(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 534 379**

(51) Int. Cl.:

A01N 3/00	(2006.01)
A01N 43/00	(2006.01)
A01N 63/00	(2006.01)
A01N 43/653	(2006.01)
A01N 55/00	(2006.01)
A01P 3/00	(2006.01)
A01P 1/00	(2006.01)
A23L 3/34	(2006.01)
A01N 43/90	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2012** **E 12707085 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015** **EP 2680691**

(54) Título: **Nuevas composiciones antifúngicas**

(30) Prioridad:

03.03.2011 EP 11156773

(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 2 534 379 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

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

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.

Un grupo importante de fungicidas son los triazoles. El primer triazol que se introdujo fue triadimefón. Este triazol se introdujo en 1976 por Bayer (véase Kuck et al., 1987). Triadimefón proporcionó actividad curativa así como protectora, tasas de aplicación bajas, y excelente redistribución en la planta. Se introdujeron fungicidas triazólicos adicionales a lo largo de las siguientes dos décadas con potencia y seguridad para la planta mejoradas (por ejemplo, epoxiconazol), un espectro eficaz más amplio (por ejemplo, propiconazol, tebuconazol) o aplicaciones especializadas (por ejemplo, difenoconazol y triticonazol para el tratamiento de semillas) (véase Kuck et al., 1987). Junto al uso para proteger productos agrícolas tales como fruta o vegetales recolectados frente a hongos fitopatógenos (véase el documento EP 2.036.438 A1) o cereales frente a la contaminación por micotoxinas (véase el documento WO 2007/009969), los triazoles se han usado para proteger productos alimentarios frente a la putrefacción fúngica (véase el documento EP 0.101.102 A2).

Los fungicidas triazólicos sin embargo no han sido inmunes a los retos en su desarrollo y mantenimiento. Tienen efectos secundarios bien documentados en las plantas. La aplicación a brotes y raíces reduce a menudo el alargamiento, y provoca que las hojas sean más pequeñas, más gruesas, y más verdes. Las plantas tratadas pueden tener retrasada la senescencia, lo que puede impedir la recolección o mejorar los rendimientos, dependiendo de la cosecha (véase Buchenauer, 1987).

Una mayor preocupación ha sido el desarrollo de resistencia, puesto que los fungicidas triazólicos tienen muchas de las mismas propiedades que los bencimidazoles. La resistencia a los fungicidas triazólicos se desarrolló primeramente en los oidios, y también se ha observado en otras enfermedades (véanse Kuck et al., 1987; Buchenauer, 1987; Ma et al., 2002).

Además, aunque el lanzamiento de fungicidas triazólicos proporcionó soluciones fungicidas sistémicas, potentes, para enfermedades por ascomicetos y basidiomicetos, el control de las enfermedades devastadoras por oomicetos, tales como tizón tardío de la patata y mildiu lanoso de la uva es limitado, y las putrefacciones de las raíces de plantas consolidadas (provocadas por *Phytophthora* y *Pythium*) y mildius sistémicos no se pueden controlar en absoluto aplicando fungicidas triazólicos.

Durante muchas décadas, el antimicótico macrólido poliénico natamicina se ha usado para prevenir el crecimiento fúngico en productos alimentarios tales como quesos y embutidos. Por ejemplo, en el documento EP 0748588 A1 se describe el uso de composiciones fúngicas que comprenden un agente antifúngico poliénico y un agente antifúngico imidazólico para el tratamiento de productos alimentarios y agrícolas. 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. 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.

En consecuencia, se puede concluir que hay una necesidad importante de composiciones antimicrobianas más eficaces, por ejemplo composiciones antifúngicas, para el tratamiento del crecimiento fúngico en y sobre plantas y cosechas.

Descripción de la invención

La presente invención resuelve el problema al proporcionar una nueva composición antimicrobiana, por ejemplo antifúngica, sinérgica que comprende el compuesto antifúngico poliénico natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas triazólicos seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol,

bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol y uniconazol-P. 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.

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: ((valor del estado de evolución del control no tratado – valor del estado de evolución de la composición)/(valor del estado de evolución del control no tratado))*100. Entonces se puede calcular un coeficiente de interacción 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.

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 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.

El al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas triazólicos se selecciona del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol y uniconazol-P. En una realización preferida, el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas triazólicos se selecciona del grupo que consiste en bitertanol, ciproconazol, difenoconazol, epoxiconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, metconazol, miclobutanilo, propiconazol, protioconazol, tebuconazol, tetraconazol, triticonazol y uniconazol. En incluso una realización más preferida, el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas triazólicos se selecciona del grupo que consiste en difenoconazol, epoxiconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, propiconazol, protioconazol, tebuconazol y tetraconazol. En una realización, las composiciones también pueden contener dos o más compuestos antifúngicos diferentes de la familia de fungicidas triazólicos. Los ejemplos de productos comerciales que contienen fungicidas triazólicos tales como propiconazol son los productos con el nombre comercial Tilt® (propiconazol), Propimax® (propiconazol), Bumper® (propiconazol), Quilt® (propiconazol + azoxistrobina) o Stratego® (propiconazol + trifloxistrobina). Los ejemplos de productos comerciales que contienen fungicidas triazólicos tales como tebuconazol son los productos con el nombre comercial Folicur® (tebuconazol), Orius® (tebuconazol), Uppercut® (tebuconazol) o Headline SBR® (tebuconazol + piraclostrobina). Los ejemplos de productos comerciales que contienen fungicidas triazólicos tales como tetraconazol, metconazol o protioconazol son los productos con el nombre comercial Domark® (tetraconazol), Twinline® (metconazol + piraclostrobina) o Stratego YLD® (protioconazol + trifloxistrobina) o Proline® (protioconazol), respectivamente. Dichos productos comerciales se pueden incorporar en la presente invención.

Los ejemplos de productos comerciales que contienen natamicina son los productos con el nombre comercial Delvocid®. 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.

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 triazólicos. Más preferiblemente, la cantidad es de 0,001 g/l a 1000 g/l.

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 triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P, 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.

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 un compuesto antifúngico poliénico (por ejemplo 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 natamicina. 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 fosfitos de potasio, por ejemplo KH_2PO_3 y K_2HPO_3, fosfitos de sodio y fosfitos de amonio, y ésteres alquílicos de (C_1-C_4) 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 triazólicos.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P.

La natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas triazólicos listada anteriormente 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 triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo,

penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P. 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 triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P. El producto se puede tratar mediante aplicación secuencial de la natamicina poliénica y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas triazólicos 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 triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P. 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 triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P 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 triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, ' diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P, 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 triazólicos 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 el compuesto antifúngico poliénico natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P, 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 CO_2, deficiencia de CO_2 o de O_2, 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; Pezicula 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 fruiticola; 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 atrofiliformis, 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 triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P, 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 triazólicos listada anteriormente 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 triazólicos listada anteriormente 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 triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P. 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 triazólicos listada anteriormente. Los productos tratados pueden comprender natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P 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/dm^2, preferiblemente 0,00001 a 100 mg/dm^2, más preferiblemente de 0,00005 a 10 mg/dm^2 de natamicina sobre su superficie. En una realización adicional, comprenden de 0,000001 a 200 mg/dm^2, preferiblemente 0,00001 a 100 mg/dm^2, más preferiblemente de 0,00005 a 10 mg/dm^2 del al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas triazólicos listada anteriormente 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.

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 o conveniente.

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.

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, 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.

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 triazoles seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P. 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

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 (bitertanol), composición 3 (ciproconazol), composición 4 (difenoconazol), composición 5 (fenbuconazol), composición 6 (flusilazol), composición 7 (flutriafol), composición 8 (metconazol), composición 9 (miclobutanilo), composición 10 (propiconazol), composición 11 (protioconazol), composición 12 (tebuconazol), composición 13 (tetraconazol), composición 14 (triticonazol), composición 15 (uniconazol), composición 16 (natamicina + bitertanol), composición 17 (natamicina + ciproconazol), composición 18 (natamicina + difenoconazol), composición 19 (natamicina + fenbuconazol), composición 20 (natamicina + flusilazol), composición 21 (natamicina + flutriafol), composición 22 (natamicina + metconazol), composición 23 (natamicina + miclobutanilo), composición 24 (natamicina +

propiconazol), composición 25 (natamicina + protioconazol), composición 26 (natamicina + tebuconazol), composición 27 (natamicina + tetraconazol), composición 28 (natamicina + triticonazol) y composición 29 (natamicina + uniconazol). 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

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 bitertanol, e) sumergidos en ciproconazol, f) sumergidos en difenoconazol, g) sumergidos en fenbuconazol, h) sumergidos en flusilazol, i) sumergidos en flutriafol, j) sumergidos en metconazol, k) sumergidos en miclobutanilo, l) sumergidos en propiconazol, m) sumergidos en protioconazol, n) sumergidos en tebuconazol, o) sumergidos en tetraconazol, p) sumergidos en triticonazol, q) sumergidos en uniconazol, r) sumergidos en natamicina + bitertanol, s) sumergidos en natamicina + ciproconazol, t) sumergidos en natamicina + difenoconazol, u) sumergidos en natamicina + fenbuconazol, v) sumergidos en natamicina + flusilazol, w) sumergidos en natamicina + flutriafol, x) sumergidos en natamicina + metconazol, y) sumergidos en natamicina + miclobutanilo, z) sumergidos en natamicina + propiconazol, z1) sumergidos en natamicina + protioconazol, z2) sumergidos en natamicina + tebuconazol, z3) sumergidos en natamicina + tetraconazol, z4) sumergidos en natamicina + triticonazol, z5) sumergidos en natamicina + uniconazol. Después de este tratamiento, los plátanos se incubaron en cajas cerradas a 21ºC a humedad elevada. Cada día, los plátanos se valoraron visualmente con respecto al desarrollo fúngico.

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

Ejemplo 3

Tratamiento de bananas

Se usaron cuatro plátanos inmaduros (verdes), orgánicos, por tratamiento. La piel de cada plátano se lesionó tres veces usando un sacacorchos según el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Subsiguientemente, cada lesión se inoculó con 15 μl de una suspensión de *Fusarium proliferatum* que contiene 1 x 10^5 esporas/ml. Después de un período de incubación de 4 horas a 20ºC, cada plátano lesionado se trató con 100 μl de una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 1000 ppm de propiconazol, o ambos. Además, las composiciones antifúngicas comprendían 1,00% (p/p) de metilhidroxietilcelulosa (MHEC), 0,40% (p/p) de goma de xantana, 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 potásico. El pH de la composición fue 4,0. Como control, se usó una composición sin natamicina o propiconazol. Los plátanos inmaduros, tratados se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20ºC y una humedad relativa del aire de 95%, que se obtuvo en presencia de una disolución acuosa de Na_2HPO_4 saturado. Durante los primeros 20 días de incubación, se incluyó en la caja cerrada un plátano maduro (amarillo) para elevar el nivel de gas etilénico, y de este modo, inducir la maduración de los plátanos inmaduros tratados.

El grado de crecimiento de moho en los plátanos se determinó contando el número de lesiones con moho por total de 12 lesiones después de 39 y 42 días de incubación.

Los resultados en la Tabla 1 demuestran claramente que la composición antifúngica que comprende 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de propiconazol protegió a los plátanos mejor frente al crecimiento de moho que la natamicina o el propiconazol solo.

Después de 39 y 42 días de incubación, las 12 lesiones tratadas con la composición de control o con natamicina sola mostraron crecimiento de moho, así como lo tuvieron 4 de las 12 lesiones tratadas con propiconazol solo. Sin embargo, cuando se trataron con la composición que comprende tanto natamicina como propiconazol, ninguna de las 12 lesiones mostró crecimiento de moho después de 39 días y sólo 1 de las 12 lesiones lo mostró después de 42 días (véase la Tabla 1).

Por tanto, la aplicación combinada de 500 ppm de natamicina y 1000 ppm de propiconazol tiene una actividad

antifúngica sinérgica sobre los plátanos.

Ejemplo 4

Tratamiento de plátanos

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada lesión de plátano inoculada se trató con 100 μl de una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 150 ppm de propiconazol, o ambos.

Durante la incubación, el grado de crecimiento de moho en los plátanos se evaluó de dos maneras: (i) se contó el número de lesiones con moho por total de 12 lesiones; y (ii) la actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales se determinó calculando la reducción del crecimiento de moho observada en las lesiones de los plátanos tratadas con la composición antifúngica en comparación con el crecimiento de moho en las lesiones de los plátanos 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):

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

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.

Los resultados en la Tabla 2 (número de lesiones con moho por total de 12 lesiones) y Tabla 3 (actividad antifúngica) demuestran que la composición antifúngica combinada que comprende 500 ppm de natamicina y 150 ppm de propiconazol fue más eficaz reduciendo el crecimiento de moho sobre los plátanos que la natamicina o propiconazol solo.

Después de 26 días de incubación, las 12 lesiones tratadas con la composición de control mostraron crecimiento de moho, así como lo tuvieron 8 de las 12 lesiones con natamicina sola y 9 de las 12 lesiones tratadas con propiconazol solo. Sin embargo, ninguna de las 12 lesiones tratadas con la composición que comprende natamicina y propiconazol, mostraron crecimiento de moho (véase la Tabla 2). Además, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como propiconazol fue 8% mayor que la actividad antifúngica esperada, lo que dio como resultado un factor de sinergia >1,0 (véase la Tabla 3).

Después de 27, 28, 29, 31 y 32 días de incubación, las 12 lesiones tratadas con la composición de control o con propiconazol solo tenían moho, así como lo tenían 8 de las 12 lesiones tratadas con natamicina sola. Sin embargo, cuando se usó para el tratamiento la composición que comprende natamicina y propiconazol, no se observó crecimiento de moho en ninguna de las 12 lesiones en los días 27, 28 y 29, y se observó sólo en 1 de las 12 lesiones en los días 31 y 32 (véase la Tabla 2). Además, la actividad antifúngica observada de la combinación de ingredientes activos de natamicina y propiconazol excedió la actividad antifúngica esperada con 8% a 18% entre los días 27 y 32 de incubación, y se obtuvieron factores de sinergia >1,0 (véase la Tabla 3).

Por tanto, la aplicación combinada de 500 ppm de natamicina y 150 ppm de propiconazol reduce sinérgicamente el crecimiento de moho sobre los plátanos.

Ejemplo 5

Tratamiento de bananas

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada lesión de plátano inoculada se trató con 100 μl de una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 500 ppm de propiconazol, o ambos. Durante la incubación, se evaluó el grado de crecimiento de moho sobre las lesiones de los plátanos según los dos métodos descritos en el Ejemplo 4.

Los resultados en la Tabla 4 (número de lesiones con moho por total de 12 lesiones) y en la Tabla 5 (actividad antifúngica) revelan que la composición antifúngica que comprende 250 ppm de natamicina así como 500 ppm de propiconazol fue superior a las composiciones que comprenden natamicina sola o propiconazol solo reduciendo el crecimiento de moho sobre los plátanos.

Después de 34 y 36 días de incubación, se observó crecimiento de moho para las 12 lesiones tratadas con la composición de control o con natamicina sola y para 10 de las lesiones tratadas con propiconazol solo. Sin embargo, cuando se trataron con la combinación de ingredientes activos de natamicina y propiconazol, sólo 7 de las 12 lesiones tenían moho después de 34 días y 8 de las 12 lesiones después de 36 días (véase la Tabla 4). Además, la

actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como propiconazol excedió la actividad antifúngica esperada con 11% y 21% después de 34 y 36 días de incubación, respectivamente. Consiguientemente, se obtuvieron factores de sinergia >1,0 (véase la Tabla 5).

Después de 39 y 42 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende natamicina y propiconazol fue respectivamente 32 y 38% mayor que la actividad antifúngica esperada. Consiguientemente, el factor de sinergia aumentó desde 1,1 en el día 34 hasta 1,8 en el día 39 y 2,1 en el día 42 (véase la Tabla 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 propiconazol es sinérgica cuando se aplica sobre plátanos.

Ejemplo 6

Tratamiento de plátanos

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada lesión de plátano inoculada se trató con 100 μl de una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 50 ppm de propiconazol, o ambos. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados sobre las lesiones de los plátanos tratados se determinó según el método descrito en el Ejemplo 4.

Los resultados en la Tabla 6 muestran que la composición antifúngica que comprende tanto 250 ppm de natamicina como 50 ppm de propiconazol tuvo una actividad antifúngica más fuerte que natamicina o propiconazol individualmente.

Después de 23, 27 y 29 días de incubación, la actividad antifúngica observada actualmente de la combinación de ingrediente activo de natamicina y propiconazol fue 8 a 18% mayor que la actividad antifúngica esperada, lo que dio como resultado factores de sinergia >1,0.

Por lo tanto, los resultados de este ejemplo demuestran claramente la actividad antifúngica sinérgica entre 250 ppm de natamicina y 50 ppm de propiconazol sobre plátanos.

Ejemplo 7

Tratamiento de plátanos

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada lesión de plátano inoculada se trató con 100 μl de una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 50 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 250 ppm de propiconazol, o ambos. Se evaluó el grado de crecimiento de moho sobre las lesiones de los plátanos según los dos métodos descritos en el Ejemplo 4.

Los resultados en la Tabla 7 (número de lesiones con moho por total de 12 lesiones) y en la Tabla 8 (actividad antifúngica) muestran que la combinación antifúngica combinada que comprende 50 ppm de natamicina y 250 ppm de propiconazol protegió los plátanos más eficazmente frente al crecimiento de moho sobre plátanos que las composiciones que comprenden natamicina o propiconazol solo.

Después de 29 días de incubación, las 12 lesiones tratadas con la composición de control o con natamicina sola tuvieron moho, así como lo tuvieron 5 de las 12 lesiones tratadas con propiconazol solo. Sin embargo, ninguna de las 12 lesiones tratadas con la composición que comprende natamicina y propiconazol mostró crecimiento de moho (véase la Tabla 7). Además, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como propiconazol fue 7% mayor que la actividad antifúngica esperada, lo que dio como resultado un factor de sinergia > 1.0 (véase la Tabla 8).

Después de 32 días de incubación, las 12 lesiones tratadas con la composición de control o con natamicina sola tuvieron moho, así como lo tuvieron 8 de las 12 lesiones tratadas con propiconazol solo. Sin embargo, sólo 2 de las 12 lesiones tratadas con la composición que comprende natamicina y propiconazol mostró crecimiento de moho (véase la Tabla 7). Además, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como propiconazol fue 7% mayor que la actividad antifúngica esperada y se obtuvo un factor de sinergia > 1.0 (véase la Tabla 8).

Después de 34 días de incubación, las 12 lesiones tratadas con la composición de control o con natamicina sola tuvieron moho, así como lo tuvieron 10 de las 12 lesiones tratadas con propiconazol solo. Sin embargo, sólo 4 de las 12 lesiones tratadas con la composición que comprende natamicina y propiconazol mostró crecimiento de moho (véase la Tabla 7). Además, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como propiconazol fue 10% mayor que la actividad antifúngica esperada. Por lo tanto, el factor de sinergia excedió 1.0 (véase la Tabla 8).

Después de 36, 39 y 42 días de incubación, las 12 lesiones tratadas con la composición de control, con natamicina sola o con propiconazol solo tuvieron moho. Sin embargo, cuando se aplicó la composición que comprende tanto natamicina como propiconazol sobre las lesiones, se observó crecimiento de moho para sólo 5 de las 12 lesiones en el día 36, 8 de las 12 lesiones en el día 39 y 10 de las 12 lesiones en el día 42 (véase la Tabla 7). Además, la actividad antifúngica observada de la combinación de ingrediente activo de natamicina y propiconazol excedió la actividad antifúngica esperada con 10, 30 y 37% después de 36, 39 y 42 días de incubación, respectivamente. Consiguientemente, el factor de sinergia aumentó de 1,1 en el día 29, 32 y 34 hasta 1,2 en el día 36, 1,5 en el día 39 y 1,8 en el día 42 (véase la Tabla 8).

De este modo, la aplicación combinada de 50 ppm de natamicina y 250 ppm de propiconazol conduce a una reducción sinérgica sorprendentemente fuerte en el crecimiento de moho sobre plátanos.

Ejemplo 8

Tratamiento de plátanos

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada lesión de plátano inoculada se trató con 100 μl de una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 500 natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 250 protioconazol o ambos. Como control, se usó una composición sin natamicina o protioconazol. El grado de crecimiento de moho sobre los plátanos se determinó contando el número de lesiones con moho por total de 12 lesiones después de 27 y 29 días de incubación.

Los resultados en la Tabla 9 revelan que la composición que comprende 500 natamicina y 250 ppm de protioconazol tuvo más éxito a la hora de limitar el crecimiento de moho sobre plátanos que natamicina o protioconazol individualmente.

Después de 27, 28 y 29 días de incubación, las 12 lesiones tratadas con la composición de control mostraron crecimiento de moho. Además, se observó crecimiento de moho para 8 de las lesiones tratadas con natamicina sola y 10 de las lesiones tratadas con protioconazol solo. Sin embargo, sólo 2 de las 12 lesiones tratadas con la composición que comprende natamicina y protioconazol tuvieron moho (véase la Tabla 9).

En conclusión, la combinación de ingredientes activos de 500 ppm de natamicina y 250 ppm de protioconazol tiene actividad sinérgica antifúngica sobre plátanos.

Ejemplo 9

Tratamiento de plátanos

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, excepto por el hecho de que cada lesión de plátano inoculada se trató con 100 μl de una composición antifúngica acuosa recientemente preparada que comprende 250 natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 100 protioconazol o ambos. Como control, se usó una composición sin natamicina o protioconazol. El grado de crecimiento de moho se determinó como se describe en el Ejemplo 8.

Los resultados en la Tabla 10 demuestran que la composición que comprende 250 ppm de natamicina y 100 ppm de protioconazol protegió los plátanos mejor frente al crecimiento de moho que natamicina o protioconazol individualmente.

Después de 27, 28 y 29 días de incubación, las 12 lesiones tratadas con la composición de control o con natamicina sola tuvieron moho. De las 12 lesiones tratadas con protioconazol solo, 11 lesiones mostraron crecimiento de moho en el día 27 y 12 en el día 28 y 29. Sin embargo, sólo 9 de las 12 lesiones tratadas con la composición que comprende natamicina y protioconazol tuvieron moho después de 27, 28 y 29 días de incubación (véase la Tabla 10).

Este ejemplo demuestra claramente que existe actividad antifúngica sinérgica entre 250 ppm de natamicina y 100 ppm de protioconazol cuando se aplican como combinación de ingredientes activos sobre plátanos.

Ejemplo 10

Tratamiento de fresas

Se usaron doce 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 10^5 esporas/ml. Después de un período de incubación de 2 horas a 20ºC, cada fresa 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 protioconazol, o ambos. Las composiciones antifúngicas también comprendían 1,00% (p/p) de metilhidroxietilcelulosa (MHEC), 0,40% (p/p) de goma de xantana, 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 potásico.

El pH de la composición fue 4,0. Como control, se usó una composición sin natamicina o propiconazol. Las fresas tratadas se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20ºC durante 3 días.

Después de 2 y 3 días de 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 12 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 según el método de Colby descrito en el Ejemplo 4 (Colby, 1967).

Los resultados en la Tabla 11 (número de fresas con moho por total de 12 fresas) y en la Tabla 12 (actividad antifúngica) demuestran que la composición antifúngica que comprende 250 ppm de natamicina y 500 ppm de protioconazol tuvo una actividad antifúngica más fuerte sobre fresas que natamicina o protioconazol solos.

Después de 2 días de incubación, las 12 fresas tratadas con la composición de control o con protioconazol solo mostraron crecimiento de moho, mientras que 10 de las 12 fresas tratadas con natamicina sola tuvieron moho. Sin embargo, se observó crecimiento de moho sólo para 6 de las 12 fresas tratadas con la composición que comprende natamicina y protioconazol (véase la Tabla 11). Además, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como protioconazol excedió la actividad antifúngica esperada con 14%, lo que dio como resultado un factor de sinergia >1.0 (véase la Tabla 12).

Después de 3 días de incubación, las 12 fresas tratadas con la composición de control, con natamicina sola o con protioconazol solo mostraron crecimiento de moho. Sin embargo, sólo 8 de las 12 fresas tratadas con la composición que comprende natamicina y protioconazol tuvieron moho (véase la Tabla 11). Además, la actividad antifúngica observada de la composición combinada que comprende natamicina y protioconazol fue 10% mayor que la actividad antifúngica esperada y se obtuvo un factor de sinergia >1.0 (véase la Tabla 12).

Por lo tanto, la aplicación combinada de 250 ppm de natamicina y 500 ppm de protioconazol reduce sinérgicamente el crecimiento de moho en fresas.

Ejemplo 11

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 μl de una suspensión de *Penicillium italicum* que contiene 1 x 10^4 esporas/ml. Tras la incubación durante 2 horas a 20ºC, 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), 600 ppm de protioconazol, 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 polioxietilen 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 4,0. Como control, se usó una composición sin natamicina o protioconazol.

Las mandarinas tratadas se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20ºC y se evaluaron con respecto al crecimiento de moho después de 25, 28, 31 y 34 días de 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 4.

Los resultados en la Tabla 13 demuestran que la composición antifúngica que comprende 500 ppm de natamicina y 600 ppm de protioconazol fue superior a las composiciones que comprenden natamicina o propiconazol solos previniendo el crecimiento de moho en mandarinas.

Después de 25, 28, 31 y 34 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende tanto natamicina como propiconazol fue respectivamente 6, 12, 32 y 38% mayor que la actividad antifúngica esperada. Consiguientemente, el factor de sinergia aumentó de 1,1 en el día 25 hasta 1,4 en el día 34 (véase la Tabla 13).

De este modo, la aplicación combinada de 500 ppm de natamicina y 600 ppm de propiconazol reduce sinérgicamente el crecimiento de moho en mandarinas.

Ejemplo 12

Tratamiento de mandarinas

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 11, 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), 150 ppm de protioconazol, o ambos. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados en mandarinas se evaluó después de 13, 16, 21, 26, 29 y 34 días de incubación según el método de Colby (Colby, 1967) descrito en el Ejemplo 4.

Los resultados (véase la Tabla 14) revelan que la composición antifúngica que comprende 250 ppm de natamicina y 150 ppm de protioconazol fue más eficaz reduciendo el crecimiento de moho en mandarinas que natamicina o protioconazol solos.

Después de 13, 16, 21, 26, 29 y 34 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la combinación de ingrediente activo de natamicina y protioconazol excedió la actividad antifúngica esperada con 10, 15, 17, 28, 35 y 38% respectivamente. El factor de sinergia aumentó de 1,1 en el día 13 hasta 2,4 en el día 34 (véase la Tabla 14).

Por lo tanto, se puede concluir que la aplicación combinada de 250 ppm de natamicina y 150 ppm de protioconazol conduce a una reducción sinérgica en el crecimiento de moho en mandarinas.

Ejemplo 13

Actividad antifúngica *in vitro*

Para demostrar la actividad antifúngica sinérgica de la combinación de natamicina con propiconazol o protioconazol 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),
- 0,63 ó 1,25 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos),
- 0,50 ó 1,00 ppm de propiconazol,
- 0,13 ppm de protioconazol,
- 0,63 ppm de natamicina + 1,00 ppm de propiconazol,
- 1,25 ppm de natamicina + 0,50 ppm de propiconazol,
- 1,25 ppm de natamicina + 0,13 ppm de protioconazol.

Después de llenar cada pocillo de una placa de microtitulación con 92 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 x 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 durante 5 y 10 días a 25ºC, 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.

Los resultados (véase la Tabla 15) demuestran que la combinación tanto de natamicina+propiconazol como de natamicina+protioconazol tuvo actividades antifúngicas mucho más fuertes frente a *Botrytis cinerea* que natamicina, propiconazol o protioconazol individualmente. Las actividades antifúngicas observadas de las combinaciones de natamicina+propiconazol y natamicina+protioconazol fueron 50 a 100% mayores que las actividades antifúngicas esperadas. En consecuencia, se obtuvieron factores de sinergia por encima de 1,0.

Por tanto, la aplicación combinada de natamicina y propiconazol así como la aplicación combinada de natamicina y protioconazol inhiben sinérgicamente el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

Ejemplo 14

Actividad antifúngica *in vitro*

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 13, excepto por el hecho de que se ensayaron las siguientes composiciones:

- Control (sin ingrediente activo),
- 2,5 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos),
- 7,5 ó 10,0 ppm de propiconazol,
- 0,5 ppm de protioconazol,
- 2,5 ppm de natamicina + 7,5 ppm de propiconazol,
- 2,5 ppm de natamicina + 10,0 ppm de propiconazol,
- 2,5 ppm de natamicina + 0,5 ppm de protioconazol.

Además, para la inoculación se usó *Fusarium proliferatum*. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados se determinó según el método descrito en el Ejemplo 13.

Los resultados (véase la Tabla 16) revelan que las combinaciones de ingredientes activos natamicina+propiconazol y natamicina+protioconazol inhiben el crecimiento de *Fusarium proliferatum* más eficazmente que natamicina, propiconazol o protioconazol individualmente. Las actividades antifúngicas observadas de las combinaciones de ingredientes activos natamicina + propiconazol y natamicina + protioconazol excedieron las actividades antifúngicas esperadas con 50 a 100%, que dio como resultado factores de sinergia por encima de 1,0.

Por tanto, la aplicación combinada de natamicina y propiconazol así como la aplicación combinada de natamicina y protioconazol presentan actividad antifúngica sinérgica fuerte frente a *Fusarium proliferatum*.

Tabla 1. Número lesiones con moho en plátanos incubados a 20ºC después de tratamiento con composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 1000 ppm de protioconazol, o ambos.

Composición antifúngica	Número de lesiones con moho / número total de 12 lesiones durante el tiempo de incubación (en días)	
	Día 39	Día 42
Control	12/12	12/12
Natamicina 500 ppm	12/12	12/12
Propiconazol 1000 ppm	4/12	4/12
Natamicina 500 ppm + propiconazol 1000 ppm	0/12	1/12

Tabla 2. Número lesiones con moho en plátanos incubados a 20ºC después de tratamiento con composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 150 ppm de propiconazol, o ambos.

Composición antifúngica	Número de lesiones con moho / número total de 12 lesiones durante el tiempo de incubación (en días)		
	Día 26	Días 27-29	Días 31-32
Control	12/12	12/12	12/12
Natamicina 500 ppm	8/12	8/12	8/12
Propiconazol 150 ppm	9/12	12/12	12/12
Natamicina 500 ppm + propiconazol 150 ppm	0/12	0/12	1/12

Tabla 3. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 150 ppm de propiconazol, o ambos, en plátanos tras la incubación a 20ºC.

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		81	-	-
Propiconazol 150 ppm		57	-	-
Natamicina 500 ppm + propiconazol 150 ppm		100	92	1,1
Control	28	0	-	-
Natamicina 500 ppm		81	-	-
Propiconazol 150 ppm		56	-	-
Natamicina 500 ppm + propiconazol 150 ppm		100	91	1,1
Control	29	0	-	-
Natamicina 500 ppm		81	-	-
Propiconazol 150 ppm		54	-	-
Natamicina 500 ppm + propiconazol 150 ppm		100	91	1,1
Control	31	0	-	-
Natamicina 500 ppm		74	-	-
Propiconazol 150 ppm		44	-	-
Natamicina 500 ppm + propiconazol 150 ppm		99	85	1,2
Control	32	0	-	-
Natamicina 500 ppm		72	-	-
Propiconazol 150 ppm		33	-	-
Natamicina 500 ppm + propiconazol 150 ppm		99	81	1,2

Tabla 4. Número lesiones con moho en plátanos incubados a 20ºC después de tratamiento con composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de propiconazol, o ambos.

Composición antifúngica	Número de lesiones con moho / número total de 12 lesiones durante el tiempo de incubación (en días)	
	Día 34	Día 36
Control	12/12	12/12

Composición antifúngica	Número de lesiones con moho / número total de 12 lesiones durante el tiempo de incubación (en días)	
	Día 34	Día 36
Natamicina 250 ppm	12/12	12/12
Propiconazol 500 ppm	10/12	10/12
Natamicina 250 ppm + propiconazol 500 ppm	7/12	8/12

Tabla 5. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de propiconazol, o ambos, en plátanos tras la incubación a 20ºC.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	34	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Propiconazol 500 ppm		74	-	-
Natamicina 250 ppm + propiconazol 500 ppm		85	74	1,1
Control	36	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Propiconazol 500 ppm		62	-	-
Natamicina 250 ppm + propiconazol 500 ppm		83	62	1,3
Control	39	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Propiconazol 500 ppm		43	-	-
Natamicina 250 ppm + propiconazol 500 ppm		75	43	1,7
Control	42	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Propiconazol 500 ppm		33	-	-
Natamicina 250 ppm + propiconazol 500 ppm		71	33	2,2

Tabla 6. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 50 ppm de propiconazol, o ambos, en plátanos tras la incubación a 20ºC.

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		23	-	-
Propiconazol 50 ppm		36	-	-
Natamicina 250 ppm + propiconazol 50 ppm		59	51	1,2
Control	27	0	-	-
Natamicina 250 ppm		26	-	-
Propiconazol 50 ppm		30	-	-
Natamicina 250 ppm + propiconazol 50 ppm		66	48	1,4
Control	29	0	-	-
Natamicina 250 ppm		29	-	-
Propiconazol 50 ppm		35	-	-
Natamicina 250 ppm + propiconazol 50 ppm		69	53	1,3

Tabla 7. Número lesiones con moho en plátanos incubados a 20ºC después de tratamiento con composiciones que comprenden 50 ppm de natamicina, 250 ppm de propiconazol, o ambos.

Composición antifúngica	Número de lesiones con moho / número total de 12 lesiones durante el tiempo de incubación (en días)					
	Día 29	Día 32	Día 34	Día 36	Día 39	Día 42
Control	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Natamicina 50 ppm	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Propiconazol 250 ppm	5/12	8/12	10/12	12/12	12/12	12/12
Natamicina 50 ppm + propiconazol 250 ppm	0/12	2/12	4/12	5/12	8/12	10/12

Tabla 8. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 50 ppm de natamicina, 250 ppm de propiconazol, o ambos, en plátanos tras la incubación a 20ºC.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	29	0	-	-
Natamicina 50 ppm		4	-	-
Propiconazol 250 ppm		92	-	-
Natamicina 50 ppm + propiconazol 250 ppm		100	93	1,1
Control	32	0	-	-
Natamicina 50 ppm		1	-	-
Propiconazol 250 ppm		90	-	-
Natamicina 50 ppm + propiconazol 250 ppm		97	90	1,1
Control	34	0	-	-
Natamicina 50 ppm		1	-	-
Propiconazol 250 ppm		85	-	-
Natamicina 50 ppm + propiconazol 250 ppm		95	85	1,1
Control	36	0	-	-
Natamicina 50 ppm		0	-	-
Propiconazol 250 ppm		81	-	-
Natamicina 50 ppm + propiconazol 250 ppm		94	81	1,2
Control	39	0	-	-
Natamicina 50 ppm		0	-	-
Propiconazol 250 ppm		57	-	-
Natamicina 50 ppm + propiconazol 250 ppm		87	57	1,5
Control	42	0	-	-
Natamicina 50 ppm		0	-	-
Propiconazol 250 ppm		47	-	-
Natamicina 50 ppm + propiconazol 250 ppm		84	47	1,8

Tabla 9. Número lesiones con moho en plátanos incubados a 20ºC después de tratamiento con composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 250 ppm de protioconazol, o ambos.

Composición antifúngica	Número de lesiones con moho / número total de 12 lesiones durante el tiempo de incubación (en días)
	Día 27, 28 y 29
Control	12/12
Natamicina 500 ppm	8/12
Protioconazol 250 ppm	10/12
Natamicina 500 ppm + protioconazol 250 ppm	2/12

Tabla 10. Número lesiones con moho en plátanos incubados a 20ºC después de tratamiento con composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 100 ppm de protioconazol, o ambos.

Composición antifúngica	Número de lesiones con moho / número total de 12 lesiones durante el tiempo de incubación (en días)	
	Día 27	Día 28 y 29
Control	12/12	12/12
Natamicina 250 ppm	12/12	12/12
Protioconazol 100 ppm	11/12	12/12
Natamicina 250 ppm + protioconazol 100 ppm	9/12	9/12

Tabla 11. Número fresas con moho incubadas a 20ºC después de tratamiento con composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de protioconazol, o ambos.

Composición antifúngica	Número de lesiones con moho / número total de 12 lesiones durante el tiempo de incubación (en días)	
	Día 2	*Día 3*
Control	12/12	12/12
Natamicina 250 ppm	10/12	12/12
Protioconazol 500 ppm	12/12	12/12
Natamicina 250 ppm + protioconazol 500 ppm	6/12	8/12

Tabla 12. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 500 ppm de protioconazol, o ambos, en fresas tras la incubación a 20ºC.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	2	0	-	-
Natamicina 250 ppm		31	-	-
Protioconazol 500 ppm		14	-	-
Natamicina 250 ppm + protioconazol 500 ppm		55	41	1,4
Control	3	0	-	-
Natamicina 250 ppm		24	-	-
Protioconazol 50 ppm		21	-	-
Natamicina 250 ppm + protioconazol 500 ppm		50	40	1,2

Tabla 13. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 600 ppm de protioconazol, o ambos, en mandarinas tras la incubación a 20ºC.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	25	0	-	-
Natamicina 500 ppm		34	-	-
Protioconazol 600 ppm		91	-	-
Natamicina 500 ppm + protioconazol 600 ppm		100	94	1,1
Control	28	0	-	-
Natamicina 500 ppm		27	-	-
Protioconazol 600 ppm		83	-	-
Natamicina 500 ppm + protioconazol 600 ppm		100	88	1,1
Control	31	0	-	-
Natamicina 500 ppm		24	-	-
Protioconazol 600 ppm		71	-	-
Natamicina 500 ppm + protioconazol 600 ppm		100	78	1,3
Control	34	0	-	-

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Natamicina 500 ppm		24	-	-
Protioconazol 600 ppm		63	-	-
Natamicina 500 ppm + protioconazol 600 ppm		100	72	1,4

Tabla 14. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 150 ppm de protioconazol, o ambos, en mandarinas tras la incubación a 20ºC.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	13	0	-	-
Natamicina 250 ppm		27	-	-
Protioconazol 150 ppm		86	-	-
Natamicina 250 ppm + protioconazol 150 ppm		100	90	1,1
Control	16	0	-	-
Natamicina 250 ppm		15	-	-
Protioconazol 150 ppm		82	-	-
Natamicina 250 ppm + protioconazol 150 ppm		100	85	1,2
Control	21	0	-	-
Natamicina 250 ppm		6	-	-
Protioconazol 150 ppm		71	-	-
Natamicina 250 ppm + protioconazol 150 ppm		100	73	1,4
Control	26	0	-	-
Natamicina 250 ppm		5	-	-
Protioconazol 150 ppm		63	-	-
Natamicina 250 ppm + protioconazol 150 ppm		93	65	1,4
Control	29	0	-	-
Natamicina 250 ppm		3	-	-
Protioconazol 150 ppm		40	-	-
Natamicina 250 ppm + protioconazol 150 ppm		77	42	1,8

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	34	0	-	-
Natamicina 250 ppm		0	-	-
Protioconazol 150 ppm		27	-	-
Natamicina 250 ppm + protioconazol 150 ppm		65	27	2,4

Tabla 15. Actividad antifúngica *in vitro* (%) de natamicina en combinación con propiconazol o protioconazol frente a *Botrytis cinerea* tras la incubación a 25ºC.

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Control	5	0	-	-
Natamicina 0,63 ppm		0	-	-
Natamicina 1,25 ppm		0	-	-
Propiconazol 0,50 ppm		0	-	-
Propiconazol 1,00 ppm		0	-	-
Protioconazol 0,13 ppm		0	-	-
Natamicina 0,63 ppm + Propiconazol 1,00 ppm		100	0	>100
Natamicina 1,25 ppm + Propiconazol 0,50 ppm		100	0	>100
Natamicina 1,25 ppm + Protioconazol 0,13 ppm		100	0	>100
Control	10	0	-	-
Natamicina 1,25 ppm		0	-	-
Protioconazol 0,13 ppm		50	-	-
Natamicina 1,25 ppm + Protioconazol 0,13 ppm		100	50	2,0

Tabla 16. Actividad antifúngica *in vitro* (%) de natamicina en combinación con propiconazol o protioconazol frente a *Fusarium proliferatum* tras la incubación a 25ºC.

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

Composición antifúngica	Tiempo de incubación (días)	Actividad antifúngica observada O (%)	Actividad antifúngica esperada E (%)	Factor de sinergia O/E
Natamicina 2,5 ppm		0	-	-
Propiconazol 7,5 ppm		0	-	-
Propiconazol 10,0 ppm		0	-	-
Natamicina 2,5 ppm + Propiconazol 7,5 ppm		50	0	>50
Natamicina 2,5 ppm + Propiconazol 10,0 ppm		100	0	>100
Control		0	-	-
Natamicina 2,5 ppm	10	0	-	-
Protioconazol 0,5 ppm		50	-	-
Natamicina 2,5 ppm + Protioconazol 0,5 ppm		100	0	2,0

REFERENCIAS

Buchenauer H (1987), DMI fungicide: Side effects on the plant and problems of resistance. Páginas 259-290 en: Modern Selective Fungicides, 2ª Ed. H. Lyr, ed. Gustav Fisher Verlag, Jena, Alemania.

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

Kuck KH, Scheinpflug H y Pontzen R (1987), DMI fungicides. Páginas 205-258 en: Modern Selective Fungicides, 2ª Ed. H. Lyr, ed. Gustav Fisher Verlag, Jena, Alemania.

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

Ma Z, Morgan DP, Felts D y Michailides TJ (2002), Sensitivity of Botryosphaeria dothidea from California pistachio to tebuconazol. Crop Prot. 21:829-835.

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas triazólicos seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol y uniconazol-P.

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.

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 triazólicos está en el intervalo de 0,0001 g/l a 2000 g/l.

4. Un kit que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas triazólicos seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol y uniconazol-P.

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 triazólicos seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol y uniconazol-P.

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.

10. Un producto que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de fungicidas triazólicos seleccionado del grupo que consiste en amisulbrom, azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluotrimazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triazbutilo, triticonazol, uniconazol y uniconazol-P.

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.