

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 418**

51 Int. Cl.:

A01N 63/02	(2006.01)	C07D 223/04	(2006.01)
A01N 43/08	(2006.01)	C07D 295/18	(2006.01)
A01N 43/72	(2006.01)	C07D 307/33	(2006.01)
A01N 35/06	(2006.01)	C07D 309/30	(2006.01)
A01P 9/00	(2006.01)		
C07C 59/42	(2006.01)		
C07C 233/06	(2006.01)		
C07D 207/04	(2006.01)		
C07C 233/09	(2006.01)		
C07D 211/06	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2010** **E 13158219 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017** **EP 2601840**

54 Título: **Agentes químicos y biológicos para el control de moluscos**

30 Prioridad:

20.04.2009 US 170790 P
20.04.2009 US 170686 P
10.12.2009 US 285525 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2017

73 Titular/es:

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. (100.0%)
2121 Second Street, Suite B-107
Davis, CA 95618, US

72 Inventor/es:

ASOLKAR, RATNAKAR;
RACKL, SARAHANN;
HUANG, HUAZHANG;
KOIVUNEN, MARJA;
MARRONE, PAMELA y
SHU, STEPHANIE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 618 418 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

Agentes químicos y biológicos para el control de moluscos

5 **Campo de la invención**

Composiciones y métodos para controlar moluscos, tales como mejillones y/o caracoles y/o babosas que incluyen, pero no se limitan a, lactonas, lactamas, carbamatos, amidas y/o compuestos que contienen ácido carboxílico como principios activos y/o compuestos derivados de un microbio (por ejemplo, *Pseudomonas* y/o *Envinia*). También se proporcionan métodos y composiciones para aumentar la eficacia del control químico y biológico para moluscos, tales como mejillones y/o caracoles y/o babosas en aguas abiertas, centrales eléctricas e instalaciones de tratamiento de agua potable bajo condiciones de agua fría o superficies sólidas.

15 **Antecedentes de la invención**

El mejillón cebra *Dreissena polymorpha* es originario del mar Caspio y del río Ural en Asia. En el siglo XIX, se extendió al oeste y ahora está presente en la mayoría de Europa, la porción occidental de la Comunidad de Estados Independientes (antiguamente la Unión Soviética) y Turquía. Durante hace más de dos décadas, los mejillones, tales como el mejillón cebra, *Dreissena polymorpha* y el mejillón quagga, *Dreissena bugensis*, se introdujeron en América del Norte. Su amplia extensión a través de las aguas interiores ha conducido a una cobertura de la mayoría del este de EE.UU. [U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station. 1995. Zebra mussels: Biology, Ecology, and Recommended Control Strategies. Technical Note. ZMR-1-01. Zebra Mussel Research Program, Vicksburg, MS]. Similarmente, el mejillón dorado, *Limnoperna fortunei*, afectó los países asiáticos y de América del Sur (mejillón dorado - *Limnoperna fortunei*). El bivalvo asiático *Corbicula fluminea* casi se extendió en todos los países asiáticos y EE.UU. [Non-indigenous species information bulletin: Asian clam, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Mollusca: Corbiculidae)]. Y otros mejillones tales como los mejillones unionidos existen en EE.UU. y otros países.

La capacidad de los mejillones para colonizar rápidamente nuevas áreas, lograr rápidamente altas densidades y unirse a cualquier sustrato duro (por ejemplo, rocas, troncos, plantas acuáticas, conchas de mejillones nativos y exoesqueletos de cangrejos de río, plástico, hormigón, madera, fibra de vidrio, tuberías hechas de hierro y poli(cloruro de vinilo) y superficies cubiertas con pinturas convencionales) hace que produzcan consecuencias adversas graves. Estas consecuencias incluyen daños de la infraestructura dependiente del agua, aumento de los millones de dólares en el gasto de operación y daño significativo de los sistemas ecológicos [O'Neill, C.R., Jr. 1997, Economic impact of zebra mussels-results of the 1995 national zebra mussel information clearing house study. Gt. Lakes Res. Rev. 3, 35-44; Karatayev, A.Y., L.E. Burlakova, D.K., Padilla, 1997, the effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communalities in eastern Europe. Journal Shellfish Research, 16, 187-203; Maclsaac, H.J., 1996. Potential abiotic and biotic impacts of zebra mussels on the inland waters of North America. American Zoology, 36, 289-299; D.P. Molloy, the potential for using biological control technologies in the management of *Dreissena* spp, Journal of Shellfish Research, 1998 (17) 177-183], además de reducción de la productividad que cuesta billones de dólares en ingreso perdido (Connelly, N. A., C. R. O'Neill, Jr, et al. (2007), "Economic impacts of Zebra mussels on drinking water treatment and electric power generation facilities", Environmental Management 90:10. Economic impacts of zebra mussels on drinking water treatment and electric power generation facilities. Environmental Management 40: 105-112). Adicionalmente, la rápida invasión de los ecosistemas acuáticos por estos mejillones invasivos ha causado una disminución en la riqueza y abundancia de mejillones unionidos endémicos, una parte importante de la biodiversidad (Ricciardi, A, Neves, R.J., Rasmussen, J.B. 1998. Impending extinctions of North American freshwater mussels (Unionidae) following the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) invasion. Journal of Animal Ecology 67: 613-619).

La gestión de los mejillones es muy importante para proteger la infraestructura dependiente del agua y sistemas ecológicos del agua. Hay muchas formas de reducir las poblaciones de mejillones. Estos métodos incluyen métodos pre-activos y reactivos. La eliminación reactiva incluye la eliminación mecánica, eliminación mediante predadores y eliminación química y bioquímica. Por ejemplo, se ha mostrado que las aves, cangrejos de río, cangrejos, sanguijuelas y mamíferos depredan mejillones. Sin embargo, es poco probable que la población de mejillones se controle por predación natural, especialmente en estructuras hechas por el hombre tales como tuberías o plantas de bombeo.

La aplicación de molusquicidas es otra forma eficaz de reducir la población de mejillones. Por ejemplo, el hipoclorito de sodio es un agente de control comúnmente usado en Europa, EE.UU. y Canadá. Sin embargo, los mejillones pueden resistir a este tratamiento durante varios días cerrando sus conchas y el cloro solo puede ser usado en tuberías o conductos que contienen equipo de detección de presión u otro equipo debido a la toxicidad medioambiental del cloro [U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station. 1995. Zebra mussels: Biology, Ecology, and Recommended Control Strategies. Technical Note. ZMR-1-01. Zebra Mussel Research Program, Vicksburg, MS]. Además, hay muchos otros molusquicidas comercializados tales como sales de amonio tensioactivas, hidroxitolueno butilado (BHT) en pinturas, N-trifenilmetil-morfolina, etc. Estos productos químicos tanto reducen la selectividad como afectan los ecosistemas del agua. Por ejemplo, un 4-trifluoroetil-4-nitrofenol comercializado como Bayluscide® (Bayer) es un posible candidato para el control de tales especies exóticas

invasivas. Sin embargo, el mecanismo tóxico de un producto químico tal es afectar la respiración celular del mejillón, que en la naturaleza limitará su selectividad entre el mejillón y otras especies acuáticas tales como los peces [Karen Perry & John Lynn, Detecting physiological and pesticide-induced apoptosis in early developmental stages of invasive bivalves, *Hydrobiologia* (2009) 628:153-164; I Takougang, J Meli, F Angwafo, Field trials of low dose Bayluscide on snail hosts of schistosome and selected non-target organisms in sahelian Cameroon, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2006, 101(4): 355-358].

Es crucial tratar los mejillones invasivos de una forma segura, respetuosa con el medio ambiente y barata. Con el fin de encontrar métodos menos perjudiciales para controlar estos mejillones invasivos, el Laboratorio de investigación de campo del Museo del Estado de Nueva York (NYSM) investigó más de 700 cepas clínicas bacterianas como posibles agentes de control biológico que iban a usarse contra mejillones cebra y quagga. Como resultado, encontraron una cepa clínica, la cepa CL145A de *Pseudomonas fluorescens*, que era letal para estos mejillones (véase Molloy, D. P., patente de EE.UU. N.º 6.194.194, concedida el 27 de febrero de 2001). Esta bacteria está en distribución mundial y está presente en todos los cuerpos de agua de América del Norte. En la naturaleza es una especie bacteriana inocua que se encuentra protegiendo a las raíces de plantas de la podredumbre y el mildiu. Es tan ubicua que es un organismo de desperdicios de comida común en el frigorífico doméstico medio [Daniel P. Molloy and Denise A. Mayer, Overview of a Novel Green Technology: Biological Control of Zebra and Quagga Mussels with *Pseudomonas fluorescens*, Versión 6: Actualizado el 24 de agosto de 2007].

LACTONAS, LACTAMAS, CARBAMATO Y AMIDAS

Las lactonas están ampliamente distribuidas en alimentos y bebidas, y también son metabolitos secundarios de los animales (por ejemplo, esponjas) y microorganismos (por ejemplo, levaduras, hongos). Algunas lactonas tienen un aroma especial (por ejemplo, gamma-decalactona), que produce un aumento de la demanda de productos naturales en la industria alimentaria por el uso de procesos biotecnológicos para la producción de estas lactonas [Mohamed Alchihab, Jacqueline Destain, Mario Aguedo, Lamia Majad, Hakim Ghalfi, Jean-Paul Wathelet, Philippe Thonart, Production of γ -Decalactone by a Psychrophilic and a Mesophilic Strain of the Yeast *Rhodotorula aurantiaca*, *Appl Biochem Biotechnol* (2009) 158:41-50]. Otras funciones de diferentes lactonas están asociadas a actividad antibacteriana [Ikuko Shimizu, Yasunori Isshiki, Harue Nomura, Keisuke Sakuda, Katsuya Sakuma, Seiichi Kondo, The Antibacterial Activity of Fragrance Ingredients against *Legionella pneumophila*, *Biol. Pharm. Bull.* 2009, 32(6) 1114-1117], actividad hepatoprotectora [Yumiko Itoh, Hiroshi Shimura, Mayumi Ito, Naoharu Watanabe, Michio Yamagishi, Masaharu Tamai and Kazunori Hanada, Novel hepatoprotective γ -lactone, MH-031, I. Discovery isolation, physicochemical properties and structural elucidation, *The Journal of Antibiotics* 1991, 832-837], actividad anti-tuberculosis [Ma, G.Y. et al. anti-tuberculosis constituents from the stem bark of *micromelum hirsutum*, *Planta Med.* 2005, 71, 261-267], actividad anti-VIH [zhang et al., sesquiterpenes and butenolides, natural anti-HIV constituents from *Litsea verticillata*, *Planta Med.* 2005, 71, 452-457], feromona sexual [J. H. Tumlinson, Identification of the Female Japanese Beetle Sex Pheromone Inhibition of Male Response by an Enantiomer, *Science*, 1977, 197, 789-792], actividad citotóxica [Fan, X. N. et al. Chemical Constituents of *Heteroplexis micocephala*, *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1184-1190], moléculas señal [M.K. Vinson, et al. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 9427-9431] y actividad insecticida [John A. Findlay, et al., Insect toxins from spruce endophytes, *Can. J. Chem.* 2003, 81, 284-292].

Aunque las lactamas existen en algunas plantas y organismos marinos, frecuentemente son metabolitos fúngicos. Muchas actividades biológicas (por ejemplo, actividad citotóxica y antitumoral, inhibición de la angiogénesis, actividad neuronal, actividades antiinfecciosas) se revisaron en una publicación reciente [Bastien Nay, Nassima Riache and Laurent Evanno, Chemistry and biology of non-tetramic γ -hydroxy- γ -lactams and γ -alkylidene- γ -lactams from natural sources, *Natural Product reports*, 2009, 26, 1044-1062].

Los carbamatos existen en plantas, microorganismos y esponjas, pero se informan menos actividades biológicas para estos compuestos en comparación con las lactonas, amidas debido a que muchos de estos compuestos no son estables en soluciones acuosas. Hubo un ejemplo de actividad fungicida de carbamatos naturales [Richard J. Clark, et al., Antifungal Alkyl Amino Alcohols from the Tropical Marine Sponge *Haliclona* n. sp., *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 1568-1571]. Las amidas están ampliamente distribuidas en plantas, microorganismos y esponjas. Por ejemplo, la escalusamida A del hongo derivado del mar *Penicillium citrinum* presentó actividad antibacteriana y antifúngica [Masashi Tsuda, et al., Scalusamides A-C, New Pyrrolidine Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*, *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 273-276].

Otro ejemplo de una amida es un compuesto derivado de planta llamado sarmentina, que presentó muchas bioactividades. Como se describe en la solicitud N.º de serie 61/227.412, 21 de julio de 2009, la sarmentina se aisló por primera vez del fruto de *Piper sarmentosum* en 1987 [Likhitwitayawuid, K., Ruangrunsi, N, Lange, G and Decicco, C., Structural Elucidation and Synthesis of New Components isolated from *Piper Sarmentosum*, *Tetrahedron* 1987 (43) 3689-3694] y también de *Piper nigrum* en 1988 [Kiuchi, F., Nakamura, N., Tsuda, Y., Kondo, K and Yoshimura, H. Studies on Crude Drugs Effective on Visceral Larva Migrans. IV. Isolation and Identification of Larvicidal Principles in Pepper Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1988(36):2452], y se sintetizó por primera vez en 1995 [Bernabeu, M., Chinchilla, R. and Najera, C., (2E,4E)-5-Tosyl-2,4-pentadienamides: New Dienic Sulfones for

the Stereoselective Synthesis of (2E,4E)-Dienamides, Tetrahedron Letter, 1995 (36)3901-3904]. Se ha encontrado que la sarmentina actúa de antioxidante de la piel *in vivo* protegiendo la piel fotoenvejecida [Cornacchione, S.; Sadick, N. S.; Neveu, M.; Talbourdet, S.; Lazou, K.; Viron, C.; Renimel, I.; de Quéral, D.; Kurfurst, R.; Schnebert, S.; Heusèle, C.; André, P.; Perrier E. In vivo skin antioxidant effect of a new combination based on a specific Vitis vinifera shoots extract and a biotechnological extract. J. Drugs in Dermatol. 2007, 6S, 8-13], presenta actividad anti-agregación plaquetaria [Li, C.Y.; Tsai, W.; Damu, A.G.; Lee, E. J.; Wu, T. S.; Dung, N. X.; Thang, T. D.; Thanh, L. Isolation and identification of antiplatelet aggregatory principles from the leaves of Piper lolot, J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 9436-9442], tiene actividades antiplasmodiales y antimicobacterianas [Tuntiwachwuttikul, P.; Phansa, P.; Pootaeng-on, Y.; Taylor, W. C. Chemical constituents of the roots of Piper sarmentosum, Chem. Pharm. Bull. 2006, 54, 149-151] y actividad antituberculosis [Rukachaisirikul, T.; Siriwatanakit, P.; Sukcharoenphol, K.; Wongvein, C.; Ruttanaweang, P.; Wongwattanavuch, P.; Suksamrarn, A. Chemical constituents and bioactivity of Piper sarmentosum, J. Ethnopharmacol., 2004, 93, 173-176]. La sarmentina se usa como solubilizante de compuestos hidrófobos en cosméticos y productos farmacéuticos (Stephen, T.; Andrew, H. Compositions comprising macromolecular assemblies of lipid surfactant, publicación PCT N.º WO/2008/065451). La solicitud N.º de serie 61/227.412, 21 de julio de 2009, desvela además que la sarmentina y sus análogos pueden usarse para controlar plagas de plantas.

Breve resumen de la invención

La invención se refiere a un método de control de uno o más moluscos en una localización donde se desea el control, que comprende introducir en dicha localización uno o más compuestos aislados capaces de controlar dichos uno o más moluscos, en el que dichos uno o más compuestos aislados están seleccionados de

- (a) γ -dodecalactona, δ -tridecalactona y α -heptil- γ -butirolactona;
- (b) una amida seleccionada de N-ciclopentildecenamida y N-ciclopentildecenamida;
- (c) piliferólido A;
- (d) ácido 11-hidroxi-12-eno-octadecanoico; y
- (e) N-(decenoil)pirrolidina,

y control de dichos uno o más moluscos.

En una realización, el método se caracteriza porque los moluscos se controlan induciendo la muerte en dichos moluscos.

En una realización, el método se caracteriza porque el molusco es un miembro de las clases *Gastropoda* o *Bivalvia*.

En una realización, el método se caracteriza porque el molusco es *Dreissana* sp.

La memoria descriptiva desvela compuestos, composiciones y métodos de control de moluscos, particularmente miembros de las clases *Gastropoda* y/o *Bivalvia*, y más particularmente mejillones, caracoles y babosas. La memoria descriptiva desvela compuestos aislados obtenibles o derivados de (a) microorganismo, particularmente, especie de *Pseudomonas*, más particularmente, *Pseudomonas fluorescens* o alternativamente un organismo que tiene las características identificadoras de *Pseudomonas* ATCC 55799; (b) es tóxico para un miembro de una clase de los moluscos seleccionados del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limita a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Cornu* sp., *Theba* sp.) y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.) y (c) tiene un peso molecular seleccionado del grupo que consiste en: aproximadamente 540-550 y aproximadamente 1280-1335 como se ha determinado por cromatografía de líquidos/espectroscopia de masas (CL/EM). Estas composiciones pueden formularse en composiciones que pueden usarse para controlar moluscos, particularmente miembros de las clases *Gastropoda* y/o *Bivalvia*, y más particularmente mejillones, caracoles y babosas. La memoria descriptiva desvela que el compuesto: (a) es obtenible de un microorganismo, particularmente *Pseudomonas* sp.; (b) es tóxico para un miembro de una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Cornu* sp., *Theba* sp.) y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.); (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 1280-1310 y más particularmente 1295, como se ha determinado por cromatografía de líquidos/espectroscopia de masas (CL/EM); (d) tiene valores de RMN ¹H de δ 9,25, 8,36, 8,06, 7,82, 7,71, 7,52, 7,45, 6,82, 6,36, 6,08, 5,42, 5,39, 5,30, 5,14, 4,68, 4,42, 4,31, 4,16, 4,11, 4,07, 3,95 - 3,86, 3,83, 3,72, 3,66, 3,53, 3,48, 3,37, 3,17, 3,06, 2,56, 2,53, 2,45, 2,32, 2,21, 2,02, 1,96, 1,84, 1,72, 1,65, 1,61, 1,51, 1,48 - 1,37, 1,32, 1,12, 0,94, 0,91, 0,68; (e) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 50-55 minutos, más específicamente

aproximadamente 52 minutos, e incluso más específicamente aproximadamente 51,66 min, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa (por ejemplo, Thermo Scientific, Hydersil Gold, 100 x 10 mm) usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema de disolventes en gradiente (0-10 min; 30 - 40 % de CH₃CN acuoso, 10-20 min; 40 - 60 % de CH₃CN acuoso, 20-60 min; 60 - 80 % de CH₃CN acuoso, 60-65 min; 80 - 100 % de CH₃CN acuoso) a 2,5 ml/min de caudal y detección UV de 210 nm.

El compuesto desvelado por la memoria descriptiva tiene las siguientes características: (a) es obtenible de un microorganismo, particularmente *Pseudomonas* sp.; (b) es tóxico para un miembro de una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Comu* sp., *Theba* sp.), y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.); (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 1310-1335, y más particularmente 1321, como se ha determinado por CL/EM; (d) tiene un tiempo de retención de HPLC de aproximadamente 55-60 minutos, más particularmente aproximadamente 60 minutos e incluso más particularmente 59,61 min en una columna C-18 de HPLC de fase inversa (Thermo Scientific, Hydersil Gold, 100x 10 mm) usando un gradiente de acetonitrilo:agua usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema de disolventes en gradiente (0-10 min; 30 - 40 % de CH₃CN acuoso, 10 - 20 min; 40 - 60 % de CH₃CN acuoso, 20-60 min; 60 - 80 % de CH₃CN acuoso, 60-65 min; 80 - 100 % de CH₃CN acuoso) a 2,5 ml/min de caudal y detección UV de 210 nm. La memoria descriptiva también desvela un compuesto aislado que tiene las siguientes características (a) es obtenible de un microorganismo, particularmente *Pseudomonas* sp.; (b) es tóxico para un miembro de una clase de moluscos seleccionados del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Comu* sp., *Theba* sp.) y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.); (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 540-550, y más particularmente, aproximadamente 546, como se ha determinado por CL/EM; (d) tiene un tiempo de retención de HPLC de aproximadamente 50-55 minutos, más particularmente aproximadamente 52 minutos, e incluso más particularmente aproximadamente 51,54 min en una columna C-18 de HPLC de fase inversa (Phenomenex, Luna C 18(2) 10 μ, 100 Å Axia, A250 x 30 mm) usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (0-10 min; 35 - 45 % de CH₃CN acuoso, 10-20 min; 45 - 60 % de CH₃CN acuoso, 20-50 min; 60 - 85 % de CH₃CN acuoso, 50-60 min; 85 - 100 % de CH₃CN acuoso, 60-70 min; 100 % de CH₃CN) a 10 ml/min de caudal y detección UV de 210 nm.

La memoria descriptiva desvela además un método de obtención del (de los) compuesto(s) de la presente invención que comprende (a) obtener una suspensión de células derivadas de una especie de *Pseudomonas* y (b) aislar el compuesto por métodos cromatográficos de dicha suspensión

La memoria descriptiva desvela además composiciones que comprenden dichos compuestos, además de una composición que comprende un sistema de disolventes de agua:acetonitrilo (0-10 min; 35-45 % de CH₃CN acuoso, 10-20 min; 45-60 % de CH₃CN acuoso, 20-50 min; 60-85 % de CH₃CN acuoso, 50-60 min; 85-100 % de CH₃CN acuoso, 60-70 min; 100 % de CH₃CN) a 10 ml/min de caudal y Detección UV de 210 nm de fracción obtenible a partir de una suspensión de células de la especie *Pseudomonas* por HPLC con un tiempo de retención de aproximadamente 45-50 min, comprendiendo dicha fracción al menos dos compuestos que (a) son tóxicos para un miembro de una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, especie *Dreissana*) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, especie *Biomphalaria*) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Comu* sp., *Theba* sp.), y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.); (b) tienen pesos moleculares entre aproximadamente 630-660 y entre aproximadamente 970-1000 como se ha determinado por CL/EM.

La memoria descriptiva desvela un método de control de uno o más moluscos en una localización donde se desea el control que comprende introducir en dicha localización al menos uno de (a) una suspensión de células o extracto derivado de células de *Erwinia* sp.; (b) uno o más compuestos, en la que dichos compuestos son lactona, lactama, carbamato, ácido carboxílico y/o compuestos de amida o composición que comprende dichos compuestos, con la condición de que dichos compuestos no sean gamma-octalactona, gamma-nonolactona, gamma-decanolactona, gamma-undecalactona, N-ciclopentilcinamamida, N-(trans-cinamoil)pirrolidina, N-(trans-cinamoil)piperidina y N-(trans-cinamoil)hexametenimina, ácido 4-hidroxi-dodecanoico y ácido dodecanoico y con la condición de que la composición no sea un cultivo, extracto o suspensión de *Pseudomonas*; (c) uno o más compuestos obtenibles o derivados de (i) especies de *Pseudomonas*, (ii) es tóxico para un miembro de una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*,

particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Comu* sp., *Theba* sp.) y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.) y (iii) tiene un peso molecular seleccionado del grupo que consiste en: aproximadamente 540-550 y aproximadamente 1280-1335 como se ha determinado por cromatografía de líquidos/espectroscopía de masas (CL/EM); (d) una composición que comprende un sistema de disolventes de agua:acetonitrilo (0-10 min; 35 - 45 % de CH₃CN acuoso, 10-20 min; 45 - 60 % de CH₃CN acuoso, 20-50 min; 60 - 85 % de CH₃CN acuoso, 50-60 min; 85 - 100 % de CH₃CN acuoso, 60-70 min; 100 % de CH₃CN) a 10 ml/min de caudal y detección UV de 210 nm de fracción obtenible de una suspensión de células de especies de *Pseudomonas* por HPLC con un tiempo de retención de aproximadamente 45-50 min, comprendiendo dicha fracción al menos dos compuestos que (i) son tóxicos para un miembro de una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Comu* sp., *Theba* sp.) y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.); (ii) tienen pesos moleculares entre aproximadamente 630-660 y entre aproximadamente 970-1000 como se ha determinado por CL/EM, en cantidades eficaces para controlar dichos moluscos en dicha localización.

Este control puede lograrse en una realización induciendo la muerte en uno o más moluscos que comprende poner en contacto dichos moluscos con los compuestos expuestos anteriormente. Los moluscos pueden ponerse en contacto en un cuerpo de agua o superficie sólida. Similarmente, la invención se refiere al uso de los compuestos, suspensiones y composiciones anteriormente citados para formular una composición para su uso en controlar moluscos, tales como *Gastropoda* y/o *Bivalvia* en una localización.

En un aspecto relacionado, la memoria descriptiva desvela además composiciones para controlar uno o más moluscos, particularmente mejillones y/o caracoles (por ejemplo, caracoles de jardín blancos y/o marrones, caracoles acuáticos) y/o babosas en una localización donde se desea el control y/o inducir la muerte en uno o más moluscos, particularmente mejillones y/o caracoles (por ejemplo, caracoles de jardín blancos y/o marrones, caracoles acuáticos) y/o babosas en dicha localización, que comprenden una o más lactonas, lactamas, carbamatos, ácidos carboxílicos y/o amidas, nuevamente con la condición de que dicho compuesto no es gamma-octalactona, gamma-nonolactona, gamma-decanolactona, gamma-undecalactona, N-ciclopentilcinamamida, N-(trans-cinamoil)pirrolidina, N-(trans-cinamoil)piperidina y N-(trans-cinamoil)hexametilenoimina, ácido 4-hidroxidecanoico y ácido decanoico, y con la condición de que la composición no es un cultivo, extracto o suspensión de *Pseudomonas*.

La memoria descriptiva desvela además un método de control de uno o más moluscos, particularmente mejillones y/o caracoles (por ejemplo, caracoles de jardín blancos y/o marrones, caracoles acuáticos) y/o babosas, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) preparar una suspensión de células o extracto derivado de células de *Erwinia* sp.; y (b) introducir dicha suspensión o extracto en una localización donde se desea el control en una cantidad eficaz para controlar dichos moluscos.

Los extractos de *Erwinia* pueden contener los principios activos expuestos anteriormente, tales como lactonas y amidas. Similarmente, la suspensión de células o extracto derivado de células de *Erwinia* sp. puede formularse en composiciones para su uso en controlar moluscos, particularmente una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Comu* sp., *Theba* sp.) y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.).

La memoria descriptiva se refiere además a un método según las reivindicaciones que comprende al menos una o más sustancias eficaces para controlar uno o más moluscos, particularmente una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Comu* sp., *Theba* sp.) y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.), y opcionalmente un material inerte, preferentemente para su uso en controlar uno o más moluscos. Además, la invención desvela el uso de estas sustancias y otros compuestos y composiciones de la presente invención para su uso en formular una composición para controlar uno o más moluscos, particularmente una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que

incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Comu* sp., *Theba* sp.), y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.). La sustancia puede derivarse de cloro o una especie de *Pseudomonas*, más particularmente derivada de *Pseudomonas fluorescens* o alternativamente un organismo (por ejemplo, una cepa de *Pseudomonas*) que tiene las características identificadoras de *Pseudomonas* ATCC 55799. La memoria descriptiva desvela que la composición puede comprender una sustancia que es una suspensión de células derivada de una especie de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. fluorescens*) e incluso en una realización más particular, la suspensión de células puede comprender células que tienen las características productoras de toxina de *Pseudomonas* ATCC 55799. La memoria descriptiva desvela que las sustancias en dicha composición pueden ser una o más toxinas derivadas de aisladas de una especie de *Pseudomonas* o alternativamente derivadas de un organismo que tiene las características identificadoras de *Pseudomonas* ATCC 55799. La composición puede comprender alternativamente los compuestos usados en el método de la presente memoria descriptiva expuestos anteriormente, además de los compuestos de la presente memoria descriptiva expuestos anteriormente y puede usarse para controlar un miembro de una clase *Gastropoda* y *Bivalvia*. El material inerte puede ser un mineral de arcilla (caolinita, esmectita, atapulgita). La memoria descriptiva se refiere además a un método de control de uno o más moluscos, particularmente mejillones y/o caracoles (por ejemplo, acuáticos, caracoles de jardín y/o babosas en una localización donde se desea el control, que comprende introducir en dicha localización una sustancia eficaz para controlar dichos moluscos y opcionalmente uno o más materiales inertes en cantidades eficaces para controlar dichos moluscos en dicha localización que contiene dichos moluscos. En particular, la sustancia para controlar dichos moluscos está presente en una cantidad eficaz para producir al menos aproximadamente una mortalidad del 20 % con respecto al control no tratado, normalmente aproximadamente el 50-95 % y dicho material inerte está presente en una cantidad suficiente o eficaz para aumentar la tasa de mortalidad de dicha sustancia para controlar dichos moluscos al menos aproximadamente el 20 %, normalmente el 25-40 %. En una realización particular, el material inerte se introduce en dicha localización antes de la introducción de la sustancia para controlar dichos moluscos; en una realización más particular, el material inerte se introduce al menos aproximadamente una hora antes de la introducción de la sustancia. En otra realización particular, el material inerte se introduce en la localización simultáneamente con la sustancia para controlar los moluscos expuestos anteriormente, particularmente mejillones, caracoles y/o babosas.

La memoria descriptiva desvela el uso de un material inerte, para aumentar la eficacia de una o más sustancias para controlar uno o más moluscos, particularmente una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Comu* sp., *Theba* sp.), y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.), en una localización donde se desea el control. La localización puede ser un líquido (por ejemplo, un cuerpo de agua o pintura) o superficie sólida, tal como plástico, hormigón, madera, fibra de vidrio, tuberías hechas de hierro y poli(cloruro de vinilo), superficies cubiertas con materiales de recubrimiento y/o pinturas. La memoria descriptiva desvela un método de aumento de la eficacia de una o más sustancias para controlar uno o más de dichos moluscos, particularmente una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, *Dreissana* sp.) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, *Biomphalaria* sp.) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, *Cantareus* sp., *Comu* sp., *Theba* sp.) y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmannia* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.), que comprende introducir en una localización donde se desea el control de uno o más materiales inertes en cantidades eficaces para aumentar la eficacia de dicha sustancia cuando se introduce en dicha localización. Se desvela que estos materiales inertes aumentan la eficacia de dichas sustancias al menos aproximadamente el 20 %.

Además, la memoria descriptiva se refiere a una pintura anti-incrustante que comprende una cantidad eficaz biocida antivegetativa de las composiciones y compuestos de la presente invención en un vehículo de pintura. La memoria descriptiva se refiere además al uso de los compuestos y composiciones de la presente invención en formular una pintura anti-incrustante tal.

Breve descripción de las figuras

Las Fig. 1a y 1b muestran estructuras de productos naturales usadas en el método de la presente memoria descriptiva.

La Fig. 2 muestra el esquema para aislar las fracciones activas.

La Fig. 3 muestra una representación esquemática del esquema de purificación para obtener los compuestos de la presente memoria descriptiva de cultivo celular de *Pseudomonas*.

La Fig. 4 muestra el desarrollo de mortalidad con el tiempo para mejillones tratados con arcilla y producto biopesticida de *P. fluorescens* en una bio-caja.

Descripción detallada de la invención

5 Donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo, entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo intermedio, está englobado dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños que pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños también están englobados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Donde el intervalo establecido incluye uno o
10 ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualesquiera dos de aquellos límites incluidos también están incluidos en la invención.

15 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento también puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

20 Debe observarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un," "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo.

25 Como se define en el presente documento, "controlar mejillones" significa controlar los huecos, larvas, velíferas y post-velíferas del mejillón aniquilándolas o inhabilitándolas de manera que no puedan colonizar en una localización dada.

Como se define en el presente documento, "derivado de" significa directamente aislado u obtenido de una fuente particular o alternativamente que tiene características identificadoras de una sustancia u organismo aislado u obtenido de una fuente particular.

30 Como se usa en lo sucesivo, el término "alquilo" se refiere a un radical de hidrocarburo saturado que puede ser de cadena lineal o cadena ramificada (por ejemplo, etilo, isopropilo, t-amilo, o 2, 5-dimetilhexilo, etc.). Esta definición se aplica tanto cuando el término se usa solo como cuando se usa como parte de un término compuesto.

35 Los términos "cicloalquilo" y "cicloalqueno" se refieren a un anillo de hidrocarburo saturado e incluye anillos bicíclicos y policíclicos. Similarmente, grupos cicloalquilo y cicloalqueno que tienen un heteroátomo (por ejemplo, N, O o S) en lugar de un átomo de carbono pueden denominarse "heterocicloalquilo", "heterociclo" y "heterocicloalqueno", respectivamente.

40 El término "alqueno", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo como se ha descrito anteriormente que contiene uno o más sitios de insaturación que es un doble enlace. Similarmente, el término "alquino", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo como se ha descrito anteriormente que contiene uno o más sitios de insaturación que es un triple enlace.

45 El término "alcoxi" se refiere a un radical alquilo como se ha descrito anteriormente que también posee un sustituyente de oxígeno que es capaz de unión covalente a otro radical de hidrocarburo (tal como, por ejemplo, metoxi, etoxi, ariloxi y t-butoxi).

50 El término "arilo" se refiere a un sustituyente carbocíclico aromático que puede ser un único anillo o múltiples anillos que están condensados juntos, unidos covalentemente, o unidos a un grupo común tal como un resto etileno o metileno. Similarmente, los grupos arilo que tienen un heteroátomo (por ejemplo, N, O, o S) en lugar de un átomo del anillo de carbono se denominan "heteroarilo".

55 Los términos "arilalquilo", "arilalqueno" y "ariloxialquilo" se refieren a un radical arilo unido directamente a un grupo alquilo, un grupo alqueno, o un átomo de oxígeno que está unido a un grupo alquilo, respectivamente. Por brevedad, arilo como parte de un término combinado como antes también pretende incluir heteroarilo.

60 El término "hetero", como se usa en un "grupo alquilo que contiene heteroátomo" (es decir, un grupo "heteroalquilo") o un "grupo arilo que contiene heteroátomo" (es decir, un grupo "heteroarilo"), se refiere a una molécula, enlace o sustituyente en el que uno o más átomos de carbono se sustituyen con un átomo distinto de carbono, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo o silicio.

65 Como se define en el presente documento, "derivado de" y "obtenible de" significa directamente aislado u obtenido de una fuente particular o que alternativamente tiene características identificadoras de una sustancia u organismo aislado u obtenido de una fuente particular. Estos términos se usan indistintamente en toda la memoria descriptiva.

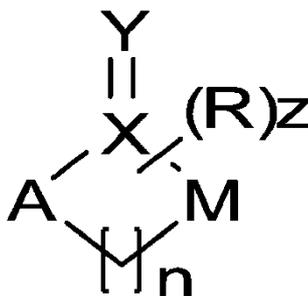
Como se define en el presente documento, un "compuesto aislado" está esencialmente libre de otros compuestos o sustancias, por ejemplo, al menos aproximadamente el 20 % puro, preferentemente al menos aproximadamente el 40 % puro, más preferentemente aproximadamente el 60 % puro, incluso más preferentemente aproximadamente el 80 % puro, lo más preferentemente aproximadamente el 90 % puro, e incluso lo más preferentemente aproximadamente el 95 % puro, como se ha determinado por métodos analíticos, que incluyen, pero no se limitan a, métodos cromatográficos, métodos electroforéticos.

Compuestos

Los compuestos desvelados en el presente documento pueden ser miembros de las tres siguientes familias.

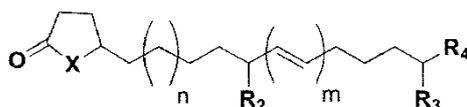
Compuestos de la familia I

La memoria descriptiva desvela que la familia I posee las siguientes estructuras químicas:



Donde X incluye, pero no se limita a, carbono, azufre, fósforo; Y incluye, pero no se limita a, azufre, oxígeno; A y M incluyen, pero no se limitan a, carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre y n es 1 a 21 donde (R)_z representa el número Z del número de sustituyentes en el grupo R en el anillo. R y los sustituyentes en R pueden ser un hidrógeno, hidroxilo, alquilhidroxilo, alquenilhidroxilo, alquinilhidroxilo, alquiloxi, alqueniloxi, alquiniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, heterocicilo, heteroarilo, aromático, grupo arilo, grupo sustituido con NH o sustituido con N,N, o cualquier otro grupo sustituido. La longitud de unas de las cadenas de R sustituidas puede ser de 1 a 25 átomos, la longitud preferida será de 7 a 17 átomos; el número Z puede ser 0, 1, 2, 3 hasta n+2, preferido z = 0, 1, 2, 3.

El compuesto puede derivar de *Pseudomonas fluorescens* y tiene una estructura de lactona de ácido graso insaturado hidroxilado que comprende al menos un resto de lactona que es una γ -lactona de 5 miembros, al menos un resto insaturado y al menos un grupo alcohol; un peso molecular de 285 a aproximadamente 310 en la estructura de núcleo; al menos 15 carbonos y al menos 3 oxígenos. La memoria descriptiva desvela que el compuesto puede tener la estructura



en la que: X son cada uno independientemente --O-, --NR₁, o --S, en la que R₁ es --H o alquilo C₁-C₆; n = 0 a 15, R₂ a R₄ son cada uno independientemente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxí, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo; m = doble enlace o triple enlace. En otra realización más particular, Y y M son oxígeno, A y X son carbono y n es 2 o 3, R es un alquilo C₇ o C₈ y z es 0, en la que cuando n es 2 y R es un alquilo C₇, R está unida a A.

La memoria descriptiva desvela que los compuestos de la familia I pueden ser los compuestos expuestos en 1 a 28 (Figs. 1a y 1b). Éstos son de cualquier material natural o compuesto obtenido de fuentes comerciales o por síntesis química. Fuentes naturales de los compuestos de la familia I incluyen, pero no se limitan a, plantas, corales, microorganismos, esponjas y animales. La memoria descriptiva desvela que las plantas que incluyen los compuestos de la familia I incluyen, pero no se limitan a, o alternativamente, los compuestos de la familia I pueden derivar de especies tales como *Myoporium bontioides* (compuesto 14) [Moe Kanemoto, et al., Chlorine-containing iridoid and iridoid glucoside, and other glucosides from leaves of Myoporium bontioides, *Phytochemistry* 69 (2008) 2517-2522], *Micromelum hirsutum* (compuesto 18) [Ma, G.Y. et al. anti-tuberculosis constituents from the stem bark of *Micromelum hirsutum*, *Planta Med.* 2005, 71, 261-267], los compuestos de la familia I también pueden derivar de microorganismos que incluyen, pero no se limitan a, *Antrodia camphorate* (compuestos 4, 5) [Shao, Y.Y. et al., Chemical constituents of *Antrodia camphorata* submerged whole broth, *Natural Product Research*, 2008, 22 (13)

1151-1157], *Saccharomyces cerevisiae* (compuesto 2) [Gocho, S. et al. Biotransformation of oleic acid to optically active γ -dodecalactone, Biosci. Biotech. Biochem. 1995, 59 (8) 1571-1572], *Mesorhizobium* sp. (compuestos 2, 17) [Wei, G.H. et al., Rhizobialide: A New Stearolactone Produced by Mesorhizobium sp. CCNWGX022, a Rhizobial Endophyte from Glycyrrhiza uralensis, Chemistry and Biodiversity, 2007, 4, 893-898], *Ophiostoma piliferum* (compuesto 16), [Wei, G.H. et al., Rhizobialide: A New Stearolactone Produced by Mesorhizobium sp. CCNWGX022, a Rhizobial Endophyte from Glycyrrhiza uralensis, Chemistry and Biodiversity, 2007, 4, 893-898], *Streptomyces* sp. (compuesto 8) [Khaled A. Shaaban, Mohamed Shaaban, Petrea Facey, Serge Fotso, Hohn Frauendorf, Elisabeth Helmke, Armin Maier, Heinz H. Fiebig, Hartmut Laatsch, Electrospray Ionization Mass Spectra of Piperazimycins A and B and γ -Butyrolactones from a Marine-derived Streptomyces sp. J. Antibiot. 61(12): 736-746, 2008], *Macrophomina phaseolina* (compuestos 9, 10 y 15) [Shashib, Mahat et al., structure and stereochemistry of phaseolinic acid: a new acid from Macrophomina phaseolizna, Journal of Natural products, 1987, 50 (2) 245-247], *Sporidiobolus salmonicolor* (compuestos 1, 3) [Laurent Dufosse, et al., Chirality of the γ -Lactones Produced by Sporidiobolus salmonicolor Grown in Two Different Media, Chirality, 1997, 667-671] y Streptomyces (compuesto 7) [Shohei Sakuda, et al., Biosynthetic Studies on Virginiae Butanolide A, a Butyrolactone Autoregulator from Streptomyces. Part 2, Preparation of Possible Biosynthetic Intermediates and Conversion Experiments in a Cell-free System. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1993, 2309-2315].

La memoria descriptiva desvela que los compuestos de la familia I pueden derivar de esponjas tales como *Haliclona* n. sp (compuestos 26, 27 y 28) [Richard J. Clark, Mary J. Garson, and John N. A. Hooper, Antifungal Alkyl Amino Alcohols from the Tropical Marine Sponge Haliclona n. sp. J. Nat. Prod. 2001, 64, 1568-1571], *Axinellas* sp. (compuesto 25) [Miller, W. F. Tinto, J.-P. Yang, S. McLean and W. F. Reynolds, Axinellamide, a new alkaloid from the marine sponge Axinellas sp. Tetrahedron Lett., 1995, 36, 5851], *Plakortis nigra* (compuestos 19-20) [Joel S. Sandler, et al., Cytotoxic β -Carbolines and Cyclic Peroxides from the Palauan Sponge Plakortis nigra, J. Nat. Prod. 2002, 65, 1258-1261] e *Ircinia formosana* (compuestos 21-24) [Shen, Y. C. et al., Novel linear C22-sesterterpenoids from sponge Ircinia formosana, Tetrahedron Letters 47 (2006) 4007-4010]. Los compuestos 26-28 son ejemplos de carbamatos.

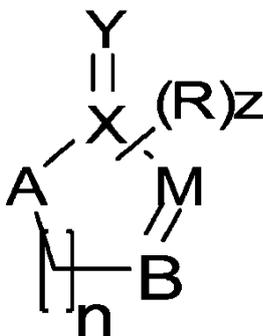
La memoria descriptiva desvela además que los compuestos de la familia I pueden derivarse de corales que incluyen, pero no se limitan a, *Sarcophyton trocheliophorum* y *Lithophyton arboretum* (compuestos 11 y 13) [Tomas Rezanka, et al., γ -lactones from the soft corals Sarcophyton trocheliophorum and Lithophyton arboretum, Tetrahedron, 2001, 57, 8743-8749].

La memoria descriptiva desvela que los insectos que incluyen compuestos de la familia I pueden derivarse de insectos que incluyen, pero no se limitan a, feromonas sexuales del escarabajo japonés hembra (compuesto 12) [J. H. Tumlinson, Identification of the Female Japanese Beetle Sex Pheromone Inhibition of Male Response by an Enantiomer, Science, 1977, 197, 789-792] y toxinas de insecto (compuesto 6) [John A. Findlay, et al., Insect toxins from spruce endophytes, Can. J. Chem. 2003, 81,284-292].

Los compuestos de la familia I según las reivindicaciones se refieren a gamma-dodecalactona, delta-tridecalactona, piliferólido A y alfa-heptil-gamma-butyrolactona, como se expone en los ejemplos. Éstos pueden obtenerse por métodos sintéticos usando procedimientos conocidos en la técnica o de fuentes comerciales.

Compuestos de la familia II

La memoria descriptiva desvela que la familia II posee las siguientes estructuras químicas:



Donde X es carbono; Y es oxígeno; A, B y M son carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre u otros átomos y n es 1 a 21.

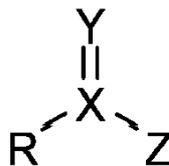
Donde (R)_z representa el número Z del número de sustituyentes en el grupo R en el anillo. R y los sustituyentes en R pueden ser un hidrógeno, hidroxilo, alquilhidroxilo, alquenilhidroxilo, alquinilhidroxilo, alquiloxi, alqueniloxilo, alquiniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, heterociclilo, heteroarilo, aromático, grupo arilo, grupo sustituido con NH o sustituido con N,N, o cualquier otro grupo sustituido. La longitud de unas de las cadenas de R sustituidas puede ser de 1 a 25 átomos, siendo la longitud preferida de 7 a 17 átomos. El número Z puede ser

0, 1, 2, 3 hasta n+2, preferido z=0, 1, 2, 3.

La memoria descriptiva desvela que los compuestos de la familia II tales como los compuestos de **29 a 36 y 44** (véanse las Figs. 1a y 1b) pueden derivar de fuentes naturales, síntesis química o fuentes comerciales. Fuentes naturales de los compuestos de la familia II incluyen, pero no se limitan a, plantas, corales, microorganismos, esponjas y animales. Según la divulgación de la memoria descriptiva, ejemplos de tales plantas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes especies tales como *Heteroplexis micocephala* (compuestos **30, 31, 32 y 33**) [Fan, X.N., et al., Chemical Constituents of *Heteroplexis micocephala*. J. Nat. Prod. 2009, 72, 1184-1190] y especies de *Iryanthera* (compuesto **34**) [Vieira, P.C., et al., γ -Lactones from *Iryanthera* species, Phytochemistry, 1983, 22 (3) 711-713] y *Litsea verticillata* (compuesto **44**) [Zhang, H. J. et al., sesquiterpenes and butenolides, natural anti-HIV constituents from *Litsea verticillata*, Planta Med, 2005, 71, 452-457]. Según la divulgación de la memoria descriptiva, las fuentes de microorganismos que incluyen los compuestos de la familia II incluyen, pero no se limitan a, las siguientes especies tales como *Streptomyces rishiriensis* A-5969 (compuesto **29**) [Yumiko Itoh, Hiroshi Shimura, Mayumito, NaoHaru Watanabe, Michio Yamagishi, Masaharu Tamai and Kazunori Hanada, novel hepatoprotective 7-lactone, MH-031, Discovery, Isolation, Physical-Chemical properties and structural elucidation, The Journal of antibiotics, 1991, 44 (8) 832-837. En una realización más particular, corales que incluyen los compuestos de la familia II incluyen, pero no se limitan a, las siguientes especies tales como *Pterogorgia anceps* (compuesto **35**) [Guo, Y. W. et al., Three New Butenolide Lipids from the Caribbean Gorgonian *Pterogorgia anceps*, J. Nat. Prod. 1999, 62, 1194-1196; Manuel Lorenzo et al., ¹³C NMR-Based Empirical Rules to Determine the Configuration of Fatty Acid Butanolides. Novel γ -Dilactones from *Pterogorgia* spp, Organic Letters, 8 (22) 5001-5004] y *Pterogorgia citrine* (compuesto **36**) [Abimael D. Rodriguez et al., further butenolides from the Caribbean octocoral *Pterogorgia citrine*, Journal of Natural Products, 1994, 57(3) 339-347].

Compuestos de la familia III

La memoria descriptiva desvela que los compuestos de la familia III poseen la siguiente estructura química:

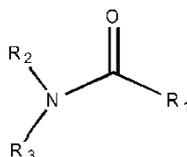


en la que X es carbono; Y es oxígeno; Z es hidrógeno, hidroxilo, alquencilhidroxilo, alquencilhidroxilo, alquilo, alquencil, alquencil, heterociclilo, aromático, grupo arilo, grupo sustituido con NH, o sustituido con N,N, o cualquier otro grupo sustituido.

En la que R es alquencilhidroxilo, alquencilhidroxilo, alquilo, alquencil, alquencil, heterociclilo, aromático, grupo arilo, grupo sustituido con NH, o sustituido con N,N o cualquier otro grupo sustituido. La longitud de la cadena de R puede ser de 1 a 50, preferida de 7 a 17.

Según la divulgación de la memoria descriptiva, los compuestos de la familia III tales como los compuestos de **37 a 43** (Figs. 1a y 1b) pueden derivar de fuentes naturales o comerciales o por síntesis química. Fuentes naturales de los compuestos de la familia III incluyen, pero no se limitan a, plantas, corales, microorganismos, esponjas y animales. En una realización más particular, las fuentes de plantas incluyen, pero no se limitan a, *Piper* spp (compuesto **43**) [Likhitwitayawuid, K., Ruangrunsi, N, Lange, G and Decicco, C., Structural Elucidation and Synthesis of New Components isolated from *Piper Samentosum*, Tetrahedron 1987 (43) 3689-3694; Kiuchi, F., Nakamura, N., Tsuda, Y., Kondo, K and Yoshimura, H. Studies on Crude Drugs Effective on Visceral Larva Migrans. IV. Isolation and Identification of Larvicidal Principles in Pepper Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1988(36):2452]. En una realización más particular, los corales incluyen, pero no se limitan a, *Plexaura flava* (compuesto **42**) [B. N. Ravi, et al., Lipid and Terpenoid Metabolites of the Gorgonian *Plexaura flava*, Aust. J. Chem., 1982, 35, 105-12] y en una realización más particular, los microorganismos que incluyen los compuestos de la familia III incluyen, pero no se limitan a, las siguientes especies tales como *Lyngbya majuscula* y *Schizothrix calcicola* (compuesto **39, 40**) [George G. Harrigan, et al., Tumonoic Acids, Novel Metabolites from a Cyanobacterial Assemblage of *Lyngbya majuscula* and *Schizothrix calcicola*, J. Nat. Prod. 1999, 62, 464-467], *Pseudomonas aeruginosa* (compuesto **41**) [Michael, K. Winson., et al. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 9427-9431], *Erwinia carotovora* (compuesto **37**) [Günter Brader, Solveig Sjöblom, Heidi Hyytiäinen, Karen Sims-Huopaniemi, and E. Tapio Palva, Altering Substrate Chain Length Specificity of an Acylhomoserine Lactone Synthase in Bacterial Communication, The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(11) 10403-10409] y *Photobacterium phosphoreum* (compuesto 38) [L. R. Flodgaard, P. Dalgaard, J. B. Andersen, K. F. Nielsen, M. Givskov, and L. Gram, Nonbioluminescent Strains of *Photobacterium phosphoreum* produce the Cell-to-Cell Communication Signal N-(3-Hydroxyoctanoyl)homoserine Lactone, Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4), 2113-2120].

La memoria descriptiva desvela que los compuestos de la familia III pueden ser un análogo de sarmentina que tiene la siguiente estructura:



5 En la que R1 es un alquilo, alquenilo, alquinilo, heterociclilo, aromático, grupo arilo, grupo sustituido con NH, o sustituido con N,N y la longitud de la cadena de R1 es de 4 a 20 átomos, y preferentemente de 6 a 12 átomos.

10 En la que R2 y R3 son alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, aromático, arilalquilo, heterociclilo o heteroarilo; o alternativamente R2 +R3+ N pueden ser un resto heterocíclico que contiene N,

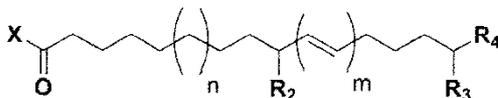
En la que cuando R2 +R3+ N es un resto heterocíclico que contiene N, R1 es un alquilo, alquenilo, alquinilo, heterociclilo, grupo sustituido con NH o sustituido con N,N.

15 Según las reivindicaciones, el análogo de sarmentina es N-ciclopentildecenamida, N-ciclopentildecenamida o (N-(decenoil)pirrolidina.

Los análogos de sarmentina pueden obtenerse usando procedimientos conocidos en la técnica que pueden incluir, pero no se limitan a, aquellos expuestos en la solicitud N.º de serie 61/227.412, presentada el 21 de julio de 2009.

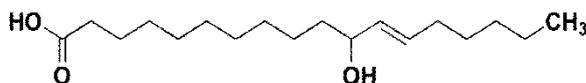
20 La memoria descriptiva desvela que el compuesto puede derivarse de *Pseudomonas fluorescens* y se caracteriza por tener una estructura de ácido graso insaturado hidroxilado que comprende al menos un resto de ácido carboxílico, al menos un resto insaturado y al menos un grupo alcohol; peso molecular de 285 a aproximadamente 310 en la estructura de núcleo; al menos 15 carbonos y al menos 3 oxígenos.

25 La memoria descriptiva desvela además compuestos que tienen la estructura



30 en la que: X son cada uno independientemente --OH, --NR1 o --S, en la que R1 es --H o alquilo C1-C6; n = 0 a 15, R2 a R4 son cada uno independientemente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; m = doble enlace, triple enlace.

La invención desvela además que el compuesto tiene la estructura



40 **Métodos de producción**

Como se observa anteriormente, los compuestos y composiciones de la presente invención pueden obtenerse, son obtenibles o derivan de un organismo que tiene las características identificadoras de una especie de *Pseudomonas*, más particularmente de un organismo que tiene las características identificadoras de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* o alternativamente de un organismo que tiene las características identificadoras de la cepa clínica de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 55799 como se expone en la patente de EE.UU. N.º 6.1944.194. Los métodos comprenden cultivar estos organismos y obtener los compuestos y/o composiciones de la presente invención aislando estos compuestos de las células de estos organismos.

50 En particular, los organismos se cultivan en un medio nutritivo usando métodos conocidos en la técnica. Los organismos pueden cultivarse por cultivo en matraz oscilante, fermentación a pequeña escala o gran escala (que incluye, pero no se limita a, fermentaciones continuas, discontinuas, de lotes alimentados o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en medio adecuado y en condiciones que permiten el crecimiento celular. El cultivo puede tener lugar en medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y de nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados que están disponibles pueden estar disponibles de fuentes comerciales o prepararse según composiciones publicadas. Una

realización particular se desvela en los ejemplos más adelante y en la patente de EE.UU. N.º 6.194.194.

Después del cultivo, las células pueden concentrarse y posteriormente suspenderse en un tampón para obtener una suspensión de células. Los compuestos y/o composiciones de la presente invención pueden extraerse de la suspensión. El extracto puede fraccionarse por cromatografía. La cromatografía puede ensayarse para actividad tóxica contra moluscos, tales como mejillones, caracoles (por ejemplo, caracoles acuáticos y/o de jardín) y/o babosas, usando métodos conocidos en la técnica; una realización particular se desvela en los ejemplos, abajo. Este proceso puede repetirse una o más veces usando los mismos métodos cromatográficos o diferentes.

Los compuestos de la presente invención también pueden obtenerse por métodos sintéticos. Alternativamente, para compuestos de péptido, los compuestos pueden obtenerse expresando secuencias de ácidos nucleicos que codifican estos compuestos en un huésped de ADN recombinante usando métodos conocidos en la técnica.

Formulaciones

La composición de la presente memoria descriptiva puede comprender un producto químico o biopesticida que es útil en controlar moluscos, particularmente miembros de las clases *Gastropoda* y/o *Bivalvia* y más particularmente mejillones, caracoles y babosas. La memoria descriptiva desvela compuestos aislados obtenibles o derivados de (a) un microorganismo tal como una especie de *Pseudomonas*, más particularmente, *Pseudomonas fluorescens* o alternativamente un organismo que tiene las características identificadoras de *Pseudomonas* ATCC 55799; (b) es tóxico para un miembro de una clase de moluscos seleccionada del grupo que consiste en *Bivalvia*, particularmente mejillones (por ejemplo, especie de *Dreissana*) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, especie de *Biomphalaria*) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, especie de *Cantareus*, especie de *Cornu*, especie de *Theba*), y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmanna* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.) y (c) tiene un peso molecular seleccionado del grupo que consiste en: aproximadamente 540-550 y aproximadamente 1280-1335 como se ha determinado por cromatografía de líquidos/espectroscopía de masas (CL/EM). Estas composiciones pueden formularse en composiciones que pueden usarse para controlar moluscos, particularmente miembros de las clases *Gastropoda* y/o *Bivalvia* y más particularmente mejillones, caracoles y babosas.

Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cloro y sustancias derivadas de una especie de *Pseudomonas* como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.194.194. Además, los compuestos desvelados anteriormente y usados en la invención pueden prepararse en composiciones (también denominadas alternativamente "formulaciones") y pueden formularse en cualquier forma. Ejemplos de formulaciones no limitantes incluyen concentrados emulsionables (EC), polvos humectables (WP), líquidos solubles (SL), aerosoles, soluciones de concentrado de volumen ultra-bajo (ULV), polvos solubles (SP), microencapsulación, gránulos dispersos en agua, fluidos (FL), microemulsiones (ME), nanoemulsiones (NE), etc. En cualquier formulación descrita en el presente documento, el porcentaje de principio activo está dentro de un intervalo del 0,01 % al 99,99 %. En una realización particular, las formulaciones pueden estar libres de tensioactivos.

Ejemplos del material inerte que puede usarse en las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, minerales inorgánicos tales como caolín, mica, yeso, filosilicatos, carbonatos, sulfatos o fosfatos; o materiales botánicos tales como productos de madera, corcho, mazorcas de maíz en polvo, cáscaras de arroz, cáscaras de cacahuete y cáscaras de nueces. En una realización particular, el material inerte puede obtenerse o derivarse de un mineral de arcilla (caolinita, esmectita, atapulgita) suspenso en agua a una tasa de aproximadamente 1 a 20 mg/litro correspondientes a aproximadamente 1 a 20 UTN (unidades de turbidez normalizada). Los materiales inertes usados para potenciar el sifonaje de mejillones pueden aplicarse en forma sólida o como una suspensión en solución acuosa, preferentemente agua, directamente al agua o la localización (por ejemplo, superficie sólida) donde los mejillones se tratan. En una realización particular, para potenciar la eficacia del producto, un material inerte, tal como arcilla, limo, sedimento o cualquier otro material sin valor nutritivo y con un tamaño de partícula suficientemente pequeño, puede suspenderse en agua antes del tratamiento con un producto químico o un producto biopesticida.

Métodos de uso

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden usarse para controlar moluscos, particularmente un miembro de la clase *Gastropoda* y/o *Bivalvia*, más particularmente mejillones (por ejemplo, especies de *Dreissana*) y/o *Gastropoda*, particularmente caracoles, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles acuáticos (por ejemplo, especies de *Biomphalaria*) y caracoles de jardín, que incluyen, pero no se limitan a, caracoles de jardín marrones, caracoles de jardín blancos (por ejemplo, especies de *Cantareus*, especies de *Cornu*, especies de *Theba*) y/o babosas, que incluyen, pero no se limitan a, babosa de jardín gris (por ejemplo, *Deroceras* sp.), la babosa de bandas o de tres bandas (por ejemplo, *Lehmanna* sp.), la babosa leonada (por ejemplo, *Limacus* sp.) y la babosa de invernadero (por ejemplo, *Milax* sp.) en un cuerpo de agua o sobre superficies donde moluscos tales como mejillones, caracoles y/o babosas se juntan o alternativamente como agente anti-incrustante en pintura. En el

supuesto caso de que se use como agente anti-incrustante en pintura, está presente en una cantidad antivegetativa biocidamente eficaz. Superficies donde los moluscos tales como mejillones, caracoles y/o babosas incluyen, pero no se limitan a, plástico, hormigón, madera, fibra de vidrio, tuberías hechas de hierro y poli(cloruro de vinilo), y superficies cubiertas con pinturas y/o recubrimientos. Los recubrimientos pueden formularse a partir de pigmentos, aglutinantes, aditivos y/o fluidos de soporte y se aplican preferentemente en una película delgada para proporcionar protección o decoración a una superficie. El producto final (que contiene el compuesto activo) se usará a 10-200 mg/l, más específicamente a 25-100 mg/l (ppm) o 25-10000 mg/kg. Se aplicará tanto como un producto seco o suspenso en agua en tuberías, estructuras de presa, tanques de contención y aguas abiertas tales como corrientes, ríos, lagos, canales de riego, estanques y lagos mediante bombas de aplicación específica y sistemas de mezcla.

La invención desvela un método para mejorar la actividad biopesticida y pesticida de materiales usados para controlar moluscos invasivos, particularmente mejillones, que comprende las etapas de:

1. suspensión de material inerte tal como arcilla en el agua para desencadenar la actividad de sifonaje durante aproximadamente 1 - 24 horas antes del tratamiento químico o con biopesticidas
2. adición de un producto químico o un biopesticida en el agua a un nivel deseado.

La invención también se refiere a un método que comprende una etapa de administrar un biopesticida microbiano en combinación de un material inerte, tal como arcilla, para potenciar la captación y, de ahí, la mortalidad de los mejillones.

Para activar el sifonaje de mejillones, este tratamiento con arcilla (turbidez) debe llevarse a cabo durante aproximadamente 1 a 6 horas, normalmente aproximadamente 3-4 horas, y durante aproximadamente 1 a 24 horas, normalmente aproximadamente 14-18 horas, antes del tratamiento con un producto químico/pesticida. Alternativamente, el tratamiento de turbidez puede aplicarse simultáneamente con el tratamiento químico o con biopesticidas.

Según una realización de la presente invención, el tratamiento de moluscos, tales como mejillones, caracoles y babosas, puede llevarse a cabo en frascos de vidrio de 500 ml o en una bio-caja construida de hojas acrílicas. En los frascos de vidrio, la aireación durante el tratamiento se proporciona por flujo de aire a través de piedras difusoras de acuario conectadas a tubo de nailon. En la bio-caja, se hace circular constantemente agua a una tasa de 1 galón (3,8 l) por minuto.

Los materiales para el tratamiento de turbidez, además de para el producto químico/biopesticida, pueden mezclarse en el agua pipeteando o mediante una bomba peristáltica. En las bio-cajas, se logra una mezcla más uniforme usando una mezcladora de paletas en el punto de inyección. Las composiciones de la presente invención pueden estar en una forma adecuada para la aplicación directa o como un concentrado o composición primaria, que requiere dilución con una cantidad adecuada de agua u otro diluyente antes de la aplicación.

La cantidad eficaz de los materiales de turbidez dependerá de la aplicación, temperatura del agua, si se aplica a agua, y la duración del tratamiento. En general, la composición puede aplicarse a una tasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg por litro; preferentemente a una tasa de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg por litro, de manera que la turbidez medida no suba por encima de 20 UNT.

Ejemplos

El ejemplo a continuación se presenta para describir realizaciones preferidas y utilidades de la invención y no pretende limitar la invención, a menos que se establezca de otro modo en las reivindicaciones adjuntas a la presente.

Ejemplo 1: Estudios molusquicidas

Materiales y métodos

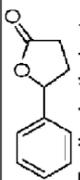
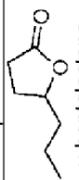
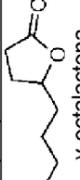
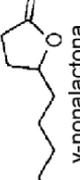
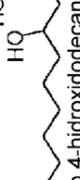
1. Dejar que mejillones quagga se aclimaten en placas de Petri pequeñas durante 24 h.
 - Verter los mejillones en una placa de Petri para determinar si los mejillones están vivos o no. Tirar los mejillones muertos y vacíos.
 - Contar 10 mejillones vivos/sanos.
 - Poner 10 mejillones vivos/sanos en cada placa de Petri pequeña con agua dura.
 - Mantener una placa de mejillones separada. Éstos son los "mejillones extra" que se usarán para sustituir los mejillones muertos o vacíos después de 24 h en las otras placas experimentales.
 - No se necesita aireación debido al bajo volumen de agua (DO es alta).
2. Día de tratamiento de los mejillones:

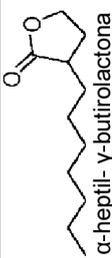
- Comprobar los mejillones (Usar una varilla de policía en todo momento cuando se comprueban los mejillones. Solo usar las pinzas para eliminar los mejillones muertos).
 - Contar para asegurarse de que hay 10 mejillones vivos/sanos por placa de Petri pequeña.
 - Tener listas la(s) muestra(s).
- 5
- Diluir apropiadamente con agua dura en un tubo Falcon de 50 ml para cada muestra. Agitar con vórtex para mezclar antes de la dosificación.
 - EX: 70 ppm, 2 repeticiones por muestra. Añadir 34 ml de agua dura en el tubo Falcon. Añadir 51 ul de la muestra en el mismo tubo Falcon con agua dura. Agitar con vórtex para mezclar antes de la dosificación.
- 10
3. Dosificación:
- Agitar con vórtex la muestra antes de la dosificación.
 - Usar una pipeta serológica de 25 ml, pipetear arriba y abajo y mezclar. Pipetear 15 ml de la mezcla en cada placa de Petri pequeña.
- 15
- Dejar sedimentar los mejillones sin alteraciones durante 24 h. Anotar la hora y la fecha.
4. 24 h después de tratamiento:
- Después de 24 h después de la dosificación, eliminar el agua tratada y comprobar la mortalidad de los mejillones.
 - Verter el agua tratada. Aclarar con agua dura limpia 3 veces antes de añadir agua a cada placa de Petri pequeña.
 - Repetir este proceso para todas las placas de Petri.
 - Todas las placas de Petri deben esterilizarse en autoclave después de la prueba. Después de esterilizarse en autoclave, los frascos se lavarán con agua.
- 20
- 25
5. Calcular la mortalidad
- Mortalidad (%) = $100 * (\text{Mejillones muertos totales en el tratamiento} - \text{mejillones muertos totales en el blanco}) / \text{Tratamiento de mejillones total}$
- 30

Estudios con compuestos comerciales

35 Se examinaron compuestos comerciales obtenidos de Sigma-Aldrich a una concentración final de 11,1 µg/ml. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto moluscicida de compuestos comerciales

N.º	Estructura	Conc. [µg/ml]	24 h	48 h	72 h	96 h
SAR-013	 γ-Fenil-γ-butirolactona	11,1	0	0	0	0
SAR-011	 γ-heptalactona	11,1	0	0	0	0
SAR-010	 γ-octalactona	11,1	0	0	0	0
SAR-008	 γ-nonolactona	11,1	0	0	0	0
SAR-014	 γ-decanolactona	11,1	0	0	0	0
SAR-009	 γ-undecalactona	11,1	0	0	0	0
SAR-001	 γ-dodecalactona	11,1	86,7 ± 5,8	96,7 ± 5,8	96,7 ± 5,8	96,7 ± 5,8
SAR-006	 ácido 4-hidroxidodecanoico	11,1	0	0	0	0
SAR-005	 ácido dodecanoico	11,1	0	0	0	0
SAR-003	 δ-tridecalactona	11,1	3,3 ± 5,7	10 ± 10	10 ± 10	10 ± 10
SAR-004	 δ-miristolactona	11,1	0	0	0	0

SAR-002	 α -heptil- γ -butirolactona	11,1	30 \pm 10	66,7 \pm 15,3	73,3 \pm 11,5	76,7 \pm 15,3
---------	--	------	-------------	-----------------	-----------------	-----------------

Compuestos sintéticos

Los compuestos sintetizados se criban contra los mejillones quagga a una concentración final de 11,1 µg/ml. Se usa el siguiente procedimiento para obtener los compuestos.

5 Síntesis de amidas: A la solución de ácido carboxílico (3 mmoles) enfriada en hielo en diclorometano (20 ml) se añaden secuencialmente 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (3,3 mmoles) y 4-dimetilaminopiridina (3 mmoles). Después de 5 min, se añade amina (3,3 mmoles) en la solución de reacción. La reacción se calienta lentamente a la temperatura ambiente y duró durante la noche. La reacción se extrae con acetato de etilo (200 ml). La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro. Después de la evaporación a vacío, el residuo se ejecuta a través de una columna de gel de sílice con una relación apropiada de acetato de etilo en hexano. El rendimiento de los productos finales oscila del 85 % al 90 %. Los productos finales se caracterizan con RMN de protones.

15 N-Ciclopentilcinamamida (SAR-023): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 7,62 (d, J=15,6 Hz, 1H), 7,50 (d, J=7,0 Hz, 2H), 7,35 (m, 3H), 6,37 (d, J=15,6, 1H), 5,61 (d, J= 5,0, Hz, 1H, NH), 4,35 (sextuplete, J=7,0 , 1H), 2,06 (m, 2H), 1,71 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,46 (m, 2H).

N-(trans-Cinamoil)pirrolidina (SAR-024): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 7,70 (d, J=15,5 Hz, 1H), 7,53 (d, J=7,0 Hz, 2H), 7,36 (m, 3H), 6,74 (d, J=15,5, 1H), 3,63 (t, J=7,0 , 2H), 3,60 (t, J=7,0, 2H), 2,01 (quintuplete, J=7,0, 2H), 1,91 (quintuplete, J=7,0, 2H).

20 N-(trans-Cinamoil)piperidina (SAR-025): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 7,64 (d, J=15,5 Hz, 1H), 7,52 (d, J=7,2 Hz, 2H), 7,36 (m, 3H), 6,90 (d, J=15,5, 1H), 3,67 (s, 2H), 3,59 (s, 2H), 1,68 (m, 2H), 1,62 (m, 4H).

N-(trans-Cinamoil)hexametiliminina (SAR-026): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 7,70 (d, J=15,4 Hz, 1H), 7,52 (d, J=7,6 Hz, 2H), 7,36 (m, 3H), 6,88 (d, J=15,4, 1H), 3,63 (t, J=6,0, 2H), 3,61 (t, J=6,0, 2H), 1,76 (m, 4H), 1,59 (m, 4H).

25 N-Ciclopentildecenamida (SAR-020): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 5,35 (a, 1H), 4,22 (sextuplete, J=7,00, 1H), 2,12 (t, J=7,20, 2H), 1,98 (m, 2H), 1,59-1,67 (m, 6H), 1,26-1,36 (m, 14H), 0,88 (t, J=7,00, 3H).

N-(Decanoil)pirrolidina (SAR-007): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 3,45 (t, J=6,80, 2H), 3,40 (t, J=6,80, 2H), 2,24 (t, J=7,20, 2H), 1,94 (quintuplete, J=6,80, 2H), 1,84 (quintuplete, J=6,80, 2H), 1,62 (quintuplete, J=7,20, 2H), 1,25-1,30 (m, 12H), 0,87 (t, J=7,20, 3H).

30 N-(Decanoil)piperidina (SAR-021): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 3,55 (t, J=5,20, 2H), 3,39 (t, J=5,20, 2H), 2,31 (t, J=7,60, 2H), 1,58-1,65 (m, 4H), 1,52-1,57 (m, 4H), 1,20-1,30 (m, 12H), 0,87 (t, J=7,20, 3H).

N-(Decanoil)hexametiliminina (SAR-022): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 3,52 (t, J=6,00, 2H), 3,42 (t, J=6,00, 2H), 2,30 (t, J=7,80, 2H), 1,66-1,74 (m, 4H), 1,60-1,66 (m, 2H), 1,50-1,6,0 (m, 4H), 1,20-1,30 (m, 12H), 0,87 (t, J=7,20, 3H).

35 N-Ciclopentildecenamida (SAR-027): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 6,82 (dt, J₁=15,20, J₂=7,20, 1H), 5,71 (d, J=15,20, 1H), 5,33 (a, 1H), 4,27 (sextuplete, J=7,00, 1H), 2,15 (m, 2H), 2,10 (m, 2H), 1,67 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,40 (m, 4H), 1,28 (m, 8H), 0,88 (t, J=7,00, 3H).

40 N-(Decenoil)pirrolidina (SAR-030): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 6,90 (dt, J₁=15,20, J₂=7,00, 1H), 6,07 (d, J=15,20, 1H), 3,52 (t, J=6,30, 2H), 3,50 (t, J=6,30, 2H), 2,19 (m, 2H), 1,96 (quintuplete, J=7,00, 2H), 1,85 (quintuplete, J=7,00, 2H), 1,44 (m, 2H), 1,28 (m, 8H), 0,88 (t, J=7,00, 3H).

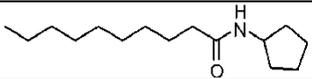
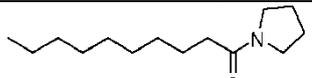
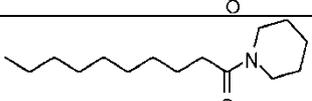
N-(Decenoil)piperidina (SAR-031): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 6,82 (dt, J₁=15,20, J₂=7,00, 1H), 6,23 (d, J=15,20, 1H), 3,59 (t, J=6,30, 2H), 3,47 (t, J=6,30, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,64 (quintuplete, J=5,60, 2H), 1,56 (quintuplete, J=5,60, 4H), 1,44 (quintuplete, J=7,00, 2H), 1,28 (m, 8H), 0,88 (t, J=7,00, 3H).

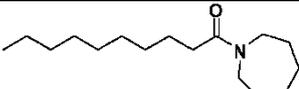
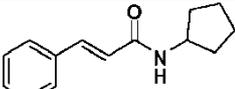
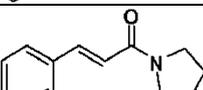
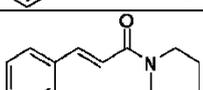
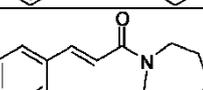
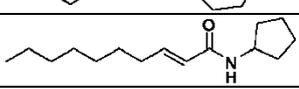
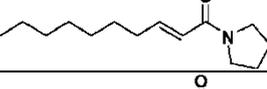
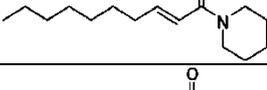
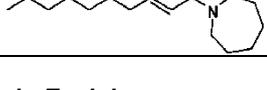
45 N-(Decenoil)hexametiliminina (SAR-032): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 6,91 (dt, J₁=15,20, J₂=7,00, 1H), 6,21 (d, J=15,20, 1H), 3,57 (t, J=6,00, 2H), 3,49 (t, J=6,00, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,73 (m, 4H), 1,56 (m, 4H), 1,45 (m, 2H), 1,28 (m, 8H), 0,88 (t, J=7,00, 3H).

N-(Decenoil)piperidina (SAR-033): RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 6,82 (dt, J₁=15,20, J₂=7,00, 1H), 6,23 (d, J=15,20, 1H), 3,59 (t, J=6,30, 2H), 3,47 (t, J=6,30, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,64 (quintuplete, J=5,60, 2H), 1,56 (quintuplete, J=5,60, 4H), 1,44 (quintuplete, J=7,00, 2H), 1,28 (m, 8H), 0,88 (t, J=7,00, 3H).

50 Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Potencia de amidas sintetizadas hacia mejillones quagga

N.º	Estructura	Conc [µg/ml]	24 h	48 h	72 h	96 h
SAR-020		11,1	75 ± 7	75 ± 7	75 ± 7	75 ± 7
SAR-007		11,1	35 ± 7	50 ± 14	55 ± 21	65 ± 21
SAR-021		11,1	55 ± 21	55 ± 21	60 ± 14	65 ± 7

SAR-022		11,1	35 ± 7	40 ± 14	40 ± 14	45 ± 21
SAR-023		11,1	0	0	0	0
SAR-024		11,1	0	0	0	0
SAR-025		11,1	0	0	0	0
SAR-026		11,1	0	0	0	0
SAR-027		11,1	85 ± 7	95 ± 7	95 ± 7	95 ± 7
SAR-031		111	20 ± 14	35 ± 35	35 ± 35	40 ± 28
SAR-032		11,1	45 ± 21	50 ± 14	80 ± 14	80 ± 14
SAR-033		11,1	70 ± 14	75 ± 21	75 ± 21	75 ± 21

Ejemplo 2. Extractos de *Erwinia*

5 Se cultiva *Erwinia carotovora* en caldo de LB (por litro: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, pH=7,5). Se cultiva inóculo extendiendo una placa de TSA (agar de soja triptica) de una solución madre de glicerol. La pureza del cultivo se confirma mediante inspección visual de la morfología de colonias. Usando un bucle estéril de 10 µl, se recogen colonias de la superficie del agar y se resuspenden en 50 ml de caldo de LB en un matraz Erlenmeyer sin tabiques deflectores de 250 ml con tapa roscada. El cultivo líquido se incuba durante 48-72 horas a 200 rpm y 25 °C.

10 Después de 72 h, el caldo completo se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se seca a vacío. La extraída secada se enrasa a una solución de 5,0 mg/ml en sulfóxido de dimetilo (DMSO). Entonces, tal solución (100 µl) se añade en 45 ml de agua dura. La concentración final de los extractos de acetato de etilo es 11,1 ppm.

15 Los datos mostrados en la Tabla 3 indica que los compuestos bioactivos contra los mejillones quagga se producen en *Erwinia carotovora* cuando se cultivan en los medios de LB. El compuesto **37** (Fig. 1b) descrito anteriormente es una de las lactonas producidas por *E. carotovora* cultivadas en los medios de LB [Günter Brader, Solveig Sjöblom, Heidi Hyytiäinen, Karen Sims-Huopaniemi, and E. Tapio Palva, Altering Substrate Chain Length Specificity of an Acylhomoserine Lactone. Synthase in Bacterial Communication, The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(11) 10403-10409].

20

Tabla 3: Eficacia de los extractos de acetato de etilo de *Erwinia carotovora* cultivados en el caldo de LB

Tratamientos	% de mortalidad (24 h)	% de mortalidad (48 h)	% de mortalidad (72 h)	% de mortalidad (96 h)	% de mortalidad (120 h)	% de mortalidad (144 h)
<i>Erwinia carotovora</i>	30 ± 0	75 ± 7	80 ± 0	80 ± 0	80 ± 0	90 ± 14
Blanco	0	0	0	0	0	0

Ejemplo 3: Aislamiento de compuestos molusquicidas de *Pseudomonas**Estudio A*5 Fraccionamiento de compuestos

Se usa el siguiente procedimiento para el fraccionamiento de compuestos extraídos de células lavadas de *Pseudomonas fluorescens* CL-145A:

10 El sedimento de células derivado de la fermentación de 10 l de *P. fluorescens* CL 145A (ATCC 55799) en medio de crecimiento FM2 se suspende en tampón de dilución y se extrae con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus Streptomyces strain CNQ-085 J. Nat. Prod. 69:1756-1759; Williams, P. G., Miller, E. D., Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Fenical, W. 2007. Arenicolides A-C, 26-Membered Ring Macrolides from the Marine Actinomycete Salinispora arenicola. J. Org. Chem. 72:5025-5034) agitando la suspensión de células con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. Se recogen la resina y la masa celular por filtración a través de tela de queso y se lavó con agua DI para eliminar sales. La resina, masa de células y tela de queso se impregnaron entonces durante 2 h en acetona después de que se filtrara la acetona y se secó a vacío usando un evaporador rotatorio para dar el extracto en bruto. El extracto en bruto se fracciona entonces usando cromatografía de líquidos a vacío C18 en fase inversa (H₂O/CH₃OH; gradiente 90:20 a 0:100 %) dando 7 fracciones. Estas fracciones se concentran entonces a sequedad usando un evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se criban para actividad biológica usando tanto un bioensayo de prueba en frasco de mejillones vivos con mejillones quagga, además de un ensayo basado en células con un línea celular de embriones de caracol de agua fresca (*Biomphalaria glabrata*). Los bioensayos se describen en más detalle en los Ejemplos N.º 2 y N.º 3. Las fracciones activas se someten entonces a HPLC de fase inversa/normal (Spectra System P4000 (Thermo Scientific)) dando compuestos puros, que entonces se criban en los bioensayos anteriormente mencionados para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registran datos espectroscópicos adicionales tales como CL/EM y RMN.

30 Un diagrama del método usado se muestra en la Figura 3. Basándose en tanto el ensayo de mejillones vivos como de células de caracol, las fracciones N.º 4 y N.º 5 contienen compuestos activos. De todos los compuestos separados por HPLC (columna C-18, sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (0-10 min; 30 - 40 % de CH₃CN acuoso, 10-20 min; 40 - 60 % de CH₃CN acuoso, 20-60 min; 60 - 80 % de CH₃CN acuoso, 60-65 min; 80 - 100 % de CH₃CN acuoso) a 2,5 ml/min de caudal y detección UV de 210 nm, los picos número 20, tiempo de retención 51,66 min, 21, tiempo de retención 52,56 min y 22A, tiempo de retención 59,61 min, inhiben el crecimiento (por ejemplo, valor de DO600 bajo) de células de caracol en el bioensayo.

Se realizan análisis de espectroscopía de masas de picos activos en un instrumento de electropulverización (ESI) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus usando tanto modos de ionización positiva como negativa en un modo de barrido completo (m/z 100-1500 Da) en un espectrómetro de masas LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Instrumento de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Thermo equipado con Finnigan Surveyor PDA más detector, inyector automático más, bomba de EM y una columna de 4,6 mm x 100 mm Luna C18 5 µm (Phenomenex). El sistema de disolventes consiste en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). La fase móvil empieza al 10 % de disolvente B y aumenta linealmente al 100 % de disolvente B durante 20 min y luego se mantiene durante 4 min, y finalmente se devuelve al 10 % de disolvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. El caudal es 0,5 ml/min. El volumen de inyección era 10 µl y las muestras se mantienen a temperatura ambiente en un inyector automático. Los compuestos se analizan por CL-EM utilizando CL y cromatografía de fase inversa. El análisis de espectroscopía de masas de los presentes compuestos se realiza bajo las siguientes condiciones: El caudal de gas nitrógeno se fijó a 30 y 15 arb para la funda y caudal de gas aux/de barrido, respectivamente. Se realizó ionización por electropulverización con un voltaje de pulverización establecido a 5000 V y un voltaje capilar a 35,0 V. La temperatura del capilar se estableció a 400 °C. Los datos se analizaron en el software Xcalibur. El compuesto activo en el pico N.º 20 tiene una masa molecular de 1294,75 en modo de ionización positiva. El cromatograma de CL-EM para otro compuesto activo (pico N.º 22A) sugiere una masa molecular de 1320,83 en modo de ionización positiva.

55 Para la elucidación de estructuras, el compuesto parcialmente purificado del pico activo N.º 20 se analiza además usando un instrumento de RMN de 600 MHz, y tiene valores de δ a δ 9,25, 8,36, 8,06, 7,82, 7,71, 7,52, 7,45, 6,82, 6,36, 6,08, 5,42, 5,39, 5,30, 5,14, 4,68, 4,42, 4,31, 4,16, 4,11, 4,07, 3,95 - 3,86, 3,83, 3,72, 3,66, 3,53, 3,48, 3,37, 3,17, 3,06, 2,56, 2,53, 2,45, 2,32, 2,21, 2,02, 1,96, 1,84, 1,72, 1,65, 1,61, 1,51, 1,48 - 1,37, 1,32, 1,12, 0,94, 0,91, 0,68 en CDCl₃. Los datos de RMN indican que el compuesto contiene grupos amino, éster, ácido carboxílico, fenilo, indol, metilo alifático, etilo, metileno, oximetileno, metino, o-metilo, oximetino y azufre.

65 Similarmente, el análisis de HPLC en una columna C-18 y sistema de disolventes de acetonitrilo:agua (0-10 min; 35 - 45 % de CH₃CN acuoso, 10-20 min; 45 - 60 % de CH₃CN acuoso, 20-50 min; 60 - 85 % de CH₃CN acuoso, 50-60 min; 85 - 100 % de CH₃CN acuoso, 60-70 min; 100 % de CH₃CN) a 10 ml/min de caudal y detección UV de 210 nm de la fracción activa N.º 4 usando fraccionamiento guiado por bioensayo dio múltiples picos con actividad contra

tanto mejillones vivos como células de embrión de caracol. La mayoría de la actividad se concentra en los picos N.º 27 tiempo de retención 47,73 min y N.º 30 tiempo de retención 51,52 min.

Los picos N.º 27 y N.º 30 se analizan además por CL/EM. Basándose en los resultados, el pico N.º 27 contiene múltiples compuestos, teniendo los dos componentes principales una masa de aproximadamente 643 y 984. El pico N.º 30 contiene menos compuestos, y el análisis de masa sugiere una masa molecular de aproximadamente 546 para el principal componente bajo el pico.

Prueba de bioensayo de mejillones

Esta prueba de bioensayo de mejillones vivos se usa para guiar la identificación de compuestos activos mediante fraccionamiento de muestras usando HPLC y CL-EM como herramientas analíticas.

Se colocan veinte mejillones quagga recién recogidos en un frasco que contiene 250 ml de agua de grifo desclorada a temperatura ambiente. Los frascos se mantienen a temperatura ambiente y se conectan a un colector que proporciona suministro de aire constante mediante burbujeo. Cada sujeto de prueba (fracción o pico de HPLC) disuelto en DMSO se pipetea en frascos por separado a una concentración de 1 - 5 mg, y los mejillones se incuban con el sujeto de prueba durante 24 horas. Después del periodo de incubación, se desecha el agua en cada frasco, y los mejillones se aclaran con agua fresca y se transfieren a placas de Petri de vidrio abiertas durante un periodo de observación de 10 días. Los mejillones se comprueban diariamente para mortalidad, y se retiran los mejillones muertos y se desechan. Cada tratamiento se lleva a cabo en tres duplicados, y al final del periodo de incubación de 10 días, se calcula el % de mortalidad para cada tratamiento.

Ensayo basado en células

Como método alternativo, este ensayo basado en células se usa como herramienta para facilitar el aislamiento y la identificación de compuestos activos en las células de *P. fluorescens* después de la fermentación. Se usan células embrionarias de un caracol de agua dulce (*Biomphalaria glabrata*, ATCC CRL-1494) como sistema modelo para las células epiteliales de la glándulas digestivas de mejillón que se sabe que son susceptibles para las biotoxinas de *P. fluorescens*. Para el ensayo, se añaden 200 µl de células activamente en crecimiento en un medio de crecimiento completo que contenía el medio de *Drosophila*, suero de ternero fetal, d-galactosa y lactalbúmina en cada pocillo de una placa de 96 pocillos estéril. El compuesto de prueba (fracción o pico de HPLC a 20 mg/ml) disuelto en DMSO se añade a cada pocillo, y la placa se cubre y se incuba en un entorno controlado a 23 °C y 5 % de CO₂. Se mide la actividad (inhibición del crecimiento = baja turbidez) a 600 nm usando un lector de placas SpectraMax con el software SoftMax Pro, y se compara con el control negativo con DMSO puro como compuesto de prueba. Cada tratamiento se realiza en cuatro duplicados, y se incluye un tratamiento de control positivo duplicado en cada placa.

Estudio B

Métodos y materiales

El siguiente procedimiento se usa para la purificación de compuestos extraídos de cultivo celular de *Pseudomonas fluorescens* y se resume en la Fig. 3. Específicamente, el sedimento de células derivado de la fermentación de 10 l de *P. fluorescens* CL 145A (ATCC 55799) en medio de crecimiento FM2 se suspende en tampón de dilución y se extrae con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus Streptomyces strain CNQ-085 J. Nat. Prod. 69:1756-1759 and Williams, P. G., Miller, E. D., Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Fenical, W. 2007. Arenicolides A-C, 26-Membered Ring Macrolides from the Marine Actinomycete Salinispora arenicola. J. Org. Chem. 72:5025-5034) agitando la suspensión de células con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa de células se recogen por filtración a través de tela de queso y se lavan con agua DI para eliminar sales. La resina, masa de células y tela de queso se impregnan entonces durante 2 h en acetona después de que se filtrara la acetona y se secan a vacío usando un evaporador rotatorio para dar el extracto en bruto. El extracto en bruto se fracciona entonces usando cromatografía de líquidos a vacío C18 en fase inversa (H₂O/CH₃OH; gradiente 90:20 a 0:100 %) dando 7 fracciones. Estas fracciones se concentran entonces a sequedad usando un evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se criban para actividad biológica usando tanto un bioensayo de prueba en frasco de mejillones vivos con mejillones quagga, además de un ensayo basado en células con una línea celular de embriones de caracol de agua fresca (*Biomphalaria glabrata*). Las fracciones activas se someten a HPLC de fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific)) dando compuestos puros, que entonces se criban en los bioensayos anteriormente mencionados para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registran datos espectroscópicos adicionales tales como CL/EM y RMN.

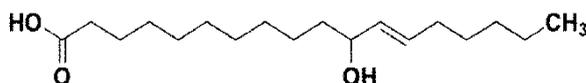
La fracción activa 4 se subfracciona adicionalmente usando cromatografía de exclusión por tamaño Sephadex LH 20 dando 7 subfracciones. Se realiza la purificación de pilferólido A y ácido 11-hidroxi-12-eno-octadecanoico usando la columna C-18 de HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (0-10 min; 50 - 60 % de CH₃CN acuoso, 10-20 min; 60 - 75 % de CH₃CN acuoso, 20-45 min; 75 - 100 % de CH₃CN acuoso, 45-55 min; 100 % de CH₃CN, 55-70 min; 100 - 50 % de CH₃CN acuoso) a 8 ml/min de

caudal y detección UV de 210 nm, los picos activos número 21, tiempo de retención 45,59 min, y 23, tiempo de retención 48,53 min.

Se realiza el análisis de espectroscopía de masas de picos activos en un instrumento de electropulverización (ESI) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus usando tanto modos de ionización positiva como negativa en un modo de barrido completo (m/z 100-1500 Da) en un espectrómetro de masas LCQ DECA XP^{PLUS} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Instrumento de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Thermo equipado con Finnigan Surveyor PDA más detector, inyector automático más, bomba de EM y una columna de 4,6 mm x 100 mm Luna C18 5 μ m (Phenomenex). El sistema de disolventes consistió en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). La fase móvil empieza al 10 % de disolvente B y aumenta linealmente al 100 % de disolvente B durante 20 min y entonces se mantuvo durante 4 min, y finalmente se devolvió al 10 % de disolvente B durante 3 min y se mantuvo durante 3 min. El caudal es 0,5 ml/min. El volumen de inyección fue 10 μ l y las muestras se mantienen a temperatura ambiente en un inyector automático. Los compuestos se analizan por CL-EM utilizando la CL y cromatografía de fase inversa. El análisis de espectroscopía de masas de los presentes compuestos se realiza bajo las siguientes condiciones: El caudal del gas nitrógeno se fijó a 30 y 15 arb para la funda y caudal de gas aux/de barrido, respectivamente. Se realizó ionización por electropulverización con un voltaje de pulverización establecido a 5000 V y un voltaje capilar a 35,0 V. La temperatura del capilar se estableció a 400 °C. Los datos se analizaron en el software Xcalibur. El compuesto activo piliferólido A tiene una masa molecular de 295,65 en modo de ionización negativa. El cromatograma de CL-EM para otro compuesto activo sugiere una masa molecular de 297,74 en modo de ionización negativa.

Para la elucidación de estructuras, el compuesto purificado piliferólido A con un peso molecular 296 se analiza además usando un instrumento de RMN de 500 MHz; la referencia se establece en el patrón interno de tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm). El compuesto tiene valores de δ de RMN ¹H a 5,62, 5,42, 4,55, 3,97, 2,58, 2,35, 2,04, 1,88, 1,73, 1,64, 1,54, 1,39, 0,92 y tiene valores de RMN ¹³C de δ 179,1, 133,3, 131,3, 81,9, 72,6, 37,3, 35,4, 32,1, 31,3, 29,5, 29,4, 29,0, 28,6, 27,8, 25,4, 25,3, 22,5, 13,3. Los análisis de RMN 1D y 2D detallados confirman la estructura para el compuesto como piliferólido A como compuesto conocido.

El segundo compuesto purificado con un peso molecular 298 se analiza además usando un instrumento de RMN de 500 MHz, y tiene valores de δ de RMN ¹H a 5,61, 5,41, 3,96, 2,27, 2,04, 1,69, 1,51, 1,42, 1,32, 0,92 y RMN ¹³C valores de δ 176,6, 133,2, 132,6, 73,5, 37,5, 33,9, 32,4, 31,6, 29,8, 29,7, 29,6, 29,4, 29,3, 29,1, 25,7, 24,9, 22,8, 14,3. El análisis de RMN 1D y 2D detallado confirma la estructura para el compuesto que no se informa para la fuente microbiana; fórmula molecular C₁₈H₃₄O₃. La estructura del compuesto, ácido 11-hidroxi-12-eno-octadecanoico, se muestra a continuación:



La potencia de los compuestos aislados de cultivo celular de *Pseudomonas* se prueba usando los procedimientos descritos anteriormente. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Efectos molusquicidas de piliferólido A y ácido 11-hidroxi-12-eno-octadecanoico

Estructura	Conc [μg/ml]	% de mortalidad 24 h	% de mortalidad 48 h	% de mortalidad 72 h	% de mortalidad 96 h
 Piliferólido A	16	53,3 ± 15,3	53,3 ± 15,3	70 ± 10	80 ± 10
 Ácido 11-hidroxi-12-eno-octadecanoico	16	0	20 ± 20	33,3 ± 20,8	40 ± 26,5

Ejemplo 5: Efectos del caolín

El efecto de la arcilla de caolín sobre la eficacia de un biopesticida microbiano basado en bacterias *P. fluorescens* se prueba en un estudio de bio-caja realizado a 11,8 °C. El primer día del experimento, se aplica arcilla de caolín a la bio-caja de una solución madre concentrada mediante una bomba peristáltica de manera que la turbidez final de la bio-caja fuera aproximadamente 20 UNT (unidades normalizadas de turbidez). Se colocan cincuenta mejillones quagga en tubos acrílicos de 1 pie (30,5 cm) de largo cerrados con una malla de nailon en ambos extremos, y los tubos se colocan en el fondo de la bio-caja para el tratamiento. La duración de la aplicación de arcilla es 6 horas, después de lo cual los mejillones en los tubos acrílicos se expusieron a agua corriente fresca en la bio-caja durante 18 horas. Al día siguiente, se limpia la arcilla adicional del fondo de la bio-caja, y se aplicó el biopesticida en suspensión acuosa mediante una bomba peristáltica a una concentración final de 200 ppm. Después del tratamiento

con biopesticida de 6 horas, los mejillones en tubos se incuban en la bio-caja con agua corriente fresca a una tasa de 1 galón (3,8 l) por minuto. Los mejillones se observan y se cuentan semanalmente durante 5 semanas para la determinación del % de mortalidad. Los tratamientos de control incluyeron un control no tratado, un tratamiento con solo arcilla de caolín (sin biopesticida) y un tratamiento con solo biopesticida (sin pre-tratamiento de arcilla). Todos los tratamientos se ejecutan en tres duplicados.

Los resultados presentados en la Tabla 5 y la Figura 4 muestran un aumento significativo en la mortalidad para los mejillones expuestos a arcilla de caolín 18 horas antes del tratamiento con biopesticida en comparación con mejillones sin pre-tratamiento con arcilla. Este fenómeno puede explicarse por la elevada actividad de sifonaje de mejillones recogidos y tratados en agua fría (11,8 °C) durante el periodo de baja actividad biológica. Este elevado sifonaje produce mayor captación de producto pesticida, que a su vez produce elevada mortalidad de mejillones.

Tabla 5. Eficacia del biopesticida expresada como % de mortalidad medido en cada momento de tiempo (días)

	% de mortalidad					
	1	9	16	21	27	34
Control no tratado	0	0	0	0	0	0
Caolín 20 UNT	0	0	0	0	0	1
Caolín 20 UNT + 200 ppm	0	35	64	71	77	83
200 ppm	0	22	46	55	58	63

Ejemplo 6: Efectos de gamma-dodecalactona y N-decenoil)pirrolidina sobre caracoles

Experimentos en caracoles: Se disuelve una cantidad apropiada de un compuesto de prueba en acetona (2 ml) primero. La solución se añadió en 2,5 gramos de almidón de maíz y se mezcló bien. La mezcla resultante se transfiere a una placa de Petri (Φ 25 mm). La placa de Petri se pone entonces en la campana para el secado natural. Después de secar, se añade agua (2 ml) en la placa de Petri para producir la pasta.

Se recogen caracoles de jardín marrones (*Cantareus aspersus*) de un jardín de casa y se crían al menos 1 día en el laboratorio con col o zanahoria roja. Se eligen cinco individuos con un tamaño similar para cada tratamiento y se transfieren en un vaso de precipitados de 1 l. Para activar el caracol, se pulveriza algo de agua sobre ellos y en el vaso de precipitados usando un pulverizador manual. Después de pulverizar agua, la placa de Petri con almidón de maíz que contiene producto químico se dispone en el vaso de precipitados, el vaso de precipitados se cubre sobre la superficie superior con lámina de aluminio. Se registra el comportamiento de alimentación, cantidad de almidón de maíz consumida y mortalidad a las 24 h.

Los datos indican (expuestos en la Tabla 6) que la gamma-dodecalactona (SAR-014) a 100 mg/gramo de almidón de maíz repelería fuertemente los caracoles de jardín marrones. Sin embargo, la N-decenoil)pirrolidina (SAR-030) en 100 mg/gramo de almidón de maíz aniquilaría todos los caracoles de jardín marrones después de que comieran.

Tabla 6. Efectos químicos sobre el caracol de jardín marrón

tratamiento	Productos químicos	Dosis (mg/gramo de almidón de maíz)	Comportamiento de alimentación	Cantidad de almidón de maíz consumida	24 h de mortalidad
control		0	Todos los individuos comieron almidón de maíz	Acabaron todo el almidón de maíz en el plazo de 2 h	0 %
1	SAR-014	100	Todos los individuos escaparon rápidamente del almidón	0 % después de 24 h	0 %
2	SAR-030	100	Cuatro individuos de los cinco comieron un bocado pequeño del almidón y se marcharon.	Menos del 5 % del almidón de maíz fue consumido después de 24 h	Murieron todos los individuos que comieron el almidón de maíz

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, los detalles de las mismas no deben interpretarse como limitantes, ya que es obvio que pueden usarse diversos equivalentes, cambios y modificaciones y todavía estar dentro del alcance de la presente invención, que se define por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de control de uno o más moluscos en una localización donde se desea el control, que comprende introducir en dicha localización uno o más compuestos aislados capaces de controlar dichos uno o más moluscos, en el que dichos uno o más compuestos aislados están seleccionados de
- (a) γ -dodecalactona, δ -tridecalactona y α -heptil- γ -butirolactona;
 - (b) una amida seleccionada de N-ciclopentildecanamida y N-ciclopentildecenamida;
 - (c) piliferólido A;
 - 10 (d) ácido 11-hidroxi12-eno-octadecanoico; y
 - (e) N-(decenil)pirrolidina
- y controlar dichos uno o más moluscos.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que dichos moluscos se controlan induciendo la muerte en dichos moluscos.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el molusco es un miembro de las clases *Gastropoda* o *Bivalvia*.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el molusco es *Dreissana* sp.

Fig. 1a

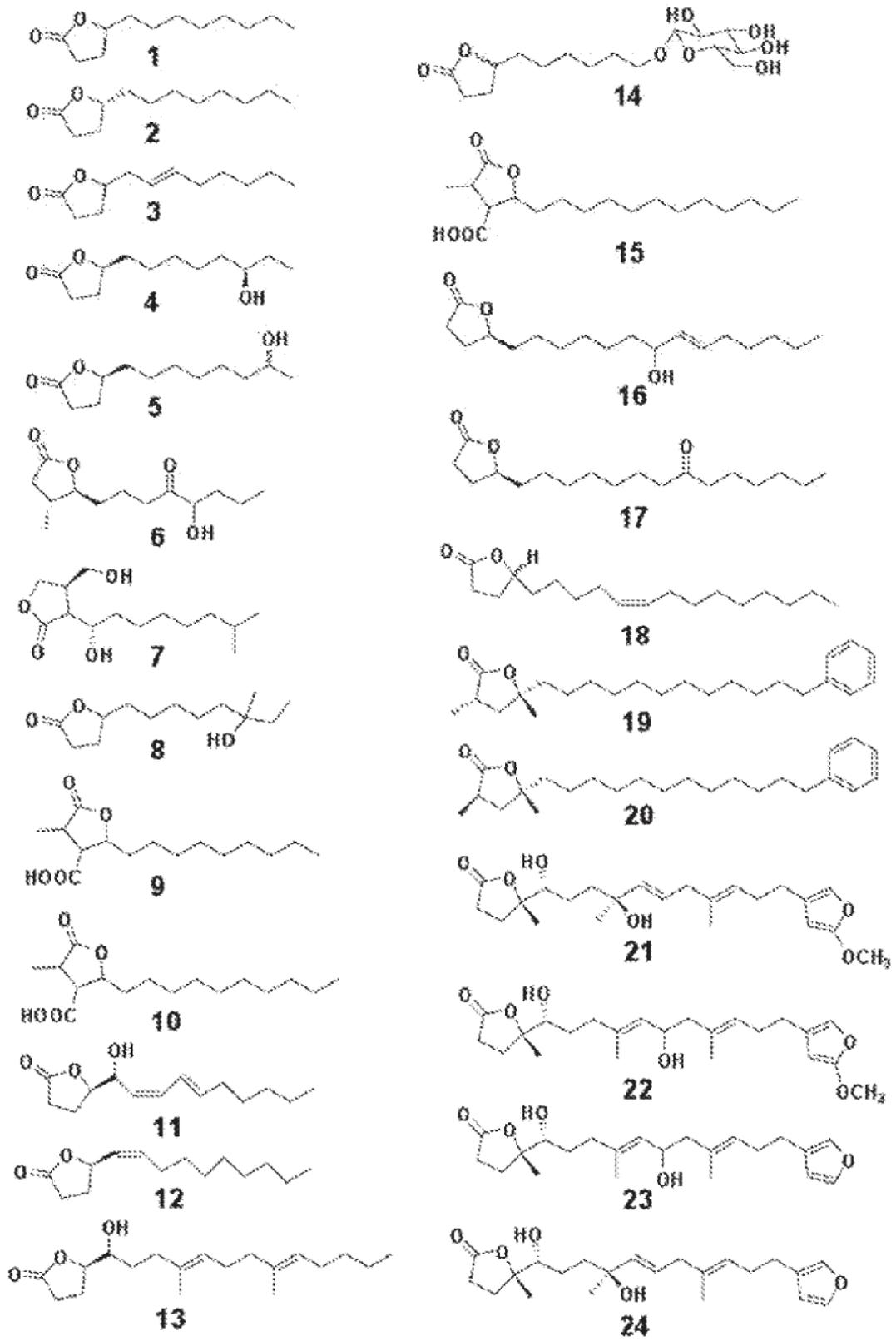


Fig. 1b

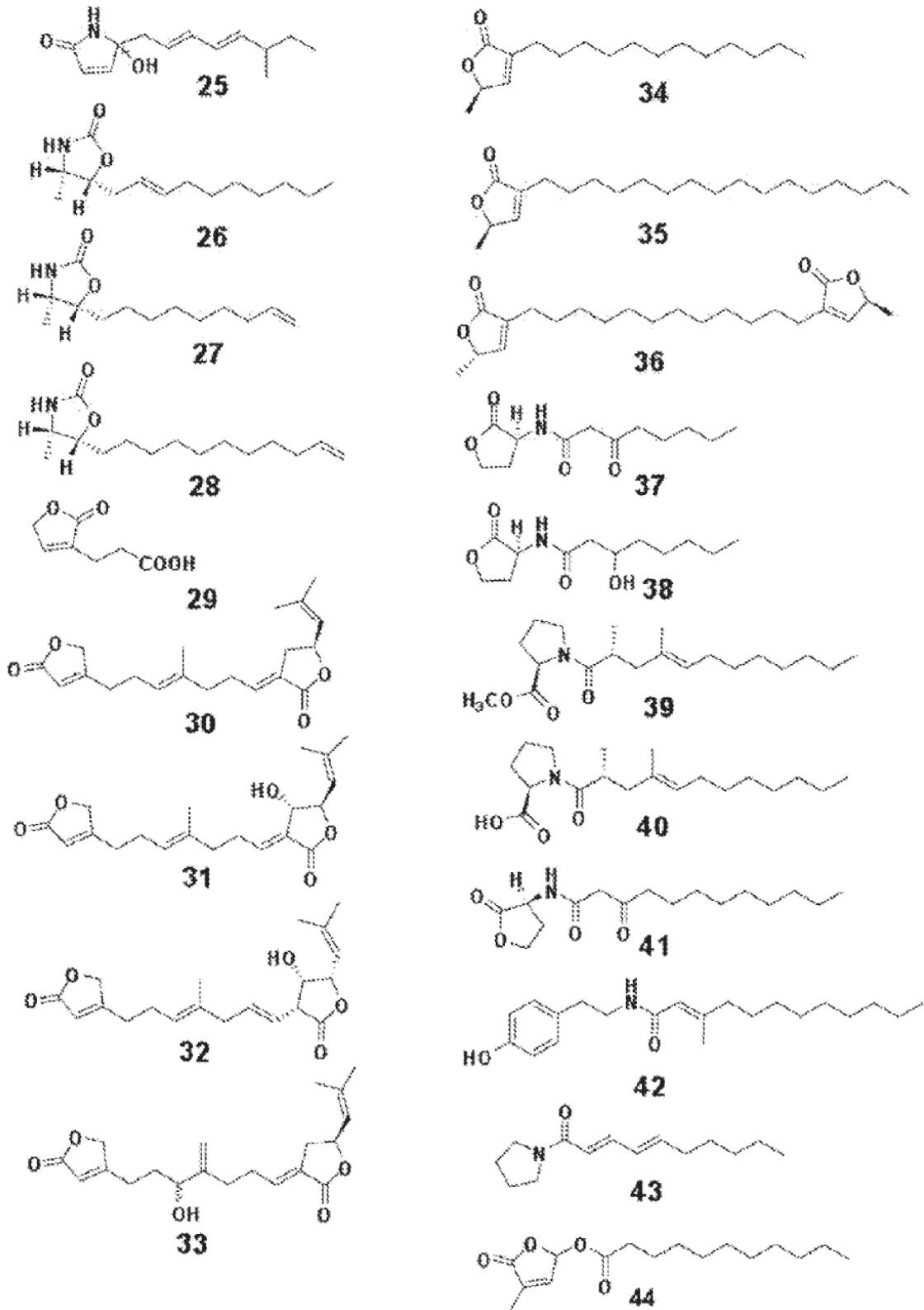
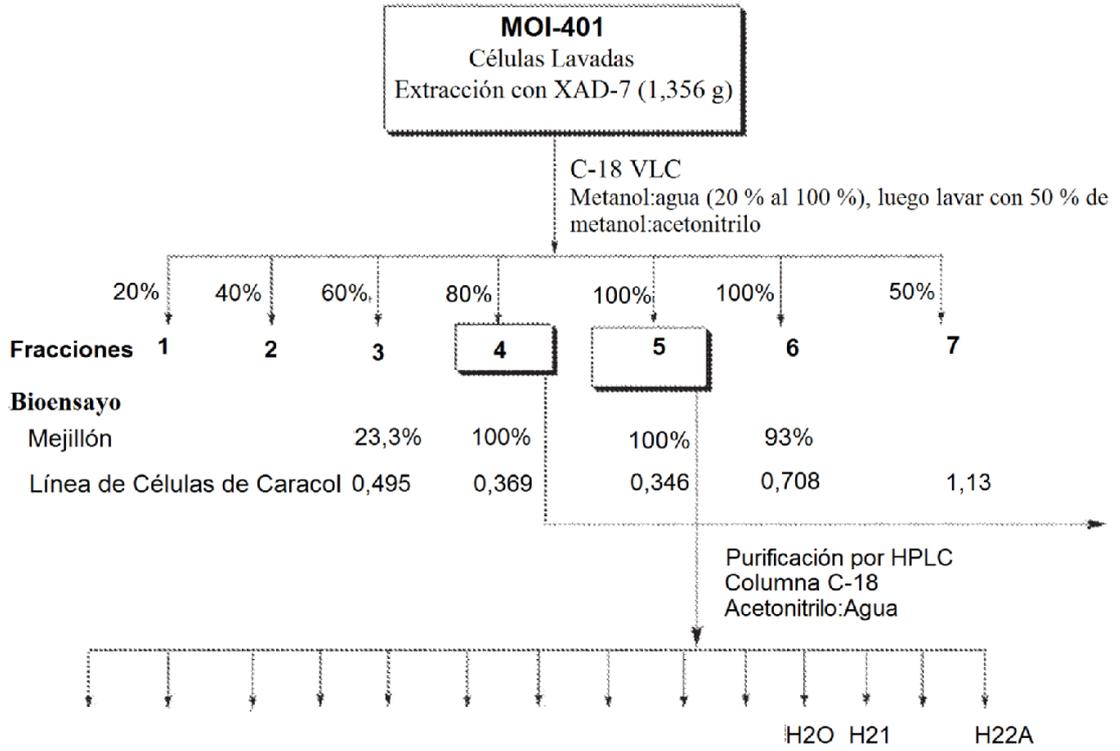


Fig. 2



Todos los picos de HPLC se sometieron al bioensayo de células de caracol
 H-20 = 0,401
 H-21 = 0,461
 H-22A = 0,506

Fig. 3

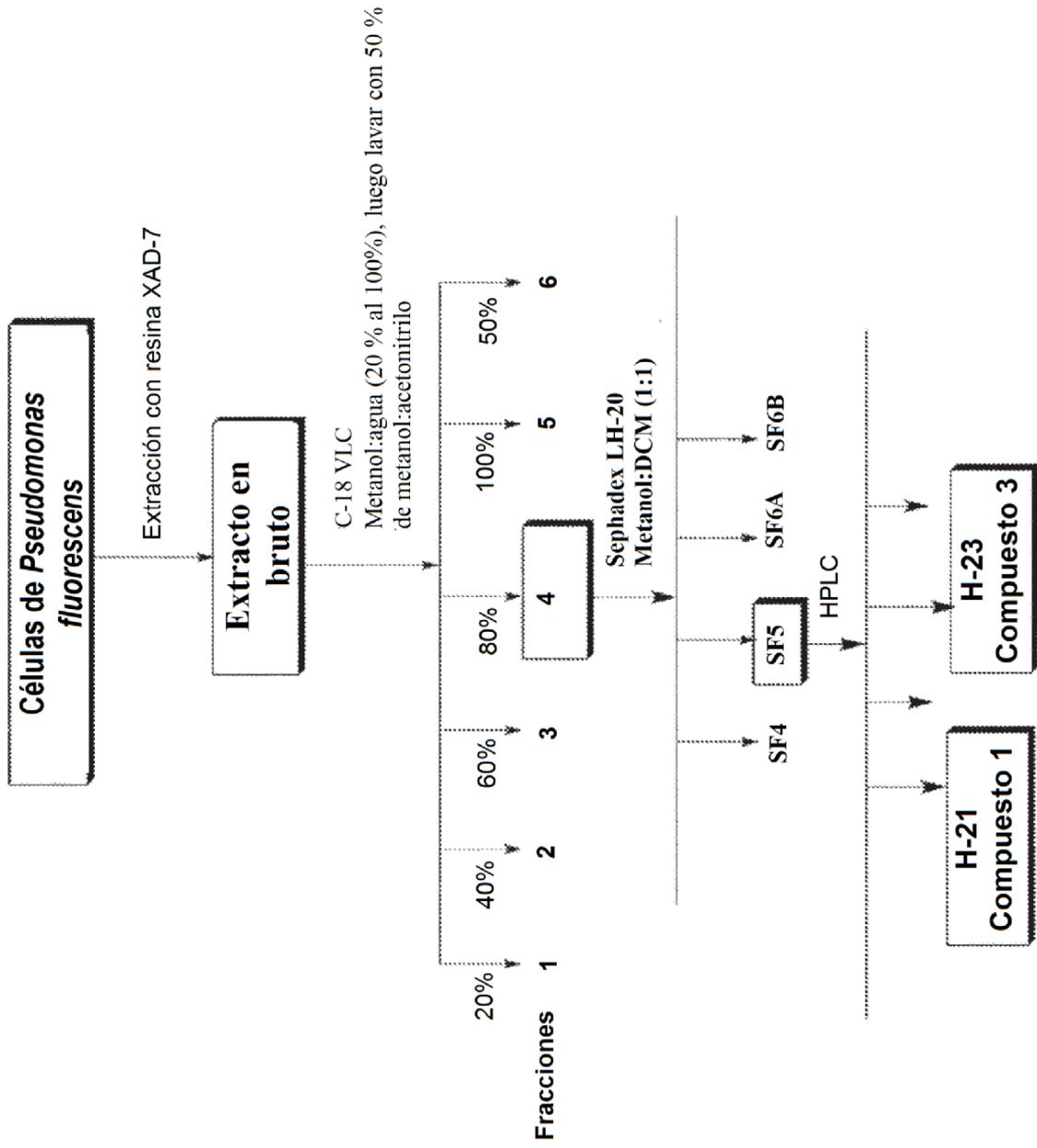


Fig. 4

