

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 454**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/10** (2006.01)

**A01N 65/08** (2009.01)

**A01P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2014 PCT/IB2014/000221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14132120**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2014 E 14712341 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2961272**

54 Título: **Extracto de café que contiene ácido protocatecuico y su uso en agroquímica contra patógenos**

30 Prioridad:

**28.02.2013 EP 13001018**

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

**21.12.2017**

73 Titular/es:

**SUSTAINABLE AGRO SOLUTIONS, SA (100.0%)  
Ctra. N-240, km 110  
25100 Almacelles (Lleida), ES**

72 Inventor/es:

**GIL ROMERO, JUAN, FERNANDO;  
ECHEVERRI LÓPEZ, LUIS, FERNANDO y  
JUSTRIBÓ ABÓS, FRANCESC XAVIER**

74 Agente/Representante:

**TORNER LASALLE, Elisabet**

ES 2 647 454 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

Extracto de café que contiene ácido protocatecuico y su uso en agroquímica contra patógenos de plantas

## 5 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un extracto, en forma acuosa y seca, de pulpa de café, a un procedimiento para su preparación y a su uso en agroquímica contra patógenos de plantas, especialmente contra infecciones fúngicas. La invención también se refiere al uso del componente activo principal contenido en el extracto, ácido protocatecuico (PA), en agroquímica en particular para su uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones por hongos biotróficos en plantas y/o la prevención de patógenos fúngicos tales como *Hemileia vastatrix*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Verticillium dahlie*.

## 15 Antecedentes técnicos

Las infecciones fúngicas provocan daños severos a cultivos agrícolas, especialmente, pero sin limitarse a, cultivos de café. En lo que se refiere al café, los hongos atacan las hojas y, si no se tratan eficazmente las plantas, la producción de café puede verse fatalmente perjudicada.

20 Los hongos biotróficos colonizan tejido vegetal vivo y obtienen nutrientes de células huésped vivas. Entre estos hongos, *Hemileia vastatrix* crece sobre las hojas y provoca un parasitismo (denominado "roya del café") que puede dar como resultado graves pérdidas económicas. En el caso de la producción de café, *Hemileia vastatrix* provoca una enfermedad que es devastadora para los cultivos de café y puede entenderse fácilmente que en países en los que la producción y exportación de café es la principal fuente de ingresos, tales como países de Latinoamérica y Centroamérica, esta infección puede ser económicamente devastadora.

30 E. Bladyka en "Some insights on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*)" The specialty coffee chronicle, Digital Edition, 15 de Febrero de 2013, recuperado de Internet, divulga extensiblemente la roya del café, cómo se propaga y sus efectos devastadores.

Con el fin de limitar esta clase de infecciones, generalmente se usan agentes antimicóticos sintéticos convencionales, tales como azoles, entre otros ciproconazol, o una mezcla de agentes activos. Sin embargo, los resultados no siempre son satisfactorios y estos agentes sintéticos provocan el desarrollo de resistencia a fungicidas en patógenos de plantas de modo que siempre se necesita el descubrimiento y desarrollo de nuevos fungicidas.

35 Otro grave inconveniente producido por el uso de agentes antimicóticos sintéticos es que estos agentes pasan al entorno, contaminando así el suelo, agua, etc.

40 Aziz N H y otros, "Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compound", Microbios, Cambridge GB, vol. 93, nº 374, Enero de 1998, páginas 45-54, divulga la actividad antifúngica de algunos compuestos fenólicos aislados del orujo de la aceituna. Se reporta que el ácido protocatecuico ha sido testado ante dos hongos micotoxigénicos, concretamente *Aspergillus flavus* y *Apergillus parasitucs*.

45 Jose R Ramirez-Martinez en "Phenolic compounds in coffee pulp: Quantitative determination by HPLC" Journal of the science of food and agriculture, vol. 43, nº 2, 1 de Enero de 1998, páginas 135-144, divulga un análisis en diferentes cultivares de café para comprobar el contenido de compuestos fenólicos, concretamente la determinación por HPLC de los contenidos de compuestos fenólicos, entre otros el ácido protocatecuico. Se muestra que los compuestos fenólicos son esencialmente similares en los diferentes cultivares y que no hay una diferencia significativa entre cultivares que son susceptibles o resistentes a la roya de las hojas.

50 Por tanto, existe una necesidad de nuevas sustancias activas contra patógenos de plantas, especialmente contra hongos, que sean altamente eficaces y posiblemente respetuosas con el medio ambiente.

55 Tal como se conoce, para producir café en polvo, se divide la cereza de la planta de café, es decir se retiran la pulpa (mesocarpio) y la cáscara (endocarpio) de la cereza y se recoge la semilla (o grano) y se seca y se muele. La pulpa y la cáscara son materiales sin interés comercial práctico y por tanto deben eliminarse. Teniendo en cuenta la producción mundial de café, puede entenderse fácilmente que constituyen una enorme cantidad de producto que debe eliminarse, con un impacto económico muy importante. A la vista de esto, deben investigarse nuevos usos rentables de estos materiales.

## 60 Sumario de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar nuevos agentes activos contra patógenos de plantas, especialmente contra hongos, que sean muy eficaces y que no provoquen daños al ecosistema. También se proporciona un

procedimiento para la preparación de nuevos agentes activos contra patógenos de plantas que se preparan usando residuos que de otro modo tendrían que eliminarse.

5 Otro objeto de la invención es un método para el tratamiento y/o la prevención de infecciones por *Hemileia vastatrix* en plantas.

Aún otro objeto de la invención es ácido protocatecuico (PA) para su uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones fúngicas biotróficas en plantas causadas por *Hemileia vastatrix*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp*, y *Phytophthora capsici*.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la inhibición en respuesta a la dosis de la germinación de esporas de *Hemileia vastatrix* por ácido protocatecuico (PA).

15 La figura 2 muestra los efectos del tratamiento con ácido protocatecuico (PA) sobre hojas de café infectadas por *Hemileia vastatrix*.

20 La figura 3 muestra el desarrollo de roya en café a lo largo del tiempo para cada tratamiento.

La figura 4 muestra un análisis global del porcentaje de infección de roya durante la prueba.

25 La figura 5 muestra observaciones en el campo. Izquierda: reacción de hipersensibilidad en las hojas de café tratadas con un extracto acuoso PA05 (3%), derecha: hojas con tratamiento de control.

La figura 6 muestra el porcentaje de incidencia de roya a lo largo de la prueba en la plantación de San Fernando.

La figura 7 muestra la evolución del índice de severidad de la roya en la plantación de San Fernando.

30 La figura 8 muestra el promedio del índice de severidad en cada uno de los tratamientos evaluados.

La figura 9 muestra el promedio del porcentaje de incidencia de roya en los tratamientos evaluados (pruebas de campo en 2012).

35 La figura 10 muestra la evolución del porcentaje de incidencia de roya durante la prueba (prueba de campo en 2013).

La figura 11 muestra la evolución del índice de severidad de la roya durante la misma prueba.

40 La figura 12 muestra el promedio del porcentaje de incidencia de roya en cada tratamiento

La figura 13 muestra el promedio de la severidad de la roya en cada tratamiento

45 La figura 14 muestra el promedio del porcentaje de incidencia de roya por estrato en cada tratamiento.

La figura 15 muestra el promedio de la severidad de la roya por estrato en cada tratamiento.

50 La figura 16 muestra el porcentaje de uredosporas no germinadas a las 15, 40 y 64 horas de exposición (pruebas de laboratorio en 2013).

La figura 17 muestra el efecto de la dosificación de PA en la inhibición de uredosporas de roya.

55 La figura 18 muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de diferentes fitopatógenos expuestos a 0, 0,5 y 2 cc/l de compuesto sintetizado (PA5).

La figura 19 muestra el promedio del porcentaje de incidencia de roya mediante tratamiento con (PA5) solo o en combinación con inductores de defensa adicionales seleccionados de polisacáridos de pared celular (PC).

60 La figura 20 muestra el promedio del porcentaje de severidad de la roya mediante el mismo tratamiento.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a la prevención y/o el tratamiento de infecciones fúngicas en plantas por los hongos: *Hemileia vastatrix*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp*, y *Phytophthora capsici*.

65

Por tanto, según uno de sus aspectos, la presente invención se refiere a un extracto de pulpa de café de *Coffea arabica*, tal como Colombia, Bourbon, Castillo y Catimor, preferiblemente *Coffea arabica* var. Caturra, que comprende al menos el 0,5% (p/p) de ácido 3,4-dihidroxibenzoico (a continuación en el presente documento también "ácido protocatecuico") para combatir *Hemileia vastatrix*.

Según una realización preferida, la cantidad de ácido protocatecuico es de aproximadamente el 0,1-10% (p/p), de manera preferible aproximadamente el 0,5-5% (p/p), ventajosamente el 5% (p/p).

El extracto de la invención puede prepararse mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- a) extraer mediante percolación pulpa de café con un alcohol inferior;
  - b) retirar dicho alcohol inferior mediante filtración y recuperar la pulpa y/o la cascarilla de café;
  - c) volver a extraer la pulpa de café de la etapa b) con una mezcla de acetona/agua;
  - d) retirar la mezcla de acetona/agua mediante filtración, recuperar la mezcla de acetona/agua filtrada y evaporar la acetona, obteniendo así un extracto acuoso;
- proporcionando entonces un extracto acuoso denominado en este caso PA05.

Por tanto, siguiendo las etapas de procedimiento a) a d) puede obtenerse un extracto que comprende al menos el 0,5% (p/p) de ácido protocatecuico, generalmente el 0,5-5% (p/p). Además de ácido protocatecuico (PA), otras sustancias tales como procianidina, fenoles de bajo peso molecular, catequinas y taninos.

Puede obtenerse un extracto refinado (concentrado/secado), denominado en este caso PA1, añadiendo a las etapas anteriores a) a d) las siguientes etapas:

- e) tratar el extracto acuoso filtrado en la etapa d) con una resina;
- f) tratar la resina de la etapa e) con un alcohol inferior obteniendo así un extracto de alcohol;
- g) concentrar el extracto de alcohol de la etapa f).

Opcionalmente el extracto puede concentrarse adicionalmente mediante la siguiente etapa:

- h) liofilizar o secar por pulverización el extracto de la etapa g).

Este extracto liofilizado o secado por pulverización comprende al menos el 30% de ácido protocatecuico. En una realización preferida dicho extracto liofilizado o secado por pulverización comprende del 30 al 50% de ácido protocatecuico.

Según las realizaciones preferidas de la invención:

- la expresión "alcohol inferior" significa un alcohol alifático C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, tal como metanol, etanol, propanoles tales como por ejemplo isopropanol, etc.; etanol es el alcohol inferior más ventajoso;
- las extracciones de las etapas a) y c) se completan generalmente en unos pocos días, por ejemplo en tres días;
- en la etapa a) las proporciones de (pulpa de café)/(alcohol inferior) son de aproximadamente 1 kg/1-3 litros;
- cuando se usa etanol, es etanol al 80% (v/v) o etanol al 95% (v/v);
- la mezcla de acetona/agua está en una proporción de aproximadamente 2/3 (v/v);
- en la etapa c) las proporciones de (pulpa de café)/(mezcla de acetona/agua) son de aproximadamente 1 kg/1-2 litros;
- en la etapa d) la acetona se evapora a vacío;
- en la etapa e) la resina se selecciona de resinas moderadamente polares, resinas iónicas, resinas mesoporosas; ventajosamente, la resina es una resina acrílica moderadamente polar tal como resina XAD7;
- en la etapa e) las proporciones de extracto/resina son de aproximadamente 1 litro/100 g;

- en la etapa f) las proporciones de resina/alcohol inferior son de aproximadamente 100 g de resina/1 litro de alcohol inferior.

5 La etapa a) no es obligatoria, pero es útil para retirar azúcares del material de partida.

De cualquier modo, como procedimiento alternativo, pueden eliminarse las etapas a) y b) y puede extraerse directamente la pulpa de café según la etapa c).

10 Para su uso, cualquiera de los extractos de la invención se diluye ventajosamente con un disolvente oportuno, preferiblemente agua.

El extracto final es un material semisólido de color marrón oscuro.

15 El extracto de la invención también puede liofilizarse o secarse por pulverización con el fin de transportarlo más fácilmente; el extracto liofilizado puede diluirse entonces simplemente con agua en el momento de su uso.

20 Para su uso, el extracto puede diluirse con un disolvente oportuno, preferiblemente agua, hasta una concentración del 3,0-0,1% (p/v). El tratamiento de las plantas con el extracto de la invención se lleva a cabo ventajosamente con una disolución acuosa al 3,0-0,1% (p/v) del extracto.

25 El método de la invención puede realizarse pulverizando en las plantas que van a tratarse, especialmente pulverizando en las hojas de las plantas, una disolución acuosa del extracto, preferiblemente una disolución acuosa al 3,0-0,1% (p/v) del extracto. En los usos y/o métodos relativos al tratamiento y/o la prevención de infecciones fúngicas en plantas de acuerdo con la presente invención, el ácido protocatecuico se puede diluir en agua hasta una concentración de aproximadamente el 0,15-0,005% (p/v). Sin embargo, si es necesario pueden prepararse diferentes concentraciones.

30 Según las realizaciones preferidas, las infecciones por patógenos anteriores son infecciones fúngicas, preferiblemente infecciones por hongos biotróficos, especialmente infecciones por *Hemileia vastatrix*.

Según otras realizaciones preferidas, las plantas anteriores son plantas de café.

35 Una composición acuosa que comprende el 3,0-0,1% (p/v) del extracto de la invención junto con excipientes adecuados representa otro objeto de la invención.

Dicha disolución acuosa también puede comprender agentes antifúngicos adicionales y/o agentes que actúan como inductores de defensa.

40 Por ejemplo, y según una realización preferida, la disolución también puede comprender uno o más inductores de defensa tales como agentes seleccionados de polisacáridos de pared celular tales como pectina; polisacáridos tales como dextrina; gomas exudadas de plantas tales como gomas tragacanto, xantana, arábica, karaya o almáciga; y monosacáridos tales como glucosamina.

45 Se encontró sorprendentemente que el extracto de la invención es particularmente eficaz en el tratamiento, y también en la prevención, de infecciones fúngicas en plantas.

Se llevaron a cabo ensayos experimentales y se dan a conocer en detalle en la sección experimental de esta descripción.

50 En resumen, se llevaron a cabo pruebas *in vitro* para evaluar la mitad de la concentración eficaz máxima (CE<sub>50</sub>) del componente activo principal, es decir ácido protocatecuico, sobre esporas fúngicas.

También se llevaron a cabo experimentos con hojas y con los cultivos, con resultados muy interesantes.

55 Sección experimental

Ensayos en campo con PA para el control de la roya de hojas de café

60 Sistema patógeno y condiciones experimentales

Se han realizado ensayos en campo durante 4 años (2010-2013) con café "Caturra" (sensible) a la roya de hojas de café provocada por el patógeno, hongos *Hemileia vastatrix*.

En todas las pruebas se comparó el producto PA con un fungicida químico convencional (los fungicidas convencionales se aplican cada 45 días, 4-5 aplicaciones por ciclo); cuando fue posible se evaluó un control sin tratamiento. El volumen total por hectárea usado para las pulverizaciones foliares en café de 2-4 años de edad es de 500 l/Ha.

5 Los ensayos en campo se realizaron en Colombia, las pulverizaciones comenzaron tras la floración hasta la temporada de cosecha, durante este tiempo la presión de la enfermedad se vuelve alta, debido a las condiciones de alta humedad (lluvia) y altas producciones por árbol de café.

10 Formulaciones sometidas a prueba: riqueza, concentración y dosificación/Ha

Las variables implicadas fueron las siguientes:

- 15 • 3 formulaciones: PA05 (extracto acuoso), PA1 (extracto refinado o secado-concentrado) y PA5 (ácido protocatecuico sintético) con diferentes riquezas de ácido protocatecuico (PA): PA al 0,5, 1,0 y 5,0% p/p.
- 4 concentraciones de PA5 en la dilución de aplicación foliar: entre el 0,005, 0,05, 0,10 y 0,15% (p/v).
- 20 • 4 dosificaciones de PA por hectárea: 2,5, 25, 50 y 75 g de PA/Ha.

20 Hipótesis demostrada

2010 -> PA05 (riqueza de PA al 0,5%); concentración del 3% (dilución para hojas de 30 cc/l), cada 45 días.

25 2011 -> PA05 (riqueza de PA al 0,5%); concentración del 1% (dilución para hojas de 10 cc/l), cada 45 días.

2012 -> PA05 (riqueza de PA al 0,5%); concentración del 1% (dilución para hojas de 10 cc/l), cada 45 días.

30 -> PA05 (riqueza de PA al 0,5%); concentración del 0,1% (dilución para hojas de 1 cc/l), cada 45 días.

-> PA1 (riqueza de PA al 1%); concentración del 1% (dilución para hojas de 10 cc/l), cada 45 días.

2013 -> PA5 (riqueza de PA al 5%); concentración del 0,2% (dilución para hojas de 2 cc/l), cada 45 días.

35 Los siguientes informes de ensayo de campo se realizaron todos en condiciones confidenciales.

Resultados observados

Ensayo en campo en 2010

40 Se llevó a cabo un ensayo exploratorio para evaluar la eficacia de posibles activadores de defensa de plantas en el café. El ensayo se realizó en una granja comercial ubicada en Faraones-Bolívar-Antioquia-Colombia incluyendo un fungicida convencional y un control sin tratamiento. La unidad experimental estaba formada por 100 plantas de café (2 años de edad) de la variedad "Caturra", que se pulverizaron cada 45 días. Se evaluó la progresión de la enfermedad como porcentaje de infección por roya de hojas de café frente a un fungicida convencional.

45 Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que PA05 (3%) es eficaz en el control de la roya de hojas de café. El porcentaje de infección de la enfermedad permaneció inferior al 10% hasta 40 días tras la primera pulverización. A lo largo del tiempo la enfermedad continúa su evolución, alcanzando un 20% de la infección a los 60 días. Esta evidencia de enfermedad se mantuvo hasta 100 días tras la primera pulverización; durante este ensayo se realizaron 2 pulverizaciones foliares. A los 100 días tras la primera pulverización el porcentaje de infección de roya de hojas de café era similar a aquél con fungicida convencional. En el control sin tratamiento el desarrollo de la enfermedad aumentó alcanzando los mayores porcentajes de infección hasta el final del ensayo (figura 3)

55 El análisis global, a los 100 días tras la primera pulverización, demuestra que las plantas de café tratadas con el producto PA05 (3%) muestran el porcentaje de infección de roya de hojas de café más bajo y significativo en comparación con el resto de los tratamientos (figura 4). Además de estos resultados de infección de la enfermedad, se observó que el producto PA05 (3%) provoca una reacción de hipersensibilidad en las hojas de las plantas de café con síntomas de roya de hojas de café (pústulas). Esta reacción de hipersensibilidad es una respuesta de defensa de la planta debido a la actividad antioxidante para enfrentarse a la infección de roya. Esta respuesta de HR sólo se observó en las hojas de café con pústulas. Esto indica que PA tiene probablemente dos modos de acción; uno fungicida y al mismo tiempo desencadena la activación de las respuestas de defensa de las plantas de café (figura 5).

65 Ensayo en campo en 2011

Durante este año se realizó otra prueba en la granja de San Fernando, ubicada en el mismo lugar y el ensayo se llevó a cabo usando el mismo protocolo descrito anteriormente. Este ensayo se realizó entre los meses de agosto y diciembre de 2011. En esta prueba se evaluó la eficacia de PA05 (1%) frente al fungicida convencional y un control sin tratamiento durante agosto y diciembre de 2011.

Las plantas de café usadas para este ensayo tenían 2 años de edad y sin mucha producción durante 2010. Sin embargo, el porcentaje de incidencia de roya de hojas de café, en todos los tratamientos, no superó el 10% hasta 90 días después de la primera pulverización. Cuando aumentaron las lluvias, el desarrollo de la enfermedad progresó de una manera natural en el control sin tratamiento. El porcentaje de infección de hojas en el tratamiento con PA05 (1%) fue similar en comparación con el fungicida convencional; no se observaron diferencias significativas (figura 6).

El análisis del índice de severidad muestra la eficacia de PA05 (1%) para controlar la roya de hojas de café. Las plantas tratadas con PA05 (1%) mostraron menos severidad durante el ensayo, seguido por el fungicida convencional (figuras 7 y 8).

#### Ensayos en campo en 2012

Durante este año se llevó a cabo un nuevo ensayo en campo con el fin de confirmar los resultados de 2010 y 2011. El ensayo se realizó en la misma ubicación, Faraones-Bolívar-Antioquia-Colombia. La unidad experimental estaba formada por 100 plantas de café "Caturra", de 3 años de edad. Las pulverizaciones se realizaron cada 45 días entre mayo y diciembre. En este ensayo, se evaluó la eficacia de los productos PA05 (1%), PA05 (0,1%) y PA1 (1%) frente a un fungicida convencional. Se evaluó la progresión de la enfermedad en cuanto al índice de severidad antes de cada pulverización.

Los resultados muestran que los tratamientos evaluados reducen significativamente la severidad de la roya de hojas de café en comparación con el control sin tratamiento. No obstante, el índice de severidad de la roya fue menor en las plantas de café en las que se pulverizó PA05 (0,1%) y PA1 (1%) en comparación con el control sin tratamiento y el fungicida convencional (figura 9).

#### Ensayos en campo en 2013

Durante este año se llevó a cabo un nuevo ensayo en campo en una granja comercial diferente y aumentando el tamaño del terreno. El objetivo del ensayo era evaluar la eficacia del producto PA5 (0,2%). El ensayo se realizó en Amagá-Antioquia-Colombia entre mayo y diciembre. La unidad experimental estaba formada por 500 plantas de café, de 3 años de edad, "Caturra", que se pulverizaron cada 45 días. Se evaluó la progresión de la enfermedad como porcentaje de incidencia e índice de severidad de la roya de hojas de café.

El análisis del porcentaje de incidencia y el índice de severidad muestra la eficacia de PA5 (0,2%) para controlar la roya de hojas de café en comparación con 3 fungicidas convencionales Verdadero, Alto, que también se aplicaron y pulverizaron cada 45 días, mientras que el fungicida Amistarz se pulverizó 3 veces durante mayo, junio y agosto, es importante tener en cuenta que durante este año las condiciones meteorológicas no fueron óptimas para el desarrollo de la enfermedad; por este motivo se registraron niveles bajos de incidencia y severidad (figuras 10 y 11).

En general, las plantas de café en las que se pulverizó PA5 (0,2%) mostraron un porcentaje de incidencia de roya de hojas de café bajo y significativo, seguido por los fungicidas convencionales Amistarz, Alto y Verdadero (figura 12). Mientras tanto no se observaron diferencias significativas en el índice de severidad entre tratamientos (figura 13).

Por otro lado, el desarrollo de la enfermedad fue regular durante el ensayo. En este sentido, se observó una alta incidencia de roya de hojas de café en el tercio inferior de la planta y disminuyó progresivamente hacia los tercios superiores. Las plantas en las que se pulverizó PA5 (0,2%) mostraron menores porcentajes de incidencia de la enfermedad en todos los tercios evaluados en comparación con el resto de los tratamientos propuestos, seguido por Amistarz, Alto y Verdadero (figura 14).

El análisis de la severidad mostró que en el tercio inferior y central de las plantas el índice de severidad de la enfermedad fue similar entre los tratamientos con PA5 (0,2%), Verdadero y Amistarz. El fungicida Alto mostró una menor severidad de la enfermedad en los tercios inferior y central. En el tercio superior de las plantas, el índice de severidad de la enfermedad fue menor en las plantas en las que se pulverizó PA5 (0,2%) y Amistarz en comparación con los fungicidas Alto y Verdadero (figura 15).

Evidencias de la activación de las respuestas de defensa de plantas de café usando polisacáridos (PC) como complemento al producto PA para roya de hojas de café.

Se realizó un ensayo en campo en 2013 con el fin de evaluar la eficacia del producto PA5 (50 g/ha), por sí solo y mezclado con el producto PC (formulación propia basada en polisacáridos) para controlar la roya de hojas de café.

Este ensayo se realizó en Amagá-Antioquia-Colombia entre mayo y diciembre. La unidad experimental estaba formada por 500 plantas de café, de 2 años de edad, "Caturra", que se pulverizaron cada 45 días. Se evaluó la progresión de la enfermedad en cuanto a la incidencia y la severidad.

5 Incidencia: Los resultados de este ensayo muestran que PA5 y la mezcla de PCPA5 (PA5 y PC) pulverizados cada 45 días reducen la incidencia de roya de hojas de café. Estos tratamientos con PA5 y PCPA5 redujeron la incidencia de la enfermedad en aproximadamente un 23% en comparación con el tratamiento químico, fungicida Amistarz (figura 19).

10 Severidad: La severidad de la enfermedad muestra que el producto PA5 es igual de eficaz que el fungicida convencional, ambos presentan valores similares de severidad de la enfermedad. Sin embargo, la severidad de la roya de hojas de café se redujo aproximadamente un 20% en las plantas de café en las que se pulverizó la mezcla PCPA5. Esto indica un efecto adicional para el control de la enfermedad debido probablemente a la activación de las propias respuestas de defensa de la planta de café tras haberse pulverizado el producto de polisacáridos PC (figura 15 20).

#### Pruebas de laboratorio en 2013

20 Se desarrolló una metodología de laboratorio para entender el modo de acción de PA1 (1%). Se realizaron ensayos de eficacia usando uredosporas de roya de hojas de café, recogidas en el campo.

25 Se realizaron ensayos de eficacia *in vitro* a las 24, 40 y 64 horas de exposición a PA1 (1%); los resultados muestran una acción fungicida directa que inhibe la germinación de esporas-pústulas. El porcentaje de esporas no germinadas con PA1 (1%) fue similar a los observados con el fungicida convencional Verdadero que tiene como componente activo triazol a las 15, 40 y 64 horas tras el tratamiento. Es importante tener en cuenta que el tiempo de exposición a los tratamientos no presentó ninguna diferencia significativa en ningún caso (figura 16).

30 Por otro lado, el efecto fungicida de PA1 (1%) es eficaz incluso a la menor dosificación evaluada de 0,25 mg/ml y no se observaron diferencias significativas entre dosificaciones superiores y con el fungicida convencional triazol (figura 17).

35 Adicionalmente, se realizó una prueba de eficacia *in vitro* con el fin de determinar el efecto de PA5 contra otros fitopatógenos. Se expuso cada cepa de patógeno a 0,5 y 2 cc/l, preparado con medios PDA. Se evaluó el porcentaje de inhibición frente al control durante 7 días. Los resultados muestran que la dosis de 2 cl/l de PA5 inhibe más del 50% del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum sp* y *Phytophthora capsici*. Por otro lado, PA5 no tiene ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahlia* (figura 18).

#### Conclusiones (a 14 de febrero de 2014)

40 1.- El compuesto PA presenta una acción fungicida directa sobre *Hemileia vastatrix* (condiciones *in vitro*), caracterizada por la germinación de uredosporas con 0,25 mg/ml.

45 2.- El compuesto PA también inhibe el crecimiento de *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum sp* y *Phytophthora capsici* (condiciones *in vitro*).

50 3.- Las formulaciones sometidas a prueba (PA05, PA1 y PA5) reducen la incidencia y severidad de la roya de hojas de café en plantas sometidas a pulverización cada 45 días, como tratamiento preventivo; según esta experiencia, es recomendable su uso durante la estación de baja presión de la enfermedad, o bien en estados iniciales (severidad de la enfermedad inferior al 8%).

55 4.- Las formulaciones sometidas a prueba (PA05, PA1 y PA5) provocan una reacción de hipersensibilidad, cuando se pulverizan en plantas de café muestran uredosporas activas. Esta reacción de hipersensibilidad es una respuesta de defensa de la planta debido a la actividad antioxidante que previene la colonización, el desarrollo de patógenos hacia las células adyacentes sanas.

5.- Las formulaciones sometidas a prueba (PA05, PA1 y PA5) aplicadas como fungicidas preventivos presentan una eficacia muy similar en comparación con fungicidas convencionales aplicados cada 45 días.

60 Evidencias de la activación de las respuestas de defensa de plantas de café usando polisacáridos (PC) como complemento al producto PA para roya de hojas de café.

Se realizó un ensayo en campo en 2013 con el fin de evaluar la eficacia del producto PA5 (50 g/ha), por sí solo y mezclado con el producto PC (formulación propia basada en polisacáridos) para controlar la roya de hojas de café. Este ensayo se realizó en Amagá-Antioquia-Colombia entre mayo y diciembre. La unidad experimental estaba

formada por 500 plantas de café, de 2 años de edad, "Caturra", que se pulverizaron cada 45 días. Se evaluó la progresión de la enfermedad en cuanto a la incidencia y la severidad.

5 Incidencia: Los resultados de este ensayo muestran que PA5 y la mezcla de PCPA5 (PA5 y PC) pulverizados cada 45 días reducen la incidencia de roya de hojas de café. Estos tratamientos con PA5 y PCPA5 redujeron la incidencia de la enfermedad en aproximadamente un 23% en comparación con el tratamiento químico, fungicida Amistarz (figura 19).

10 Severidad: La severidad de la enfermedad muestra que el producto PA5 es igual de eficaz que el fungicida convencional, ambos presentan valores similares de severidad de la enfermedad. Sin embargo, la severidad de la roya de hojas de café se redujo aproximadamente un 20% en las plantas de café en las que se pulverizó la mezcla PCPA5. Esto indica un efecto adicional para el control de la enfermedad debido probablemente a la activación de las propias respuestas de defensa de la planta de café tras haberse pulverizado el producto de polisacáridos PC (figura 20).

15 Pruebas de laboratorio en 2013

20 Se desarrolló una metodología de laboratorio para entender el modo de acción de PA1 (1%). Se realizaron ensayos de eficacia usando uredosporas de roya de hojas de café, recogidas en el campo.

25 Se realizaron ensayos de eficacia *in vitro* a las 24, 40 y 64 horas de exposición a PA1 (1%); los resultados muestran una acción fungicida directa que inhibe la germinación de esporas-pústulas. El porcentaje de esporas no germinadas con PA1 (1%) fue similar a los observados con el fungicida convencional Verdadero que tiene como componente activo triazol a las 15, 40 y 64 horas tras el tratamiento. Es importante tener en cuenta que el tiempo de exposición a los tratamientos no presentó ninguna diferencia significativa en ningún caso (figura 16).

30 Por otro lado, el efecto fungicida de PA1 (1%) es eficaz incluso a la menor dosificación evaluada de 0,25 mg/ml y no se observaron diferencias significativas entre dosificaciones superiores y con el fungicida convencional triazol (figura 17).

35 Adicionalmente, se realizó una prueba de eficacia *in vitro* con el fin de determinar el efecto de PA5 contra otros fitopatógenos. Se expuso cada cepa de patógeno a 0,5 y 2 cc/l, preparado con medios PDA. Se evaluó el porcentaje de inhibición frente al control durante 7 días. Los resultados muestran que la dosis de 2 cl/l de PA5 inhibe más del 50% del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum sp* y *Phytophthora capsici*. Por otro lado, PA5 no tiene ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahlia* (figura 18).

Conclusiones (a 14 de febrero de 2014)

40 1.- El compuesto PA presenta una acción fungicida directa sobre *Hemileia vastatrix* (condiciones *in vitro*), caracterizada por la germinación de uredosporas con 0,25 mg/ml.

2.- El compuesto PA también inhibe el crecimiento de *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum sp* y *Phytophthora capsici* (condiciones *in vitro*).

45 3.- Las formulaciones sometidas a prueba (PA05, PA1 y PA5) reducen la incidencia y severidad de la roya de hojas de café en plantas sometidas a pulverización cada 45 días, como tratamiento preventivo; según esta experiencia, es recomendable su uso durante la estación de baja presión de la enfermedad, o bien en estados iniciales (severidad de la enfermedad inferior al 8%).

50 4.- Las formulaciones sometidas a prueba (PA05, PA1 y PA5) provocan una reacción de hipersensibilidad, cuando se pulverizan en plantas de café muestran uredosporas activas. Esta reacción de hipersensibilidad es una respuesta de defensa de la planta debido a la actividad antioxidante que previene la colonización, el desarrollo de patógenos hacia las células adyacentes sanas.

55 5.- Las formulaciones sometidas a prueba (PA05, PA1 y PA5) aplicadas como fungicidas preventivos presentan una eficacia muy similar en comparación con fungicidas convencionales aplicados cada 45 días.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un extracto de pulpa de café de *Coffea arabica* que comprende al menos el 0,5% (p/p) de ácido protocatecuico, para el tratamiento y/o la prevención de infecciones por *Hemileia vastatrix* en plantas.
2. Uso de un extracto según la reivindicación 1, en el que comprende el 0,5-10% (p/p), preferiblemente el 0,5%-5,0% (p/p) de ácido protocatecuico.
- 10 3. Uso de un extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que *Coffea arabica* es *Coffea arabica* var. Caturra.
4. Uso de un extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que es un extracto acuoso.
- 15 5. Uso de un extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho extracto se ha refinado y secado mediante liofilización o secado por pulverización y comprende al menos el 30% de ácido protocatecuico.
6. Uso de un extracto según la reivindicación 5, en el que es un extracto seco que comprende del 30 al 50% de ácido protocatecuico.
- 20 7. Uso de un extracto según las reivindicaciones 5 ó 6, caracterizado porque se obtiene mediante tratamiento del extracto según la reivindicación 3, con resina, alcoholes, concentración y liofilización o secado por pulverización.
- 25 8. Método para el tratamiento y/o la prevención de infecciones por *Hemileia vastatrix* en plantas, que comprende tratar dichas plantas con un extracto según la reivindicación 4, diluido en un disolvente, preferiblemente agua hasta una concentración del 3,0-0,1% (p/v).
- 30 9. Método para el tratamiento y/o la prevención de infecciones por *Hemileia vastatrix* en plantas, que comprende tratar dichas plantas con un extracto según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, diluido en un disolvente, preferiblemente agua hasta una concentración del 1,0-0,01% (p/v).
- 35 10. Método según las reivindicaciones 8 ó 9, en el que dicha disolución acuosa también comprende agentes fungicidas adicionales y/o agentes que actúan como inductores de defensa.
11. Método según la reivindicación 10, en el que dichos inductores de defensa adicionales se seleccionan de polisacáridos de pared celular tales como pectina; polisacáridos tales como dextrina; gomas exudadas de plantas tales como gomas tragacanto, xantana, arábica, karaya o almáciga; y monosacáridos tales como glucosamina.
- 40 12. Método según las reivindicaciones 8 a 11, en el que dicho tratamiento se lleva a cabo pulverizando en dichas plantas dicha disolución acuosa.
- 45 13. Método para el tratamiento y/o la prevención de infecciones por *Hemileia vastatrix* en plantas, que comprende tratar dichas plantas con ácido protocatecuico diluido en agua hasta una concentración de aproximadamente el 0,15-0,005% (p/v).
- 50 14. Uso de ácido protocatecuico para el tratamiento y/o la prevención de infecciones por *Hemileia vastatrix* en plantas.
15. Uso de ácido protocatecuico según la reivindicación 14, diluido en agua hasta una concentración de aproximadamente el 0,15-0,005% (p/v).
16. Uso de ácido protocatecuico, en una dosis de 2 cc/l, para el tratamiento y/o la prevención de los siguientes patógenos fúngicos: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, y *Phytophthora capsici*.

Figura 1

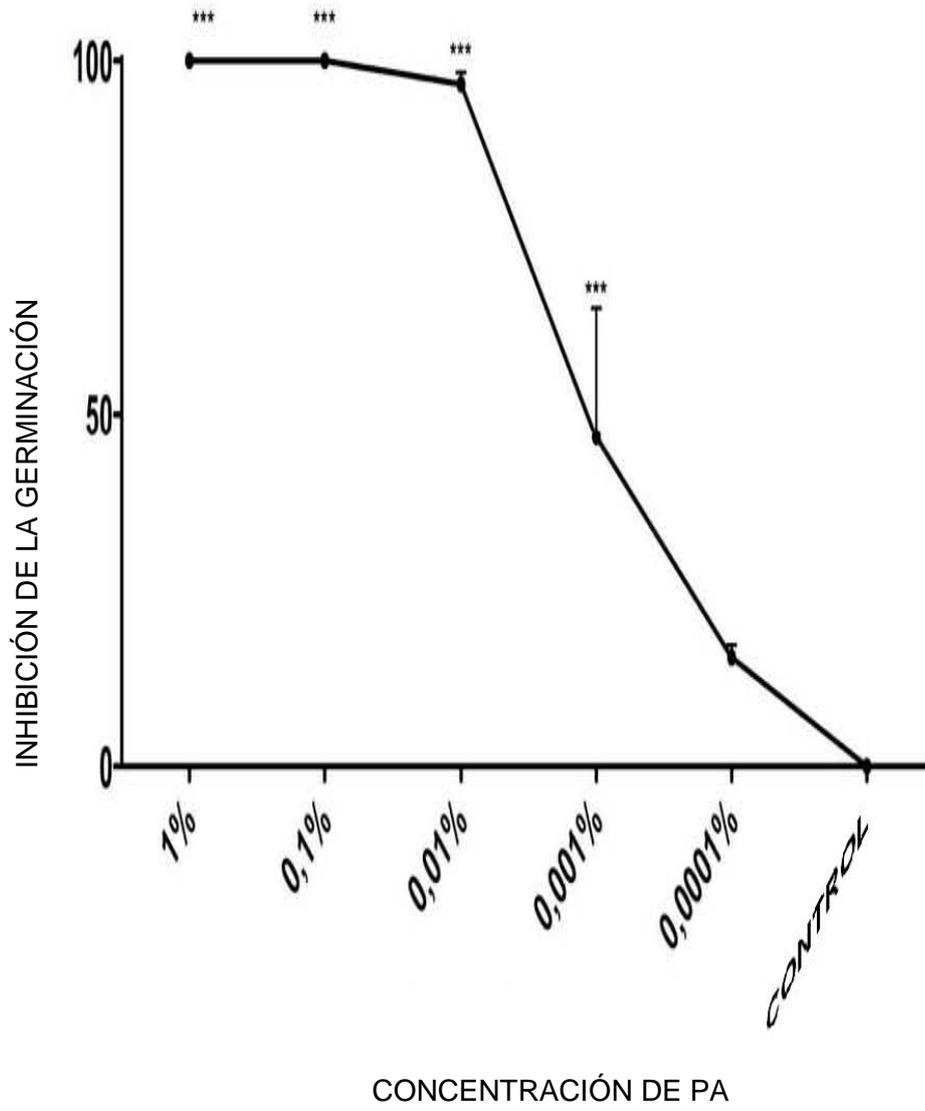
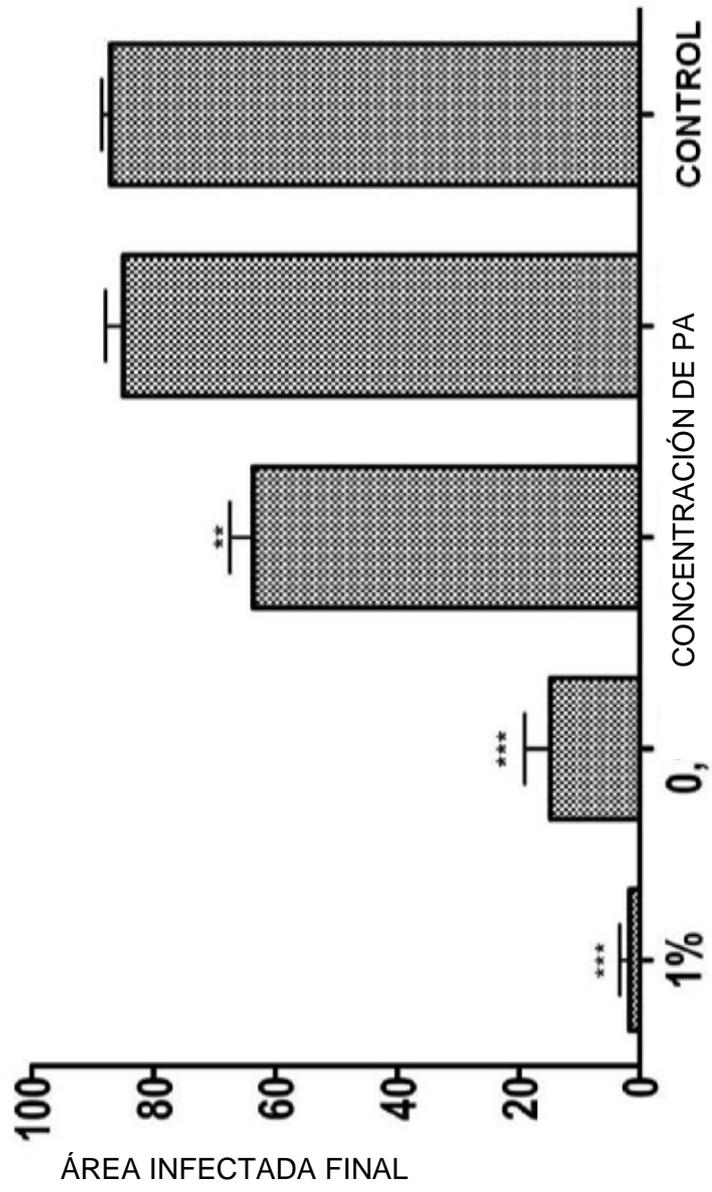


Figura 2



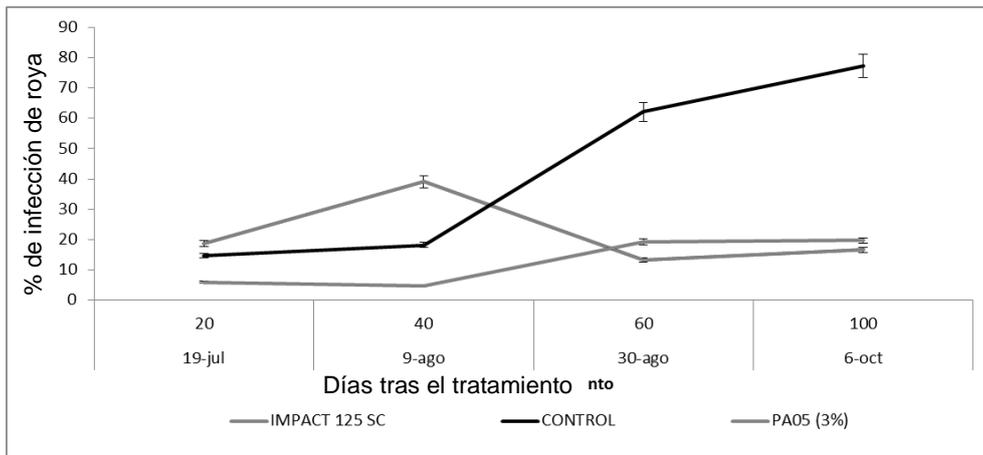


Figura 3

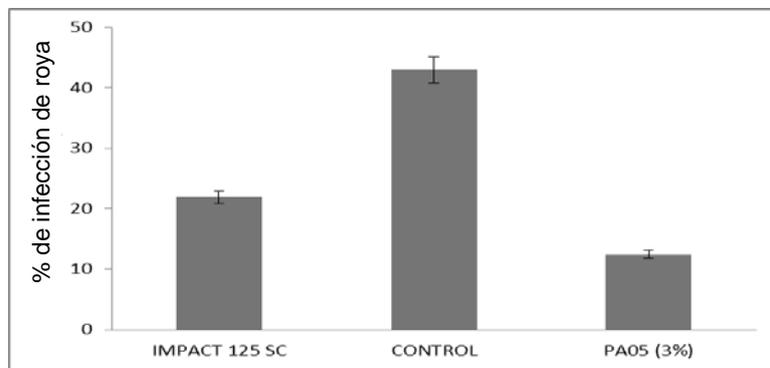


Figura 4

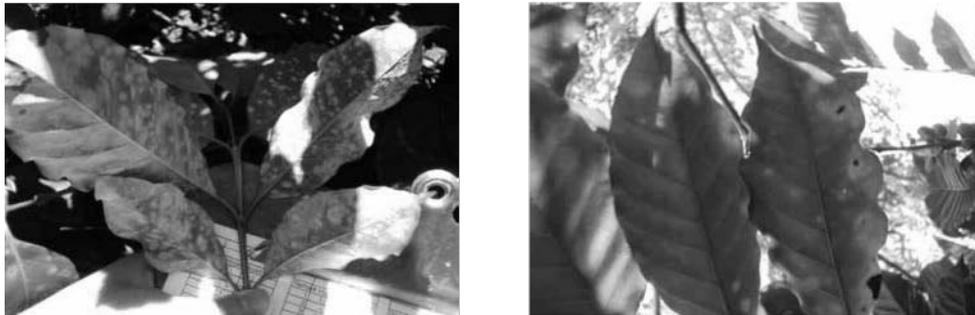


Figura 5

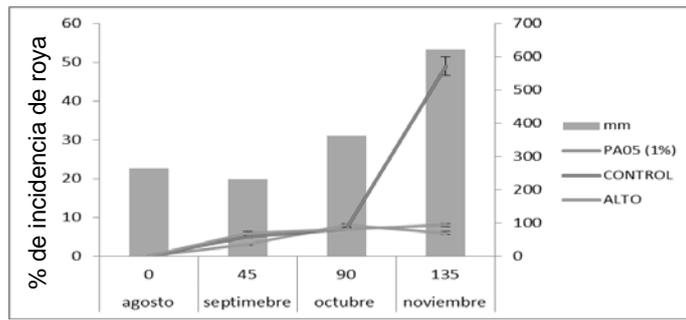


Figura 6

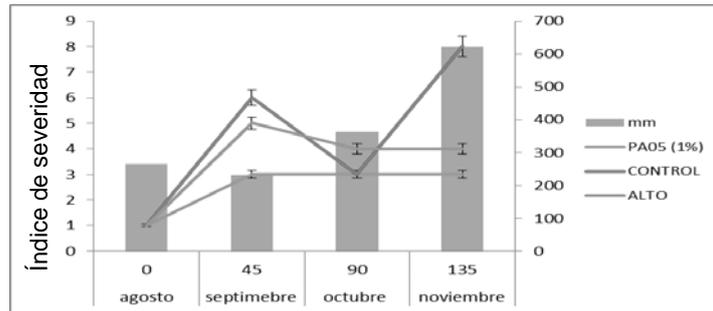


Figura 7

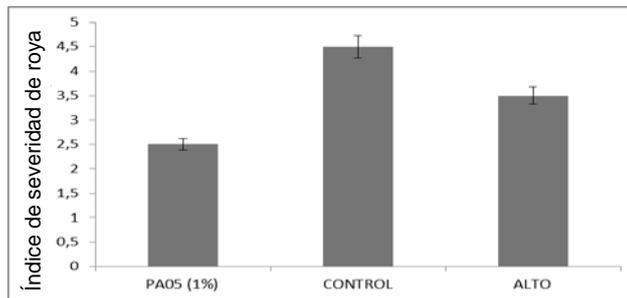


Figura 8

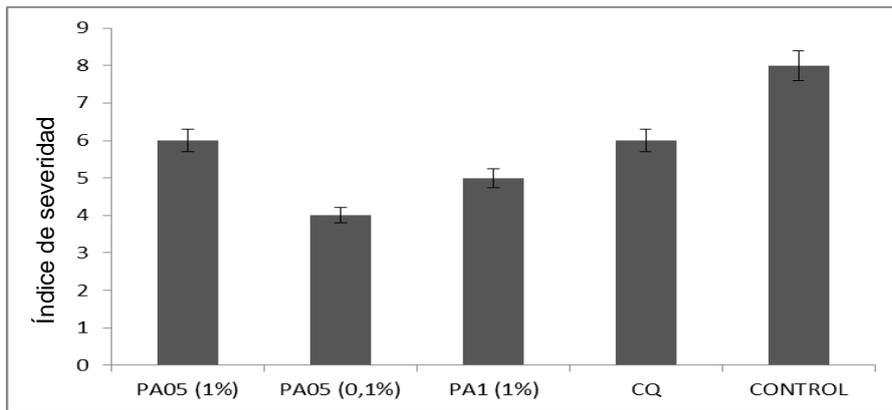


Figura 9

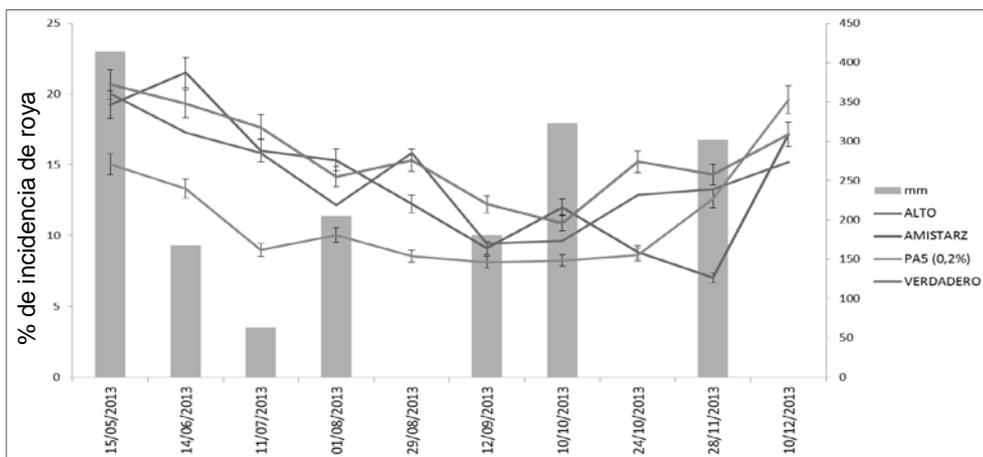


Figura 10

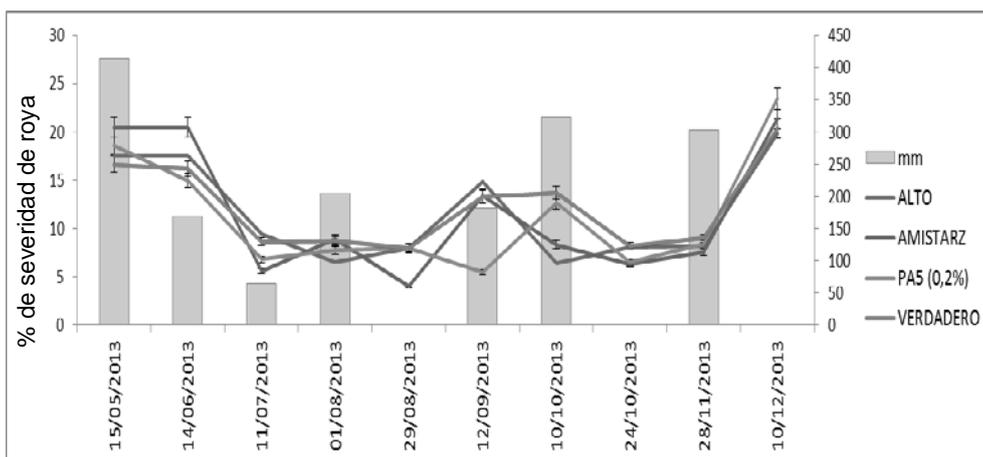


Figura 11

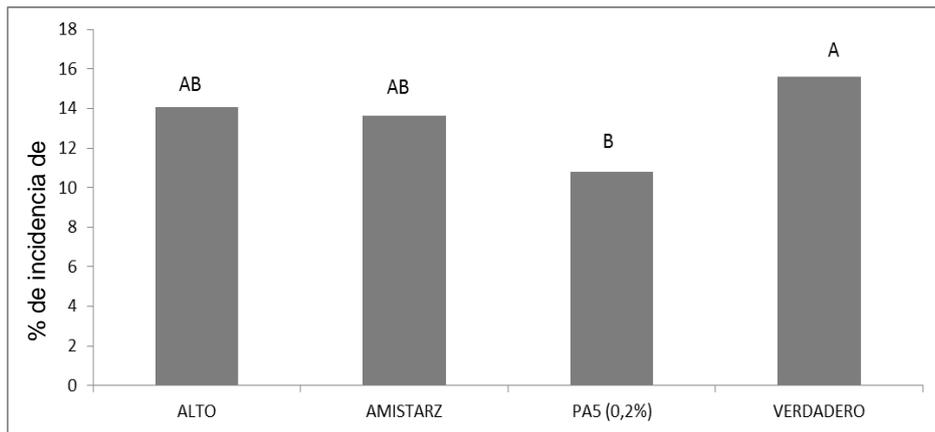


Figura 12

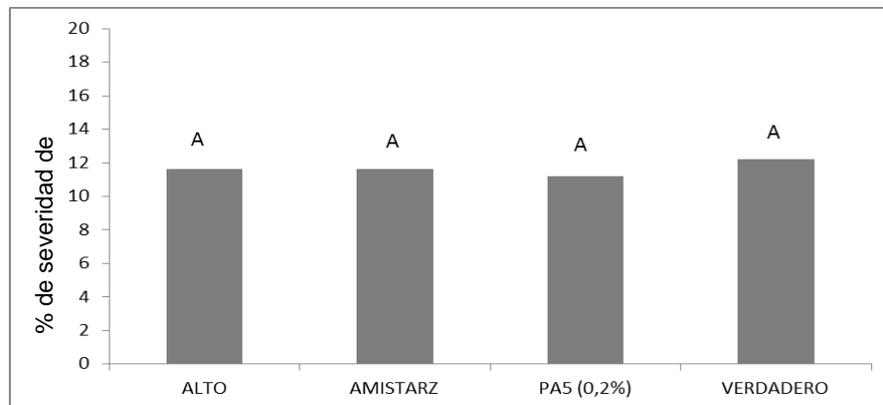


Figura 13

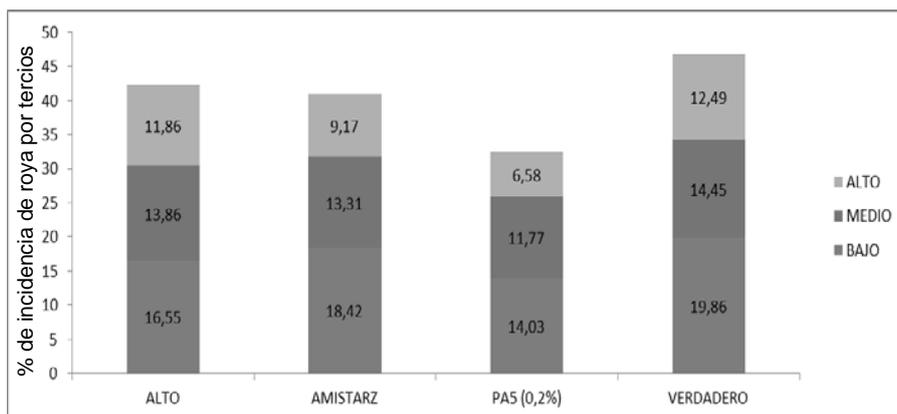


Figura 14

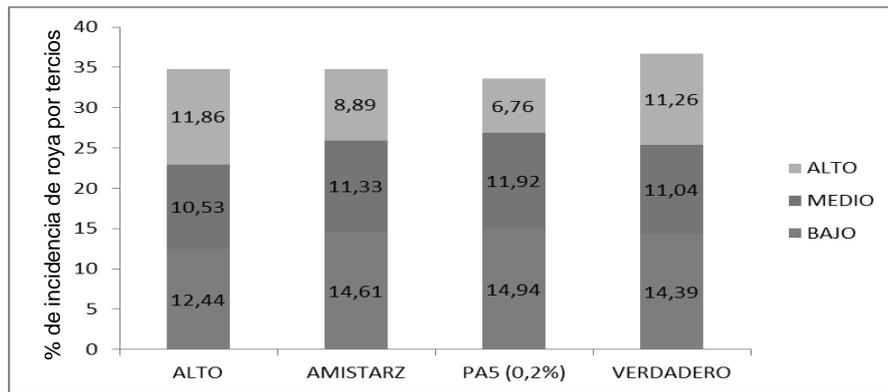


Figura 15

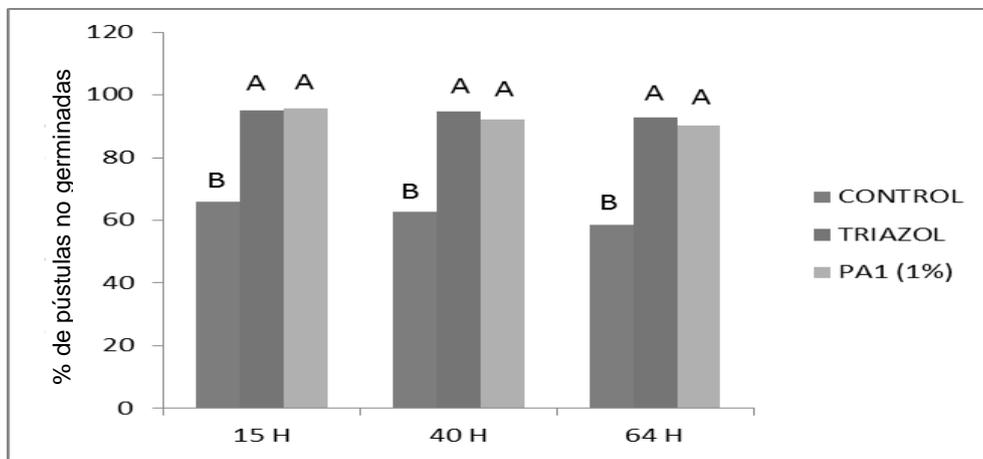


Figura 16

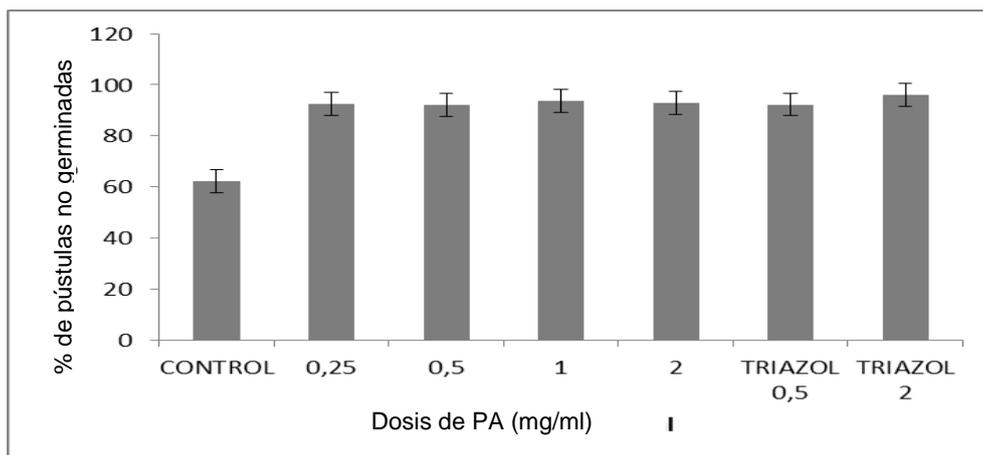


Figura 17

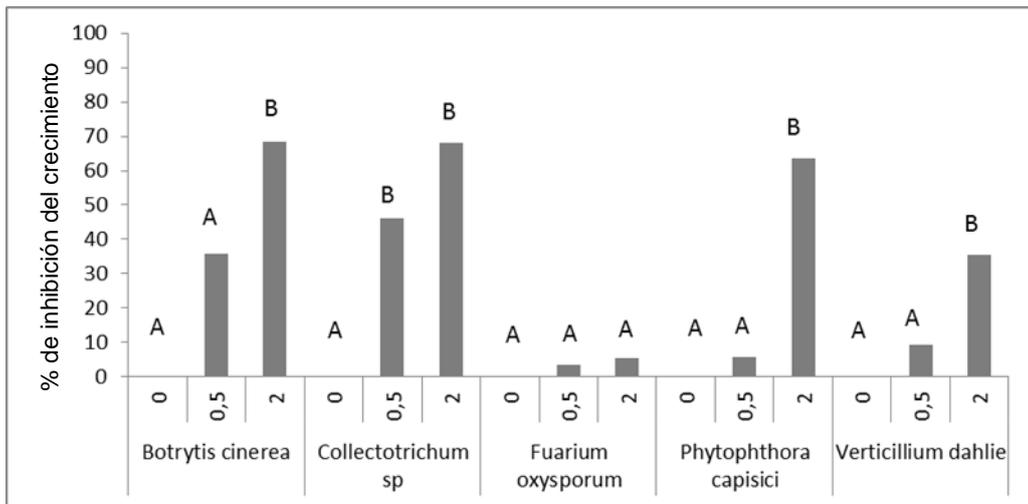


Figura 18

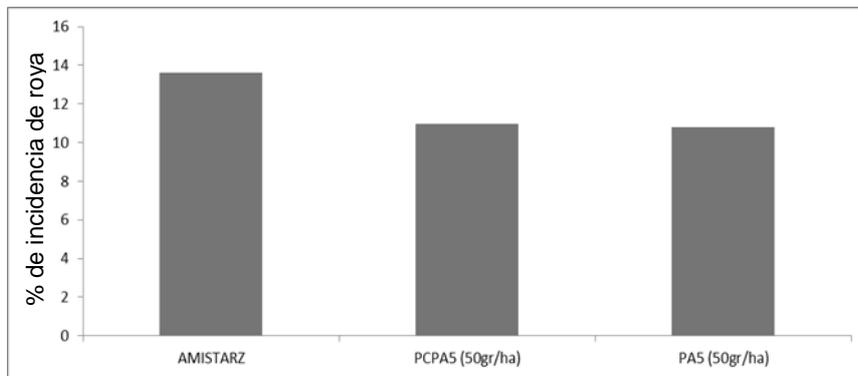


Figura 19

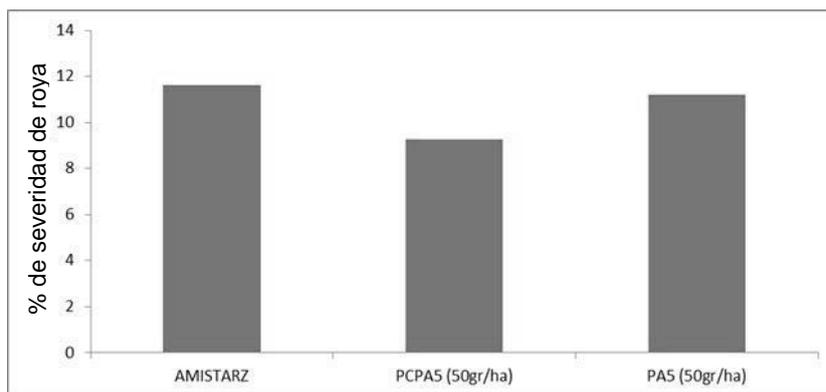


Figura 20