

10 Por tanto, la combinación de ingredientes activos de natamicina e isopirazam inhibe sinérgicamente el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

Ejemplo 16

Actividad antifúngica *in vitro*

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 15, excepto por el hecho de que se ensayaron las siguientes composiciones:

- 15 - Control (sin ingrediente activo),
 - 0,63 ó 1,25 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos),
 - 25 ppm de isopirazam,
 - 25 ppm de bixafeno,
 - 0,63 ppm de natamicina + 25 ppm de isopirazam,
 20 - 1,25 ppm de natamicina + 25 ppm de bixafeno.

Además, para la inoculación se usó *Penicillium italicum*. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados se determinó según el método descrito en el Ejemplo 15.

25 Los resultados (véase la Tabla 21) revelan que las combinaciones de ingredientes activos natamicina + isopirazam y natamicina + bixafeno inhibieron el crecimiento de *Penicillium italicum* con más éxito que natamicina, isopirazam o bixafeno individualmente. Las actividades antifúngicas observadas de las combinaciones de ingredientes activos natamicina + isopirazam y natamicina + bixafeno excedieron las actividades antifúngicas esperadas con 25%, que dio como resultado factores de sinergia $>1,0$.

Por tanto, la aplicación combinada de natamicina e isopirazam así como la aplicación combinada de natamicina y bixafeno presentan actividad antifúngica sinérgica frente a *Penicillium italicum*.

30 Tabla 1. Número de fresas con moho incubadas a 20°C después de tratamiento con composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 2000 ppm de bixafeno, o ambos.

Composición antifúngica	Número de fresas con moho / número total de 10 fresas durante tiempo de incubación (en días)		
	Día 3	Día 4	Día 5-6
Control	10/10	10/10	10/10
Natamicina 500 ppm	10/10	10/10	10/10
Bixafeno 2000 ppm	8/10	9/10	10/10
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm	4/10	5/10	8/10

ES 2 534 378 T3

Tabla 2. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 2000 ppm de bixafeno, o ambos, sobre fresas tras la incubación a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	3	0	-	-
Natamicina 500 ppm		21	-	-
Bixafeno 2000 ppm		62	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		85	70	1,2
Control	4	0	-	-
Natamicina 500 ppm		16	-	-
Bixafeno 2000 ppm		55	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		78	62	1,3
Control	5	0	-	-
Natamicina 500 ppm		3	-	-
Bixafeno 2000 ppm		34	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		64	37	1,7
Control	6	0	-	-
Natamicina 500 ppm		0	-	-
Bixafeno 2000 ppm		27	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		47	27	1,7
Control	7	0	-	-
Natamicina 500 ppm		0	-	-
Bixafeno 2000 ppm		12	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		33	12	2,8
Control	9	0	-	-
Natamicina 500 ppm		0	-	-
Bixafeno 2000 ppm		3	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		18	3	6,0

ES 2 534 378 T3

Tabla 3. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 1000 ppm de bixafeno, o ambos, en fresas tras la incubación a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	3	0	-	-
Natamicina 500 ppm		59	-	-
Bixafeno 1000 ppm		72	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		97	89	1,1
Control	5	0	-	-
Natamicina 500 ppm		19	-	-
Bixafeno 1000 ppm		55	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		79	63	1,3
Control	6	0	-	-
Natamicina 500 ppm		12	-	-
Bixafeno 1000 ppm		35	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		61	43	1,4

5 Tabla 4. Número de fresas con moho incubadas a 20°C después del tratamiento con composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 1000 ppm de bixafeno, o ambos.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Número de lesiones con moho / número total de 10 lesiones
Control	5	10/10
Natamicina 250 ppm		10/10
Bixafeno 1000 ppm		8/10
Natamicina 250 ppm + bixafeno 1000 ppm		5/10

ES 2 534 378 T3

Tabla 5. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de bixafeno, o ambos, en fresas tras la incubación a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	4	0	-	-
Natamicina 250 ppm		6	-	-
Bixafeno 500 ppm		65	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		78	67	1,2
Control	6	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Bixafeno 500 ppm		33	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		50	33	1,5
Control	7	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Bixafeno 500 ppm		12	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		32	12	2,7
Control	9	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Bixafeno 500 ppm		5	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		15	5	3,0
Control	10	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Bixafeno 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		10	0	>10

5 Tabla 6. Número de fresas con moho incubadas a 20°C después del tratamiento con composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 250 ppm de bixafeno, o ambos.

Composición antifúngica	Número de fresas con moho / número total de 10 fresas durante tiempo de incubación (en días)		
	Día 3	Día 4	Día 5
Control	10/10	10/10	10/10
Natamicina 250 ppm	8/10	10/10	10/10
Bixafeno 250 ppm	9/10	9/10	10/10
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm	5/10	7/10	8/10

Tabla 7. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 250 ppm de bixafeno, o ambos, en fresas tras la incubación a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	4	0	-	-
Natamicina 250 ppm		6	-	-
Bixafeno 250 ppm		47	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		67	50	1,3
Control	5	0	-	-
Natamicina 250 ppm		2	-	-
Bixafeno 250 ppm		33	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		55	34	1,6
Control	6	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Bixafeno 250 ppm		23	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		40	23	1,7
Control	7	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Bixafeno 250 ppm		10	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		23	10	2,3

5 Tabla 8. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 2000 ppm de bixafeno, o ambos, en mandarinas tras la incubación a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	4	0	-	-
Natamicina 500 ppm		63	-	-
Bixafeno 2000 ppm		47	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		93	80	1,2
Control	6	0	-	-
Natamicina 500 ppm		28	-	-
Bixafeno 2000 ppm		32	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		62	51	1,2
Control	9	0	-	-

Natamicina 500 ppm		15	-	-
Bixafeno 2000 ppm		7	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		29	21	1,4
Control	11	0	-	-
Natamicina 500 ppm		13	-	-
Bixafeno 2000 ppm		9	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		26	20	1,3
Control	14	0	-	-
Natamicina 500 ppm		9	-	-
Bixafeno 2000 ppm		3	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		19	12	1,6
Control	15	0	-	-
Natamicina 500 ppm		5	-	-
Bixafeno 2000 ppm		0	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		14	5	2,8

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

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	4	0	-	-
Natamicina 500 ppm		63	-	-
Bixafeno 1000 ppm		37	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		90	77	1,2
Control	6	0	-	-
Natamicina 500 ppm		28	-	-
Bixafeno 1000 ppm		22	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		58	44	1,3
Control	7	0	-	-
Natamicina 500 ppm		16	-	-
Bixafeno 1000 ppm		6	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		35	21	1,7
Control	9	0	-	-
Natamicina 500 ppm		15	-	-
Bixafeno 1000 ppm		2	-	-

ES 2 534 378 T3

Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		24	17	1,4
Control	14	0	-	-
Natamicina 500 ppm		9	-	-
Bixafeno 1000 ppm		0	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		19	9	2,1
Control	15	0	-	-
Natamicina 500 ppm		5	-	-
Bixafeno 1000 ppm		0	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		15	5	3,0

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

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	4	0	-	-
Natamicina 250 ppm		43	-	-
Bixafeno 500 ppm		40	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		80	66	1,2
Control	6	0	-	-
Natamicina 250 ppm		18	-	-
Bixafeno 500 ppm		26	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		60	39	1,5
Control	7	0	-	-
Natamicina 250 ppm		10	-	-
Bixafeno 500 ppm		10	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		44	19	2,3
Control	9	0	-	-
Natamicina 250 ppm		8	-	-
Bixafeno 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		34	8	4,3
Control	11	0	-	-
Natamicina 250 ppm		13	-	-

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Bixafeno 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		29	13	2,2
Control	13	0	-	-
Natamicina 250 ppm		12	-	-
Bixafeno 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		23	12	1,9
Control	15	0	-	-
Natamicina 250 ppm		6	-	-
Bixafeno 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		15	6	2,5

Tabla 11. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 250 ppm de bixafeno, o ambos, en mandarinas tras la incubación a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	3	0	-	-
Natamicina 250 ppm		70	-	-
Bixafeno 250 ppm		65	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		100	90	1,1
Control	4	0	-	-
Natamicina 250 ppm		43	-	-
Bixafeno 250 ppm		27	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		87	58	1,5
Control	6	0	-	-
Natamicina 250 ppm		18	-	-
Bixafeno 250 ppm		28	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		56	41	1,4
Control	7	0	-	-
Natamicina 250 ppm		10	-	-

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Bixafeno 250 ppm	9	10	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		41	19	2,2
Control		0	-	-
Natamicina 250 ppm		8	-	-
Bixafeno 250 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		26	8	3,3

Tabla 12. Número de manzanas con moho incubadas a 20°C después del tratamiento con composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 2000 ppm de bixafeno, o ambos.

Composición antifúngica	Número de manzanas con moho / número total de 10 manzanas durante tiempo de incubación (en días)			
	Día 3-4	Día 6	Día 7	Día 9-14
Control	10/10	10/10	10/10	10/10
Natamicina 500 ppm	9/10	10/10	10/10	10/10
Bixafeno 2000 ppm	5/10	8/10	8/10	10/10
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm	2/10	2/10	4/10	6/10

5 Tabla 13. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 2000 ppm de bixafeno, o ambos, en manzanas tras la incubación a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	3	0	-	-
Natamicina 500 ppm		33	-	-
Bixafeno 2000 ppm		60	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		87	73	1,2
Control	6	0	-	-
Natamicina 500 ppm		6	-	-
Bixafeno 2000 ppm		39	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		89	42	2,1
Control	9	0	-	-

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Natamicina 500 ppm		21	-	-
Bixafeno 2000 ppm		29	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		75	44	1,7
Control	11	0	-	-
Natamicina 500 ppm		26	-	-
Bixafeno 2000 ppm		30	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		78	48	1,6
Control	14	0	-	-
Natamicina 500 ppm		30	-	-
Bixafeno 2000 ppm		36	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 2000 ppm		85	56	1,5

Tabla 14. Número de manzanas con moho incubadas a 20°C después del tratamiento con composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 1000 ppm de bixafeno, o ambos.

Composición antifúngica	Número de manzanas con moho / número total de 10 manzanas durante tiempo de incubación (en días)				
	<i>Día 3</i>	<i>Día 4</i>	<i>Día 6</i>	<i>Día 7</i>	<i>Día 9-14</i>
Control	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Natamicina 500 ppm	9/10	9/10	10/10	10/10	10/10
Bixafeno 1000 ppm	6/10	6/10	8/10	9/10	10/10
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10

5 Tabla 15. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 1000 ppm de bixafeno, o ambos, en manzanas tras la incubación a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	3	0	-	-
Natamicina 500 ppm		33	-	-

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Bixafeno 1000 ppm		47	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		87	64	1,4
Control	6	0	-	-
Natamicina 500 ppm		6	-	-
Bixafeno 1000 ppm		44	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		78	48	1,6
Control	9	0	-	-
Natamicina 500 ppm		21	-	-
Bixafeno 1000 ppm		38	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		75	51	1,5
Control	11	0	-	-
Natamicina 500 ppm		26	-	-
Bixafeno 1000 ppm		30	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		74	48	1,5
Control	14	0	-	-
Natamicina 500 ppm		30	-	-
Bixafeno 1000 ppm		21	-	-
Natamicina 500 ppm + bixafeno 1000 ppm		76	45	1,7

Tabla 16. Número de manzanas con moho incubadas a 20°C después del tratamiento con composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de bixafeno, o ambos.

Composición antifúngica	Número de manzanas con moho / número total de 10 manzanas durante tiempo de incubación (en días)		
	Día 6	Día 7	Día 9
Control	10/10	10/10	10/10
Natamicina 250 ppm	10/10	10/10	10/10

Composición antifúngica	Número de manzanas con moho / número total de 10 manzanas durante tiempo de incubación (en días)		
	Día 6	Día 7	Día 9
Bixafeno 500 ppm	10/10	10/10	10/10
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm	5/10	6/10	8/10

Tabla 17. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de bixafeno, o ambos, en manzanas tras la incubación a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	6	0	-	-
Natamicina 250 ppm		38	-	-
Bixafeno 500 ppm		33	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		72	59	1,2
Control	7	0	-	-
Natamicina 250 ppm		42	-	-
Bixafeno 500 ppm		39	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		74	65	1,1
Control	9	0	-	-
Natamicina 250 ppm		35	-	-
Bixafeno 500 ppm		17	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 500 ppm		58	46	1,3

5 Tabla 18. Número de manzanas con moho incubadas a 20°C después del tratamiento con composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 250 ppm de bixafeno, o ambos.

Composición antifúngica	Número de manzanas con moho / número total de 10 manzanas durante tiempo de incubación (en días)	
	Día 6-9	Día 11-15
Control	10/10	10/10
Natamicina 250 ppm	10/10	10/10
Bixafeno 250 ppm	10/10	10/10
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm	6/10	7/10

Tabla 19. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 250 ppm de bixafeno, o ambos, en manzanas tras la incubación a 20°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	6	0	-	-
Natamicina 250 ppm		38	-	-
Bixafeno 500 ppm		17	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		67	49	1,4
Control	9	0	-	-
Natamicina 250 ppm		35	-	-
Bixafeno 500 ppm		13	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		75	43	1,7
Control	11	0	-	-
Natamicina 250 ppm		42	-	-
Bixafeno 500 ppm		0	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		67	42	1,6
Control	14	0	-	-
Natamicina 250 ppm		49	-	-
Bixafeno 500 ppm		6	-	-
Natamicina 250 ppm + bixafeno 250 ppm		73	53	1,4

5 Tabla 20. Actividad antifúngica (%) *in vitro* de natamicina en combinación con isopirazam frente a *Botrytis cinerea* tras la incubación a 25°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	3	0	-	-
Natamicina 1,25 ppm		0	-	-
Isopyrazam 6,25 ppm		0	-	-
Natamicina 1,25 ppm + Isopyrazam 6,25 ppm		100	0	>100

Tabla 21. Actividad antifúngica (%) *in vitro* de natamicina en combinación con isopirazam o bixafeno frente a *Penicillium italicum* tras la incubación a 25°C.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	10	0	-	-
Natamicina 0,63 ppm		0	-	-
Natamicina 1,25 ppm		0		
Isopyrazam 25 ppm		50	-	-
Bixafeno 25 ppm		50	-	-
Natamicina 0,63 ppm + Isopyrazam 25 ppm		75	50	1,5
Natamicina 1,25 ppm + Bixafeno 25 ppm		75	50	1,5

REFERENCIAS

Colby SR (1967), Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combination. *Weeds* 15: 20-22.

5 Culbreath AK, Brenneman TB, Kemerait RC y Hammes GG (2008), Effect of the new pyrazole carboxamide fungicide penthiopyrad on late leaf spot and stem rot of peanut. *Pest Manag. Sci.* 65:66-73.

Lapeyre de Bellaire de L y Dubois C (1987), Distribution of Thiabendazole-Resistant *Colletotrichum musae* Isolates from Guadeloupe Banana Plantations. *Plant disease* 81:1378-1383.

Slinker BK (1998), The Statistics of Synergism. *Journal of Mol. and Cell. Cardiology* 30:723-731.

10 Vincentini CB, Romagnoli C, Andreotti E y Mares D (2007), Synthetic pyrazole derivatives as growth inhibitors of some phytopathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.* 55:10331-10338.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxapiroxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano.
- 5 2. Una composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende además al menos un compuesto adicional seleccionado del grupo que consiste en un agente de pegajosidad, un vehículo, 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 para la fluidez, una sustancia mineral, un disolvente, un dispersante, un emulsionante, un agente humectante, un estabilizante, un agente antiespumante, un agente tamponante, un absorbente de UV y un antioxidante.
- 10 3. Una composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que la cantidad de natamicina está en el intervalo de 0,005 g/l a 100 g/l, y la cantidad del al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos está en el intervalo de 0,0001 g/l a 2000 g/l.
- 15 4. Un kit que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxapiroxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano.
- 20 5. Un método para proteger un producto frente a hongos al tratar el producto con natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxapiroxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano.
- 25 6. Un método según la reivindicación 5, en el que el producto se trata con una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un kit según la reivindicación 4.
7. Un método según la reivindicación 5 ó 6, en el que el producto se selecciona del grupo que consiste en un producto alimentario, un producto de pienso, un producto farmacéutico, un producto cosmético y un producto agrícola.
8. Un método según la reivindicación 7, en el que el producto es un producto agrícola.
9. Un método según la reivindicación 8, en el que el producto se trata después de la recolección.
- 30 10. Un producto que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas pirazólicos seleccionado del grupo que consiste en bixafeno, fenpirazamina, fluxapiroxad, furametpir, isopirazam, penflufeno, pentiopirad, rabenzazol y sedaxano.
11. Un producto según la reivindicación 10, en el que el producto se selecciona del grupo que consiste en un producto alimentario, un producto de pienso, un producto farmacéutico, un producto cosmético y un producto agrícola.
12. Un producto según la reivindicación 11, en el que el producto es un producto agrícola.