

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 962**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 3/02</b>	(2006.01)
<b>A01N 55/08</b>	(2006.01)
<b>A23B 4/20</b>	(2006.01)
<b>A23B 7/154</b>	(2006.01)
<b>A01N 59/16</b>	(2006.01)
<b>A01N 25/18</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2014 PCT/US2014/013510**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14120715**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2014 E 14705633 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2950644**

54 Título: **Uso de benzoxaboroles como agentes antimicrobianos volátiles en carnes, plantas o partes de plantas**

30 Prioridad:  
**30.01.2013 US 201361758313 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.10.2017**

73 Titular/es:  
**AGROFRESH INC. (100.0%)  
400 Arcola Road P.O. Box 7000  
Collegeville, PA 19426, US**

72 Inventor/es:  
**MACLEAN, DANIEL;  
YOUNG, DAVID, H.;  
JACOBSON, RICHARD, MARTIN;  
YAP, MAURICE C., H.;  
CIFUENTES, RODRIGO, A. y  
DEVRIES, DONALD, H.**

74 Agente/Representante:  
**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 636 962 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

Uso de benzoxaboroles como agentes antimicrobianos volátiles en carnes, plantas o partes de plantas

Antecedentes de la invención

5 Se han descrito anteriormente varios compuestos que contienen un anillo de oxaborol. Sin embargo, no se ha enseñado que estos compuestos de oxaborol son agentes antimicrobianos volátiles. Además, estos compuestos de oxaborol no se han utilizado en aplicaciones agrícolas.

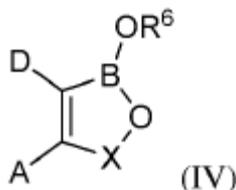
10 Baker et al., J. Med. Chem., 49, 15, July 2006, pp 4447-4450, describe un benzoxaborol como tratamiento potencial para onicomicosis. El documento EP 2015757 A2 describe el uso de derivados de boro, incluyendo benzooxaboroles, como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades causadas por hongos, levaduras, bacterias o virus. Los documentos US 8,669,207 B1 y WO 2013/050591 A2 describen ambos compuestos que comprenden determinadas unidades estructurales oxaboroles.

De este modo, sigue siendo necesario desarrollar nuevos usos de diversos agentes antimicrobianos volátiles y/o combinaciones con un regulador volátil de crecimiento de plantas, en particular para aplicaciones agrícolas.

Resumen de la invención

15 Esta invención se refiere al uso de un compuesto volátil antimicrobiano contra agentes patógenos que afectan a carnes, plantas o partes de plantas. Los compuestos antimicrobianos volátiles proporcionados incluyen ciertos compuestos oxaboroles, por ejemplo, benzoxaboroles. Se proporcionan sistemas de suministro para aprovechar la naturaleza volátil de estos compuestos antimicrobianos. También se describen combinaciones con un regulador volátil de crecimiento de plantas, por ejemplo 1-metilciclopropeno (1-MCP).

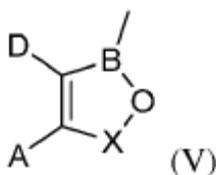
20 En un aspecto, se proporciona un método de uso de un compuesto volátil antimicrobiano contra agentes patógenos que afectan a carnes, plantas o partes de plantas. El método comprende proporcionar un compuesto volátil antimicrobiano de fórmula (IV):



25 en la que A y D junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un anillo condensado de 5, 6 o 7 miembros que puede estar sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo, halógeno, nitro, nitrilo, amino, amino sustituido con uno o más grupos alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carboxi, acilo, ariloxi, carbonamido, carbonamido sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, sulfonamido o trifluorometilo o el anillo condensado puede unir dos anillos oxaboroles;

X es un grupo -CR<sup>7</sup>R<sup>8</sup> en el que R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, nitrilo, nitro, arilo, arilalquilo o R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> junto con el átomo de carbono a los que están unidos forman un anillo alicíclico; y

30 R<sup>6</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> sustituido con alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquiltio C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo, amino, amino sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, carboxi, arilo, ariloxi, carbonamido, carbonamido sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo o arilalquilo, arilalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquilenamino C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, alquilenamino C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> sustituido con fenilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquiltio C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carbonil alquilenamino o un radical de fórmula (V):



35 en la que A, D y X son como se definen en este documento excepto para boronofalida;

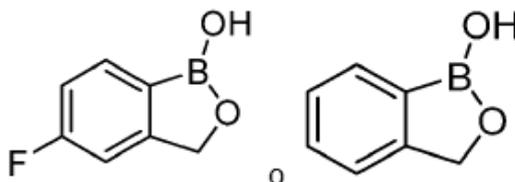
y sus sales agrícolamente aceptables; y poner en contacto una carne, planta o parte de la planta con una cantidad eficaz del compuesto volátil antimicrobiano, en donde dicho contacto comprende aplicar el compuesto volátil antimicrobiano por medio de tratamiento con gas.

5 En una realización del método proporcionado, el agente patógeno se selecciona del grupo que consiste en *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botryosphaeria* spp., *Botrytis* spp., *Byssoschlamys* spp., *Colletotrichum* spp., *Diplodia* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Monolinia* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Pezizula* spp., *Phomopsis* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Rhizopus* spp., *Sclerotinia* spp., y *Venturia* spp. En otra realización, el agente patógeno se selecciona del grupo que consiste en *Erwinia* spp., *Pectobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Xanthomonas* spp.; *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Shigella* spp., y *Staphylococcus* spp. En otra realización, el agente patógeno se selecciona del grupo que consiste en *Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Bacillus* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Vibrio* spp., y *Yersinia* spp. En otra realización, el método comprende un tratamiento previo a la recolección o un tratamiento posterior a la recolección. En una realización adicional, el tratamiento previo a la recolección se selecciona del grupo que consiste en tratamiento de semillas y tratamiento de trasplante. En otra realización, el tratamiento posterior a la recolección se selecciona del grupo que consiste en tratamiento durante el empaquetado de campo, tratamiento durante la paletización, tratamiento en caja, tratamiento durante el transporte, y tratamiento durante el almacenamiento y/o en toda la red de distribución.

20 En otra realización, las plantas o partes de las plantas comprenden plantas transgénicas o partes de las plantas transgénicas. En otra realización, las plantas o partes de las plantas se seleccionan del grupo que consiste en maíz, trigo, algodón, arroz, soja y canola. En otra realización, las plantas o partes de las plantas se seleccionan del grupo que consiste en frutas, vegetales, vivero, césped y cultivos ornamentales. En una realización adicional, la fruta se selecciona del grupo que consiste en plátano, piña, cítricos incluyendo naranjas, limón, lima, pomelo, y otros cítricos, uvas, sandía, cantalupo, melón reticulado, y otros melones, manzana, melocotón, pera, cereza, kiwi, mango, nectarina, guayaba, papaya, caqui, granada, aguacate, higo, y bayas incluyendo fresa, arándano, frambuesa, zarzamora, grosellas y otros tipos de bayas. En una realización adicional, el vegetal se selecciona del grupo que consiste en tomate, patata, camote, yuca, pimienta, pimienta dulce, zanahoria, apio, calabaza, berenjena, repollo, coliflor, brócoli, espárragos, hongos, cebolla, ajo, puerro, y frijol. Una realización adicional, la flor o parte de la flor se selecciona del grupo que consiste en rosas, claveles, orquídeas, geranios, lirio u otras flores ornamentales. Una realización adicional, la carne se selecciona del grupo de carne de vaca, bisonte, pollo, ciervo, cabra, pavo, cerdo, oveja, pescado, marisco, moluscos o productos cárnicos secos.

35 En una realización, el tratamiento con gas se selecciona del grupo consistente en liberación de una bolsita, liberación de una película sintética o natural, material fibroso y/o liberación de un revestimiento u otros materiales de envasado, liberación de polvo, liberación desde un generador de liberación de gas, liberación usando un cilindro de gas comprimido o no comprimido, liberación de una gotita dentro de una caja, y combinaciones de los mismos. En otra realización, el método comprende además poner en contacto las carnes, plantas o partes de plantas con un regulador volátil del crecimiento de las plantas. En una realización adicional, el regulador volátil de crecimiento de plantas es un compuesto de ciclopropeno. En una realización adicional, el compuesto de ciclopropeno comprende 1-metilciclopropeno (1-MCP).

En otra realización, el compuesto volátil antimicrobiano tiene una estructura de



40

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estructura química de un ejemplo del compuesto A de la invención.

La figura 2 muestra la estructura química de un ejemplo del compuesto B de la invención.

La figura 3 muestra catorce compuestos ensayados en el ejemplo 2.

45 La figura 4 muestra fotos representativas de ejemplos de resultados de inhibición in vivo usando el compuesto A, donde 0.04 mg del compuesto A muestra una inhibición del 100% y 0.0024 mg del compuesto A no muestran inhibición.

La figura 5 muestra fotos representativas de ejemplos de inhibición in vivo de *Botrytis cinerea* mediante una aplicación volátil del compuesto A después de un tratamiento de 3 días a 21°C, seguido de 2 días adicionales a 21°C.

## Descripción detallada de la invención

5 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en esta solicitud, incluyendo la memoria descriptiva y las reivindicaciones, tienen las definiciones dadas a continuación. Se debe tener en cuenta que, tal como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La definición de términos químicos estándar puede encontrarse en trabajos de referencia, incluyendo Carey and Sundberg, *Advanced Organic Chemistry* 4th Ed., Vols. A (2000) and B (2001), Plenum Press, New York, N.Y.

10 Como se usa en este documento, la frase "unidad estructural" se refiere a un segmento específico o grupo funcional de una molécula. Las unidades estructurales químicas son a menudo entidades químicas reconocidas incrustadas o añadidas a una molécula.

Como se usa en este documento, las frases "heteroátomo" y "hetero-" se refieren a átomos distintos del carbono (C) e hidrógeno (H). Ejemplos de heteroátomos incluyen oxígeno (O), nitrógeno (N) azufre (S), silicio (Si), germanio (Ge), aluminio (Al) y boro (B).

15 Como se usa en este documento, las frases "halo" y "halógeno" son intercambiables y se refieren a fluoro (-F), cloro (-Cl), bromo (-Br) y yodo (-I).

20 Como se usa en este documento, la frase "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo no sustituido o sustituido y puede incluir características lineales, ramificadas, cíclicas, saturadas y/o insaturadas. Aunque la unidad estructural alquilo puede ser una unidad estructural "alquilo insaturado", lo que significa que contiene al menos una unidad estructural alqueno o alquino, por lo general, la unidad estructural alquilo es un grupo "alquilo saturado", lo que significa que no contiene ninguna de las unidades estructurales alqueno o alquino. Del mismo modo, aunque la unidad estructural alquilo puede ser cíclica, la unidad estructural alquilo por lo general es un grupo acíclico. De este modo, en algunas realizaciones, "alquilo" se refiere a un monoradical hidrocarburo saturado de cadena lineal opcionalmente sustituida, o cadena ramificada opcionalmente sustituida que tiene de aproximadamente uno a aproximadamente treinta átomos de carbono en algunas realizaciones, de aproximadamente uno a aproximadamente quince átomos de carbono en algunas realizaciones, y de aproximadamente uno a aproximadamente seis átomos de carbono en otras realizaciones. Ejemplos de radicales alquilo saturados incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2-dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, y *n*-hexilo, y grupos alquilo más largos, tales como heptilo, y octilo. Se debe observar que siempre que aparece en este documento, un rango numérico tal como "1 a 6" se refiere a cada número entero en el rango dado; por ejemplo, "1 a 6 átomos de carbono" o "C<sub>1-6</sub>" o "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" significa que el grupo alquilo puede consistir de 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, 4 átomos de carbono, 5 átomos de carbono, y/o 6 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquilo" donde no se designa un intervalo numérico.

35 Como se usa en este documento, la frase "alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo, como se define en este documento, en el que uno o más (hasta aproximadamente cinco, preferiblemente hasta aproximadamente tres) átomos de hidrógeno está reemplazado por un sustituyente seleccionado independientemente entre el grupo sustituyente definido en este documento.

40 Como se usa en este documento, las frases "sustituyentes" y "sustituidos" se refieren a grupos que se pueden usar para reemplazar a otro grupo en una molécula. Tales grupos son conocidos para los expertos en las técnicas químicas y pueden incluir, sin limitación, uno o más de los siguientes grupos seleccionados independientemente, o subconjuntos designados de los mismos: halógeno, -CN, -OH, -NO<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, =O, =S, =NH, -SO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -COOH, nitroalquilo, amino, incluyendo grupos amino mono- y di-sustituidos, cianato, isocianato, tiocianato, isotiocianato, guanidinilo, O-carbamilo, N-carbamilo, tiocarbamilo, urilo, isourilo, tiourilo, isotiourilo, mercapto, sulfanilo, sulfínico, sulfonilo, sulfonamidilo, fosfonilo, fosfatidilo, fosforamidilo, dialquilamino, diarilamino, diarilalquilamino; y los compuestos protegidos de los mismos. Los grupos protectores que pueden formar los compuestos protegidos de los sustituyentes anteriores son conocidos para los expertos en el arte y se pueden encontrar en referencias tales como Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed.; John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1999) y Kocienski, *Protective Groups*; Thieme Verlag, New York, N.Y. (1994).

50 Como se usa en este documento, la frase "alcoxi" se refiere al grupo -O-alquilo, donde alquilo es como se define en este documento. En una realización, los grupos alcoxi incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, *tert*-butoxi, *sec*-butoxi, *n*-pentoxi, *n*-hexoxi, 1,2-dimetilbutoxi y similares. El alcoxi puede estar no sustituido o sustituido.

55 Como se usa en este documento, las frases "cíclico" y "anillo de miembros" se refieren a cualquier estructura cíclica, incluyendo sistemas de anillo condensados o no condensados alicíclicos, heterocíclicos, aromáticos, heteroaromáticos y policíclicos como se describe en este documento. El término "miembro" tiene la intención de indicar el número de átomos esqueléticos que constituyen el anillo. De este modo, por ejemplo, piridina, pirano y pirimidina son anillos de seis miembros y pirrol, tetrahidrofurano y tiofeno son anillos de cinco miembros.

Como se usa en este documento, la frase "aromático" se refiere a una unidad estructural cíclica o policíclica que tiene un sistema de electrones  $(4n+2)\pi$  conjugado insaturado (donde n es un número entero positivo), a veces denominado como sistema de electrón  $\pi$  deslocalizado.

5 Como se usa en este documento, la frase "arilo" se refiere a un monoradical de hidrocarburo aromático, cíclico, opcionalmente sustituido, de entre seis a aproximadamente veinte átomos en el anillo, preferiblemente de seis a aproximadamente diez átomos de carbono e incluye anillos aromáticos fusionados (o condensado) y no fusionados. Un radical de anillo aromático condensado contiene de dos a cuatro anillos condensados en los que el anillo de unión es un anillo aromático y los otros anillos individuales dentro del anillo condensado pueden ser cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquino, heterocicloalquilo, heterocicloalqueno, heterocicloalquino, aromático, heteroaromático o cualquier combinación de los mismos. Un ejemplo no limitante de un grupo arilo de anillo único incluye fenilo; un grupo arilo de anillo condensado incluye naftilo, antrilo, azuleno; y un grupo biarilo no fusionado incluye bifenilo.

10 Como se usa en este documento, la frase "arilo sustituido" se refiere a un grupo arilo, como se define en este documento, en el que uno o más (hasta aproximadamente cinco, preferiblemente hasta aproximadamente tres) átomos de hidrógeno está reemplazado por un sustituyente seleccionado independientemente del grupo definido en este documento, (excepto que de otro modo está restringido por la definición para el sustituyente arilo).

15 Como se usa en este documento, la frase "heteroarilo" se refiere a un monoradical cíclico, aromático, opcionalmente sustituido que contiene de aproximadamente cinco a aproximadamente veinte átomos en el esqueleto del anillo, preferiblemente de cinco a aproximadamente diez átomos en el anillo e incluye anillos aromáticos fusionados (o condensado) y no fusionado, y que tienen uno o más (uno a diez, preferiblemente aproximadamente uno a aproximadamente cuatro) átomos en el anillo seleccionados entre un átomo distinto del carbono (esto es, un heteroátomo) tal como, por ejemplo, oxígeno, nitrógeno, azufre, selenio, fósforo o combinaciones de los mismos. El término heteroarilo incluye radicales heteroarilo condensados y no condensados opcionalmente sustituidos que tienen al menos un heteroátomo. Un radical heteroarilo condensado puede contener de dos a cuatro anillos condensados en los que el anillo de unión es un anillo heteroaromático y los otros anillos individuales dentro del sistema de anillos condensados pueden ser alicíclicos, heterocíclicos, aromáticos, heteroaromáticos o cualquier combinación de los mismos. El término heteroarilo incluye también heteroarilos condensados y no condensados que tienen de cinco a aproximadamente doce átomos en el esqueleto del anillo, así como aquellos que tienen de cinco a aproximadamente diez átomos en el esqueleto del anillo. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, acridinilo, benzo[1,3]dioxol, benzimidazolilo, benzindazolilo, benzoisoxazolilo, benzocisazolilo, benzofuranilo, benzofurazanilo, benzopirano, benzotiadiazolilo, benzotiazolilo, benzo[b]tienilo, benzotiofenilo, benzotiopirano, benzotriazolilo, benzoxazolilo, carbazolilo, carbolinilo, cromo, cinolinilo, furano, furazanilo, furopiridinilo, furilo, imidazolilo, indazolilo, indolilo, indolidinilo, indolizino, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoxazolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, naftilidinilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, oxazolilo, fenoxazinilo, fenotiazinilo, fenazino, fenoxatiinilo, tiantrenilo, fenatridinilo, fenatrolinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo, puteridinilo, pirazolo, pirazolilo, piridilo, piridinilo, piridazinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, quinoxalinilo, tetrazolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazinilo, (1,2,3,-) y (1,2,4)-triazolilo y similares, y sus óxidos cuando sea apropiado, tales como por ejemplo piridol-N-óxido.

20 Como se usa en este documento, la frase "heteroarilo sustituido" se refiere a un grupo heteroarilo, como se define en este documento, en el que uno o más (hasta aproximadamente cinco, preferiblemente hasta aproximadamente tres) átomos de hidrógeno está reemplazado por un sustituyente seleccionado independientemente del grupo definido en este documento.

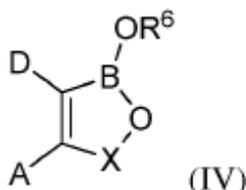
25 Como se usa en este documento, la frase "grupo saliente" se refiere a un grupo con el significado asociado convencionalmente con este en química orgánica sintética, esto es, un átomo o grupo desplazable bajo condiciones de reacción de sustitución. Ejemplos de grupos salientes incluyen, pero no se limitan a, halógeno, alcano- o arileno-sulfonilo, por ejemplo, metanosulfonilo, etanosulfonilo, tiometilo, bencenosulfonilo, tosilo, y tienilo, dihalofosfinilo, bencilo opcionalmente sustituido, isopropilo, acilo, y similares. En algunas realizaciones, un grupo saliente puede ser  $\text{HC(O)-COOH}$  o  $\text{RC(O)-COOH}$ , en el que R es un alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  o alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  sustituido.

30 Los compuestos de la invención como se describen en este documento se pueden sintetizar usando técnicas de síntesis convencionales conocidas para los expertos en el arte o usando métodos conocidos en la técnica en combinación con métodos descritos en este documento. Los materiales de partida usados para la síntesis de los compuestos de la invención, tal como se describen en este documento, se pueden obtener a partir de fuentes comerciales, tales como Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), o los materiales de partida se pueden sintetizar. Los compuestos descritos en este documento y otros compuestos relacionados que tienen diferentes sustituyentes se pueden sintetizar usando técnicas y materiales conocidos para los expertos en el arte, tal como se describe, por ejemplo, en March, Advanced Organic Chemistry 4th Ed. (1992) John Wiley & Sons, New York, N.Y.; Carey and Sundberg, Advanced Organic Chemistry 4th Ed., Vols. A (2000) and B (2001) Plenum Press, New York, N.Y. y Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed. (1999) John Wiley & Sons, New York, N.Y. Los métodos generales para la preparación de compuestos como los descritos en este documento se pueden derivar de reacciones conocidas en el campo, y las reacciones pueden ser modificadas por el uso de reactivos y condiciones

apropiadas, tal como sería reconocido por el experto en la técnica, para la introducción de las diversas unidades estructurales encontradas en las

fórmulas como se proporciona en este documento. Por ejemplo, los compuestos descritos en este documento se pueden modificar usando varios electrófilos o nucleófilos para formar nuevos grupos funcionales o sustituyentes.

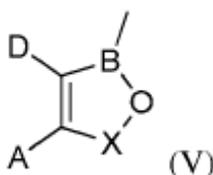
- 5 El compuesto volátil antimicrobiano del método de la invención tiene la estructura de fórmula (IV):



- 10 en la que A y D junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un anillo condensado de 5-, 6-, o 7- miembros que puede estar sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo, halógeno, nitro, nitrilo, amino, amino sustituido con uno o más grupos alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carboxi, acil, ariloxi, carbonamido, carbonamido sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, sulfonamido o trifluorometilo o el anillo condensado puede unir dos anillos oxaboroles;

X es un grupo -CR<sup>7</sup>R<sup>8</sup> en el que R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, nitrilo, nitro, arilo, arilalquilo o R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo alicíclico; y

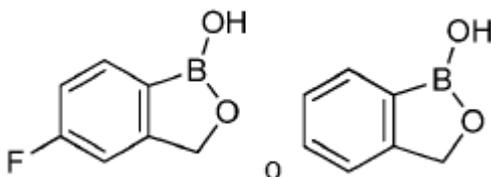
- 15 R<sup>6</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> sustituido con alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquiltio C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo, amino, amino sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, carboxi, arilo, ariloxi, carbonamido, carbonamido sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo o arilalquilo, arilalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquilenamino C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, alquilenamino C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> sustituido con fenilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquiltio C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carbonil alquilenamino o un radical de fórmula (V):



en la que A, D y X son como se definen en este documento anteriormente excepto para boronofalida;

y sus sales agrícolamente aceptables.

- 20 En otra realización, el compuesto volátil antimicrobiano tiene una estructura de



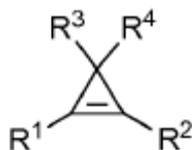
- 25 En una realización del método proporcionado, el agente patógeno se selecciona del grupo que consiste en *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botryosphaeria* spp., *Botrytis* spp., *Byssoschlamys* spp., *Colletotrichum* spp., *Diplodia* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Monolinia* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Pezizula* spp., *Phomopsis* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Rhizopus* spp., *Sclerotinia* spp., y *Venturia* spp. En otra realización, el agente patógeno se selecciona del grupo que consiste en *Erwinia* spp., *Pectobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Xanthomonas* spp.; *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Shigella* spp., y *Staphylococcus* spp. En otra realización, el agente patógeno se selecciona del grupo que consiste en *Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Bacillus* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Vibrio* spp., y *Yersinia* spp. En otra realización, el método comprende un tratamiento previo a la recolección o un tratamiento posterior a la recolección. En una realización adicional, el tratamiento previo a la recolección se selecciona del grupo que consiste en tratamiento de semillas y tratamiento de trasplante. En otra realización, el tratamiento posterior a la recolección se selecciona del grupo que consiste en tratamiento durante el empaquetado de campo,

tratamiento durante la paletización, tratamiento en caja, tratamiento durante el transporte, y tratamiento durante el almacenamiento y/o en toda la red de distribución.

5 En otra realización, las plantas o partes de las plantas comprenden plantas transgénicas o partes de las plantas transgénicas. En otra realización, las plantas o partes de las plantas se seleccionan del grupo que consiste en maíz, trigo, algodón, arroz, soja y canola. En otra realización, las plantas o partes de las plantas se seleccionan del grupo que consiste en frutas, vegetales, vivero, césped y cultivos ornamentales. En una realización adicional, la fruta se selecciona del grupo que consiste en plátano, piña, cítricos incluyendo naranjas, limón, lima, pomelo, y otros cítricos, uvas, sandía, cantalupo, melón reticulado, y otros melones, manzana, melocotón, pera, cereza, kiwi, mango, nectarina, guayaba, papaya, caqui, granada, aguacate, higo, y bayas incluyendo fresa, arándano, frambuesa, zarzamora, grosellas y otros tipos de bayas. En una realización adicional, el vegetal se selecciona del grupo que consiste en tomate, patata, camote, yuca, pimienta, pimienta dulce, zanahoria, apio, calabaza, berenjena, repollo, coliflor, brócoli, espárragos, hongos, cebolla, ajo, puerro, y frijol. Una realización adicional, la flor o parte de la flor se selecciona del grupo que consiste en rosas, claveles, orquídeas, geranios, lirio u otras flores ornamentales. Una realización adicional, la carne se selecciona del grupo de carne de vaca, bisonte, pollo, ciervo, cabra, pavo, cerdo, oveja, pescado, marisco, moluscos o productos cárnicos secos.

20 En una realización, el tratamiento con gas se selecciona del grupo consistente en liberación de una bolsita, liberación de una película sintética o natural, material fibroso y/o liberación de un revestimiento u otros materiales de envasado, liberación de polvo, liberación desde un generador de liberación de gas, liberación usando un cilindro de gas comprimido o no comprimido, liberación de una gotita dentro de una caja, y combinaciones de los mismos. En otra realización, el método comprende además poner en contacto las carnes, plantas, partes de plantas con un compuesto de ciclopropeno. En una realización adicional, el compuesto de ciclopropeno comprende 1-metilciclopropeno (1-MCP).

La práctica de la presente invención puede implicar el uso de uno o más compuestos de ciclopropeno. Como se usa en este documento, un compuesto de ciclopropeno es cualquier compuesto con la fórmula



25 donde cada  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H y un grupo químico de la fórmula:



30 donde n es un número entero de 0 a 12. Cada L es un radical bivalente. Los grupos L apropiados incluyen, por ejemplo, radicales que contienen uno o más átomos seleccionados entre H, B, C, N, O, P, S, Si, o mezclas de los mismos. Los átomos dentro de un grupo L pueden estar conectados entre sí por enlaces sencillos, dobles enlaces, triples enlaces, o mezclas de los mismos. Cada grupo L puede ser lineal, ramificado, cíclico o una combinación de los mismos. En uno cualquiera del grupo R (esto es, cualquiera de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$ ) el número total de heteroátomos (esto es, átomos que no son ni H ni C) es de 0 a 6. Independientemente, en uno cualquiera del grupo R el número total de átomos distintos de hidrógeno es 50 o menos. Cada Z es un radical monovalente. Cada Z se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, ciano, nitro, nitroso, azido, clorato, bromato, yodato, isocianato, isocianido, isotiocianato, pentafluorotio, y un grupo químico G, en el que G es un sistema de anillo de 3- a 14-miembros.

40 Los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente entre los grupos apropiados. Entre los grupos que son apropiados para uso como uno o más de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , y  $R^4$  son, por ejemplo, grupos alifáticos, grupos oxi alifáticos, grupos alquilfosfonato, grupos cicloalifáticos, grupos cicloalquilsulfonilo, grupos cicloalquilamino, grupos heterocíclicos, grupos arilo, grupos heteroarilo, halógenos, grupos sililo, otros grupos y mezclas y combinaciones de los mismos. Los grupos que son apropiados de uso de como uno o más de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  pueden estar sustituidos o no sustituidos.

45 Entre los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  apropiados se incluyen, por ejemplo, grupos alifáticos. Algunos grupos alifáticos apropiados incluyen, por ejemplo, grupos alquilo, alqueno y alquino. Los grupos alifáticos apropiados pueden ser lineales, ramificados, cíclicos o una combinación de los mismos. Independientemente, los grupos alifáticos apropiados pueden estar sustituidos o no sustituidos.

Como se usa en este documento, se dice que un grupo químico de interés está "sustituido" si uno o más átomos de hidrógeno del grupo químico de interés están reemplazados por un sustituyente.

También entre los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  apropiados se encuentran, por ejemplo, grupos heterocíclicos sustituidos y no sustituidos que están conectados al compuesto de ciclopropeno a través de un grupo oxilo intermedio, grupo amino,

grupo carbonilo o grupo sulfonilo; ejemplos de tales grupos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son heterociciloxi, heterocicilcarbonilo, diheterocicilamino, y diheterocicilaminosulfonilo.

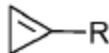
5 También entre los grupos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> apropiados están, por ejemplo, grupos heterocíclicos sustituidos y no sustituidos que están conectados al compuesto ciclopropeno a través de un grupo oxi intermedio, grupo amino, grupo carbonilo, grupo sulfonilo, grupo tioalquilo, o un grupo aminosulfonilo; ejemplos de tales grupos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son diheteroarilamino, heteroariltioalquilo, y diheteroarilaminosulfonilo.

10 También entre los grupos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> apropiados están, por ejemplo, hidrógeno, fluoro, cloro, bromo, yodo, ciano, nitro, nitroso, azido, clorato, bromato, yodato, isocianato, isocianido, isotiocianato, pentafluorotio, acetoxi, carboetoxi, cianato, nitrato, nitrito, perclorato, alenilo, butilmercapto, dietilfosfonato, dimetilfenilsililo, isoquinolilo, mercapto, naftilo, fenoxi, fenilo, piperidino, piridilo, quinolilo, trietilsililo, trimetilsililo, y análogos sustituidos de los mismos.

15 Como se utiliza en este documento, el grupo químico G es un sistema de anillos de 3 a 14 miembros. Los sistemas de anillos apropiados como grupo químico G pueden estar sustituidos o no sustituidos; pueden ser aromáticos (incluyendo, por ejemplo, fenilo y naftilo) o alifáticos (incluyendo alifáticos insaturados, alifáticos parcialmente saturados o alifáticos saturados); y pueden ser carbocíclicos o heterocíclicos. Entre los grupos heterocíclicos G, algunos heteroátomos apropiados son, por ejemplo, nitrógeno, azufre, oxígeno y combinaciones de los mismos. Los sistemas de anillos apropiados como grupo químico G pueden ser monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, policíclicos, espiro o condensados; entre los sistemas de anillo G apropiados del grupo químico que son bicíclicos, tricíclicos o condensados, los diversos anillos en un único grupo químico G pueden ser del mismo tipo o pueden ser de dos o más tipos (por ejemplo, un anillo aromático puede fundirse con un anillo alifático).

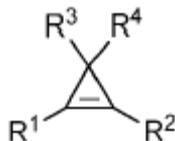
20 En una realización, uno o más de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>). En otra realización, cada uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>). En otra realización, cada uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>). En otra realización, cada uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es hidrógeno o metilo. En otra realización, R<sup>1</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es hidrógeno. En otra realización, R<sup>1</sup> es metilo y cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, y R<sup>4</sup> es hidrógeno, y el compuesto ciclopropeno se conoce en este documento como 1-metilciclopropeno o "1-MCP."

25 En otra realización, el ciclopropeno tiene la fórmula:



en la que R es un grupo alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o naftilo sustituido o no sustituido; en la que los sustituyentes son independientemente halógeno, alcoxi, o fenoxi sustituido o no sustituido. En una realización, R es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>. En otra realización, R es metilo.

30 En otra realización, el ciclopropeno tiene la fórmula:



en la que R<sup>1</sup> es un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> sustituido o no sustituido, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, cicloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, cicloalquilalquilo, fenilo o naftilo; y R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, y R<sup>4</sup> son hidrógeno. En otra realización, el ciclopropeno comprende 1-metilciclopropeno (1-MCP).

35 Como se usa en este documento, la frase "vector transgénico" se refiere a un vector que contiene un segmento insertado de ácido desoxirribonucleico (ADN), el "transgén" que se transcribe en ácido ribonucleico mensajero (ARNm) o replicado como ácido ribonucleico (ARN) dentro de una célula huésped. La frase "transgén" se refiere no sólo a la porción de ADN insertado que se convierte en ARN, sino también a aquellas porciones del vector que son necesarias para la transcripción o replicación del ARN. Un transgén comprende por lo general un gen de interés, pero no necesariamente comprende una secuencia polinucleotídica que contiene un marco de lectura abierto capaz de producir una proteína.

40

Las carnes, plantas o partes de plantas se pueden tratar en la práctica de la presente invención. Un ejemplo es el tratamiento de plantas enteras; otro ejemplo es el tratamiento de plantas enteras mientras se plantan en el suelo, antes de la recolección de partes útiles de la planta.

Cualquier planta que proporcione partes de las plantas útiles puede ser tratada en la práctica de la presente invención. Los ejemplos incluyen plantas que proporcionan frutas, vegetales y granos.

5 Como se usa en este documento, la frase "planta" incluye plantas dicotiledóneas y plantas monocotiledóneas. Ejemplos de plantas dicotiledóneas incluyen tabaco, *Arabidopsis*, soja, tomate, papaya, canola, girasol, algodón, alfalfa, patata, vid, frijol guandú, guisante, *Brassica*, garbanzo, remolacha azucarera, colza, sandía, melón, pimiento, cacahuete, calabaza, rábano, espinaca, calabaza, brócoli, repollo, zanahoria, coliflor, apio, col china, pepino, berenjena y lechuga. Ejemplos de plantas monocotiledóneas incluyen maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, centeno, sorgo, orquídeas, bambú, plátano, cattails, lirios, avena, cebolla, mijo y triticale. Ejemplos de frutas incluyen banano, piña, naranjas, uvas, pomelo, sandía, melón, manzanas, melocotones, peras, kiwis, mango, nectarinas, guayaba, caqui, aguacate, limón, higo y bayas.

Los siguientes ejemplos se dan con el propósito de ilustrar la invención y no se deben interpretar como una limitación del alcance de la invención o de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

15 Para el ensayo de inhibición in vitro de compuestos antimicrobianos volátiles se utilizan placas de microtitulación de 12 pozos (7 mililitros (mL de volumen por pozo)). Se adiciona un volumen de 3 mL de agar de dextrosa de patata (PDA) a máxima potencia a cada pozo. Después de enfriar, se localiza con pipeta 1 microlitro ( $\mu\text{L}$ ) de  $1 \times 10^6$  por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea* en el centro del agar. Para el primer experimento, se deja que las placas inoculadas germinen durante 5 días a 4°C. Para el segundo experimento, las placas se inoculan inmediatamente antes del tratamiento con fungicida volátil. Los pequeños discos de filtro Whatman # 1 (No. de Cat. 1001-0155) se colocan, por  
20 duplicado, en la cara inferior de una película de sellado de placa de PCR de polietileno.

Tabla 1. Resultados del ensayo in vitro para el fungicida volátil

Velocidad del compuesto A (mg por disco)	Inhibición de <i>Botrytis</i> % (in vitro)
1.25	100%
0.63	100%
0.31	100%
0.16	100%
0.08	100%
0.04	100%
0.023	100%
0.01	100%
0.005	100%
0.0024	85%
0.001	69%
0.0006	46%
Control	0%

25 Para la determinación de la concentración inhibidora mínima (MIC), el compuesto A (benzoxaborol, figura 1) se diluye en acetona y la cantidad apropiada de compuesto se adiciona a los discos de una manera dependiente de la dosis (1.25 a 0.0006 miligramos por disco (mg/disco)). Se deja evaporar la acetona, durante 5 minutos. El espacio de cabeza alrededor del inóculo de *Botrytis cinerea* se sella entonces dentro del pozo por la película con el disco adherente que contiene el fungicida. Las placas se invierten, colocadas sobre los discos tratados y selladas para evitar que cualquier

5 producto químico se desprenda del disco y caiga sobre el agar inoculado. Después de 14 días de almacenamiento a 4°C, los cultivos se evalúan para el crecimiento porcentual con respecto al control. Independientemente de si las esporas habían germinado durante 5 días, o si el tratamiento comenzó poco después de la inoculación de las placas (~15 minutos); hay un 100% de control del agente patógeno fúngico hasta 0.005 mg. Los resultados experimentales se resumen en la tabla 1. Los resultados sugieren que el compuesto A es capaz de matar las esporas de *Botrytis cinérea* e inhibir el crecimiento micelial en la misma concentración. De este modo, el compuesto A (Figura 1) muestra una eficacia del 100% en la inhibición in vitro del crecimiento de hongos a una velocidad de 0.005 mg/disco.

Ejemplo 2

10 Se ensayan un total de 14 compuestos antimicrobianos usando el ensayo de inhibición in vitro descrito en el ejemplo 1. Todos los 14 compuestos se aplican a los discos de Whatman, por duplicado, de una manera dependiente de la dosis (0.31 a 0.0006 mg/disco). Los resultados muestran que el compuesto A proporciona el mejor control de *Botrytis cinerea*, con un control del 100% hasta 0.005 mg/disco. Otros compuestos, tales como el compuesto C, el compuesto D y el compuesto E conferían un control del 100% hasta 0.023, 0.04 y 0.08 mg/disco, respectivamente. Los compuestos probados se muestran en la figura 3. Los resultados de nueve compuestos se resumen en la tabla 2, donde los otros cinco compuestos no muestran actividad detectada en los intervalos probados.

15

Tabla 2. Resultados del ensayo in vitro para el fungicida volátil en % de inhibición de <i>Botrytis</i>									
Velocidad (mg/disco)	Comp. A	Comp. C	Comp. D	Comp. E	Comp. F	Comp. G	Comp. H	Comp. J	Comp. K
0.31	100%	100%	100%	100%	70%	100%	85%	50%	48%
0.16	100%	100%	100%	100%	53%	78%	80%	13%	29%
0.08	100%	100%	100%	100%	40%	43%	55%	8%	5%
0.04	100%	100%	100%	79%	18%	13%	38%	5%	0%
0.023	100%	100%	80%	79%	10%	3%	18%	0%	0%
0.01	100%	83%	70%	69%	8%	0%	3%	0%	0%
0.005	100%	63%	38%	38%	8%	0%	0%	0%	0%
0.0024	85%	43%	15%	28%	0%	0%	0%	0%	0%
0.001	69%	15%	0%	13%	0%	0%	0%	0%	0%
0.0006	46%	0%	0%	13%	0%	0%	0%	0%	0%
Control	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Ejemplo 3

20 El compuesto B (Figura 2; monoéster cíclico de ácido 2-(hidroximetil)fenilborónico, un análogo desfluoro del compuesto A), se evalúa de una manera similar a la descrita en los ejemplos 1 y 2 anteriores. El compuesto se aplica al papel de filtro Whatman a velocidades de 0.5 mg a 0.0039 mg/disco. Los resultados muestran que el compuesto B inhibe el 100% de *Botrytis cinerea* a una velocidad de 0.0078 mg/disco.

Ejemplo 4

25 Con el fin de evaluar la actividad in vivo de los compuestos antimicrobianos volátiles, se desarrolla un bioensayo volátil usando uva de mesa verde. Los frutos se colocan individualmente en un vial de centelleo de 20 mL, con la herida del vástago hacia arriba. La herida fresca del vástago se inocula con 10 µL de 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*. El papel de filtro Whatman (No. de Cat. 1822-024) se coloca dentro de las tapas de los viales por duplicado. Para la determinación de la MIC, el compuesto A (Figura 1) se diluye en acetona, y la cantidad apropiada de compuesto se adiciona a los discos de una manera dependiente de la dosis (2.5 a 0.0024 mg/disco). Se deja evaporar la acetona, durante 5 minutos. A continuación, se tapan los viales con las tapas que contienen el fungicida y se colocan durante 14 días a 4°C. Después del almacenamiento, se evalúan los frutos para determinar la incidencia de la

enfermedad y el aspecto de la fitotoxicidad. Los resultados se resumen en la tabla 3 y hay un 100% de control de *Botrytis cinerea* hasta 0.04 mg/disco y no hay evidencia de fitotoxicidad en ninguna de las velocidades evaluadas. Se muestran fotos representativas de resultados de inhibición in vivo de ejemplo usando el compuesto A en la figura 4, donde 0.04 mg del compuesto A muestra una inhibición del 100% y 0.0024 mg del compuesto A no muestra inhibición.

Velocidad del compuesto A (mg por disco)	Inhibición de <i>Botrytis</i> % (in vivo)
1.25	100%
0.63	100%
0.31	100%
0.16	100%
0.08	100%
0.04	100%
0.023	0%
0.01	0%
0.005	0%
0.0024	0%
Control	0%

5

## Ejemplo 5

Con el fin de evaluar la actividad in vivo de compuestos antimicrobianos volátiles, se desarrolla un bioensayo volátil usando fresa. Dos frutas se colocan dentro de un frasco de 240 mL, con el cáliz hacia abajo. Se inocula una lesión nueva con 20  $\mu$ L de  $1 \times 10^6$  por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*. El papel de filtro Whatman (No. de Cat. 1822-024) se coloca dentro de las tapas de los frascos por duplicado. Para la determinación de la MIC, el compuesto A (benzoxaborol, figura 1) se diluye en acetona, y la cantidad apropiada de compuesto se adiciona a los discos de una manera dependiente de la dosis (2.5 a 0.005 mg/disco). Para la determinación de la MIC, el compuesto B (benzoxaborol, figura 2) se diluye en acetona, y la cantidad apropiada de compuesto se adiciona a los discos de una manera dependiente de la dosis (2.5 a 0.005 mg/disco). Se deja evaporar la acetona, durante 5 minutos. Los frascos se tapan entonces con las tapas que contienen el fungicida, y se colocan durante 5 días a 21°C. Después del almacenamiento, se evalúan los frutos para determinar la incidencia y severidad de la enfermedad y el aspecto de la fitotoxicidad. Los resultados se resumen en la tabla 4. Hay 100% de control de *Botrytis cinerea* hasta 0.16 mg/disco para el compuesto A y 100% de control de *Botrytis cinerea* hasta 0.32 mg/disco para el compuesto B, y no hay evidencia de fitotoxicidad en ninguna de las velocidades evaluadas.

Velocidad (mg/disco)	Compuesto A	Compuesto B
0.005	75%	100%
0.01	100%	100%
0.02	50%	100%
0.04	75%	75%
0.08	0%	50%

0.16	0%	25%
0.32	0%	0%
0.64	0%	0%
1.25	0%	0%
2.5	0%	0%

## Ejemplo 6

Con el fin de evaluar la dosis in vivo de la actividad temporal de compuestos antimicrobianos volátiles, se desarrolla un bioensayo volátil usando fresa. Dos frutas se colocan dentro de un frasco de 240 mL, con el cáliz hacia abajo. Se inocula una lesión nueva con 20  $\mu$ L de  $1 \times 10^6$  por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*. El papel de filtro Whatman (No. de Cat. 1822-024) se coloca dentro de las tapas de los frascos por duplicado. El compuesto A (benzoxaborol, figura 1) se diluye en acetona, y la cantidad apropiada de compuesto se adiciona a los discos a dos velocidades 0.008 o 0.125 mg. Se deja evaporar la acetona, durante 5 minutos. Los frascos se tapan con las tapas que contienen el fungicida, y se incuban con el fungicida volátil durante 1, 3, 6, 24 o 72 horas. Después de la incubación, las tapas que contienen el disco con el compuesto A se reemplazan con nuevas tapas sin compuesto A. Todas las muestras se mantienen a 21°C, durante 3 días, y después se retiran las tapas y se mantienen durante 48 horas adicionales, todas al 90% de humedad relativa (H.R.). Los frutos se evalúan para determinar la incidencia y severidad de la enfermedad y el aspecto de la fitotoxicidad. Los resultados se resumen en la tabla 5. Hay 100% de control de *Botrytis cinerea* a 0.125 mg/disco para el compuesto A, después de 6 horas de exposición, y no hay evidencia de fitotoxicidad. 0.125 mg de compuesto A muestra una inhibición in vivo del 100% en comparación con el control de acetona solamente. Un resultado de representación también se muestra en la figura 5.

Compuesto A	Incidencia (%)		Severidad (0 a 3)	
	0.008	0.125	0.008	0.125
Velocidad (mg/disco)				
Tiempo (h)				
1	100%	67%	4.0	2.3
3	0%	33%	0.0	1.3
6	33%	0%	1.0	0.0
24	67%	0%	2.3	0.0
72	33%	0%	1.0	0.0

Severidad:

0 = no hay crecimiento de hongos

1 = infección leve (<5 milímetros (mm) de diámetro)

2 = infección moderada (<1 centímetro (cm) de diámetro)

3 = alta infección (> 1 cm de diámetro)

4 = infección extrema (> media longitud de la fruta)

## Ejemplo 7

Se usan placas de microtitulación de 12 pozos (7 mL de volumen por pozo) para el ensayo de inhibición in vitro de compuestos antimicrobianos volátiles. Se adiciona a cada pozo un volumen de 3 mL de agar de LB a máxima potencia. Después de enfriar, 15 µL de *Escherichia coli*, se ajustaron a una densidad óptica de 0.02 a 0.035, y diluidos adicionalmente 1/10 se pipetea en el centro del agar y se inclinan para distribuir de manera uniforme. Los discos pequeños de filtro Whatman # 1 (No. de Cat. 1001 a 0155) se colocan, por duplicado, en la parte inferior de una película de sellado de la placa de reacción en cadena de polietileno de la polimerasa (PCR). Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), el compuesto A (benzoxaborol; figura 1) se diluye en acetona y se adicionan 5 mg de compuesto a los discos. Se deja evaporar la acetona, durante 5 minutos. El espacio de cabeza alrededor del inóculo de *Escherichia coli* se sella entonces dentro del pozo por la película con el disco adherente que contiene el fungicida. Las placas se invierten, colocadas sobre los discos tratados y selladas para evitar que cualquier producto químico se desprenda del disco y caiga sobre el agar inoculado. Después de 3 días de almacenamiento a 4°C, los cultivos se transfirieron a 23°C, durante 2 días adicionales, y a continuación se evaluaron el crecimiento de colonias en relación con el control. Los resultados experimentales se resumen en la tabla 6. Los resultados sugieren que el compuesto A es capaz de inhibir *Escherichia coli*.

Velocidad del compuesto A (mg por disco)	Clasificación de colonia
5.00	1
Sin tratar	3
No inoculado	0

Clasificación de colonia:

0 = No hay colonias

1 = Micro colonias no conectadas

2 = Pequeñas colonias con alguna fusión

3 = Grandes colonias que se fusionan

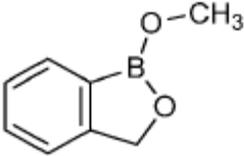
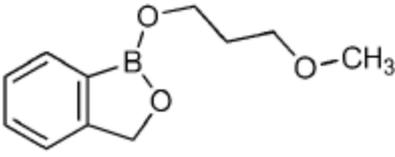
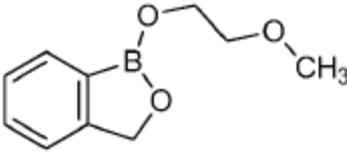
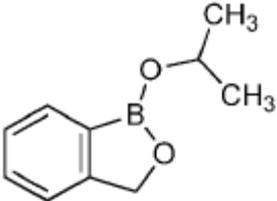
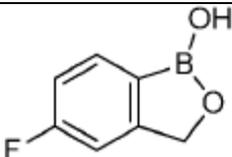
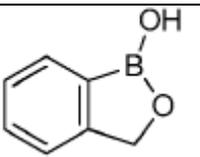
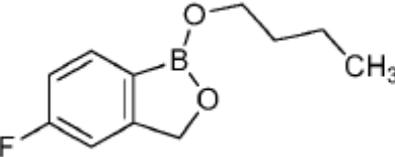
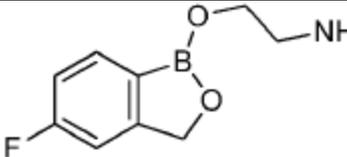
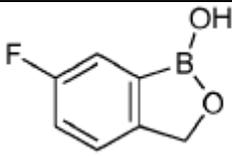
15

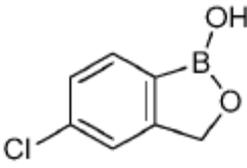
#### Ejemplo 8

Se usan placas de microtitulación de 12 pozos (6.5 mL de volumen por pozo) para el ensayo de inhibición in vitro de compuestos antimicrobianos volátiles. Se adiciona a cada pozo un volumen de 3 mL de agar de dextrosa de patata (PDA) a máxima potencia. Después del enfriamiento, se localiza con pipeta en el centro del agar 1 µL de  $1 \times 10^5$  por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*, *Monilinia fructicola* o *Glomerella cingulate*. Las placas se inoculan inmediatamente antes del tratamiento con fungicida volátil. Un disco de filtro Whatman # 1 (No. de Cat. 1001-0155) se coloca, por duplicado, en la cara inferior de una película de sellado de placa de PCR de polietileno. Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC), los compuestos se diluyen en acetona y la cantidad apropiada de compuesto se adiciona a los discos de una manera dependiente de la dosis para alcanzar una concentración final en el espacio de cabeza de 1142.9 a 0.6 mg/L. Se deja evaporar la acetona, durante 5 minutos. El espacio de cabeza alrededor del inóculo se sella entonces dentro del pozo por la película con el disco adherente que contiene el fungicida invirtiendo las placas sobre los discos tratados y sellando para evitar que cualquier producto químico se desprenda del disco y caiga sobre el agar inoculado. Después de 3 días de almacenamiento a 23°C, se evalúan los cultivos para determinar el crecimiento porcentual con respecto al control basado en la medición del diámetro de la colonia de hongos. Los resultados experimentales se resumen en la tabla 7. Los resultados indican que los compuestos de benzoxaborol tienen una excelente actividad in vitro contra cinco agentes patógenos fúngicos de plantas seleccionados.

Tabla 7. MIC (mg/L, concentración de espacio de cabeza) de numerosos compuestos de benzoxaborol aplicados como tratamiento volátil contra numerosos agentes patógenos fúngicos de plantas (el compuesto 10 es el mismo que el compuesto A, y el compuesto 11 es el mismo que el compuesto B).

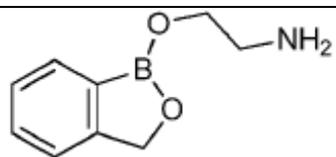
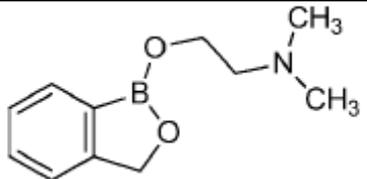
Estructura	Comp. #	MIC (mg/L)				
		BOTRCI	PENIEX	ALTEAL	MONIFC	GLOMCI

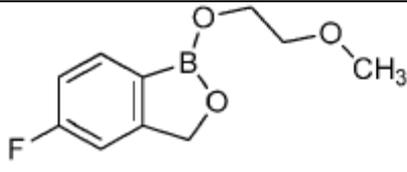
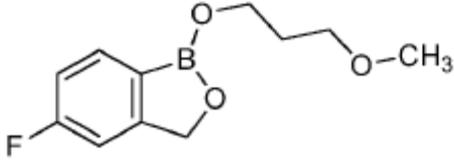
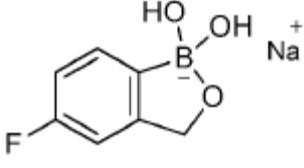
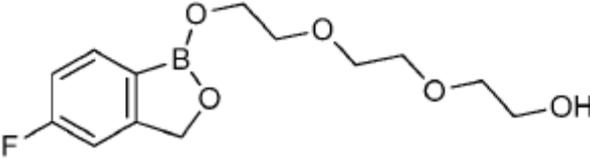
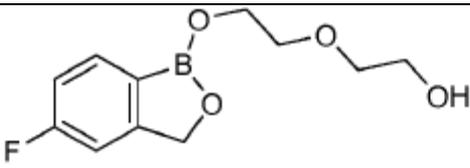
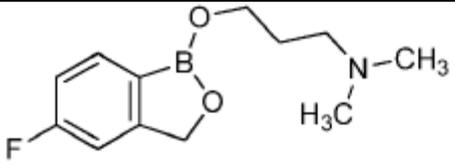
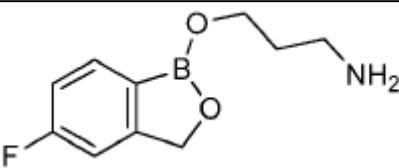
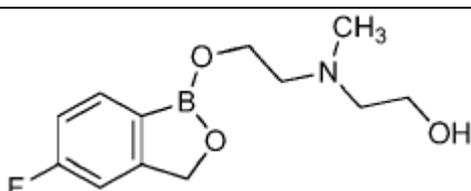
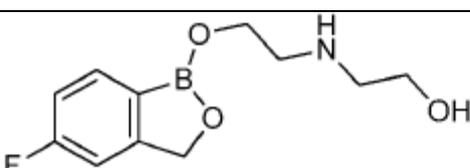
	6	2.2	17.9	4.5	8.9	17.9
	7	2.2	17.9	8.9	8.9	71.4
	8	2.2	35.7	8.9	4.5	71.4
	9	2.2	8.9	8.9	8.9	35.7
	10	2.2	2.2	<0.6	<0.6	<0.6
	11	4.5	17.9	4.5	2.2	35.7
	30	2.2	8.9	2.2	2.2	n/a
	34	<0.6	2.2	2.2	n/a	n/a
	200	10.6	68.3	7.3	6.3	n/a

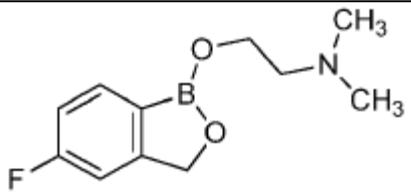
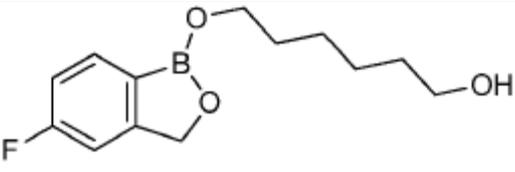
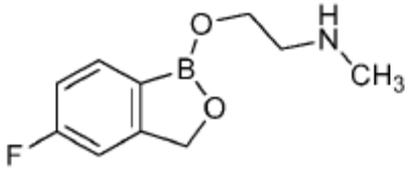
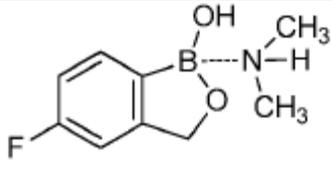
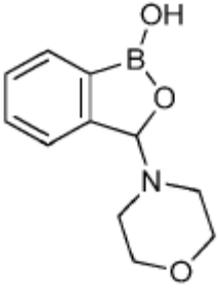
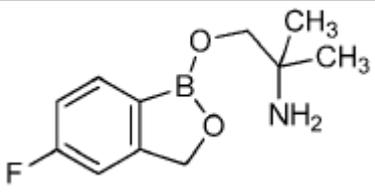
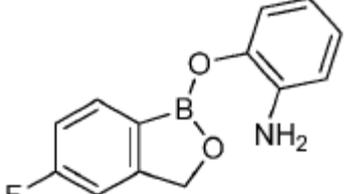
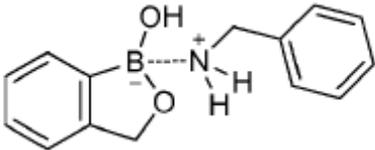
	201	3.8	29.5	16.1	8.5	9.3
<p>BOTRCI = <i>Botrytis cinerea</i> (moho gris)</p> <p>PENIEX = <i>Penicillium expansum</i> (moho azul de manzana)</p> <p>ALTEAL = <i>Alternaria alternata</i> (mancha marrón del tabaco)</p> <p>MONIFC = <i>Monilinia fructicola</i> (pudrición parda de la manzana)</p> <p>GLOMCI = <i>Glomerella cingulata</i> (antracnosis de pimienta)</p>						

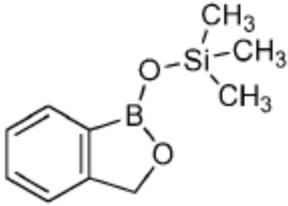
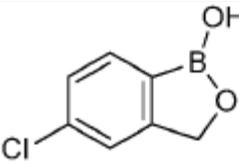
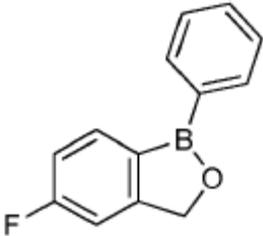
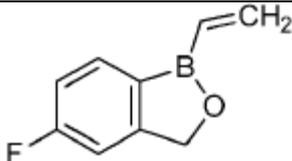
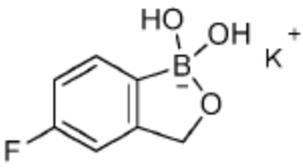
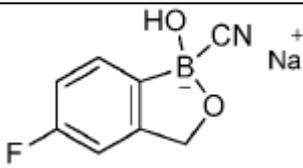
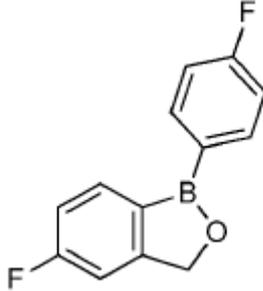
Ejemplo 9

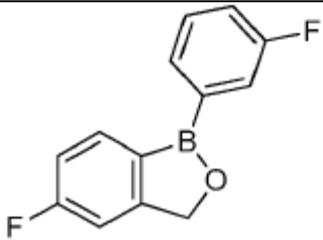
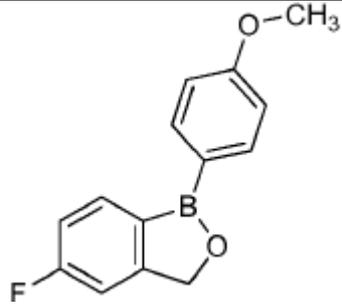
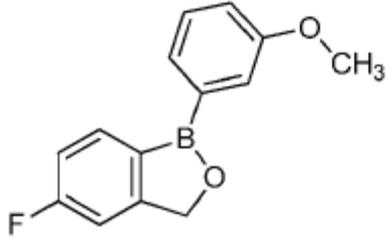
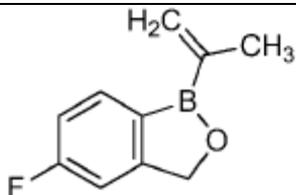
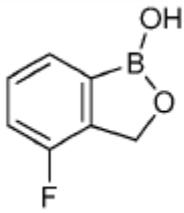
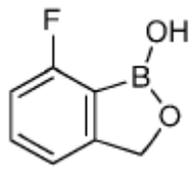
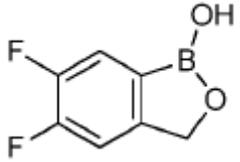
Se usan placas de microtitulación de 12 pozos (6.5 mL de volumen por pozo) para el ensayo de inhibición in vitro de compuestos antimicrobianos volátiles. Se adiciona a cada pozo un volumen de 3 mL de agar de dextrosa de patata (PDA) a máxima potencia. Después de enfriar, se localiza con pipeta 1 mL de  $1 \times 10^5$  por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en el centro del agar. Las placas se inoculan inmediatamente antes del tratamiento con fungicida volátil. Se coloca un disco de filtro Whatman # 1 (No. de Cat. 1001-0155), por duplicado, en la cara inferior de una película de sellado de placa de PCR de polietileno. Para la determinación de la concentración inhibidora mínima (MIC), los compuestos se diluyen en acetona, y la cantidad apropiada de compuesto se adiciona a los discos de una manera dependiente de la dosis para conseguir una concentración final de espacio de cabeza de 35.7 a 0.03 mg/L. Se deja evaporar la acetona, durante 5 minutos. El espacio de cabeza alrededor del inóculo se sella entonces dentro del pozo por la película con el disco adherente que contiene el fungicida invirtiendo las placas sobre los discos tratados y sellando para evitar que cualquier producto químico se desprenda del disco y caiga sobre el agar inoculado. Después de 3 días de almacenamiento a 23°C, se evalúan los cultivos para determinar el crecimiento porcentual con respecto al control basado en la medición del diámetro de la colonia de hongos. Los resultados experimentales se resumen en la tabla 8. Los resultados indican que numerosos compuestos de benzoxaborol tienen una excelente actividad in vitro contra dos agentes patógenos fúngicos de plantas seleccionados.

Tabla 8. MIC (mg/L) de numerosos compuestos de benzoxaborol aplicados como tratamiento volátil contra agentes patógenos fúngicos de plantas de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium expansum</i> .			
Estructura	Comp. #	MIC (mg/L)	
		BOTRCI	PENIEX
	21	1.1	35.7
	22	4.5	35.7

	38	0.6	8.9
	39	0.6	8.9
	54	0.6	4.5
	55	4.5	>35.7
	62	2.2	8.9
	63	1.1	17.9
	64	1.1	8.9
	72	35.7	>35.7
	73	35.7	>35.7

	74	2.2	35.7
	86	0.6	8.9
	87	0.6	8.9
	105	0.6	4.5
	114	17.9	>35.7
	115	0.6	8.9
	116	1.1	8.9
	121	4.5	17.9

	122	2.2	17.9
	124	4.5	8.9
	127	2.2	4.5
	129	4.5	8.9
	130	1.1	4.5
	132	1.1	4.5
	133	8.9	35.7

	134	17.9	>35.7
	135	17.9	>35.7
	136	8.9	>35.7
	137	0.3	1.1
	202	35.7	142.9
	203	8.9	142.9
	204	8.9	>35.7

BOTRCI = *Botrytis cinerea* (moho gris)

PENIEX = *Penicillium expansum* (moho azul de manzana)

#### Ejemplo 10

Se usan placas de microtitulación de 12 pozos (6.5 mL de volumen por pozo) para el ensayo de inhibición in vitro de compuestos antimicrobianos volátiles A y B (Figura 1) contra numerosos agentes patógenos fúngicos de plantas. Se adiciona a cada pozo un volumen de 3 mL de agar de dextrosa de patata (PDA) a máxima potencia. Después de enfriar, 1  $\mu$ L de  $1 \times 10^5$  suspensión de esporas por mL de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*, *Glomerella cingulata*, *Penicillium digitatum*, *Monilinia fruticola*, *Aspergillus brasiliensis*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium sambucinum*, *Phytophthora capsici*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Diplodia gossypina* o *Diaporthe citrii* se localiza con pipeta en el centro del agar. Un disco de filtro Whatman #1 (No. de Cat. 1001-0155) se coloca, por duplicado, en la cara inferior de una película de sellado de placa de PCR de polietileno. Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC), los compuestos de ensayo se diluyen en acetona, y la cantidad apropiada de compuesto se adiciona a los discos de una manera dependiente de la dosis para alcanzar una concentración final de espacio de cabeza de 35.7 a 0.03 mg/L. Se deja evaporar la acetona, durante cinco minutos. El espacio de cabeza alrededor del inóculo se sella entonces dentro del pozo por la película con el disco adherente que contiene el fungicida invirtiendo las placas sobre los discos tratados y sellando para evitar que cualquier producto químico se desprenda del disco y caiga sobre el agar inoculado. Después de 3 días de almacenamiento a 23°C, los cultivos se evalúan para el crecimiento porcentual con respecto al control. Los resultados mostrados en la tabla 9 demuestran la capacidad de los compuestos de benzoxaborol A y B para controlar el crecimiento de numerosos agentes patógenos fúngicos de las plantas a través de la actividad volátil.

Tabla 9 MIC (mg/L) de los compuestos A y B aplicados como volátiles contra numerosos agentes patógenos fúngicos de las plantas

Patógenos	Compuesto A	Compuesto B
	MIC	MIC
<i>B. cinerea</i>	2.2	4.5
<i>P. expansum</i>	1.1	8.9
<i>M. fruticola</i>	2.2	1.1
<i>A. alternata</i>	2.2	2.2
<i>G. cingulata</i>	17.9	35.7
<i>P. digitatum</i>	2.2	4.5
<i>A. brasiliensis</i>	2.2	0.6
<i>C. acutatum</i>	4.4	8.9
<i>F. sambucinum</i>	1.1	4.5
<i>P. capsici</i>	1.1	n/a
<i>G. candidum</i>	8.9	8.9
<i>A. niger</i>	2.2	1.1
<i>M. piriformis</i>	1.1	2.2
<i>D. gossypina</i>	1.1	4.5
<i>D. citrii</i>	2.2	17.9

## Ejemplo 11

Se usan placas de microtitulación de 12 pozos (6.5 mL de volumen por pozo) para el ensayo de inhibición in vitro del compuesto A volátil antimicrobiano (figura 1) contra numerosos agentes patógenos bacterianos. Se adiciona a cada pozo un volumen de 3 mL de agar nutriente y se deja secar antes de introducir el agente patógeno. Las suspensiones de células de *Escherichia coli*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas axonopodis* y *Salmonella enterica* se ajustan a una densidad óptica de 0.2 a 0.35 y se diluyen adicionalmente 1/10, y se pipetea 15 µL en el centro de cada pozo y se inclinan para distribuir uniformemente. Un papel de filtro Whatman # 1 (CAT 1001-0155) se coloca en la parte inferior de una película de sellado de placa de PCR de polietileno. Para la determinación de la concentración bactericida mínima (MBC), el compuesto A se diluye en acetona, y se aplican 50 µL a los discos, por duplicado, de una manera dependiente de la dosis para alcanzar una concentración final en el espacio de cabeza de 71.4 a 0.03 mg/L. Se deja evaporar la acetona, durante 5 minutos. A continuación, las películas con los discos tratados se aplican sobre las placas inoculadas y se sellan. Las placas se invierten, y se incuban a 23°C, durante 48 horas. Después del período de incubación, las colonias de bacterias se desalojan en agua estéril que contiene tween 80 (0.001%) y se determina la densidad óptica (OD, 600 nm). Los resultados se resumen en la tabla 10, donde se indica la concentración de espacio de cabeza necesaria para controlar al menos el 80% del crecimiento bacteriano. El compuesto A muestra una buena actividad antimicrobiana frente a numerosas bacterias en este ensayo in vitro.

<i>E. coli</i>	<i>P. carotovorum</i>	<i>X. axonopodis</i>	<i>S. enterica</i>
35.7	2.2	4.5	17.9

## Ejemplo 12

Con el fin de evaluar la actividad in vivo del compuesto A volátil antimicrobiano, se desarrolla un bioensayo volátil para evaluar el control de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* en carne de vacuno fresca. La carne de vacuno se lava para eliminar cualquier inóculo natural enjuagando en agua tibia durante 2 minutos. Dos tiras, de una sola capa, se colocan en un contenedor hermético SnapWare estéril de 10.8 tazas (Modelo # 109842).

Patógenos	Tratamientos	Log CFU/mL	Log reducción
<i>E. coli</i>	Control	8.27	3.17
	Compuesto A	5.09	
<i>S. enterica</i>	Control	7.38	2.43
	Compuesto A	4.95	

Cada tira se inocula en la superficie colocando 20 µL de ya sea suspensiones de células de *E. coli* o *S. enterica* que se ajustan a una densidad óptica de 0.35 (600 nm) y se diluyen adicionalmente 1/10. Para la determinación de la eficacia, el polvo del compuesto A se introduce en el contenedor con un dispositivo de sublimación (tubo de cobre calentado a 200°C con flujo de ventilador a 0.5 litros por minuto (L/min)) a una velocidad requerida para conseguir una concentración final de espacio de cabeza de 100 mg/L. Los contenedores y sus contenidos se incuban después durante 2 días a 21°C. Después del tratamiento, se lava la carne de vacuno, se recoge el lavado, se diluye en serie, se siembra en placas sobre agar nutriente y después se incuba durante 24 horas adicionales a 37°C. Las colonias bacterianas se cuentan y se expresan como unidades formadoras de colonias (CFU/mL), con la reducción logarítmica calculada en relación con el control. Los resultados enumerados en la tabla 11 muestran una buena actividad antimicrobiana del compuesto A frente a *E. coli* y *S. enterica* en este ensayo in vivo usando carne vacuna. El compuesto A demuestra una reducción logarítmica de 3.17 log (> 99.9%) de *E. coli* y una reducción de 2 log para *S. enterica*.

## Ejemplo 13

Con el fin de evaluar la actividad in vivo del compuesto A volátil antimicrobiano en el control de *Botrytis cinerea* en flores ornamentales, se desarrolla un bioensayo volátil usando claveles blancos.

Compuesto A	Incidencia de enfermedad (%) en pétalos				
	Velocidad (mg/L)	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
1	0	0	0	4	16
0.2	0	8	20	16	36
0.04	0	0	16	40	92
Control	0	68	92	96	100

Se colocan cinco claveles en un frasco de 800 mL que contiene 200 mL de un conservante de flores comercial común. Cinco frascos se colocan entonces en una caja de almacenamiento Rubbermaid de 117 L (Cat # 2244). Los pétalos se inoculan uniformemente con pulverización con 5 mL de  $1 \times 10^5$  esporas/mL de suspensión de *Botrytis cinerea*. El envase está bien cerrado. Para la aplicación del tratamiento, el compuesto A se disuelve en una solución acuosa de 1,2-propilenglicol (3:1) y 5 mL de la solución se volatiliza en el contenedor usando un sistema ES-100-H SmartFog (Reno, NV) a través de un puerto lateral 1/2" que se sella inmediatamente después de la aplicación. Las flores se incuban durante 3 días a 21°C. Después del almacenamiento, las flores se evalúan para la incidencia basada en la presencia de la enfermedad en pétalos de flores en relación con las flores control no tratadas de hasta 8 días a 21°C, y los resultados se resumen en la tabla 12. El compuesto A a 1 mg/L muestra una incidencia del 0% 2 días después de la eliminación del tratamiento y sólo una incidencia del 16% después de 8 días, y demuestra generalmente una buena actividad antimicrobiana volátil contra *Botrytis cinerea* en este análisis in vivo de la infección en una flor ornamental.

#### Ejemplo 14

Una prueba similar a la descrita anteriormente se realiza también sobre claveles blancos (tratados con o sin el tiosulfato de plata comercial compuesto anti-etileno, STS) con inóculo natural. El compuesto A se disuelve ya sea en una solución acuosa de 1,2-propilenglicol (3:1) y 5 mL de la solución se volatilizan usando un sistema ES-100-H SmartFog (Reno, NV) a través de un puerto lateral 1/2" se sella inmediatamente después de la aplicación, o se disolvió en acetona y se aplicó a un disco de filtro Whatman #1 de 42.5 milímetros (mm) (No. de Cat. 1001-042), y se colocó en un vidrio de reloj después de dejar que la acetona se evaporara durante 5 minutos. Las flores se incuban durante 3 días a 21°C. Después del almacenamiento, las flores se evalúan por un adicional de 8 días para la severidad de la enfermedad basada en el número de lesiones presentes en pétalos y sépalos de flores. Los resultados enumerados en la tabla 13 muestran una buena actividad antimicrobiana contra *Botrytis cinerea* en este análisis in vivo.

Parte de la planta	Compuesto A	Severidad (número promedio de lesiones)			
		Sin STS		STS	
		Niebla	Volátil	Niebla	Volátil
Pétalos	1	0	1.5	0	0.1
	0.2	0	1.8	0	0.1
	0.04	0.4	3.1	0.3	0.5
	0	2.1	18.8	7.7	43.2
Sépalos	1	0.04	1	0.04	0.2
	0.2	0.04	1.6	0.1	0.3
	0.04	0.3	2.1	0.6	1.1
	0	4.5	4.8	6.8	3.6

## Ejemplo 15

Una prueba similar a la descrita anteriormente también se realiza sobre rosas blancas con inóculo natural. Se colocan cinco rosas blancas en un frasco de 800 mL que contiene 200 mL de un conservante comercial común de flores.

Tabla 14. Incidencia y severidad de <i>Botrytis cinerea</i> basada en la infección en pétalos y sépalos de rosas blancas después de un tratamiento volátil de tres días del compuesto A a 21°C y dos días adicionales a 21°C.				
Compuesto A	Aplicado mediante sublimación		Volatilizado de filtro Whatman	
Velocidad (mg/L)	Incidencia (%)	Severidad (0-4) *	Incidencia (%)	Severidad (0-4) *
1	0	0	53.3	1.6
0.2	13.3	0.5	66.7	1.8
0.04	46.7	1.7	46.7	1.1
Control- Acetona	80	2.9	86.7	2.4
Control	100	3.1	100	3.1

\* Grado de severidad

0 = Sin enfermedad

1 = Ennegrecimiento y pequeñas lesiones en los sépalos o pétalos

2 = Ennegrecimiento, pétalos cubiertos con esporas de hongos

3 = Ennegrecimiento, pétalos cubiertos con esporas de hongos, algunas gotas de pétalos

4 = Ennegrecimiento, pétalos cubiertos con esporas de hongos, algunas flores abortadas

5

Después se colocan tres frascos en una caja de almacenamiento Rubbermaid de 117 L (No. de Cat. 2244). Se colocan dos pequeños ventiladores en los extremos opuestos del contenedor para ayudar con la distribución volátil del compuesto A. El envase se cierra herméticamente y luego se diluye el compuesto A en acetona y luego se pipetea sobre una tira de algodón de 1.5 pulgadas x 1 pulgada. La acetona se deja evaporar durante cinco minutos. El compuesto A se introduce entonces en los contenedores mediante un dispositivo de sublimación (tubo de cobre calentado a 200°C con flujo de ventilador a 0.5 L/min) para conseguir una concentración final de espacio de cabeza de 0.04, 0.2, 1 mg/L, a través de un puerto lateral ½" que se sella inmediatamente después de la aplicación. Alternativamente, se pipetea el compuesto A en un disco de filtro Whatman # 1 de 42.5 mm (Núm. Cat. 1001-042), soportado por un cristal de reloj, donde la acetona se deja evaporar durante cinco minutos antes de sellar el contenedor. Las flores se incuban durante tres días a 21°C. Después del tratamiento, las flores se evalúan durante dos días adicionales para la incidencia y la severidad de la enfermedad de los pétalos de las flores. La aplicación de un tratamiento a 1 mg/L a través de los resultados de sublimación en la incidencia del 0%. Los pétalos de rosa después del tratamiento con el compuesto A no tienen incidencia de enfermedad, retención de color blanco, y las rosas no tuvieron gota de pétalo. Los resultados enumerados en la tabla 14 muestran una buena actividad antimicrobiana contra la infección de *Botrytis cinerea* de rosas blancas, y que la mejora de la velocidad de volatilización por sublimación resultó en un mayor control de la enfermedad.

10

15

20

## Ejemplo 16

Para probar el efecto del compuesto A (Figura 1) en vegetales, se obtuvieron patatas, cebollas y calabazas a partir de un almacén local, y la superficie se esterilizó con hipoclorito de sodio al 0.825% (NaOCl). Se colocó una rodaja de papa o dos hojas de cebolla en una placa de Petri estéril, al mismo tiempo la calabaza entera se colocó en un contenedor hermético SnapWare estéril de 10.8 tazas (Modelo # 109842). Cada rodaja de patata se inoculó con 20 µL de una suspensión de 1x10<sup>5</sup> esporas/mL de *Fusarium sambucinum*, mientras que las cebollas se inocularon con 20 µL de una suspensión de 1x10<sup>6</sup> esporas/mL de *Botrytis cinerea*. Para la inoculación de la calabaza, se retiró un núcleo pequeño y se insertó un tapón micelial de *Phytophthora capsici* y se tapó con el núcleo. El compuesto A se diluyó en acetona y se adicionó a un disco de filtro Whatman # 1 de 42.5 mm (No. de Cat. 1001-042) unido al lado interno de la tapa a una

25

30

5 velocidad para alcanzar una concentración final de espacio de cabeza de 10 mg/L. Se dejó evaporar la acetona, durante 5 minutos antes de sellar las placas con parafilm o cerrar los contenedores herméticos. Los vegetales se incubaron a 21°C, durante 3 días y se evaluaron el crecimiento micelial, la pudrición seca y el aspecto empapado en agua (mm de diámetro) con los resultados resumidos en la tabla 13. El compuesto A demostró un buen control fúngico de 3 agentes patógenos vegetales usando 3 diferentes vegetales en este ensayo in vivo.

Tabla 15 Efecto del compuesto A en el control del crecimiento de hongos en patata, cebolla y calabaza.					
	Patata		Cebolla	Calabaza	
	<i>Fusarium sambucinum</i>		<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	
Tratamientos	Crecimiento micelial	Pudrición seca	Empapado en agua	Empapado en agua	Crecimiento micelial
10 mg/L	0	0	0	5.3	1.1
Control-acetona	4.3	4.7	7	24	17.4
Control-no acetona	31.6	10.3	8.5	30.9	24.7

10 Ejemplo 17

15 Para probar el efecto del compuesto A en el control de agentes patógenos bacterianos de vegetales, papa, cebolla y zanahoria se cortan en cubos pequeños y se esterilizan superficialmente con NaOCl 0.825% y se dejan secar. Cuatro pequeños cubos (aproximadamente 1 centímetro cuadrado (cm<sup>2</sup>)) de cada vegetal se colocan en una placa de Petri estéril. Cada cubo se inocula con 25 µL de *Pectobacterium carotovorum* (concentración bacteriana de DO 1.0, 600 nm).  
 20 Para la determinación de la eficacia, el compuesto A se diluye en acetona, y el volumen apropiado para alcanzar una concentración final en el espacio de cabeza de 50 mg/L se adiciona a un disco de filtro Whatman # 1 de 42.5 mm (No. de Cat.1001-042) unido al lado interno de la tapa. Se deja evaporar la acetona, durante cinco minutos antes de cerrar la placa y sellarla con parafilm. Los vegetales se incuban a 10°C, durante cuatro días. Los resultados enumerados en la tabla 16 demuestran la actividad antimicrobiana contra *P. carotovorum* en la cebolla (reducción log de 2.14), zanahoria (reducción log de 0.29) y patata (reducción log de 0.84) en este análisis in vivo.

Tabla 16. Efectos del compuesto A (50 mg/L) en la reducción del crecimiento de <i>P. carotovorum</i> en patata, cebolla y zanahoria.			
Cultivos	Tratamientos	Log CFU/mL	Reducción Log
Patata	Control	7.47	
	Compuesto A	6.63	0.84
Cebolla	Control	8.13	
	Compuesto A	5.99	2.14
Zanahoria	Control	6.36	
	Compuesto A	6.06	0.29

Ejemplo 18

5 Con el fin de evaluar la actividad in vivo del compuesto A volátil antimicrobiano en la fruta, se desarrolla un bioensayo volátil usando fresa, uva y arándano. Ocho fresas, 16 uvas o 30 arándanos (por repetición) se colocan en una caja en forma de concha de PET de tamaño comercialmente relevante, con el extremo del tallo hacia arriba para los arándanos y las uvas, y hacia abajo para las fresas. Una lesión nueva se inocula con 20 µL (fresa y uva) o 10 µL (arándano) de 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*. Las cajas en forma de concha se colocan dentro de un contenedor hermético SnapWare de 10.8 tazas (Modelo # 109842). Se coloca un disco de filtro Whatman # 1 de 42.5 mm (No. de Cat. 1001-042) sobre un cristal de reloj. El compuesto A se disuelve en acetona y se adiciona a los discos de una manera dependiente de la dosis para producir una concentración de espacio de cabeza final de 0.4, 2 o 10 mg/L. Se deja evaporar la acetona durante cinco minutos. Los contenedores se cierran entonces con tapas y se colocan durante tres días a 21°C. Después del almacenamiento, se evalúan los frutos para determinar la incidencia y severidad (0 a 4) de la enfermedad durante otros tres días a 21°C, y los resultados se resumen en la tabla 17. Los resultados demuestran un buen control antimicrobiano volátil in vivo de *Botrytis cinerea* con aproximadamente 50% de incidencia y severidad dramáticamente más baja para la fresa, la uva y el arándano después de tres días de vida útil.

10 Tabla 17. Efecto de un tratamiento volátil de tres días del compuesto A (0.4, 2 o 10 mg/L) en el control de la incidencia y severidad de la infección por *B. cinerea* de fresa, uva y arándano durante un periodo de evaluación de tres días después del tratamiento en 21°C.

Compuesto A	Evaluación	Fresa		Uva		Arándano	
		Incidencia	Severidad	Incidencia	Severidad	Incidencia	Severidad
Velocidad (mg/L)	Días	(%)	(0-4)	(%)	(0-4)	(%)	(0-4)
10	0	7.1	0	0	0	12.9	0.1
2	0	14.3	0.1	0	0	9.7	0
0.4	0	0	0	3.1	0	21	0.1
Control	0	50	0.4	100	2.3	95.2	1.2
10	1	35.7	0.2	0	0	12.9	0.1
2	1	50	0.3	0	0	9.7	0
0.4	1	21.4	0.1	3.1	0	21	0.2
Control	1	100	1	100	2.5	100	1.7
10	2	42.9	0.5	3.1	0	12.9	0.2
2	2	50	0.3	0	0	9.7	0.1
0.4	2	21.4	0.1	15.6	0.2	40.3	0.5
Control	2	100	2.2	100	2.7	100	1.9
10	3	42.9	0.8	56.3	0.4	41.9	0.6
2	3	64.3	0.5	56.3	0.3	40.3	0.6
0.4	3	28.6	0.5	62.5	0.5	62.9	1
Control	3	100	2.7	100	3.8	100	2.1

\*Severidad

0 = no hay crecimiento de hongos

1 = infección leve (sólo visible dentro de la lesión con microscopio)

2 = infección moderada (crecimiento visible en el punto de inoculación)

3 = infección alta (cono de 1 cm de diámetro de *Botrytis*)

4 = infección extrema (> media longitud de la fruta)

Ejemplo 19

5 Con el fin de evaluar la actividad in vivo del compuesto A volátil antimicrobiano en la fruta, se desarrolla un bioensayo volátil usando fruta de naranja. Dos naranjas se colocan dentro de una caja en forma de concha de PET. Se inoculan tres lesiones nuevas por naranja con 30 µL de 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Penicillium digitatum*. Las cajas en forma de concha se colocan dentro de un contenedor hermético SnapWare de 10.8 tazas (Modelo # 109842). Se coloca un disco de filtro Whatman # 1 de 42.5 mm (No. de Cat. 1001-042) sobre un cristal de reloj. El compuesto A se disuelve en acetona y se adiciona a los discos de una manera dependiente de la dosis para producir una concentración de espacio de cabeza final de 2, 10 o 50 mg/L. Se deja evaporar la acetona durante cinco minutos. Los contenedores se cierran entonces con las tapas y se colocan durante tres días a 21°C. Después del almacenamiento, se evalúan los frutos para determinar la incidencia de la enfermedad (mm de diámetro de la Pudrición) y la esporulación del agente patógeno (mm de diámetro) en la superficie de los frutos durante dos días adicionales a 21°C, con los resultados resumidos en la tabla 18. Los resultados demuestran buen control volátil antimicrobiano in vivo de *P. digitatum* en naranjas inoculadas, especialmente a velocidades superiores a 10 mg/L.

10

15

Compuesto A	Lesiones empapadas en agua (mm)			Esporulación (mm)		
	Velocidad (mg/L)	Día 0	Día 1	Día 2	Día 0	Día 1
50	0	0	5	0	0	1.2
10	0	0	9	0.5	0.4	2.5
2	0	0	13.4	0	0.4	2.7
Control	17.8	31.2	52.4	5	15.1	35.6

Ejemplo 20

20 Con el fin de evaluar la actividad in vivo del compuesto A volátil antimicrobiano en la fruta, se desarrolla un bioensayo volátil usando manzana. Dos manzanas se colocan dentro de una caja en forma de concha de PET. Se inoculan tres lesiones nuevas por manzana con 30 µL de 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Penicillium expansum*. Las cajas en forma de concha se colocan dentro de un contenedor hermético SnapWare de 10.8 tazas (Modelo # 109842). Se coloca un disco de filtro Whatman # 1 de 42.5 mm (No. de Cat. 1001-042) sobre un cristal de reloj. El compuesto A se disuelve en acetona y se adiciona a los discos de una manera que produzca una concentración final en el espacio de cabeza de 50 mg/L. Se deja evaporar la acetona durante cinco minutos. Los contenedores se cierran entonces con las tapas y se colocan durante tres días a 21°C. Después del almacenamiento, se evalúan los frutos para determinar la incidencia de la enfermedad (mm de diámetro de la Pudrición) y la esporulación del agente patógeno (mm de diámetro) en la superficie de los frutos durante otros tres días a 21°C, con los resultados resumidos en la tabla 19. Los resultados demostraron control volátil antimicrobiano in vivo del 100% del moho *P. expansum* de manzana hasta 3 días después del tratamiento.

25

Compuesto A	Pudrición (mm)				Esporulación (mm)			
	Velocidad (mg/L)	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2

50	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	15.9	20.1	25.7	30	3.5	3.9	3.9	6.5

Ejemplo 21

Con el fin de evaluar la actividad in vivo del compuesto volátil antimicrobiano B en la fruta, se desarrolla un bioensayo volátil usando naranja. Dos naranjas por réplica se colocan dentro de una caja en forma de concha. Se inoculan tres lesiones nuevas por naranja con 30 µL de 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Penicillium digitatum*. Las cajas en forma de concha se colocan dentro de un contenedor hermético SnapWare de 10.8 tazas (Modelo # 109842). El polvo del compuesto B se introduce en los contenedores mediante un dispositivo de sublimación (tubo de cobre calentado a 200°C con flujo de ventilador a 0.5 L/min) para conseguir una concentración final de espacio de cabeza de 0.4, 2, 10 o 50 mg/L. Los contenedores se cierran entonces con las tapas y se colocan durante tres días a 21°C. Después del almacenamiento, se evalúan los frutos para determinar la incidencia de la enfermedad (mm de diámetro de la Pudrición) y la esporulación del agente patógeno (mm de diámetro) en la superficie de los frutos durante otros tres días a 21°C, con los resultados resumidos en la tabla 20. Los resultados demostraron buena inhibición volátil in vivo de *P. digitatum* en naranja a velocidades de 0.4 mg/L e inhibición completa a 10 mg/L.

Tabla 20. Incidencia y severidad de *Penicillium digitatum* sobre naranjas, como se muestra por lesión empapada en agua y esporas de hongos en la superficie de los frutos después de un tratamiento con el compuesto B.

Compuesto B Velocidad (mg/L)	Pudrición (mm)				Esporulación (mm)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
50	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0.8	0	0	0	0
2	0.5	7.8	30.7	42.6	0	0.3	2.8	5.7
0.4	5.7	29.4	49.3	63.4	0.7	1.4	8.1	27.2
Control	12.3	35.5	61.1	83.2	0.3	2.7	8.5	44.5

Ejemplo 22

Para evaluar la actividad in vivo del compuesto A volátil antimicrobiano (Figura 1) en fruta, se desarrolla un bioensayo volátil usando manzana, pera, naranja, fresa, uva y arándano. Dos manzanas, 2 naranjas, 2 peras, 8 fresas, 16 uvas o 30 arándanos para repetición, por duplicado) se colocan en una caja en forma de concha con el extremo del tallo hacia arriba para todas las frutas, excepto la fresa (extremo del tallo hacia abajo). Se inocula una lesión nueva con 20 µL 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Penicillium expansum* (manzana y pera), 20 µL 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Penicillium digitatum* (naranja) y 20 µL (fresa y uva) o 10 µL (arándano) de 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*. Las cajas en forma de concha se colocan dentro de una caja de almacenamiento Rubbermaid de 117 L (Cat # 2244) con tapas cerradas. El compuesto A, disuelto en acetona, se pipetea sobre una tira de algodón, donde la acetona se deja evaporar durante cinco minutos, y luego se introduce en el contenedor por un dispositivo de sublimación (tubo de cobre calentado a 200°C con flujo de ventilador a 0.5 L/min) para lograr una concentración de espacio de cabeza final de 10 mg/L. Los contenedores se mantienen entonces durante tres días a 21°C. Después del tratamiento, los frutos se mantienen durante tres días adicionales a 21°C, luego se evalúan la incidencia de la enfermedad (mm de diámetro de ennegrecimiento o lesiones de empapado en agua) y la esporulación del agente patógeno (mm de diámetro) para manzana, pera y naranja, así como la incidencia (%) y la severidad (0 a 4) de la enfermedad de *Botrytis cinerea* para la fresa, la uva y el arándano, con los resultados resumidos en la tabla 21. Los resultados demostraron un buen control antimicrobiano in vivo de al menos tres agentes patógenos fúngicos en al menos seis huéspedes diferentes cuando se aplican como un fungicida volátil.

Tabla 21: Efectos de la sublimación del compuesto A según se refleja en la incidencia y severidad de *B. cinerea* en la fresa, la uva y el arándano, y la severidad en naranjas, manzanas y peras como se muestra en las lesiones empapadas en agua, ennegrecimiento y esporulación después de un tratamiento de tres días más tres días adicionales a 21°C.

Tratamiento	Incidencia (%)			Severidad (0-4)		
	Fresa	Arándano	Uva	Fresa	Arándano	Uva
(10 mg/L)						
Compuesto A	18.8	5	26.7	0.09	0.03	0.1
Control	100	100	80	3.6	2.2	0.9

	Lesiones empapadas en agua			Ennegrecimiento (mm)			Esporulación (mm)		
	Naranja	Manzana	Pera	Naranja	Manzana	Pera			
Compuesto A	3.04	5.4	2.7	0	8.55	0			
Control	50.5	11.5	23.3	4.8	33.2	15.5			

Ejemplo 23

5 Para comparar la capacidad del compuesto A cuando se volatiliza activamente mediante diferentes mecanismos, se realiza un ensayo in vivo usando fresa. Ocho fresas se colocan en una caja en forma de concha con el extremo del tallo hacia abajo. Se inocula una lesión nueva con 20 µL de 1 X 10<sup>5</sup> por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*. La caja en forma de concha se coloca en un contenedor hermético SnapWare de 10.8 tazas (Modelo # 109842) y se cierra con las tapas. El compuesto A se disuelve en acetona y se volatiliza a través de un puerto lateral de ½ pulgada sellable mediante un sistema SmartFog ES-100-H (Reno, NV). Alternativamente, se pipetea el compuesto A, disuelto en acetona, sobre una tira de algodón, donde la acetona se deja evaporar durante cinco minutos, y luego se introduce en el contenedor por un dispositivo de sublimación (tubo de cobre calentado a 200°C con flujo de ventilador a 0.5 L/min) para lograr una concentración final en el espacio de cabeza de 10 mg/L. Los frutos se almacenan durante tres días a 21°C. Después de los tres días de tratamiento, los frutos se almacenan durante tres días adicionales a 21°C, y luego se evalúan la incidencia (%) y la severidad de la enfermedad (0 a 4). Los resultados se resumen en la tabla 22 y demuestran una buena actividad antimicrobiana contra *Botrytis cinerea* en este análisis in vivo, lo que indica que el compuesto A es un antimicrobiano volátil eficaz.

Tabla 22. Efectos de diferentes métodos de aplicación volátil del compuesto A según se refleja por la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en fresa después de un tratamiento de tres días más tres días adicionales a 21°C.

Tratamientos	Incidencia (%)	Severidad (0 a 4)
Niebla, 10 mg/L del compuesto A	6.3	0.03
Niebla, control	62.5	1.6
Sublimación, 10 mg/L del compuesto A	0.0	0.0
Sublimación, control	100.0	3.7

Ejemplo 24

20 Se usa un ensayo in vivo para evaluar la capacidad del compuesto A de volatilizarse a partir de diferentes materiales y controlar agentes patógenos fúngicos. Ocho fresas se colocan en una caja en forma de concha con el extremo del tallo hacia abajo. Se inocula una lesión nueva con 20 µL de 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*. Las cajas en forma de concha se colocan luego en un contenedor hermético SnapWare de 10.8 tazas (Modelo # 109842). El compuesto A se disuelve en acetona y después se pulveriza uniformemente sobre papel de celulosa y tejido Tyvek® a una velocidad de 200 miligramos por metro cuadrado (mg/m<sup>2</sup>). Se deja evaporar la acetona. Igualmente, el compuesto A se disuelve en propilenglicol y se pulveriza uniformemente sobre papel de celulosa y tejido Tyvek®. No se intenta evaporar en este caso.

Tabla 23. Efectos de diferentes películas y posterior liberación del compuesto A sobre la incidencia y severidad de

<i>Botrytis cinerea</i> en fresas después de un tratamiento de tres días y un almacenamiento adicional de dos días a 21°C.			
Velocidad (mg/L)	Tipo de Película	Incidencia (%)	Severidad (0-4)
0.4	Papel de celulosa	37.5	0.8
2	Papel de celulosa	37.5	0.7
10	Papel de celulosa	12.5	0.2
0.4	Tyvek®	31.3	0.5
2	Tyvek®	6.3	0.1
10	Tyvek®	6.3	0.3
Control	Sin película	100	2.5

5 Se cortan piezas de material a las dimensiones apropiadas para proporcionar una concentración final de espacio de cabeza de 0.4, 2 o 10 mg/L. Los contenedores se cierran y se colocan durante tres días a 21°C. Después del tratamiento, los frutos se almacenan durante dos días adicionales a 21°C y luego se evalúan la incidencia (%) y la severidad (0 a 4) de la enfermedad, con los resultados resumidos en la tabla 23. Los resultados demuestran una buena actividad antimicrobiana in vivo del compuesto A contra *Botrytis cinerea*, con una reducción de la incidencia y severidad a todas las velocidades, de una manera dependiente de la dosis, y que el compuesto volátil se puede liberar de diferentes materiales.

Ejemplo 25

10 Se usa un ensayo in vivo para evaluar la capacidad del compuesto A de volatilizarse a partir de diferentes materiales y controlar agentes patógenos fúngicos. Ocho fresas se colocan en una caja en forma de concha con el extremo del tallo hacia abajo. Se inocula una lesión nueva con 20 µL de 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*.  
 15 Las cajas en forma de concha se colocan entonces en un contenedor hermético SnapWare de 10.8 tazas (Modelo # 109842). Como sustrato para el compuesto A, se utiliza ya sea un disco de filtro Whatman # 1 de 42.5 mm (No. de Cat. 1001-042) colocado sobre un cristal de reloj o piezas de 10 centímetros cuadrados (cm<sup>2</sup>) de cartón utilizado por lo general para envasar fresas. El compuesto A se disuelve en acetona y ya sea se pipetea sobre el disco o se pinta sobre el cartón a una velocidad para conseguir una concentración final en el espacio de cabeza de 0.4, 2 o 10 mg/L. Se deja evaporar la acetona durante cinco minutos. Los contenedores se cierran, y se colocan durante tres días a 21°C.  
 20 Después del tratamiento, los frutos se almacenan durante dos días adicionales a 21°C y luego se evalúan la incidencia (%) y la severidad (0 a 4) de la enfermedad, con los resultados resumidos en la tabla 24. Los resultados demuestran una buena actividad antimicrobiana in vivo del compuesto A contra *Botrytis cinerea*, con una reducción de la incidencia y severidad a todas las velocidades, de una manera dependiente de la dosis, y que el compuesto volátil se puede liberar de diferentes materiales.

Tabla 24. Efectos de diferentes películas y posterior liberación del compuesto A sobre la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en fresas después de un tratamiento de tres días y un almacenamiento adicional de dos días a 21°C.

Velocidad (mg/L)	Tipo de material	Incidencia (%)	Severidad (0-4)
10	Cartón	25	0.2
2	Cartón	37.5	0.3
0.4	Cartón	87.5	0.9
Control	Cartón	93.8	2.7
10	Papel de filtro	18.8	0.3
2	Papel de filtro	37.5	0.6

0.4	Papel de filtro	56.3	2.5
Control	Papel de filtro	100	2.5

## Ejemplo 26

Se utiliza un ensayo in vitro para evaluar la capacidad del compuesto A (Figura 1) de volatilizarse a partir de diferentes materiales y controlar el crecimiento de hongos.

Tabla 25. Efectos de diferentes materiales sobre la liberación volátil del compuesto A y la posterior inhibición in vitro (MIC) de <i>Botrytis cinerea</i> .	
Material	MIC (mg/L)
Polietileno	0.28
Fibra de vidrio revestida con PTFE	0.56
Fibra de vidrio	0.56
Celulosa	0.56
Sílica	0.56
Aramida y fibra de vidrio	0.56
Poliéster recubierto de vinilo	0.56
Fibra de vidrio recubierta con acrílico	0.56
Fibra de vidrio recubierta de silicona	0.56
PTFE	1.1
Cartón	2.2
Aramida	2.2

5

Recubierto de PTFE (8577K81), fibra de vidrio (8816k1), sílica (8799K3), aramida y fibra de vidrio (8821K4), poliéster recubierto de vinilo (8843K31), fibra de vidrio recubierta con acrílico (8838K2), fibra de vidrio recubierta de silicona (87815K1), aramida (McMaster-Carr, Santa Fe Springs, CA-1206T1), película de sellado de PCR de polietileno, celulosa (Whatman # 1, Cat No. 1001-0155), y cartón se cortan en discos de 15 mm de diámetro. Se usan placas de microtitulación de 12 pozos (6.5 mL de volumen por pozo) para el ensayo de inhibición in vitro de los compuestos antimicrobianos volátiles. Se adiciona a cada pozo un volumen de 3 mL de agar de dextrosa de patata (PDA) a máxima potencia. Después de enfriar, se localiza con pipeta en el centro del agar 1  $\mu$ L de  $1 \times 10^5$  por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*. Las placas se inoculan inmediatamente antes del tratamiento con fungicida volátil. Los diversos materiales se colocan, por duplicado, en la cara inferior de una película de sellado de placa de PCR de polietileno. Para la determinación de la concentración inhibidora mínima (MIC), los compuestos se diluyen en acetona, y la cantidad apropiada de compuesto se adiciona a los materiales de una manera dependiente de la dosis para conseguir una concentración final de espacio de cabeza de 35.7 a 0.03 mg/L. Se deja evaporar la acetona, durante cinco minutos. El espacio de cabeza alrededor del inóculo de *Botrytis cinerea* se sella entonces dentro del pozo por la película con el disco adherente de material que contiene el fungicida. Las placas se invierten, colocadas sobre los discos tratados y selladas para evitar que cualquier producto químico se desprenda del disco y caiga sobre el agar inoculado. Después de tres días de almacenamiento a 23°C, los cultivos se evalúan para el crecimiento porcentual con respecto al control basado en la medición del diámetro de la colonia de hongos. Los resultados experimentales se resumen en la tabla 25. Los resultados indican que el compuesto A se puede volatilizar a partir de numerosos materiales para inhibir el crecimiento in vitro de *Botrytis cinerea* con niveles similares de control.

25 Ejemplo 27

Se usa un ensayo in vivo para evaluar la capacidad del compuesto A para controlar el crecimiento de hongos de las semillas.

Granos	Crecimiento fúngico en PDA (mm)		
	Compuesto A	Control-Acetona	Control-No Acetona
Cebada	0	12.8	21.7
Maíz seco	0	10.1	22.8
Mijo	0	7.2	19.1
Arroz	0	7.5	21.6
Centeno	0	8.4	21
Trigo	0	8.1	22.4

5 Los granos que constan de maíz, trigo, arroz, centeno, mijo y cebada se esterilizan la superficie con 0.825% de NaOCl durante 1 minuto y se aclaró tres veces con agua destilada estéril. Los granos se inoculan remojándolos en una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas/mL de *Aspergillus brasiliensis* durante 1 minuto. El exceso de inóculo se borra con una toalla de papel estéril antes de depositar cinco semillas en una placa de Petri que contiene 25 mL de PDA. Para la determinación de la eficacia, el compuesto A se diluye en acetona y se adiciona a discos de filtro Whatman # 1 de 42.5 mm (No. de Cat. 1001-042) unido al lado interior de la tapa de una manera dependiente de la dosis para conseguir una concentración final del espacio de cabeza 0.4, 2 o 10 mg/L. Se deja evaporar la acetona, durante cinco minutos antes de cerrar la placa y sellarla con parafilm. Las placas se incuban a 23°C, durante tres días. Después del almacenamiento, los granos se evalúan para el diámetro del micelio colonia (mm), con los resultados resumidos en la tabla 26. Los resultados demostraron el control del 100% de *Aspergillus brasiliensis* en este análisis in vivo.

10  
15 Ejemplo 28

Para evaluar un tratamiento de combinación del compuesto A con 1-metilciclopropeno (1-MCP), se realiza un experimento in vivo sobre rosas blancas.

Tratamientos	Incidencia (%)	Severidad * (0-4)
Control	66.7	2.0
1-MCP	33.3	0.4
0.008 mg/L	20.0	0.2
0.04 mg/L	20.0	0.03
0.2 mg/L	0.0	0.0
0.008 mg/L+1-MCP	6.7	0.9
0.04 mg/L+1-MCP	0.0	0.0
0.2 mg/L+1-MCP	0.0	0.0

\* Grado de severidad

0 = Sin enfermedad

1 = Ennegrecimiento y pequeñas lesiones en los sépalos o pétalos

2 = Ennegrecimiento, pétalos cubiertos con esporas de hongos

3 = Ennegrecimiento, pétalos cubiertos con esporas de hongos, algunas gotas de pétalos

4 = Ennegrecimiento, pétalos cubiertos con esporas de hongos, algunas flores abortadas

5 Se colocan cinco rosas blancas en un frasco de 800 mL que contiene 200 mL de un conservante de flores comercial común. Tres frascos se colocan entonces en una caja de almacenamiento Rubbermaid de 117 L (Cat # 2244). Se colocan dos pequeños ventiladores en extremos opuestos del contenedor para ayudar con la distribución de los dos volátiles. Se aplica un tratamiento con 1-MCP de 500 partes por billón (ppb) de volumen por volumen (v/v) (AgroFresh, Springhouse, PA), durante 24 horas a 21°C. Después de terminar el tratamiento con 1-MCP, se ventilan los contenedores y se aplica polvo de Compuesto A de una manera dependiente de la dosis para alcanzar una concentración final de espacio de cabeza de 0.2, 0.04 o 0.008 mg/L con un dispositivo de sublimación (tubo de cobre calentado a 200°C con flujo de ventilador a 0.5 L/min), con el extremo del tubo penetrando a través de un puerto lateral de ½ pulgadas en el contenedor que se sella inmediatamente después de la aplicación. Las flores se incuban durante tres días a 21°C. Después del tratamiento, las flores se evalúan durante siete días adicionales a 21°C para la incidencia y la severidad de la enfermedad de los pétalos de las flores. Los resultados enumerados en la tabla 27 muestran una buena actividad antimicrobiana contra la infección por *Botrytis cinerea* de rosas blancas y que el aumento de la velocidad de volatilización a través de la sublimación resultó en un mayor control de la enfermedad. También el tratamiento con 1-MCP muestra gota reducida de pétalos como se refleja en las puntuaciones de severidad.

15 Ejemplo 29

Para evaluar un tratamiento de combinación del compuesto A con 1-metilciclopropeno (1-MCP), se realiza un experimento in vivo sobre brócoli.

Tabla 28. Efectos del compuesto A y 1-MCP en el control de la pudrición de *Alternaria* y el amarillamiento del brócoli, respectivamente, cinco o tres días de tratamiento a 10 o 21°C con dos días adicionales a 21°C

Tratamientos (mg/L)	21°C		11°C	
	Severidad	Puntuación de color *	Severidad	Puntuación de color *
Control	1.5	2.39	0.18	1.55
1-MCP	0.61	1.79	0.18	1.50
0.4 mg/L	0.29	1.32	0.00	1.75
2 mg/L	0.07	1.89	0.00	2.11
0.4 mg/L+1-MCP	0.21	0.93	0.00	1.39
2 mg/L+1-MCP	0.07	1.93	0.00	2.23

Puntuación de calificación del color

0 = brócoli de aspecto regular, verde

1 = Pocos puntos verdes claros

2 = Manchas verdes y amarillas claras

3 = Verde claro, amarillo y algo marrón

4 = Mayormente amarillo y marrón

Las flores de brócoli se inoculan con  $1 \times 10^6$  esporas/mL de *Alternaria alternata* y luego se colocan en una caja de almacenamiento Rubbermaid de 117 L (Cat # 2244) con dos pequeños ventiladores colocados en extremos opuestos del contenedor. Se aplica un tratamiento con 1-MCP de 500 ppb v/v (AgroFresh, Springhouse, PA) durante 24 horas a 1°C. Después de completar el tratamiento con 1-MCP, los flósculos de brócoli se retiran y se colocan en un contenedor hermético SnapWare de 10.8 tazas (Modelo # 109842). El polvo del compuesto A se aplica de una manera dependiente de la dosis para conseguir una concentración final de espacio de cabeza de 2 o 0.4 mg/L con un dispositivo de sublimación (tubo de cobre calentado a 200°C con flujo de ventilador a 0.5 L/min), con el final del tubo que penetra a través de un puerto lateral de ½ pulgada en el contenedor que se sella inmediatamente después de la aplicación. Los flósculos se incuban durante cinco días a 10°C o tres días a 21°C, luego se evalúan durante cinco días adicionales a 21°C para la incidencia y severidad de la enfermedad. Los resultados enumerados en la tabla 28 muestran una buena actividad antimicrobiana contra la infección por *Alternaria alternata*.

Ejemplo 30

Para evaluar un tratamiento de combinación del compuesto A con 1-metilciclopropeno (1-MCP), se realiza un experimento in vivo en tomate. Cada fruto de tomate es lesionado tres veces e inoculado con  $1 \times 10^6$  esporas/mL de *Alternaria alternata* y luego colocado en una caja de almacenamiento Rubbermaid de 117 L (Cat # 2244) con dos pequeños ventiladores colocados en los extremos opuestos del contenedor. Se aplica un tratamiento con 1-MCP de 1000 ppb v/v (AgroFresh, Springhouse, PA) durante 24 horas a 21°C. Después de completar el tratamiento con 1-MCP, los tomates se retiran y se colocan en un contenedor hermético SnapWare de 10.8 tazas (Modelo # 109842). El polvo del compuesto A se aplica de una manera dependiente de la dosis para conseguir una concentración final de espacio de cabeza de 2 o 0.4 mg/L con un dispositivo de sublimación (tubo de cobre calentado a 200°C con flujo de ventilador a 0.5 L/min), con el extremo del tubo que penetra a través de un puerto lateral de ½ pulgada en el contenedor que se sella inmediatamente después de la aplicación. Los tomates se incuban durante tres días a 21°C, luego se evalúan durante tres días adicionales a 21°C para la incidencia y la severidad de la enfermedad. Los resultados enumerados en la tabla 29 muestran una buena actividad contra la infección por *Alternaria alternata* de tomate.

Compuesto A	Diámetro de pudrición (mm)
Control	14.8
1-MCP	13.6
0.4 mg/L	3.8
2 mg/L	0.0
0.4 mg/L+1-MCP	3.8
2 mg/L+1-MCP	0.0

Ejemplo 31

Para evaluar la actividad in vivo de compuestos antimicrobianos volátiles A y B (Figura 1) en fruta, se desarrolla un bioensayo volátil usando manzana, pera, naranja, fresa, uva y arándano.

Tabla 30. Efectos de la sublimación de los compuestos A y B según se refleja por la incidencia y severidad de *B. cinerea* en la fresa, la uva y el arándano, y la severidad en naranjas, manzanas y peras como se muestra en las lesiones empapadas en agua, ennegrecimiento y esporulación después de un tratamiento de tres días más tres días adicionales

## ES 2 636 962 T3

a 21°C.						
Tratamientos (1 mg/L)	Incidencia (%)			Severidad (0-4)		
	Fresa	Arándano	Uva	Fresa	Arándano	Uva
Compuesto A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Compuesto B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Control	100.0	100.0	100.0	3.9	2.5	1.9
	Lesión empapada en agua	Ennegrecimiento (mm)		Esporulación (mm)		
	Naranja	Manzana	Pera	Naranja	Manzana	Pera
Compuesto A	0.0	0.8	4.7	0.0	0.0	0.0
Compuesto B	0.0	2.3	1.1	0.2	0.0	0.0
Control	73.2	21.7	29.7	46.0	5.2	18.5

5 Dos manzanas, 2 naranjas, 2 peras, 8 fresas, 16 uvas o 30 arándanos (para repetición, por duplicado) se colocan en una caja en forma de concha con el extremo del tallo hacia arriba para todas las frutas, excepto para la fresa (con el extremo del vástago hacia abajo). Se inocula una lesión nueva con 20  $\mu$ L de  $1 \times 10^6$  por mL de suspensión de esporas de *Penicillium expansum* (manzana y pera), 20  $\mu$ L de  $1 \times 10^6$  por mL de suspensión de esporas de *Penicillium digitatum* (naranja) y 20  $\mu$ L (fresa y uva) o 10  $\mu$ L (Arándano) de  $1 \times 10^6$  por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea*. Las cajas en forma de concha se colocan dentro de una caja de almacenamiento Rubbermaid de 117 L (Cat # 2244) con tapas cerradas. Los polvos de los compuestos A y B se introducen en los contenedores mediante un dispositivo de sublimación (tubo de cobre calentado a 200°C con flujo de ventilador a 0.5 L/min) para conseguir una concentración final de espacio de cabeza de 1 mg/L. Los contenedores se mantienen entonces durante tres días a 21°C. Después del tratamiento, los frutos se mantienen durante tres días adicionales a 21°C, luego se evalúan la incidencia de la enfermedad (mm de diámetro de ennegrecimiento o lesiones empapadas en agua) y la esporulación del agente patógeno (mm de diámetro) para manzana, pera y naranja, así como incidencia (%) y severidad (0 a 4) de enfermedad *Botrytis cinerea* para la fresa, la uva y el arándano, con los resultados resumidos en la tabla 30. Los resultados demostraron un control antimicrobiano de 100% in vivo de *B. cinerea* y *P. digitatum* por ambos compuestos A y B en diferentes huéspedes cuando se aplica como un fungicida volátil.

### Ejemplo 32

20 Con el fin de evaluar la actividad del compuesto A como un fungicida de contacto, se desarrolla un ensayo in vitro. Se utiliza una placa de Petri de 6 cm de diámetro. El compuesto A se modifica en agar de dextrosa de patata (PDA) para obtener una concentración final de solución de 10, 2, 0.4 o 0.08 mg/L, y se adiciona volumen de solución de 15 mL a cada placa. Después del enfriamiento, se localiza con pipeta 1  $\mu$ L de  $1 \times 10^5$  por mL de suspensión de esporas de *Penicillium expansum* o *Penicillium digitatum* en el centro del agar.

25 Las placas se sellan con un parafilm y se colocan en una incubadora mantenida a 23°C. Después de tres días de almacenamiento, los cultivos se evalúan para el crecimiento porcentual con respecto al control basado en la medición del diámetro de la colonia de hongos. Los resultados experimentales se resumen en la tabla 31. Los resultados indican que el compuesto A tiene actividad como un fungicida de contacto en este ensayo in vitro contra agentes patógenos fúngicos de las plantas.

Tabla 31. La MIC in vitro para el compuesto A como un fungicida de contacto para la inhibición del crecimiento micelial de <i>Penicillium expansum</i> y <i>Penicillium digitatum</i> .		
	Incidencia (%)	
	<i>P. expansum</i>	<i>P. digitatum</i>
Velocidad (mg/L)		

10	0.0	0.0
2	0.0	0.0
0.4	33.0	12.5
0.08	93.1	42.0

Ejemplo 33

5 Con el fin de evaluar la actividad del compuesto A (Figura 1) como un fungicida de drenaje por contacto, se desarrolla un ensayo in vivo. Dos manzanas o 2 naranjas (para repetición, por duplicado) se colocan en una caja en forma de concha, y se hacen tres lesiones nuevas cerca de la región ecuatorial de cada fruta. El compuesto A se disuelve en agua para conseguir una concentración final de solución de tratamiento de 250, 50 o 10 mg/L. Se sumerge la fruta en solución de Compuesto A durante 1 minuto y se deja secar durante 1 hora. Las heridas de la fruta se inoculan entonces con 30 µL de 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Penicillium expansum* (manzana) o suspensión de esporas de *Penicillium digitatum* (naranja). Las cajas en forma de concha se colocan entonces en un contenedor hermético SnapWare de 10.8 tazas (Modelo # 109842) y se incuban durante 3 días a 21°C. Después del tratamiento, el fruto se mantiene durante 3 días adicionales a 21°C y luego se evalúa la incidencia de la enfermedad (mm de diámetro de ennegrecimiento o lesiones empapadas en agua) y esporulación de agente patógeno (mm de diámetro), con los resultados resumidos en la tabla 32. Los resultados demuestran buen control antimicrobiano in vivo de 2 agentes patógenos fúngicos en 2 huéspedes diferentes cuando se aplica como un fungicida de contacto.

Tabla 32. La MIC in vivo para el compuesto A como un fungicida de contacto para el control de *Penicillium digitatum* y *Penicillium expansum* sobre naranjas y manzanas, respectivamente.

Compuesto A (mg/L)	Naranjas		Manzanas	
	Empapado en agua (mm)	Esporulación (mm)	Ennegrecimiento (mm)	Esporulación (mm)
Control	42.7	31.0	9.7	3.5
10	27.5	16.6	8.5	2.1
50	18.8	12.0	3.7	1.6
250	1.7	0.4	0.8	0.5

15

Ejemplo 34

20 Con el fin de evaluar la actividad del compuesto A como un fungicida volátil, se desarrolla un ensayo in vitro para evaluar la germinación de esporas. Se vierten dos mL de agar de agua en placas de Petri de 3.5 cm. El compuesto A se disuelve en acetona para conseguir una concentración de solución de tratamiento final de 0.14, 0.07, o 0.035 mg/L. Las placas se inoculan con 1 µL de 1 X 10<sup>6</sup> por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*. Las placas se incuban a continuación durante un día a 0°C, cinco días a 0°C o cinco días a 0°C más uno o dos días adicionales a 21°C. En cada punto de tiempo, se eliminan las placas y se cuentan 100 esporas por porcentaje de germinación, donde se define la germinación como un tubo germinal que se ha extendido una distancia mayor que la longitud de la espora. Los resultados se resumen en la tabla 33. En las tres concentraciones de tratamiento y regímenes de temperatura, el compuesto A inhibe completamente la germinación de las esporas de agentes patógenos de hongos ensayados.

25

Tabla 33. Porcentaje de germinación de esporas de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en respuesta a un tratamiento volátil con el compuesto A bajo 4 regímenes de temperatura diferentes

Patógenos	Compuesto A Velocidad (mg/L)	Inhibición de la germinación (%)			
		1 día, 0°C	5 días, 0°C	5 días, 0°C 1 día, 21°C	5 días, 0°C 2 días, 21°C

<i>B. cinerea</i>	0.14	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.07	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.035	0.0	0.0	0.0	0.0
	Control	44.8	98.7	92.2	98.4
	Acetona	48.9	98.9	93.9	95.8
<i>P. expansum</i>	0.14	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.07	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.035	0.0	0.0	0.0	0.0
	Control	0.0	1.1	12.6	30.8
	Acetona	0.0	0.0	6.4	21.8

## Ejemplo 35

Con el fin de evaluar la actividad del compuesto A como un fungicida volátil, se desarrolla un ensayo in vitro para evaluar la germinación de esporas. Las placas de Petri de 3.5 cm se llenan con 2 mL de agar agua. Después de enfriar, se localiza con pipeta 1  $\mu$ L de  $1 \times 10^5$  por mL de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea* en el centro de la placa. Las placas se inoculan inmediatamente antes del tratamiento con fungicida volátil. Un disco de filtro Whatman #1 (No. de Cat. 1001-0155) se coloca, por duplicado, en la parte inferior de una tapa de placa. Para la determinación de la concentración inhibidora mínima (MIC), los compuestos se diluyen en acetona y la cantidad apropiada de compuesto se adiciona a los discos de una manera dependiente de la dosis para alcanzar una concentración final en el espacio de cabeza de 142.9 a 0.07 mg/L. Se deja evaporar la acetona durante cinco minutos y luego se colocan las tapas en las placas y se sellan con parafilm. Después de 24 horas de almacenamiento a 23°C, se cuentan 100 esporas por porcentaje de germinación, donde se define la germinación como un tubo germinal que se ha extendido una distancia mayor que la longitud de la espora. Después del recuento, el tratamiento se retira, y las placas se vuelven a sellar. Después de 24 horas adicionales, se vuelven a contar 100 esporas. Los tapones se transfieren entonces a una placa limpia que contiene PDA a máxima potencia y se dejan incubar a 23°C, durante otros tres días. Después de la incubación, se determina el crecimiento micelial (mm de diámetro) y se resume en la tabla 34. Después de 24 horas, el 100% de las esporas de control han germinado mientras que todas las velocidades del compuesto A resultaron en un 100% de inhibición de la germinación en este ensayo volátil in vitro. Estos resultados muestran que el compuesto A proporciona un efecto fungicida, en oposición a un efecto fungistático, de tal manera que las esporas tratadas no germinan y crecen como micelios incluso después de que el compuesto se haya eliminado.

Compuesto A	Germinación de esporas (%)		Crecimiento micelial después de la transferencia (%)
	24 h <sup>a</sup>	24 h+24 h <sup>b</sup>	3 d <sup>c</sup>
Control	100.0	100.0	100.0
Acetona	98.4	92.7	100.0
142.9	0.0	0.0	0.0
71.4	0.0	0.0	0.0
35.7	0.0	0.0	0.0
17.9	0.0	0.0	0.0

## ES 2 636 962 T3

8.9	0.0	0.0	0.0
4.5	0.0	0.0	10.1
2.2	0.0	0.0	16.9
1.1	0.0	0.0	32.6
0.56	0.0	0.0	43.3
0.28	0.0	0.0	51.3
0.14	0.0	0.0	53.8
0.07	0.0	10.0	60.3

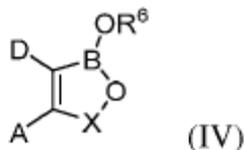
<sup>a</sup>Germinación de esporas determinada después de 24 horas de tratamiento

<sup>b</sup>Germinación de esporas se determina después de 24 horas adicionales después de la eliminación del tratamiento

<sup>c</sup>Porcentaje de crecimiento micelial 3 días después de la transferencia del inóculo a placas PDA limpias

Reivindicaciones

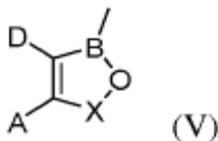
1. Un método de uso de un compuesto volátil antimicrobiano contra agentes patógenos que afectan a carnes, plantas o partes de plantas, que comprende proporcionar un compuesto volátil antimicrobiano de fórmula (IV):



5 en la que A y D junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un anillo condensado de 5, 6 o 7 miembros que puede estar sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo, halógeno, nitro, nitrilo, amino, amino sustituido con uno o más grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carboxi, acilo, arilo, arilo, carbonamido, carbonamido sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, sulfonamido o trifluorometilo o el anillo condensado puede unir dos anillos oxaboroles;

10 X es un grupo -CR<sup>7</sup>R<sup>8</sup> en el que R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, nitrilo, nitro, arilo, arilalquilo o R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> junto con el átomo de carbono a los que están unidos forman un anillo alicíclico; y

R<sup>6</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> sustituido con alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxilo, amino, amino sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, carboxi, arilo, arilo, carbonamido, carbonamido sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo o arilalquilo, arilalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquiloamino C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, alquiloamino C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> sustituido con fenilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carbonil alquiloamino o un radical de fórmula (V):



15 en la que A, D y X son como se definen en este documento anteriormente, excepto para boronofalida; y sus sales agrícolamente aceptables;

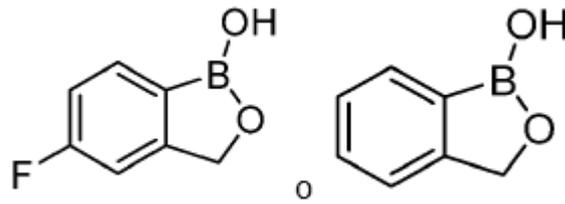
y poner en contacto una carne, planta o parte de la planta con una cantidad eficaz del compuesto volátil antimicrobiano, en el que dicho contacto comprende aplicar el compuesto volátil antimicrobiano por medio de tratamiento con gas.

20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el agente patógeno se selecciona del grupo que consiste en *Acremonium* spp., *Albugo* spp., *Alternaria* spp., *Ascochyta* spp., *Aspergillus* spp., *Botryodiplodia* spp., *Botryosphaeria* spp., *Botrytis* spp., *Byssochlamys* spp., *Candida* spp., *Cephalosporium* spp., *Ceratocystis* spp., *Cercospora* spp., *Chalara* spp., *Cladosporium* spp., *Colletotrichum* spp., *Cryptosporiopsis* spp., *Cylindrocarpon* spp., *Debaryomyces* spp., *Diaporthe* spp., *Dádmela* spp., *Diplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Elsinoe* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Gloeosporium* spp., *Glomerella* spp., *Helminthosporium* spp., *Khusicia* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Macrophoma* spp., *Macrophomina* spp., *Microdochium* spp., *Monilinia* spp., *Monilochaetes* spp., *Mucor* spp., *Mycocentrospora* spp., *Mycosphaerella* spp., *Nectria* spp., *Neofabraea* spp., *Nigrospora* spp., *Penicillium* spp., *Peronophythora* spp., *Peronospora* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Pezicula* spp., *Phacidiopycnis* spp., *Phoma* spp., *Phomopsis* spp., *Phyllosticta* spp., *Phytophthora* spp., *Polyscytalum* spp., *Pseudocercospora* spp., *Pyricularia* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Rhizopus* spp., *Sclerotium* spp., *Sclerotinia* spp., *Septoria* spp., *Sphaceloma* spp., *Sphaeropsis* spp., *Stemphylium* spp., *Stilbella* spp., *Thielaviopsis* spp., *Thyronectria* spp., *Trachysphacra* spp., *Uromyces* spp., *Ustilago* spp., *Venturia* spp., y *Verlicillium* spp.

35 3. El método de la reivindicación 1, en el que el agente patógeno se selecciona del grupo que consiste en *Erwinia* spp., *Pantoea* spp., *Pectobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Xanthomonas* spp.; *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Listeria* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Bacillus* spp., *Campylobacter* spp., *Clavibacter* spp., *Clostridium* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Vibrio* spp., *Xanthomonas* spp., y *Yersinia* spp.

40 4. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende un tratamiento posterior a la recolección seleccionado del grupo que consiste en tratamiento durante el empaquetado de campo, el tratamiento durante la paletización o después de la paletización, en paletas abiertas o en paletas envueltas, en carpas, tratamientos en caja con o sin forros, en contenedores marítimos, camiones u otros tipos de contenedores usados durante el transporte, y tratamiento durante el almacenamiento (atmósfera regular o atmósfera controlada).

5. El método de la reivindicación 1, en el que las plantas o partes de las plantas se seleccionan del grupo que consiste en maíz, trigo, algodón, arroz, soja y canola.
6. El método de la reivindicación 1, en el que las plantas o partes de las plantas se seleccionan del grupo que consiste en frutas, vegetales, vivero, césped y cultivos ornamentales.
- 5 7. El método de la reivindicación 6, en el que la fruta se selecciona del grupo que consiste en plátano, piña, cítricos, uvas, sandía, sandía, cantalupo, melón reticulado, y otros melones, manzana, melocotón, pera, cereza, kiwi, mango, nectarina, guayaba, papaya, caqui, granada, aguacate, higo, cítricos y bayas.
8. El método de la reivindicación 7, en el que las bayas se seleccionan del grupo que consiste en fresa, arándano, frambuesa y mora.
- 10 9. El método de la reivindicación 7, en el que el cítrico se selecciona del grupo que consiste en naranjas, limón, lima, y pomelo.
10. El método de la reivindicación 1, en el que el tratamiento con gas se selecciona del grupo que consiste en la liberación de una bolsita, liberación de una película sintética o natural, liberación del revestimiento u otros materiales de envasado, liberación de polvo, liberación de un generador de liberación de gas, liberación usando un cilindro de gas comprimido o no comprimido, liberación de una gotita dentro de una caja, y combinaciones de los mismos.
- 15 11. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto volátil antimicrobiano tiene una estructura de



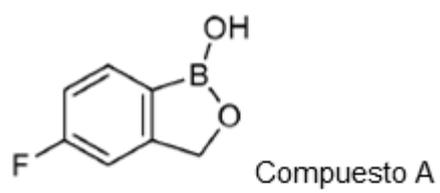


Figura 1.

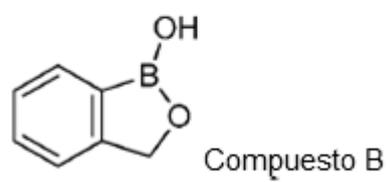


Figura 2

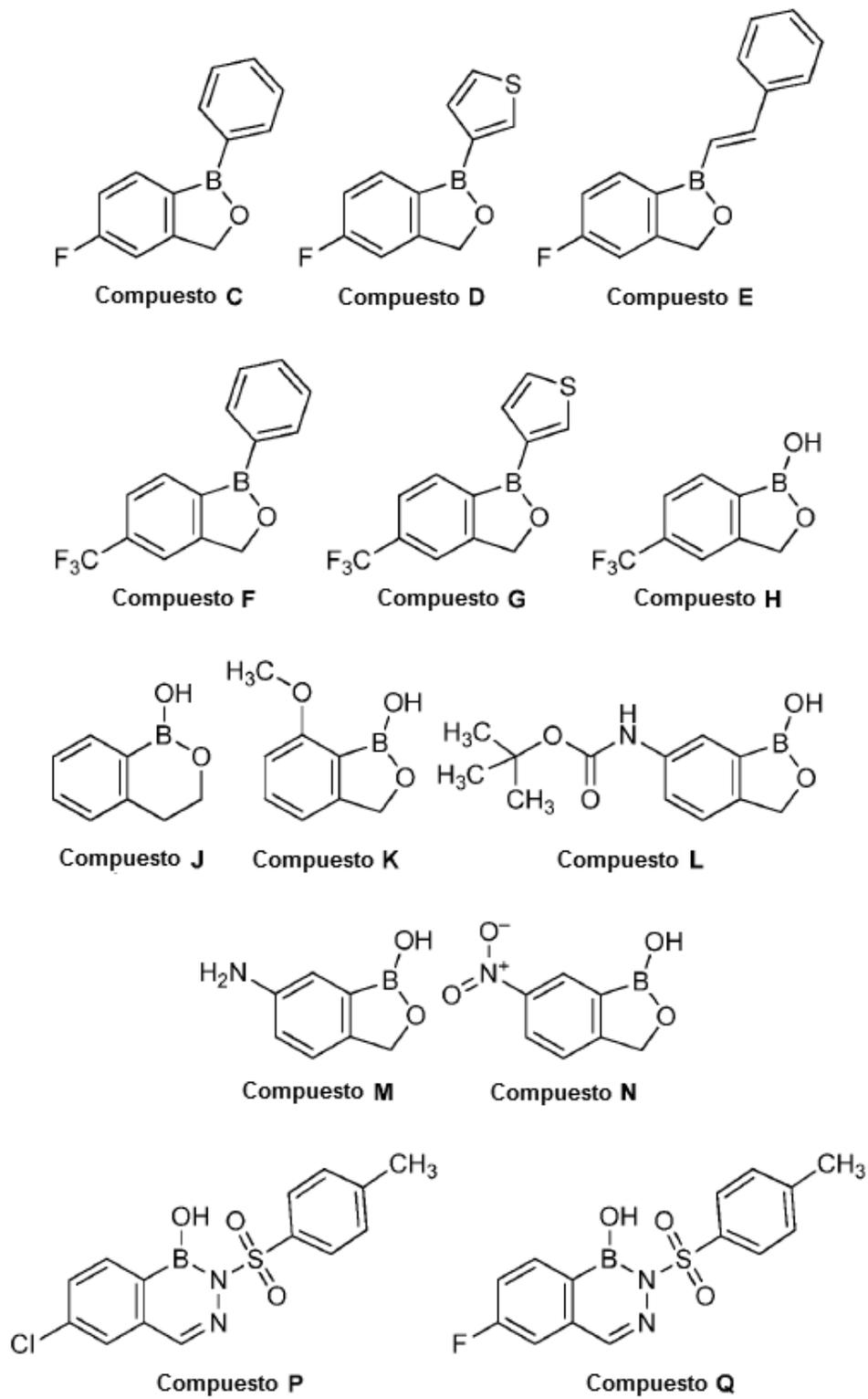
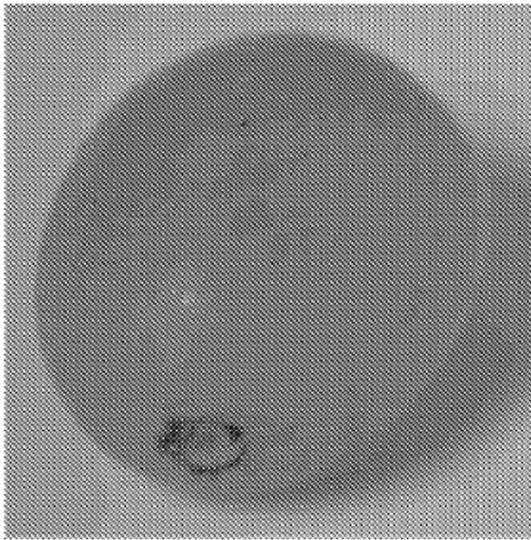
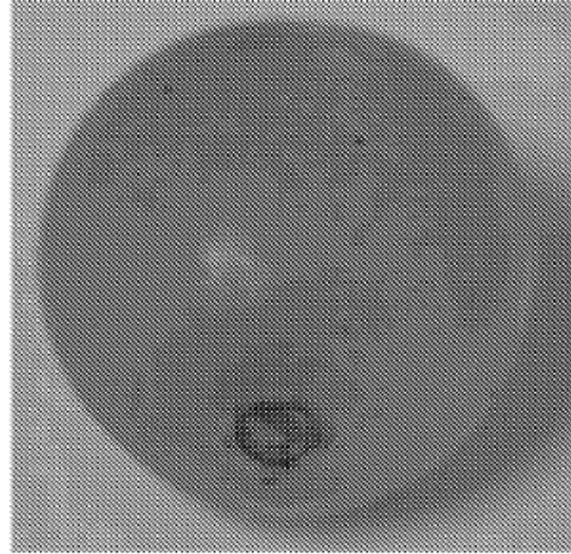


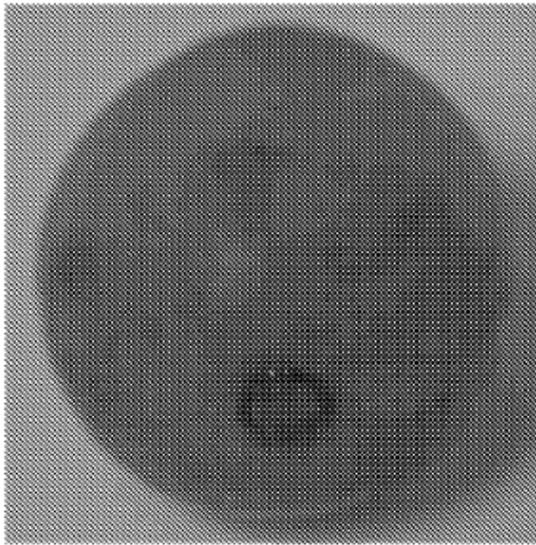
Figura 3



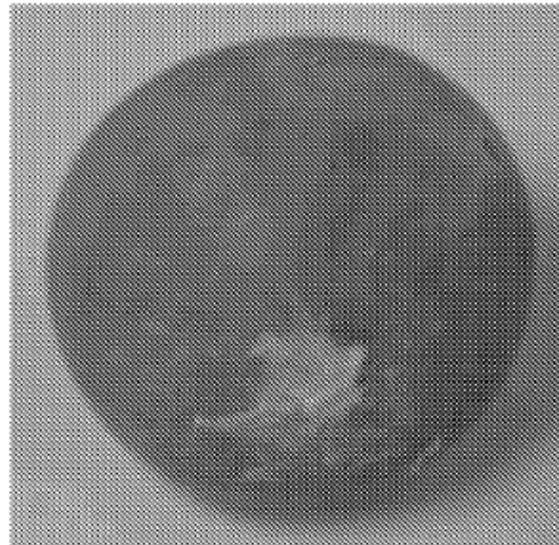
**No inoculado**



**0.04 mg**

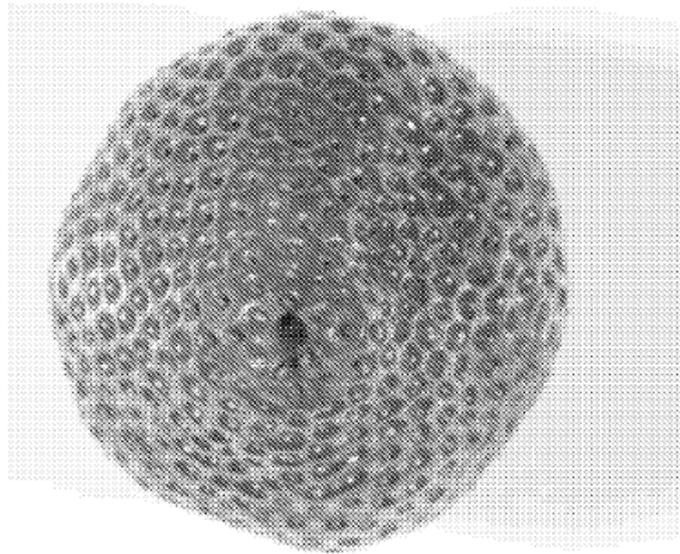


**0.0024 mg**



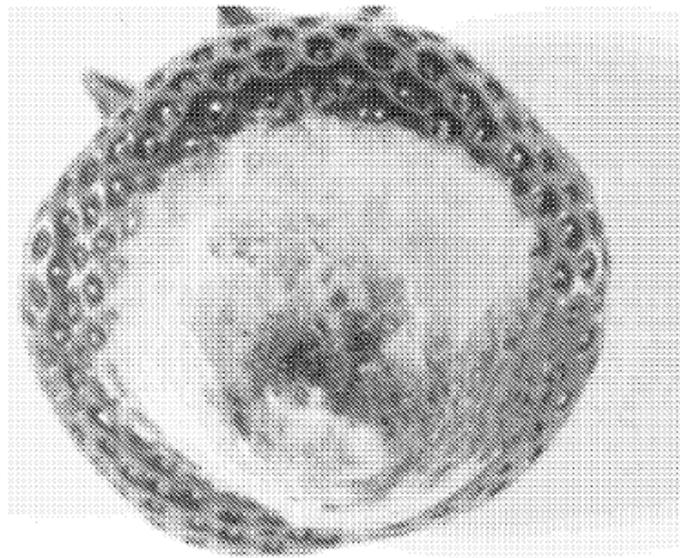
**Control  
Acetona**

Figura 4



0.125 mg Compuesto A (benzoxaborol)

Figura 5A



0 mg (acetona)

Figura 5B