

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 778**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/90** (2006.01)

**A01N 43/36** (2006.01)

**A01P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2014 PCT/EP2014/050443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14108527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2014 E 14700591 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2943068**

54 Título: **Nuevas composiciones antifúngicas**

30 Prioridad:

**14.01.2013 EP 13151116**  
**24.04.2013 EP 13165085**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.10.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STARK, JACOBUS y**  
**SACK, EVA LOUISE WILHELMINE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 637 778 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Nuevas composiciones antifúngicas

**Campo de la invención**

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

**Antecedentes de la invención**

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

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

15 A lo largo de los pasados cuarenta años se han desarrollado y comercializado nuevas clases de fungicidas. Una de esas clases es la clase de los fenilpirroles.

Los fungicidas de fenilpirrol no han sido inmunes a los retos en su desarrollo y mantenimiento. Una gran preocupación ha sido el desarrollo de resistencia. Se ha observado ahora una resistencia a fungicidas de fenilpirrol en varias enfermedades (véase Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2004; Kanelis *et al.*, 2006; Kinay *et al.*, 2007).

20 Durante muchas décadas, se ha utilizado el macrólido de polieno natamicina antimicótico para prevenir el crecimiento de hongos en productos alimentarios tales como quesos y salchichas. Este conservante natural, el cual es producido por fermentación utilizando *Streptomyces natalensis*, es ampliamente utilizado en todo el mundo como conservante de alimentos y tiene un largo historial de uso seguro en la industria alimentaria. Es muy eficaz frente a todos los hongos conocidos de deterioro de los alimentos. A pesar de que la natamicina se ha aplicado durante muchos años, p. ej., en la industria quesera, hasta ahora nunca se ha observado el desarrollo de especies de hongos resistentes.

Por consiguiente, se puede concluir que existe una necesidad seria de composiciones antimicrobianas más eficaces, p. ej. composiciones antifúngicas, para el tratamiento del crecimiento de hongos en y sobre plantas y cultivos.

30 El documento WO2012/117055 describe el uso de composiciones fungicidas sinérgicas que comprenden natamicina y un fungicida dicarboxamida (tal como procimidona, vinclozolin o iprodiona) para tratar productos agrícolas, en particular post-cosecha (ejemplos 1-11; reivindicaciones 1-15).

**Descripción de la invención**

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

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

45 Alternativamente, la sinergia se puede calcular como sigue: la actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales se puede determinar calculando la reducción en el crecimiento de moho observado en productos tratados con los ingredientes activos en comparación con el crecimiento de moho en productos tratados con una composición control. La actividad antifúngica esperado (E en %) de la composición antifúngica combinada que comprende ambos ingredientes activos se puede calcular según la ecuación de Colby (Colby, 1967):  $E = X + Y - [(X \cdot Y) / 100]$ , en donde X e Y son las actividades antifúngicas observadas (en %) de los ingredientes activos individuales X e Y, respectivamente. Si la actividad antifúngica observada (O en %) de la combinación supera la

50

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

En una realización de la invención, el al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol se selecciona del grupo que consiste en fludioxonil y fenpiclonil.

5 En una realización, las composiciones pueden contener también dos o más compuestos antifúngicos diferentes de la familia de los fungicidas de fenilpirrol. Ha de entenderse que derivados de compuestos antifúngicos de la familia de los fungicidas de fenilpirrol incluyen, pero no se limitan a sales o solvatos de compuestos antifúngicos de la familia de los fungicidas de fenilpirrol o formas modificadas de compuestos antifúngicos de la familia de los fungicidas de fenilpirrol también se pueden aplicar en las composiciones de la invención. Ejemplos de productos comerciales que contienen fungicidas de fenilpirrol tal como fludioxonil son los productos con los nombres comerciales Maxim®, Celest® y Switch®. Ejemplos de productos comerciales que contienen fungicidas de fenilpirrol tal como fenpiclonil son productos con los nombres comerciales Beret®, Galbas® y Gambit®. Dichos productos comerciales se pueden incorporar en la presente invención.

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

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

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

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

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

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

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

10  
15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol. Natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol pueden estar presentes en dos paquetes separados, p. ej., recipientes. Los componentes del kit pueden estar en forma seca o en forma líquida en el paquete. Si es necesario, el kit puede comprender instrucciones para disolver los compuestos. Además, el kit puede contener instrucciones para aplicar los compuestos.

20  
25 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para proteger un producto frente a los hongos mediante el tratamiento del producto con natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol. Además, el producto puede ser tratado con otros compuestos antifúngicos/antimicrobianos ya sea antes de, junto con o después del tratamiento de los productos con natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol. El producto puede ser tratado por aplicación secuencial de natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol o viceversa. Alternativamente, el producto puede ser tratado mediante la aplicación simultánea del compuesto antifúngico de polieno natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol. En caso de aplicación simultánea, los compuestos pueden estar presentes en diferentes composiciones que se aplican de forma simultánea o los compuestos pueden estar presentes en una sola composición. En aún otra realización, el producto puede ser tratado por modos de aplicación de los compuestos antifúngicos separados o alternativos. En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de productos mediante la aplicación a los productos de natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol. Al aplicar los compuestos se puede prevenir el crecimiento de hongos sobre o en los productos. En otras palabras, los compuestos protegen los productos frente al crecimiento de hongos y/o a una infección por hongos y/o al deterioro por hongos. Los compuestos también pueden utilizarse para tratar productos que han sido infectados con un hongo. Mediante la aplicación de los compuestos puede ralentizarse, detenerse el desarrollo de la enfermedad debida a los hongos sobre o dentro de estos productos, o los productos pueden incluso ser curados de la enfermedad. En una realización de la invención, los productos son tratados con una composición o kit de acuerdo con la invención. En una realización, el producto es un alimento, pienso, producto farmacéutico, cosmético o producto agrícola. En una realización preferida, el producto es un producto agrícola.

30  
35  
40  
45 Natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol, las composiciones de acuerdo con la invención y los kits de acuerdo con la invención se pueden aplicar a los productos por pulverización. Otros métodos adecuados para aplicar estos compuestos, composiciones y kits en forma líquida a los productos son también una parte de la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, inmersión, riego, empapamiento, introducción en un tanque basculante, vaporización, atomización, nebulización, fumigación, pintura, cepillado, eliminación de polvo, formación de espuma, dispersión, empaquetado y revestimiento (p. ej., por medio de cera o electrostáticamente). Además, los compuestos antifúngicos también se pueden inyectar en el suelo. Es conocido que aplicaciones de pulverización utilizando sistemas automáticos reducen los costos laborales y son rentables. Pueden utilizarse para ese propósito métodos y equipos bien conocidos para una persona experta en la técnica. Las composiciones de acuerdo con la invención se pueden pulverizar regularmente cuando el riesgo de infección es alto. Cuando el riesgo de infección es bajo, los intervalos de pulverización pueden ser más largos. Dependiendo del tipo de aplicación, la cantidad de natamicina aplicada puede variar de 5 ppm a 10.000 ppm, preferiblemente de 10 ppm a 5.000 ppm y lo más preferiblemente de 20 a 1.000 ppm. Dependiendo del tipo de aplicación, la cantidad del al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol aplicadas puede variar de 10 ppm a 5.000 ppm, preferiblemente de 20 ppm a 3.000 ppm y lo más preferiblemente de 50 a 1.000 ppm.

50  
55  
60 En una realización específica del producto agrícola puede ser tratado después de la cosecha. Mediante el uso de natamicina y el al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol se consigue el control de enfermedades post-cosecha y/o de almacenamiento durante un largo período de tiempo para permitir el transporte del producto agrícola cosechado a lo largo de largas distancias y bajo diversas condiciones de

almacenamiento, con diferentes sistemas de atmósfera controlada con respecto a la temperatura y la humedad. Alteraciones de almacenamiento después de la cosecha son, p. ej., manchas lenticulares, chamuscamiento, descomposición senescente, mancha amarga, quemadura, corazón acuoso, pardeamiento, descomposición vascular, lesiones por CO<sub>2</sub>, deficiencia de CO<sub>2</sub> u O<sub>2</sub>, y ablandamiento. Enfermedades provocadas por hongos pueden ser provocadas, por ejemplo, por los siguientes hongos: *Blumeria spp.*, p. ej. *Blumeria graminis*; *Uncinula spp.*, p. ej., *Uncinula necator*, *Leveillula spp.*, p. ej., *Leveillula taurica*; *Podosphaera spp.*, p. ej., *Podosphaera leucotricha*, *Podosphaera fusca*, *Podosphaera aphanis*; *Microsphaera spp.*, p. ej., *Microsphaera syringae*; *Sawadaea spp.*, p. ej., *Sawadaea tulasnei*; *Mycosphaerella spp.*, *Mycosphaerella musae*, *Mycosphaerella fragariae*, *Mycosphaerella citri*; *Mucor spp.*, p. ej., *Mucor piriformis*; *Monilinia spp.*, p. ej., *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*; *Phomopsis spp.*, *Phomopsis natalensis*; *Colletotrichum spp.*, p. ej., *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum coccodes*; *Verticillium spp.*, p. ej., *Verticillium theobromae*; *Nigrospora spp.*; *Botrytis spp.*, p. ej., *Botrytis cinerea*; *Diplodia spp.*, p. ej., *Diplodia citri*; *Pezizula spp.*; *Alternaria spp.*, p. ej., *Alternaria citri*, *Alternaria alternata*; *Septoria spp.*, p. ej., *Septoria depressa*; *Venturia spp.*, p. ej., *Venturia inaequalis*, *Venturia pyrina*; *Rhizopus spp.*, p. ej., *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*; *Glomerella spp.*, p. ej., *Glomerella cingulata*; *Sclerotinia spp.*, p. ej., *Sclerotinia fruticola*; *Ceratocystis spp.*, p. ej. *Ceratocystis paradoxa*; *Fusarium spp.*, p. ej., *Fusarium semitectum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*; *Cladosporium spp.*, p. ej., *Cladosporium fulvum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium cucumerinum*, *Cladosporium musae*; *Penicillium spp.*, p. ej., *Penicillium funiculosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*; *Phytophthora spp.*, p. ej., *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora fragariae*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora parasitica*; *Phacydiopycnis spp.*, p. ej., *Phacydiopycnis malirum*; *Gloeosporium spp.*, p. ej., *Gloeosporium album*, *Gloeosporium perennans*, *Gloeosporium fructigenum*, *Gloeosporium singulata*; *Geotrichum spp.*, p. ej., *Geotrichum candidum*; *Phlyctaena spp.*, p. ej., *Phlyctaena vagabunda*; *Cylindrocarpon spp.*, p. ej., *Cylindrocarpon mail*; *Stemphyllium spp.*, p. ej., *Stemphyllium vesica um*; *Thielaviopsis spp.*, p. ej., *Thielaviopsis paradoxy*; *Aspergillus spp.*, p. ej., *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*; *Nectria spp.*, p. ej., *Nectria galligena*; *Cercospora spp.*, p. ej., *Cercospora angreci*, *Cercospora apii*, *Cercospora atrofiformis*, *Cercospora musae*, *Cercospora zeae-maydis*.

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

En una realización específica, natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol se puede utilizar en medicina, p. ej., para tratar y/o prevenir enfermedades fúngicas. Natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol pueden utilizarse, por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica. La composición puede comprender, además, excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos antifúngicos pueden administrarse por vía oral o parenteral. El tipo de composición depende de la vía de administración.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un producto tratado con natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol. En una realización, el producto se trata con una composición o kit de acuerdo con la invención. Por lo tanto, la invención se dirige a un producto que comprende natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol. Los productos tratados pueden comprender natamicina y al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol en su superficie y/o dentro del producto. Alternativamente, los productos tratados pueden comprender un revestimiento que comprende estos compuestos. En una realización, los productos tratados comprenden de 0,000001 a 200 mg/dm<sup>2</sup>, preferiblemente 0,00001 a 100 mg/dm<sup>2</sup> y más preferiblemente de 0,00005 a 10 mg/dm<sup>2</sup> del natamicina en su superficie. En una realización adicional, comprenden de 0,000001 a 200 mg/dm<sup>2</sup>, preferiblemente 0,00001 a 100 mg/dm<sup>2</sup>, más preferiblemente de 0,00005 a 10 mg/dm<sup>2</sup> del al menos un compuesto antifúngico de la familia de los fungicidas de fenilpirrol en su superficie. En una realización, el producto es un alimento, pienso, producto farmacéutico, cosmético o producto agrícola. En una realización preferida, el producto es un producto agrícola.

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

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

La expresión "producto farmacéutico", tal como se utiliza en esta memoria, también debe entenderse en un sentido muy amplio e incluye productos que comprenden una molécula activa tal como un fármaco, agente o compuesto

farmacéutico y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable, es decir, cualquier sustancia inerte que se combina con la molécula activa para preparar una forma de dosificación agradable o conveniente.

- La expresión "producto cosmético", tal como se utiliza en esta memoria, también debe entenderse en un sentido muy amplio e incluye productos que se utilizan para proteger o tratar tejidos rugosos tales como la piel y los labios, el cabello y las uñas frente al secado mediante la prevención de la transpiración de la humedad de los mismos y, además, el acondicionamiento de los tejidos, así como el proporcionar un buen aspecto a estos tejidos. Productos contemplados por la expresión "producto cosmético" incluyen, pero no se limitan a, cremas hidratantes, productos de limpieza personales, parches de suministro de fármacos oclusivos, esmalte de uñas, polvos, toallitas, acondicionadores para el cabello, emulsiones para el tratamiento de la piel, cremas de afeitar y similares.
- La expresión "productos agrícolas", tal como se utiliza en esta memoria, también debe entenderse en un sentido muy amplio e incluye, pero no se limita a cereales, p. ej., trigo, cebada, centeno, avena, arroz, sorgo y similares; remolachas, p. ej., remolacha azucarera y forrajera; frutas con pepitas y frutas con hueso y bayas, p. ej., manzanas, peras, ciruelas, albaricoques, melocotones, almendras, cerezas, fresas, frambuesas y moras; plantas leguminosas, p. ej., habas, lentejas, guisantes, habas de soja; plantas oleaginosas, p. ej., colza, mostaza, amapola, oliva, girasol, coco, planta del aceite de ricino, cacao, cacahuetes; cucurbitáceas, p. ej., calabazas, pepinillos, melones, pepinos, calabazas, berenjenas; plantas fibrosas, p. ej., algodón, lino, cáñamo, yute; cítricos, p. ej., naranjas, limones, pomelos, mandarinas, limas; frutas tropicales, p. ej., papayas, fruta de la pasión, mangos, carambolas, piñas tropicales, plátanos, kiwis; verduras, p. ej., espinaca, lechuga, espárragos, crucíferas tales como coles y nabos, zanahorias, cebollas, tomates, patatas, patatas de siembra, chile picante y pimientos morrones; plantas similares al laurel, p. ej., aguacate, canela, alcanforero; o productos tales como maíz, tabaco, nueces, café, caña de azúcar, té, vides, lúpulo, plantas de caucho, así como plantas ornamentales, p. ej., flores cortadas, rosas, tulipanes, lirios, narcisos, jacintos, azafranes, dalias, gerbera, claveles, crisantemos, fucsias y bulbos de flores, arbustos, árboles de hoja caduca y árboles de hoja perenne tales como coníferas, plantas y árboles de invernaderos. Incluye, pero no se limita a plantas y sus partes, frutas, semillas, esquejes, cultivares, injertos, bulbos, tubérculos, tubérculos radicales, rizomas, flores cortadas y hortalizas.

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

## EJEMPLOS

### 35 Ejemplo 1

#### *Tratamiento de bananas*

- Por tratamiento se utilizan cuatro bananas (verdes) orgánicas. La piel de cada una de las bananas es lesionada tres veces utilizando un taladracorchos de acuerdo con el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Subsiguientemente, cada una de las lesiones se inocula con 15 µl de una suspensión de *Fusarium proliferatum* que contenía  $1 \times 10^5$  esporas/ml. Después de la incubación durante 4 horas a 20°C, cada una de las lesiones de las bananas se trata con 100 µl de una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprende natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), fludioxonil o ambos. Además, se testa el fungicida de fenilpirrol fenpiclonil solo o en combinación con natamicina. Las composiciones antifúngicas comprenden 1,00% (p/p) de metilhidroxietilcelulosa (MHEC), 0,40% (p/p) de goma xantano, 0,20% (p/p) de agente antiespumante, 0,30% (p/p) de ácido cítrico, 0,39% (p/p) de ácido láctico y 0,11% (p/p) de sorbato de potasio. El pH de la composición es 4.0. Como control se utiliza una composición sin natamicina o un fungicida de fenilpirrol. Las bananas verdes tratadas se incuban en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C y una humedad relativa del aire del 95%, que se obtiene en presencia de una disolución acuosa saturada de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Durante los primeros 20 días de incubación, se incluye una banana madura (amarilla) en la caja cerrada para elevar el nivel de gas de etileno y, así, para inducir la maduración de las bananas verdes tratadas.

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

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

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

- 5 Los resultados demuestran claramente que la composición antifúngica que comprende tanto natamicina como un fungicida de fenilpirrol protege mejor a las bananas frente al desarrollo de moho que natamicina o un fungicida de fenilpirrol solo.

Por lo tanto, la combinación de natamicina y un fungicida de fenilpirrol tiene actividad antifúngica sinérgica sobre las bananas.

## 10 **Ejemplo 2**

### *Tratamiento de fresas*

Por tratamiento se utilizan doce fresas frescas, orgánicas. Cada una de las fresas es lesionada con un corte de 0,5 mm de longitud y cada una de las lesiones se inocula con 10  $\mu$ l de una suspensión de *Botrytis cinerea* que contiene 1 x 10<sup>5</sup> esporas/ml. Después de un período de incubación de 2 horas a 20°C, cada una de las fresas se sumerge individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprende natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), fludioxonil o ambos. Además, se testa el fungicida de fenilpirrol fenpiclonil solo o en combinación con natamicina. Las composiciones antifúngicas también comprenden 1,00% (p/p) de metilhidroxietilcelulosa (MHEC), 0,40% (p/p) de goma xantano, 0,20% (p/p) de agente antiespumante, 0,30% (p/p) de ácido cítrico, 0,39 % (p/p) de ácido láctico y 0,11% (p/p) de sorbato de potasio. El pH de la composición es 4,0. Como control se utiliza una composición sin natamicina o un fungicida de fenilpirrol. Las fresas tratadas se incuban en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C.

Después de la incubación se evalúa el desarrollo de mohos en las fresas de una manera doble: (i) se cuenta el número total de fresas con mohos para un total de 12 fresas, y (ii) se determina la actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales, calculando la reducción en el desarrollo de moho observada en las fresas tratadas con la composición antifúngica en comparación con el desarrollo de moho en las fresas tratadas con la composición de control de acuerdo con el método de Colby descrito en el Ejemplo 1 (Colby, 1967).

Los resultados demuestran que la composición antifúngica que comprende natamicina y un fungicida de fenilpirrol tiene una actividad antifúngica más fuerte sobre fresas que natamicina o un fungicida de fenilpirrol solo.

Por lo tanto, la aplicación combinada de natamicina y un fungicida de fenilpirrol reduce sinérgicamente el desarrollo de moho en fresas.

## 30 **Ejemplo 3**

### *Tratamiento de mandarinas*

Por tratamiento se utilizan diez mandarinas frescas, orgánicas. La cáscara de cada una de las mandarinas es lesionada una vez utilizando un taladrador de acuerdo con el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Subsecuentemente, cada una de las lesiones se inocula con 10  $\mu$ l de una suspensión de *Penicillium italicum* que contiene 1 x 10<sup>4</sup> esporas/ml. Después de incubación durante 2 horas a 20°C, las mandarinas se sumergen individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprende natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), fludioxonil o ambos. Además, se testa el fungicida de fenilpirrol fenpiclonil solo o en combinación con natamicina. Además, composiciones antifúngicas comprenden 3,1% (p/p) de cera de abejas, 0,76% (p/p) de glicerol, 0,66% (p/p) de monoestearato de polioxietileno-sorbitán (Tween 60), 0,03% (p/p) de metilhidroxietilcelulosa (MHEC), 0,02% (p/p) de goma xantano, 0,02% (p/p) de agente anti-espumante, 0,15% (p/p) de ácido cítrico y 0,01% (p/p) de sorbato de potasio. El pH de la composición es 4,0. Como control se utiliza una composición sin natamicina o un fungicida de fenilpirrol.

Las mandarinas tratadas se incuban en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C y se evalúan en el desarrollo de moho después de 25, 28, 31 y 34 días de incubación. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados se determina mediante el cálculo de la reducción en el desarrollo de moho observado en las mandarinas tratadas con la composición antifúngica en comparación con el desarrollo de moho en las mandarinas tratadas con la composición de control de acuerdo con el método de Colby (Colby, 1967) descrito en los Ejemplos 1 y 2.

50 Los resultados demuestran que la composición antifúngica que comprende natamicina y un fungicida de fenilpirrol es superior a las composiciones que comprenden natamicina o un fungicida de fenilpirrol en la prevención del desarrollo de moho en las mandarinas.

Por lo tanto, la aplicación combinada de natamicina y un fungicida de fenilpirrol reduce sinérgicamente el desarrollo de moho en mandarinas.

**Ejemplo 4***Actividad antifúngica in vitro*

Para demostrar la actividad antifúngica sinérgica de la combinación de natamicina con un fungicida de fenilpirrol contra *Botrytis cinerea* se realiza un ensayo *in vitro* utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos. Se testan las siguientes composiciones:

- Control (sin ingrediente activo),
- natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos),
- un fungicida de fenilpirrol,
- natamicina + un fungicida de fenilpirrol.

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

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

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

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

Los resultados demuestran que la combinación de natamicina + fungicida de fenilpirrol tiene una actividad antifúngica mucho más fuerte frente a *Botrytis cinerea* que natamicina y un fungicida de fenilpirrol individualmente.

Por lo tanto, la aplicación combinada de natamicina y un fungicida de fenilpirrol inhibe sinérgicamente el desarrollo de *Botrytis cinerea*.

**Ejemplo 5***Tratamiento de fresas*

Por tratamiento se utilizaron doce fresas frescas, orgánicas. Cada una de las fresas fue lesionada con un corte de 0,5 mm de longitud y cada una de las lesiones se inoculó con 10 µl de una suspensión de *Botrytis cinerea* que contiene  $1 \times 10^5$  esporas/ml. Después de un período de incubación de 3 horas a 20°C, cada una de las fresas se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 500 ppm de fludioxonil o ambos. Cada una de las composiciones antifúngicas también comprendía 3,2% (p/p) de cera de abejas, 0,8% (p/p) de glicerol, 0,7% (p/p) de monoestearato de polioxietilen-sorbitán (Tween 60), 0,1% (p/p) de monooleato de polioxietilen-sorbitán (Tween 80), 0,05% (p/p) de metilhidroxietil-celulosa (MHEC), 0,03% (p/p) de agente anti-espumante, 0,02% (p/p) de goma xantano, 0,02% (p/p) de ácido cítrico, 0,01 % (p/p) de ácido láctico y 0,01% de sorbato de potasio. Como control se utilizó una composición sin natamicina o fludioxonil. Cada una de las composiciones tenía un pH de 4. Las fresas tratadas se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C durante 19 días.

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

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

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

- 5 Los resultados en la Tabla 1 (número de fresas con moho por un total de 12 fresas) y en la Tabla 2 (actividad antifúngica) demuestran inequívocamente que la composición antifúngica combinada que comprende 500 ppm de natamicina y 500 ppm de fludioxonil protegía a las fresas más eficazmente frente al desarrollo de moho que las composiciones que comprenden natamicina o fludioxonil solo.

10 Después de 7, 8, 9, 10 y 11 días de incubación, todas las 12 fresas tratadas con la composición de control o natamicina sola tenían moho, al igual que, respectivamente, 3, 5, 8, 9 y 9 de las 12 fresas tratadas con fludioxonil solo. Sin embargo, ninguna de las 12 fresas tratadas con la combinación de ingrediente activo de natamicina y fludioxonil tuvieron moho en este período de incubación de 11 días (véase la Tabla 1).

15 Los días 12 y 13, todas las 12 fresas tratadas con la composición de control o natamicina sola tenían moho, al igual que 9 y 11 de las 12 fresas tratadas con fludioxonil solo, respectivamente. Sin embargo, de las 12 fresas tratadas tanto con natamicina como fludioxonil, sólo 1 mostró un desarrollo de moho el día 12 y 2 el día 13 (véase la Tabla 1).

Después de 14 a 17 días de incubación, todas las 12 fresas tratadas con la composición de control, natamicina sola o fludioxonil solo tenían moho. Sin embargo, tantas como 8, 6, 3 y 3 de las 12 fresas tratadas tanto con natamicina como con fludioxonil seguían estando libres de desarrollo de moho los días, 14, 15, 16 y 17, respectivamente (véase la Tabla 1).

- 20 Además, la actividad antifúngica observada excedía la actividad antifúngica esperada con aproximadamente 9 a  $> 60\%$  entre 7 y 19 días de incubación. Por consiguiente, el factor de sinergia era siempre  $> 1,0$  y aumentaba de 1,1 el día 7 a incluso de 12 los días 18 y 19 (véase la Tabla 2).

Por lo tanto, la aplicación combinada de 500 ppm de natamicina y 500 ppm de fludioxonil conduce a una reducción sinérgica sorprendentemente fuerte en el desarrollo de moho en fresas.

## 25 **Ejemplo 6**

### *Tratamiento de fresas*

El experimento se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 5, excepto por el hecho de que cada una de las fresas lesionadas e inoculadas se sumergió individualmente durante 1 minuto en una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 250 ppm de fludioxonil o ambos. Durante la incubación, las fresas tratadas se evaluaron en el desarrollo de moho de acuerdo con los dos métodos descritos en el Ejemplo 5.

30 Los resultados en la Tabla 3 (número de fresas con moho por un total de 12 fresas) y en la Tabla 4 (actividad antifúngica) demuestran claramente que la composición antifúngica que comprende 250 ppm de natamicina y 250 ppm de fludioxonil tenía un efecto antifúngico mucho más fuerte sobre las fresas que natamicina o fludioxonil solo.

35 Después de 6 a 9 días de incubación, todas las 12 fresas tratadas con la composición de control tenían moho, al igual que 11 de las 12 fresas tratadas con natamicina sola. Además, de las 12 fresas tratadas con fludioxonil solo, 5 mostraban desarrollo de moho los días 6 a 8, y 8 el día 9. Sin embargo, ninguna de las 12 fresas tratadas con la combinación de ingrediente activo de natamicina y fludioxonil tuvieron moho en este período de incubación de 9 días (véase la Tabla 3).

40 Los días 10 y 11, todas las 12 fresas tratadas con la composición de control o natamicina sola tenían moho, al igual que 9 y 10 de 12 fresas tratadas con fludioxonil solo, respectivamente. Sin embargo, de las 12 fresas tratadas tanto con natamicina como fludioxonil, ninguna mostró un desarrollo de moho el día 10 y sólo una el día 11 (véase la Tabla 3).

45 Después de 12 a 15 días de incubación, todas las 12 fresas tratadas con la composición de control, natamicina sola o fludioxonil solo tenían moho. Sin embargo, de las 12 fresas tratadas tanto con natamicina como con fludioxonil, tantas como 8, 5, 4 y 2 seguían estando libres de moho los días, 12, 13, 14 y 15, respectivamente (véase la Tabla 3).

50 Además, la actividad antifúngica observada era aproximadamente 8 a 60% mayor que la actividad antifúngica esperada entre 6 y 19 días de incubación. Por lo tanto, el factor de sinergia siempre excedía 1,0 y aumentaba de 1,1 el día 6 a incluso  $>20$  los días 18 y 19 (véase la Tabla 4).

Por lo tanto, la aplicación combinada de 250 ppm de natamicina y 250 ppm de fludioxonil tiene un efecto antifúngico sinérgico extremadamente fuerte sobre fresas.

## **Ejemplo 7**

*Tratamiento de naranjas*

Se utilizaron ocho naranjas frescas, orgánicas por tratamiento. Cada una de las naranjas se empapó en una disolución de 180 ppm de hipoclorito durante 10 minutos, después se enjuagó a fondo con agua fresca del grifo y se secó. La cáscara de cada una de las naranjas desinfectadas se lesionó una vez utilizando un taladracorchos de acuerdo con el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Subsiguientemente, cada una de las lesiones se inoculó con 10 µl de una suspensión de *Penicillium italicum* que contiene  $5 \times 10^5$  esporas/ml. Después de incubación durante 3 horas a 20°C, cada una de las lesiones y el área de 1 cm de la cáscara de la naranja alrededor de la lesión se trató con un total de 150 µl de una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprende 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 300 ppm de fludioxonil o ambos. Cada una de las composiciones antifúngicas comprendía también 3,2% (p/p) de cera de abejas, 0,8% (p/p) de glicerol, 0,7% (p/p) de monoestearato de polioxietilen-sorbitán (Tween 60), 0,1% (p/p) de monooleato de polioxietilen-sorbitán (Tween 80), 0,05% (p/p) de metilhidroxietil-celulosa (MHEC), 0,03% (p/p) de agente anti-espumante, 0,02% (p/p) de goma xantano, 0,02% (p/p) de ácido cítrico, 0,01% (p/p) de ácido láctico y 0,01% (p/p) de sorbato de potasio. Como control se utilizó una composición sin natamicina o fludioxonil. Cada una de las composiciones tenía un pH de 4.

Las naranjas tratadas se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C y se evaluaron en el desarrollo de moho durante un periodo de incubación de 27 días. La actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados se determinó de acuerdo con los dos métodos descritos en el Ejemplo 5.

Los resultados en la Tabla 5 (número de naranjas con moho por un total de 8 naranjas) y en la Tabla 6 (actividad antifúngica) revelan claramente que la combinación de ingredientes activos de 500 ppm de natamicina y 300 ppm de fludioxonil tuvo más éxito en limitar el desarrollo de moho en naranjas que natamicina o fludioxonil solo.

Después de 18 a 27 días de incubación, todas las 8 naranjas tratadas con la composición de control tenían moho, al igual que 6 de las 8 naranjas tratadas con natamicina sola y 7 de las 8 naranjas tratadas con fludioxonil solo. Sin embargo, sólo 4 de las 8 naranjas tratadas con la combinación de ingrediente activo de natamicina y fludioxonil tenían moho entre el día 18 y el 27 (véase la Tabla 5).

Además de ello, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende natamicina y fludioxonil era 7 a aproximadamente 20% más alta que la actividad antifúngica esperada entre el día 18 y 27. Por lo tanto, los factores de sinergia correspondientes excedieron todos  $> 1,0$  e incluso aumentaron de 1,2 el día 18 a 1,7 los días 21 a 27 (véase la Tabla 6).

En conclusión, los resultados de este ejemplo demuestran el fuerte efecto antifúngico sinérgico de 500 ppm de natamicina y 300 ppm de fludioxonil cuando se aplican en combinación en naranjas.

**Ejemplo 8***Tratamiento de naranjas*

El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 7, excepto por el hecho de que cada una de las naranjas lesionadas e inoculadas se trató con 150 µl de una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 250 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 100 ppm fludioxonil o ambos. Durante la incubación, las naranjas tratadas se evaluaron en cuanto al desarrollo de moho de acuerdo con los dos métodos descritos en el Ejemplo 5.

Los resultados en la Tabla 7 (número de naranjas con moho por un total de 8 naranjas) y en la Tabla 8 (actividad antifúngica) demuestran que la combinación de ingredientes activos de 250 ppm de natamicina y 100 ppm de fludioxonil tiene una mayor actividad antifúngica sobre las naranjas que natamicina o fludioxonil individualmente.

Después de 14 a 27 días de incubación, todas las 8 naranjas tratadas con la composición de control o fludioxonil mostraron un desarrollo de moho, al igual que 6 o 7 de las 8 naranjas tratadas con natamicina sola. Sin embargo, sólo 4 o 5 de las 8 naranjas tratadas con la combinación de ingrediente activo de natamicina y fludioxonil tuvieron moho entre el día 14 y el 27 (véase la Tabla 7).

Además de ello, la actividad antifúngica observada de la combinación de ingrediente activo de natamicina y fludioxonil era 8 a alrededor de 30% mayor que la actividad antifúngica esperada después de 19 a 27 días de incubación. Por consiguiente, los factores de sinergia oscilaban entre 1,2 el día 19 y 2,8 los días 26 y 27 (véase la Tabla 8).

Por lo tanto, la aplicación combinada de 250 ppm de natamicina y 100 ppm de fludioxonil provoca una fuerte reducción sinérgica en el desarrollo de moho en naranjas.

**Ejemplo 9***Tratamiento de naranjas*

5 El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 7, excepto por el hecho de que cada una de las naranjas lesionadas e inoculadas se trató con 150 µl de una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprendía 500 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 400 ppm fenpiclonil o ambos. Durante un periodo de incubación de 23 días, las naranjas tratadas se evaluaron en cuanto al desarrollo de moho de acuerdo con los dos métodos descritos en el Ejemplo 5.

Los resultados en la Tabla 9 (número de naranjas con moho por un total de 8 naranjas) y en la Tabla 10 (actividad antifúngica) revelan claramente que la combinación de ingredientes activos de 500 ppm de natamicina y 400 ppm de fenpiclonil tenía más éxito en limitar el desarrollo de moho sobre las naranjas que natamicina o fenpiclonil solo.

10 Después de 14 y 15 días de incubación, todas las 8 naranjas tratadas con la composición de control 5 de las 8 naranjas tratadas con natamicina sola y 6 de las 8 naranjas tratadas con fenpiclonil solo mostraron un desarrollo de moho. Sin embargo, sólo 2 de las 8 naranjas tratadas con la combinación de ingrediente activo de natamicina y fenpiclonil tuvieron moho los días 14 y 15 (véase la Tabla 9).

15 Los días 16, 18 y 19 a 23, todas las 8 naranjas tratadas con la composición de control o fenpiclonil solo tenían moho, además de 5 o 6 de las 8 naranjas tratadas con natamicina sola. Sin embargo, entre las 8 naranjas tratadas con la combinación de ingredientes activos de natamicina y fenpiclonil, sólo 2, 3 y 4 mostraron un desarrollo de moho los días 16, 18 y 19 a 23, respectivamente (véase la Tabla 9).

Además de ello, la actividad antifúngica observada de la composición que comprende natamicina y fenpiclonil era 8 a 40% mayor que la actividad antifúngica esperada entre 12 y 23 días de incubación. Por lo tanto, los factores de sinergia correspondientes eran todos > 1,0 y aumentaban de 1,1 el día 12 a 3,6 los días 22 y 23 (véase la Tabla 10).

20 En conclusión, los resultados de este ejemplo demuestran claramente el efecto antifúngico sinérgico de 500 ppm de natamicina y 400 ppm de fenpiclonil cuando se aplican en combinación en naranjas.

### **Ejemplo 10**

#### *Tratamiento de pimientos dulces*

25 Se utilizaron 10 pimientos dulces frescos, orgánicos por tratamiento. La piel de cada uno de los pimientos dulces se lesionó una vez utilizando un taladracorchos de acuerdo con el método descrito por de Lapeyre de Bellaire y Dubois (1987). Subsecuentemente, cada una de las lesiones se inoculó con 15 µl de una suspensión de *Botrytis cinerea* que contenía  $1 \times 10^5$  esporas/ml. Después de la incubación durante 3 horas a 20°C, cada una de las lesiones y el área de la piel de 0,5 cm alrededor de la lesión se trató con un total de 75 µl de una composición antifúngica acuosa recién preparada que comprende 400 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos), 600 ppm de fenpiclonil o ambos. Cada una de las composiciones antifúngicas comprendía también 3,2% (p/p) de cera de abejas, 0,8% (p/p) de glicerol, 0,7% (p/p) de monoestearato de polioxietilen-sorbitán (Tween 60), 0,2% (p/p) de monooleato de polioxietilen-sorbitán (Tween 80), 0,05% (p/p) de metilhidroxietil-celulosa (MHEC), 0,03% (p/p) de agente anti-espumante, 0,02% (p/p) de goma xantano, 0,02% (p/p) de ácido cítrico, 0,01% (p/p) de ácido láctico y 0,01% de sorbato de potasio. Como control se utilizó una composición sin natamicina o fenpiclonil. Cada una de las 35 composiciones tenía un pH de 4.

40 Los pimientos dulces tratados se incubaron en una caja cerrada en la oscuridad a 20°C y se evaluó el desarrollo de moho durante la incubación. La actividad antifúngica (en%) de los ingredientes activos individual y combinado se determinó calculando la reducción en el desarrollo de moho observada en los pimientos dulces tratados con la composición antifúngica en comparación con el desarrollo de moho en los pimientos dulces tratados con la composición de control de acuerdo con el método de Colby (Colby, 1967) tal como se describe en el Ejemplo 5.

Los resultados en la Tabla 11 demuestran que la composición antifúngica combinada que comprenden 400 ppm de natamicina y 600 ppm de fenpiclonil protegía más eficazmente a los de los pimientos dulces contra el desarrollo de moho que las composiciones que comprenden natamicina o fenpiclonil.

45 Después de 47 a 50 días de incubación, la actividad antifúngica observada de la combinación de ingrediente activo de natamicina y fenpiclonil excedía la actividad antifúngica esperada en aproximadamente 30 a 45%, lo que dio como resultado factores de sinergia entre 4,0 y 14,0 (véase la Tabla 11).

Por lo tanto, este ejemplo demuestra el efecto antifúngico sinérgico de la aplicación combinada de 400 ppm de natamicina y 600 ppm de fenpiclonil en pimientos dulces.

### **Ejemplo 11**

#### *Tratamiento de piñas tropicales*

En este experimento se seleccionaron piñas tropicales de una planta de empaquetado localizada en Costa Rica. Estas piñas tropicales fueron seleccionadas en base a la uniformidad en color y tamaño. Además, las mismas estaban libres de desarrollo visual de moho o cualquier otra lesión visual provocada por plagas o enfermedades.

## ES 2 637 778 T3

La superficie de las piñas tropicales se desinfectó primero por inmersión de los frutos durante un minuto en una disolución que comprendía 150 ppm de hipoclorito sódico. A continuación, se secaron los frutos y después se aplicaron las composiciones antimicrobianas sobre los frutos utilizando una regadera modificada. Esta ducha, para simular la cascada de cera utilizada en las plantas de empaquetado de piña tropical, cubrió la corteza de los frutos con una delgada capa de cera. La corona de la piña tropical no fue tratada. Se aplicaron las siguientes composiciones antimicrobianas sobre los frutos:

Composición A: composición acuosa que comprende cera al 20% v/v (STA FRESH 2952);

Composición B: composición acuosa que comprende 200 ppm de natamicina (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos) y cera al 20% v/v (STA FRESH 2952);

Composición C: composición acuosa que comprende 250 ppm de fludioxonil y cera al 20% v/v (STA FRESH 2952);

Composición D: composición acuosa que comprende 200 ppm de natamicina, 250 ppm de fludioxonil y cera al 20% v/v (STA FRESH 2952).

El experimento se realizó cuarenta veces (5 cajas por composición, cada una de las cajas con 8 piñas tropicales). Todas las composiciones tenían un pH de 7,2. Además, las composiciones respectivas se pulverizaron sobre el pedúnculo (la lesión) de cada uno de los frutos tratados a una tasa de 1 ml por fruto. Después de la aplicación de las composiciones, las piñas tropicales se secaron.

Para simular el transporte de las piñas tropicales en un contenedor de transporte, las piñas tropicales se almacenaron en una cámara fría a una temperatura de 7,5°C durante 21 días. Después de 21 días, la temperatura se elevó a 18 a 20°C para simular la vida útil en un supermercado. Las piñas tropicales se almacenaron durante otros 7 días a 18 hasta 20°C. Así, el tiempo total de almacenamiento fue de 28 días.

Después de 28 días, la incidencia de moho sobre las cortezas de las piñas tropicales se evaluó utilizando el siguiente método. Se contó el número de piñas tropicales con incidencia visual de moho en la corteza por un total de 40 piñas tropicales para todas las composiciones. Posteriormente, se determinó la actividad antifúngica (en %) de los ingredientes activos individuales y combinados (composiciones B, C y D), calculando la reducción en la incidencia de moho observada en la corteza de las piñas tropicales en comparación con la composición A. La actividad antifúngica observada de la composición D se comparó con la actividad antifúngica esperada de la composición D de acuerdo con el método de Colby (Colby, 1967) tal como se describe en el Ejemplo 5.

Los resultados (véase la Tabla 12) demuestran que la composición antifúngica que comprende 200 ppm de natamicina y 250 ppm de fludioxonil tiene una actividad antifúngica más fuerte en las piñas tropicales que la natamicina o el fludioxonil solo.

Por lo tanto, la aplicación combinada de natamicina y fludioxonil reduce sinérgicamente el desarrollo de moho en piñas tropicales.

Tabla 1. Número de fresas con moho, incubadas a 20°C después de tratamiento con composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 500 ppm de fludioxonil o ambas.

| Composición Antifúngica                  | Número de fresas con moho/número total de 12 fresas |       |       |            |        |        |        |        |            |
|--|---|-------|-------|------------|--------|--------|--------|--------|------------|
|  | Durante tiempo de incubación (en días)              |       |       |            |        |        |        |        |            |
|  | Día 7   | Día 8 | Día 9 | Días 10-11 | Día 12 | Día 13 | Día 14 | Día 15 | Días 16-17 |
| Control                                  | 12/12   | 12/12 | 12/12 | 12/12      | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12      |
| Natamicina 500 ppm                       | 12/12   | 12/12 | 12/12 | 12/12      | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12      |
| Fludioxonil 500 ppm                      | 3/12  | 5/12  | 8/12  | 9/12       | 9/12   | 11/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm | 0/12  | 0/12  | 0/12  | 0/12       | 1/12   | 2/12   | 4/12   | 6/12   | 9/12       |

ES 2 637 778 T3

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

5

| Composición Antifúngica                  | Tiempo incubación (días) | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Control                                  | 7                        | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 11                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 90                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 100                                   | 91                                   | 1,1                    |
| Control                                  | 8                        | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 14                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 80                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 100                                   | 83                                   | 1,2                    |
| Control                                  | 9                        | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 4,8                                   | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 67                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 100                                   | 68                                   | 1,5                    |
| Control                                  | 10                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 2,4                                   | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 56                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 100                                   | 57                                   | 1,8                    |
| Control                                  | 11                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 2,4                                   | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 52                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 100                                   | 54                                   | 1,9                    |
| Control                                  | 12                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 44                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 98                                    | 44                                   | 2,2                    |
| Control                                  | 13                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 33                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 94                                    | 33                                   | 2,8                    |
| Control                                  | 14                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 24                                    | -                                    | -                      |

ES 2 637 778 T3

| Composición Antifúngica                  | Tiempo incubación (días) | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 90                                    | 24                                   | 3,8                    |
| Control                                  | 15                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 17                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 81                                    | 17                                   | 4,8                    |
| Control                                  | 16                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 13                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 73                                    | 13                                   | 5,6                    |
| Control                                  | 18                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 4,8                                   | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 56                                    | 4,8                                  | 12                     |
| Control                                  | 19                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 500 ppm                      |                          | 3,6                                   | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 500 ppm |                          | 44                                    | 3,6                                  | 12                     |

Tabla 3. Número de fresas con moho incubadas a 20°C después de tratamiento con composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 250 ppm de fludioxonil o ambos.

| Composición Antifúngica                  | Número de fresas con moho/número total de 12 fresas durante el tiempo de incubación (en días) |       |        |        |        |        |        |        |
|--|---|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | Días 6-8  | Día 9 | Día 10 | Día 11 | Día 12 | Día 13 | Día 14 | Día 15 |
| Control                                  | 12/12   | 12/12 | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12  |
| Natamicina 250 ppm                       | 11/12   | 11/12 | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12  |
| Fludioxonil 250 ppm                      | 5/12  | 8/12  | 9/12   | 10/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12  | 12/12  |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm | 0/12  | 0/12  | 0/12   | 1/12   | 4/12   | 7/12   | 8/12   | 10/12  |

5

10

Tabla 4. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 250 ppm de fludioxonil o ambos en fresas tras incubación a 20°C.

5

| Composición Antifúngica                  | Tiempo incubación (días) | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Control                                  | 6                        | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 23                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 89                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 100                                   | 92                                   | 1,1                    |
| Control                                  | 7                        | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 23                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 81                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 100                                   | 86                                   | 1,2                    |
| Control                                  | 8                        | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 18                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 81                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 100                                   | 85                                   | 1,2                    |
| Control                                  | 9                        | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 13                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 69                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 100                                   | 73                                   | 1,4                    |
| Control                                  | 10                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 4,8                                   | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 55                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 100                                   | 57                                   | 1,8                    |
| Control                                  | 11                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 4,8                                   | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 44                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 99                                    | 47                                   | 2,1                    |
| Control                                  | 12                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 1,2                                   | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 32                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 90                                    | 33                                   | 2,7                    |
| Control                                  | 13                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 1,2                                   | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 26                                    | -                                    | -                      |

ES 2 637 778 T3

| Composición Antifúngica                  | Tiempo incubación (días) | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 83                                    | 27                                   | 3,1                    |
| Control                                  | 14                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 1,2                                   | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 19                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 76                                    | 20                                   | 3,8                    |
| Control                                  | 15                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 11                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 70                                    | 11                                   | 6,4                    |
| Control                                  | 16                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 6,0                                   | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 57                                    | 6,0                                  | 9,5                    |
| Control                                  | 18                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 1,2                                   | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 35                                    | 1,2                                  | 29                     |
| Control                                  | 19                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 250 ppm |                          | 20                                    | 0                                    | >20                    |

Tabla 5. Número de naranjas con moho incubadas a 20°C después de tratamiento con composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 300 ppm de fludioxonil o ambos

| Composición antifúngica                  | Número de naranjas con moho/número total de 8 naranjas durante el tiempo de incubación (en días) |
|--|--|
|  | <i>Días 18 - 27</i>  |
| Control                                  | 8/8  |
| Natamicina 500 ppm                       | 6/8  |
| Fludioxonil 300 ppm                      | 7/8  |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 300 ppm | 4/8  |

5

Tabla 6. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 300 ppm de fludioxonil o ambos en naranjas tras incubación a 20°C.

ES 2 637 778 T3

| Composición antifúngica                  | Tiempo incubación (días) | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Control                                  |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 32                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 300 ppm                      |                          | 17                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 300 ppm | 18                       | 50                                    | 43                                   | 1,2                    |
| Control                                  |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 29                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 300 ppm                      | 19                       | 17                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 300 ppm |                          | 50                                    | 40                                   | 1,3                    |
| Control                                  |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 20                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 300 ppm                      | 20                       | 17                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 300 ppm |                          | 50                                    | 33                                   | 1,5                    |
| Control                                  |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 16                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 300 ppm                      | 21                       | 17                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 300 ppm |                          | 50                                    | 30                                   | 1,7                    |
| Control                                  |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 14                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 300 ppm                      | 22-27                    | 17                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fludioxonil 300 ppm |                          | 50                                    | 29                                   | 1,7                    |

- 5 Tabla 7. Número de naranjas con moho incubadas a 20°C después de tratamiento con composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 100 ppm de fludioxonil o ambos.

| Composición antifúngica                  | Número de naranjas con moho/número total de 8 naranjas durante el tiempo de incubación (en días) |                     |                   |
|--|--|---------------------|-------------------|
|  | <i>Días 14 - 18</i>  | <i>Días 19 - 22</i> | <i>Días 23-27</i> |
| Control                                  | 8/8  | 8/8                 | 8/8               |
| Natamicina 250 ppm                       | 6/8  | 7/8                 | 7/8               |
| Fludioxonil 100 ppm                      | 8/8  | 8/8                 | 8/8               |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 100 ppm | 4/8  | 4/8                 | 5/8               |

- 10 Tabla 8. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 250 ppm de natamicina, 100 ppm de fludioxonil o ambos en naranjas tras incubación a 20°C.

ES 2 637 778 T3

| Composición antifúngica                  | Tiempo incubación (días) | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Control                                  | 19                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 36                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 100 ppm                      |                          | 9                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 100 ppm |                          | 50                                    | 42                                   | 1,2                    |
| Control                                  | 20                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 34                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 100 ppm                      |                          | 2                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 100 ppm |                          | 50                                    | 35                                   | 1,4                    |
| Control                                  | 21                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 32                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 100 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 100 ppm |                          | 50                                    | 32                                   | 1,6                    |
| Control                                  | 22                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 29                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 100 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 100 ppm |                          | 50                                    | 29                                   | 1,7                    |
| Control                                  | 23                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 25                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 100 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 100 ppm |                          | 48                                    | 25                                   | 1,9                    |
| Control                                  | 25                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 19                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 100 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 100 ppm |                          | 48                                    | 19                                   | 2,5                    |
| Control                                  | 26-27                    | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm                       |                          | 17                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 100 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 250 ppm + fludioxonil 100 ppm |                          | 48                                    | 17                                   | 2,8                    |

Tabla 9. Número de naranjas con moho incubadas a 20°C después de tratamiento con composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 400 ppm de fenpiclonil o ambos

| Composición antifúngica | Número de naranjas con moho/número total de 8 naranjas durante el tiempo de incubación (en días) |        |        |              |
|-------------------------|--|--------|--------|--------------|
|                         | Días 14 - 15   | Día 16 | Día 18 | Días 19 - 23 |
| Control                 | 8/8  | 8/8    | 8/8    | 8/8          |

ES 2 637 778 T3

| Composición antifúngica                  | Número de naranjas con moho/número total de 8 naranjas durante el tiempo de incubación (en días) |        |        |              |
|--|--|--------|--------|--------------|
|  | Días 14 - 15   | Día 16 | Día 18 | Días 19 - 23 |
| Natamicina 500 ppm                       | 5/8  | 5/8    | 6/8    | 6/8          |
| Fenpiclonil 400 ppm                      | 6/8  | 8/8    | 8/8    | 8/8          |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm | 2/8  | 2/8    | 3/8    | 4/8          |

Tabla 10. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 500 ppm de natamicina, 400 ppm de fenpiclonil o ambos en naranjas incubadas a 20°C.

| Composición antifúngica                  | Tiempo incubación (días) | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica observada esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--|------------------------|
| Control                                  | 12                       | 0                                     | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 55                                    | -  | -                      |
| Fenpiclonil 400 ppm                      |                          | 78                                    | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm |                          | 98                                    | 90   | 1,1                    |
| Control                                  | 13                       | 0                                     | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 52                                    | -  | -                      |
| Fenpiclonil 400 ppm                      |                          | 70                                    | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm |                          | 94                                    | 86   | 1,1                    |
| Control                                  | 14                       | 0                                     | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 48                                    | -  | -                      |
| Fenpiclonil 400 ppm                      |                          | 66                                    | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm |                          | 92                                    | 82   | 1,1                    |
| Control                                  | 15                       | 0                                     | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 45                                    | -  | -                      |
| Fenpiclonil 400 ppm                      |                          | 59                                    | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm |                          | 90                                    | 78   | 1,1                    |
| Control                                  | 16                       | 0                                     | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 43                                    | -  | -                      |
| Fenpiclonil 400 ppm                      |                          | 47                                    | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm |                          | 85                                    | 70   | 1,2                    |
| Control                                  | 18                       | 0                                     | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 32                                    | -  | -                      |
| Fenpiclonil 400 ppm                      |                          | 28                                    | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm |                          | 81                                    | 51   | 1,6                    |
| Control                                  | 19                       | 0                                     | -  | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 29                                    | -  | -                      |

ES 2 637 778 T3

| Composición antifúngica                  | Tiempo incubación (días) | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Fenpiclonil 400 ppm                      |                          | 17                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm |                          | 73                                    | 41                                   | 1,8                    |
| Control                                  | 20                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 20                                    | -                                    | -                      |
| Fenpiclonil 400 ppm                      |                          | 6                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm |                          | 65                                    | 25                                   | 2,6                    |
| Control                                  | 21                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 16                                    | -                                    | -                      |
| Fenpiclonil 400 ppm                      |                          | 3                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm |                          | 54                                    | 19                                   | 2,8                    |
| Control                                  | 22-23                    | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm                       |                          | 14                                    | -                                    | -                      |
| Fenpiclonil 400 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 500 ppm + fenpiclonil 400 ppm |                          | 50                                    | 14                                   | 3,6                    |

Tabla 11. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 400 ppm de natamicina, 600 ppm de fenpiclonil o ambos en pimientos dulces tras incubación a 20°C.

| Composición antifúngica                  | Tiempo incubación (días) | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Control                                  | 47                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 400 ppm                       |                          | 15                                    | -                                    | -                      |
| Fenpiclonil 600 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 400 ppm + Fenpiclonil 600 ppm |                          | 60                                    | 15                                   | 4,0                    |
| Control                                  | 48                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 400 ppm                       |                          | 6                                     | -                                    | -                      |
| Fenpiclonil 600 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 400 ppm + Fenpiclonil 600 ppm |                          | 48                                    | 6                                    | 7,6                    |
| Control                                  | 49                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 400 ppm                       |                          | 4                                     | -                                    | -                      |
| Fenpiclonil 600 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 400 ppm + Fenpiclonil 600 ppm |                          | 41                                    | 4                                    | 11,0                   |
| Control                                  | 50                       | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 400 ppm                       |                          | 3                                     | -                                    | -                      |
| Fenpiclonil 600 ppm                      |                          | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 400 ppm + Fenpiclonil 600 ppm |                          | 35                                    | 3                                    | 14,0                   |

## ES 2 637 778 T3

| Composición antifúngica | Tiempo incubación (días) | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Fenpiclonil 600 ppm     |                          |                                       |                                      |                        |

Tabla 12. Actividad antifúngica (%) de composiciones que comprenden 200 ppm de natamicina, 250 ppm de fludioxonil o ambos en piñas tropicales después de 28 días de almacenamiento (21 días a 7,5°C y posteriormente 7 días a 18 hasta 20°C).

5

| Composición antifúngica                  | Actividad antifúngica observada O (%) | Actividad antifúngica esperada E (%) | Factor de sinergia O/E |
|--|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Control                                  | 0                                     | -                                    | -                      |
| Natamicina 200 ppm                       | 35                                    | -                                    | -                      |
| Fludioxonil 250 ppm                      | 90                                    | -                                    | -                      |
| Natamicina 200 ppm + Fludioxonil 250 ppm | 97,5                                  | 93,5                                 | 1,04                   |

### REFERENCIAS

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

10 Kanetis L, Forster H, Jones CA, Borkovich KA y Adaskaveg JE (2008), Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* 98: 2005-214.

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

15 Moyano C, Gomez V y Melgarejo P (2004), Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *J. Phytopathology* 152: 484-490.

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

**REIVINDICACIONES**

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