

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 112**

51 Int. Cl.:

A01P 3/00 (2006.01)

A01N 31/16 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

A01N 65/28 (2009.01)

A01N 43/54 (2006.01)

A23L 3/3472 (2006.01)

A23L 3/349 (2006.01)

A23L 3/3499 (2006.01)

A23L 3/3544 (2006.01)

A23L 3/3526 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2011 PCT/FR2011/052315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050662**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2011 E 11788545 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2763527**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento fungicida de cepas resistentes mediante aceite(s) esencial(es)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2018

73 Titular/es:

**XEDA INTERNATIONAL (100.0%)
Zone Artisanale la Crau Route Nationale 7
13670 Saint Andiol, FR**

72 Inventor/es:

SARDO, ALBERTO

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 661 112 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

Procedimiento de tratamiento fungicida de cepas resistentes mediante aceite(s) esencial(es)

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de plantas o productos alimenticios, en particular frutas y/o verduras. Efectivamente, es importante que las plantas puedan resistir a los ataques de los hongos y de las bacterias que reducen las cantidades así como la calidad de las plantas o de los productos alimenticios producidos y que, en casos extremos, pueden principalmente suponer la muerte de las plantas infectadas. También es importante que las frutas y verduras no pierdan su calidad organoléptica y conserven un aspecto atractivo cuando se comercializan para un consumo rápido. Sin embargo, tras su cosecha, las frutas y verduras a menudo se almacenan durante periodos relativamente largos antes de ser comercializadas. Los fenómenos susceptibles de alterar el aspecto y el sabor de las frutas y verduras son particularmente la proliferación de hongos y de bacterias en la superficie antes y/o después de la cosecha. Estas deterioraciones son aún más rápidas en las microheridas y cortes que aparecen en la piel durante el almacenamiento o la manipulación de frutas y verduras.
- 10
- [0002]** Para evitar dichas deterioraciones, las frutas y/o verduras son tratadas generalmente mediante la aplicación de fungicidas y/o bactericidas.
- 20 **[0003]** Sin embargo, los hongos y las bacterias desarrollan resistencias a los fungicidas y/o a los bactericidas de síntesis clásicamente utilizados.
- [0004]** Así, se sabe que numerosos géneros de hongos como los *Penicillium* han desarrollado resistencias ante los bencimidazoles, por ejemplo.
- 25 **[0005]** La resistencia a los fungicidas/bactericidas se desarrolla cuando algunas cepas son naturalmente resistentes o se vuelven resistentes, por ejemplo por mutación de su ADN, y después se seleccionan por la aplicación de los fungicidas/bactericidas. Entonces la población se enriquece con estas cepas resistentes.
- 30 **[0006]** Por tanto existe una necesidad de encontrar medios de tratamientos alternativos de estas cepas de hongos y/o de bacterias resistentes.
- [0007]** Se conoce la actividad fungicida y/o bactericida de los aceites esenciales. Así, la solicitud de patente FR 2 786 664 describe la actividad fungicida y bactericida de diferentes terpenos contenidos en los aceites esenciales. Kim et al. (Letters in Applied Microbiology, 2010, 51, 177-183) describe la utilización de timol y de fludioxonil para reducir la resistencia al fludioxonil de *Penicillium expansum*, responsable de la podredumbre de las manzanas tras su cosecha. K. Palaniappan et al. (International Journal of Food Microbiology, 2010, 2-3, 164-168) describe la utilización de agentes antibióticos naturales como el eugenol, el timol o el carvacrol en combinación con un antibiótico al que las cepas resistentes bacterianas son resistentes, para la preservación de la comida animal.
- 35
- 40 **[0008]** De forma sorprendente, se ha hallado que los aceites esenciales tienen una actividad específica sobre las cepas de hongos y/o de bacterias resistentes a los fungicidas y/o bactericidas de síntesis.
- 45 Por tanto se describe un procedimiento de tratamiento fungicida y/o bactericida de una o varias cepa/s de hongo/s y/o bacteria/s fitopatógeno/s resistente/s a uno o varios agente/s fungicida/s y/o bactericida/s de síntesis que comprende la aplicación de una composición que comprende uno o varios aceite/s esencial/es y/o el/los agente/s activo/s terpénico/s que contiene/n en plantas o productos alimenticios afectados por una dicha cepa. El objeto de la invención es un procedimiento de tratamiento fungicida de una o varias cepa/s de hongo/s fitopatógeno/s resistente/s a uno o varios agente/s fungicida/s sintético/s que comprende:
- 50
- la aplicación de una composición que comprende a título de aceite esencial el aceite de clavo y/o que a título de agente activo terpénico contiene eugenol; y
 - la aplicación de pirimetanil a título de agente fungicida al que la/s cepa/s es/son resistente/s;
- 55 en plantas o productos alimenticios afectados por una dicha cepa.
- [0009]** Las plantas o productos alimenticios normalmente hacen referencia a las plantas y a sus cosechas, en concreto a las frutas y verduras antes y después de la cosecha.
- 60 **[0010]** Se entiende por «aceite esencial» cualquier producto, generalmente oloroso y de composición compleja, obtenido a partir de una materia prima vegetal, en concreto bien por extracción por vapor de agua, bien por destilación seca, o bien mediante un procedimiento mecánico apropiado sin calefacción.
- [0011]** Los aceites esenciales suelen separarse de la fase acuosa mediante un procedimiento físico que no

suponga un cambio significativo de su composición. Su preparación se realiza según procedimientos conocidos por el experto en la materia.

5 **[0012]** A título de aceites esenciales, se describe en concreto el aceite de clavo, el aceite de canela, el aceite de tomillo, el aceite de orégano o el aceite de menta; a título de agentes activos terpénicos contenidos en dichos aceites esenciales se describe el eugenol, el isoeugenol, el cinamaldehído, el timol, el carvacrol o la carvona.

10 **[0013]** Asimismo se describe una composición que comprende una mezcla de timol, de carvacrol y de eugenol.

10 **[0014]** Se entiende que dichos agentes activos terpénicos pueden aislarse de los aceites esenciales o prepararse por síntesis o hemisíntesis.

15 **[0015]** Se entiende por «cepas resistentes» las cepas de hongos y/o de bacterias poco o nada sensibles a un agente fungicida y/o bactericida; por ejemplo, las cepas en las cuales la aplicación de fungicidas y/o de bactericidas solo destruye alrededor del 60 % o menos de dichas cepas. Esta resistencia puede estar presente de forma natural o ser el resultado de una mutación genética.

20 **[0016]** A título de fungicidas y/o bactericidas de síntesis, se entienden los agentes que no salen de productos naturales como las plantas; por tanto esta expresión excluye los agentes activos terpénicos contenidos en dichos aceites esenciales. A modo de fungicidas y/o bactericidas de síntesis que pueden engendrar resistencias se pueden citar:

25 A título de fungicidas, los bencimidazoles como el tiabendazol, o sus precursores como los tiofanatos; las anilopirimidinas como el pirimetanil; los imidazoles como el imazalil; las fenilamidas como el metaxalil; los heterociclos nitrogenados como el fludioxonil.

[0017] A título de fungicidas/bactericidas, los fenoles; los amonios cuaternarios como el cloruro de alquilo dimetil bencil amonio o el ácido peracético.

30 **[0018]** Como ejemplo de hongo/s fitopatógeno/s que presenten una/s resistencia/s a uno o varios agente/s fungicida/s y/o bactericida/s de síntesis, en concreto se pueden citar los géneros *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Gloeosporium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Venturia*, *Rhizopus*, *Phoma*, *Helminthosporium*; y más particularmente las especies *Penicillium spp.* como *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, o *Penicillium italicum*; *Botrytis spp.* como *Botrytis cinerea*, *Monilinia spp.* como *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena* o *Monilinia laxa*; *Gloeosporium spp.* como *Gloeosporium album*, *Gloeosporium fructigenum* o *Gloeosporium perennans*; *Phytophthora spp.*; *Fusarium spp.* o incluso *Alternaria alternata*; *Geotrichum candidum*; *Venturia inequalis*; *Rhizopus nigricans*; *Phoma exigua* ou *Helminthosporium Rhizoctonia solani*.

40 **[0019]** Como ejemplo de bacteria/s fitopatógena/s que presenten una/s resistencia/s a uno o varios agente/s fungicida/s y/o bactericida/s de síntesis, se describe *Pseudomonas syringae*, *Escherichia coli*, *Erwinia amylovora* o *Erwinia carotovora*.

45 **[0020]** Más particularmente, *Penicillium spp.* presenta cepas resistentes al imazalil; *Penicillium digitatum* y *Penicillium expansum* presentan cepas resistentes al pirimetanil; *Pseudomonas syringae* presenta cepas resistentes a los amonios cuaternarios; *Botrytis cinerea* posee cepas resistentes a los bencimidazoles; *Monilinia fructicola* presenta cepas resistentes al pirimetanil.

50 **[0021]** Sin querer vincularse a una teoría, se ha descubierto de forma inesperada que los aceites esenciales que pueden tener una actividad fungicida y/o bactericida modesta en cepas sensibles se vuelven muy activos en cepas resistentes. Los aceites esenciales tienen probablemente una actividad en varios emplazamientos y no dan lugar a la creación de cepas resistentes. De hecho, sus combinaciones con agentes de síntesis permiten evitar así una selección genética que desemboque en el desarrollo de cepas resistentes.

55 **[0022]** De forma ventajosa, el/los aceite/s esencial/es y/o el/los agente/s activo/s terpénico/s que contiene/n pueden utilizarse en combinación con uno o varios agente/s fungicida/s y/o bactericida/s. Esta combinación no solo permite tratar a la vez las cepas resistentes y las cepas sensibles, sino que también se ha descubierto de forma inesperada que la actividad sobre las cepas resistentes se potenciaba así gracias a esta combinación.

60 **[0023]** Preferentemente, el/los aceite/s esencial/es y el/los agente/s fungicida/s y/o bactericida/s se aplican en una proporción (parte aceite/s esencial/es /parte agente/s fungicida/s y/o bactericida/s) comprendida entre 0,3 y 3.

[0024] Generalmente, dicho/s agente/s fungicida/s y/o bactericida/s es/son aquel/aquellos al/ a los que la cepa es resistente, como los mencionados.

[0025] Entre los ejemplos de combinaciones descritas, se encuentra en concreto:

- el imazalil y el timol y/o el aceite de tomillo;
- el carvacrol y/o el aceite de orégano y el tiabendazol;
- el cloruro de alquilo dimetil bencil amonio y el aceite de canela.

[0026] Según un modo de realización preferido, el/los agente/s fungicida/s y/o bactericida/s se aplica/n simultáneamente al/a los aceite/s esencial/es y/o al/a los agente/s activo/s terpénico/s que contiene/n, como por ejemplo en el seno de una misma composición, o de forma separada, mediante composiciones distintas.

[0027] La aplicación de las composiciones según la invención puede realizarse antes o después de la cosecha.

[0028] Generalmente, las composiciones según la invención se presentan en forma de un concentrado emulsionable, que puede dispersarse en el agua antes de la aplicación. Más particularmente, el concentrado emulsionable comprende en particular uno o varios aceite/s esencial/es y/o el/los agente/s activo/s terpénico/s que contiene/n, con lecitina y/o derivados. El concentrado emulsionable puede comprender además uno o varios emulsionantes. Generalmente, el concentrado emulsionable consiste en uno o varios aceite/s esencial/es y/o el/los agente/s activo/s terpénico/s que contiene/n, con lecitina y/o derivados, y eventualmente uno o varios emulsionantes.

[0029] Según la invención, se entiende por la expresión «lecitinas y/o derivados» uno o varios compuestos elegidos entre los derivados de fosfatidilcolina y/o sus derivados, como fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina y/o ácido fosfatídico, y/o sus mezclas que presenten dos ácidos grasos, como distearil-, dipalmitil- y/o dioleil- de fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina y/o ácido fosfatídico, y/o sus mezclas.

[0030] Preferentemente, las «lecitinas y/o sus derivados» son de origen natural, como por ejemplo, derivados de clara de huevo o de soja.

[0031] Preferentemente, la proporción lecitina/aceite esencial o agente terpénico está comprendida entre 0,3 y 3/1 en peso.

[0032] Se entiende por emulsionantes los agentes emulsionantes iónicos y no iónicos, como los surfactantes no iónicos del tipo ácido graso etoxilado, alcohol graso etoxilado, tween 80, etc... Estos emulsionantes son conocidos. Según la presente invención, se entiende por «emulsionante» cualquier tipo de agente habitualmente utilizado con este fin, como los alcoholes grasos etoxilados, los ácidos grasos etoxilados, los alquilfenoles etoxilados o cualquier otro producto no iónico.

[0033] Los emulsionantes preferentemente utilizados en el marco de la invención son tensioactivos aniónicos o no iónicos.

[0034] Algunos ejemplos de tensioactivos no iónicos utilizables según la invención son en concreto el producto de condensación de un alcohol graso alifático, preferentemente C₈-C₂₂, con un óxido de alquileo C₂-C₃. El óxido de alquileo C₂-C₃ puede ser el óxido de etileno, el óxido de propileno, o bien una mezcla de óxido de etileno y de óxido de propileno en cualquier proporción. Un ejemplo de tales tensioactivos es el producto de condensación del alcohol laurílico (o alcohol n-dodecílico) con 30 moles de óxido de etileno.

[0035] Los emulsionantes no iónicos incluyen en concreto los sucroésteres, los sorbitanos monoleato etoxilados, los ácidos grasos etoxilados, la lecitina, los ácidos grasos esterificados como el oleato de glicerol y sus mezclas.

[0036] Sin embargo la invención no se limita a la utilización de estos emulsionantes en particular.

[0037] En las composiciones según la invención, los emulsionantes no iónicos están presentes generalmente entre 1 y 350 g/L, preferentemente entre 200 y 300 g/L.

[0038] En las composiciones según la invención, los emulsionantes aniónicos están generalmente presentes entre 1 y 300 g/L, preferentemente entre 100 y 200 g/L.

[0039] En las composiciones según la invención, los aceites están presentes entre 50 y 350 g/L.

[0040] En las composiciones según la invención, los agentes terpénicos están presentes entre 20 y 250 g/L.

[0041] En las composiciones según la invención, los fungicidas y/o bactericidas están presentes entre 0 y 300 g/L.

[0042] Una composición preferida según la invención comprende en particular:

- entre 0 y 250 g/L de pirimetanil;
- entre 20 y 200 g/L de eugenol;
- entre 20 y 200 g/L de lecitina.

[0043] Puede comprender además otros excipientes como agentes solubilizantes, por ejemplo, ácido orgánico así como excipientes que sirvan para enmascarar el olor de la composición como el aceite de menta.

[0044] Los concentrados emulsionables pueden dispersarse en agua para obtener una dilución de los concentrados emulsionables. La dilución de las composiciones según la invención es del 0,5 al 2 % en agua.

[0045] Las composiciones en g/L indicadas más arriba y más adelante se entienden antes de una eventual dilución.

[0046] Generalmente, en el procedimiento según la invención, la aplicación de la composición se hace por aspersión, inmersión o duchado de las plantas y/o productos alimenticios como frutas y/o legumbres. De forma preferida la aplicación se hace por inmersión o duchado de las frutas y/o verduras en el concentrado emulsionable dispersado en agua.

[0047] Según otro modo de realización, las composiciones según la invención pueden dispersarse en ceras de recubrimiento de frutas y/o verduras.

[0048] La aplicación por duchado o inmersión conviene particularmente para la aplicación después de la cosecha.

[0049] Generalmente, la composición tras dilución se aplica en una cantidad que permita la aplicación del agente fungicida y/o bactericida en sus dosis habituales, conocidas por el experto en la materia o en dosis inferiores.

[0050] Por último, se describe la utilización de un aceite esencial para el tratamiento selectivo de una o varia/s cepa/s de hongo/s y/o bacteria/s fitopatógono/s resistente/s a uno o vario/s agente/s fungicida/s y/o bactericida/s.

[0051] Los modos de realización mencionados más arriba y más adelante se entienden tomados de forma aislada o en cada una de sus combinaciones.

Descripción de las figuras:

[0052]

La figura 1 muestra la eficacia de las combinaciones de la invención en cepas de *Penicillium expansum* resistentes al pirimetanil. La figura 2 muestra la eficacia de las composiciones en cepas de *Penicillium digitatum* sensibles al pirimetanil.

EJEMPLOS:

Ejemplo 1: Ejemplo de una composición para la utilización según la invención

[0053]

Concentrado emulsionable (en g/L)

Emulsionante no iónico	240
Emulsionante aniónico	180
Aceites esenciales	160
Pirimetanil	190
Lecitina	60
Monopropilenglicol	200

Ejemplo 2: Actividad fungicida de los aceites esenciales solos o en combinación con un fungicida de síntesis, en cepas resistentes o sensibles

[0054] La siguiente tabla presenta diferentes composiciones fungicidas y/o bactericidas

Composición	A	B	C
Pirimetaniil	400 g/L	192 g/L	-
Aceite esencial/Agente terpénico	-	140 g/L de eugenol	180 g/L de eugenol
	-	20 g/L de aceite de menta	
Lecitina	-	60 g/L	250 g/L
Total	100 mL	1000 mL	1000 mL

[0055] Estas composiciones han sido testadas en diferentes cepas de hongos o bacterias, como ilustran las figuras 1 y 2. Salvo indicación contraria, las dosis expresadas en las Figuras 1 y 2 se expresan en ppm de forma activa; las indicaciones en ml/l se entienden en cantidad de la composición C. En la Figura 1 (prueba en manzanas «gala»), la composición B, que comprende pirimetaniil, eugenol y aceite de menta presenta una eficacia entre 90 y 100 % mientras que el pirimetaniil solo con la misma dosis muestra una eficacia del 60 % como máximo. Se ve igualmente que el aceite de clavo solo (composición C) no supera el 80 % de eficacia. Se observa un efecto sinérgico entre el fungicida y los aceites esenciales/agentes terpénicos.

[0056] En la Figura 2 (pruebas en limones), se observa en cepas *Penicillium digitatum* sensibles al pirimetaniil la eficacia de la composición que comprende pirimetaniil y aceites esenciales/agentes terpénicos (composición B). Además, se ve bien que los aceites esenciales/agentes terpénicos solos (composición C) no son eficaces en las cepas sensibles, con una eficacia máxima del 40 % aproximadamente.

Ejemplo 3: Evaluación de la eficacia *in vitro* de los aceites esenciales contra microorganismos fitopatógenos.

Objetivo del estudio:

[0057] El objetivo del estudio es determinar la eficacia de los aceites esenciales contra los hongos fitopatógenos *Penicillium Spp.*, *Botrytis Spp.*, *Monilinia fructicola* y una bacteria, *Pseudomonas syringae*, comparada con productos fungicidas y bactericidas de síntesis comerciales.

[0058] La eficacia de las muestras de aceites esenciales contra estos microorganismos fitopatógenos se determinó mediante el recuento de colonias (determinación CFU), cultivadas a 25°C ± 1°C para las bacterias y por determinación de la inhibición del crecimiento del halo de los hongos, de acuerdo con las directivas generales (ISO 6887: 2003; ISO 7218: 2007; ISO 7954: 1987).

Muestras testadas:

[0059]

Tratamiento	Ingrediente/s activo/s	Contenido en ingrediente activo	Tipo de formulación
Fungazil 500 EC	Imazalil	50 %	EC
TECTO SC 50	Tiabendazol	42,9 %	SC
Major C 100	Cloruro de alquilo dimetil bencil amonio	2,5 %	SL
Xedathane 20	Pirimetaniil	20 %	EC
Bioxeda	Aceite de clavo	20 %	EC
Timol	Timol	18 %	EC
Carvacrol	Carvacrol	18 %	EC
Aceite de canela	Cinamaldehído	20 %	EC

Descripción de las pruebas realizadas

[0060]

Hongo fitopatógeno	Muestra	Dosis	Aplicación	Duración	Evaluación de la eficacia
<i>Penicillium spp.</i>	1) Fungazil 2) Timol	Fungazil: 100ml/hl Timol: 100ml/hl 300 ml/hl 500ml/hl	Por adición en el medio artificial PDA (agar glucosado de patata)	5 días	Inhibición del crecimiento en placas Petri

	3) Fungazil+Timol	1000 ml/hl Fungazil ± Timol 100ml/hl+ 100ml/hl			
		100ml/hl+ 300 ml/hl			
		100ml/hl+ 500 ml/hl			
		100ml/hl+ 1000 ml/hl			

Hongo fitopatógeno	Muestra	Dosis	Aplicación	Duración	Evaluación de la eficacia
<i>Botrytis spp.</i>	1) Tecto SC 500 2) Carvacrol	Tecto SC 500: 100 ml/hl Carvacrol: 100ml/hl 300 ml/hl 500 ml/hl 1000 ml/hl	Por adición en el medio artificial PDA (agar glucosado de patata)	5 días	Inhibición del crecimiento en placas Petri
	3) Tecto SC 500 + Carvacrol	Tecto SC 500 + Carvacrol: 100ml/hl+ 100ml/hl			
		100ml/hl+ 300 ml/hl			
		100ml/hl+ 500 ml/hl			
		100ml/hl+ 1000 ml/hl			

Hongo fitopatógeno	Muestra	Dosis	Aplicación	Duración	Evaluación de la eficacia
<i>Monilinia fructicola</i>	1) Xedathane 20 2) Bioxeda	Xedathane 20: 250 ml/hl Bioxeda: 100ml/hl 300 ml/hl 500 ml/hl 1000 ml/hl	Por adición en el medio artificial PDA (agar glucosado de patata)	5 días	Inhibición del crecimiento en placas Petri
	3) Xedathane 20 + Bioxeda	Xedathane 20+ Bioxeda: 250ml/hl+ 100ml/hl			
		250ml/hl+ 300 ml/hl			
		250ml/hl+ 500 ml/hl			
		250ml/hl+ 1000 ml/hl			

Bacteria fitopatógena	Muestra	Dosis	Aplicación	Duración	Evaluación de la eficacia
<i>Pseudomonas syringae</i>	1) Major C 100	Major C 100: 250 ml/hl	Por adición en el medio artificial NA (agar nutritivo)	24 horas	determinación CFU
	2) Aceite de canela	Aceite de canela: 100ml/hl 300 ml/hl			

	3) Major C 100 + Aceite de canela	500 ml/hl 1000 ml/hl Major C 100 + Aceite de canela:			
		250ml/hl+ 100ml/hl			
		250ml/hl+ 300 ml/hl			
		250ml/hl+ 500 ml/hl			
		250ml/hl+ 1000 ml/hl			

Descripción de los métodos:

[0061]

5

Microorganismo	Método	Diluyente	Medio de cultivo	Réplicas	Condiciones crecimiento	Incubación
1) <i>Penicillium</i> <i>spp.</i>	Siembra	Solución fisiológica	PDA, Pseudomonas	4	25 °C ± 1 °C	Hongos 5/6 días
2) <i>Botrytis spp.</i>			Agar			Bacterias: 24 h
3) <i>Monilinia fruticola</i>			(solamente para <i>P. syringae</i>)			
4) <i>Pseudomonas syringae</i>						

Análisis:

10 **[0062]** Las muestras se añadieron al medio artificial y se mezclaron suavemente antes de la solidificación de la solución de Agar.

Eficacia contra los hongos:

15 **[0063]** Se coloca una pequeña cantidad de esporas de hongos en el centro del agar glucosado de patata (PDA) de las placas Petri a 25° ± 1° C durante 5/6 días. Al final de la incubación se mide la inhibición del halo formado en comparación con las placas Petri PDA no tratadas (control).

Eficacia contra las bacterias:

20 **[0064]** Se prepara una suspensión de esporas de los microorganismos fitopatógenos y se añade una cantidad apropiada de las diluciones de interés (100 microlitros) en las placas Petri de Agar de Pseudomonas y se tritura en la superficie del Agar mediante una espátula «L» estéril.

25 **[0065]** Las placas Petri se incuban a 25 °C ± 1 °C durante 24 horas. Al final de la incubación se determinan las unidades que forman colonia (CFU/ml de producto).

Evaluación de los resultados:

30 **[0066]** Los resultados se indican en porcentaje de la incidencia de la enfermedad y porcentaje de eficacia de los productos testados.

Penicillium spp.

35 **[0067]** Muestras:

- Fungazil
- Timol
- Fungazil + timol

Hongo fitopatológico	Muestra	Incidencia de la enfermedad (%)	Eficacia (%)	Dosis ml/hl	
<i>Penicillium spp.</i>	No tratada	100	0		
	Fungazil (imazalil)	5	95	100 ml/hl	
	Timol		80	20	100 ml/hl
			50	50	300 ml/hl
			30	70	500 ml/hl
			30	70	1000 ml/hl
	Fungazil + timol		0	100	100 + 100ml/hl
			0	100	100 + 300 ml/hl
			0	100	100 + 500 ml/hl
			0	100	100 + 1000 ml/hl

Penicillium spp. -Cepa resistente al Imazalil

5 [0068] Muestras:

- Fungazil
- Timol
- Fungazil + timol

10

Hongo fitopatológico	Muestra	Incidencia de la enfermedad (%)	Eficacia (%)	Dosis ml/hl	
<i>Penicillium spp.</i> Cepa resistente al Imazalil	No tratada	100	0		
	Fungazil	85	15	100 ml/hl	
	Timol		30	70	100 ml/hl
			30	70	300 ml/hl
			20	80	500 ml/hl
		10	90	1000 ml/hl	
	Fungazil + timol		10	90	100 + 100ml/hl
			10	90	100 + 300 ml/hl
			5	95	100 + 500 ml/hl
			0	100	100 + 1000 ml/hl

Botrytis spp. - Cepa resistente al tiabendazol

15

[0069] Muestras:

- Tecto SC 500
- Carvacrol
- Tecto SC 500+ Carvacrol

Hongo fitopatológico	Muestra	Incidencia de la enfermedad (%)	Eficacia (%)	Dosis ml/hl	
<i>Botrytis spp.</i> Cepa resistente al TBZ.	No tratada	100	0		
	TBZ	100	0	100 ml/hl	
	Carvacrol		0	100	100 ml/hl
			0	100	300 ml/hl
			0	100	500 ml/hl
			0	100	1000 ml/hl
	TBZ + Carvacrol		0	100	100 + 100ml/hl
			0	100	100 + 300 ml/hl
			0	100	100 + 500 ml/hl
			0	100	100 + 1000 ml/hl

Monilinia fructicola**[0070]** Muestras:

- 5
- Xedathane 20
 - Bioxeda
 - Xedathane 20+ Bioxeda

Hongo fitopat6geno	Muestra	Incidenca de la enfermedad (%)	Eficacia (%)	Dosis ml/hl
<i>Monilinia fructicola</i>	No tratada	100	0	
	Xedathane 20	5	95	250 ml/hl
	Bioxeda	75	25	100 ml/hl
		70	30	300 ml/hl
		30	70	500 ml/hl
		20	80	1000 ml/hl
	Xedathane 20 + Bioxeda	0	100	250 + 100ml/hl
		0	100	250 + 300 ml/hl
		0	100	250 + 500 ml/hl
		0	100	250 + 1000 ml/hl

Monilinia fructicola - Cepa resistente al Pirimetanil

10

[0071] Muestras:

- 15
- Xedathane 20
 - Bioxeda
 - Xedathane 20+ Bioxeda

Hongo fitopat6geno	Muestra	Incidenca de la enfermedad (%)	Eficacia (%)	Dosis ml/hl
<i>Monilinia fructicola</i> Cepa resistente al Pirimetanil	No tratada	100	0	
	Xedathane 20	55	45	250 ml/hl
	Bioxeda	30	70	100 ml/hl
		20	80	300 ml/hl
		25	75	500 ml/hl
		20	80	1000 ml/hl
		10	90	250 + 100ml/hl
Xedathane 20 + Bioxeda	5	95	250 + 300 ml/hl	
	2	97	250 + 500 ml/hl	
	5	95	250 + 1000 ml/hl	

Pseudomonas syringae - Cepa resistente a los compuestos de amonio cuaternarios

20

[0072] Muestras:

- 25
- Major C 100
 - Aceite de canela
 - Major C 100 + Aceite de canela

Hongo fitopat6geno	Muestra	Incidenca de la enfermedad (%)	Eficacia (%)	Dosis ml/hl
<i>Pseudomonas syringae</i> Cepa resistente a los compuestos de amonio cuaternario	Major C 100	100	0	
	Aceite de canela	75	25	250 ml/hl
		70	30	100 ml/hl
		35	65	300 ml/hl
		5	95	500 ml/hl
		5	95	1000 ml/hl
	Major + Aceite de canela	35	65	100 + 100ml/hl
		25	75	100 + 300 ml/hl

		0	100	100 + 500 ml/hl
		0	100	100 + 1000 ml/hl

Conclusión:

5 **[0073]** Los aceites esenciales vegetales muestran un amplio espectro de actividad contra los hongos, las bacterias fitopatógenas, que puede resumirse de la siguiente manera:

Penicillium spp.:

10 **[0074]** los hongos están presentes en el 100 % de las placas Petri no tratadas. El timol presenta una actividad moderada (eficacia comprendida entre el 20 y el 70 % en una dosis comprendida entre 100 y 1000 ml/hl), mientras que la combinación de timol y de imazalil permite un control total en todas las dosis testadas.

Penicillium spp., cepa resistente al imazalil

15 **[0075]** Los hongos están presentes en el 100 % de las placas Petri no tratadas. El timol presenta una fuerte actividad (eficacia comprendida entre el 70 y el 90 % en una dosis comprendida entre 100 y 1000 ml/hl). Se puede obtener un control total mediante la combinación de Imazalil y de timol en la dosis 100 + 1000 ml/hl.

20 Botrytis soo., cepa resistente al tiabendazol

[0076] Los hongos están presentes en el 100 % de las placas Petri no tratadas. El tiabendazol no presenta ninguna eficacia en la dosis de 100 ml/hl, mientras que el carvacrol permite un control total de esta cepa en todas las dosis testadas. Ocurre lo mismo con la combinación de tiabendazol y de carvacrol.

25 Monilinia fructicola:

[0077] Los hongos están presentes en el 100 % de las placas Petri no tratadas.

30 **[0078]** El aceite de clavo permite un control moderado de los hongos en todas las dosis testadas, mientras que el aceite de clavo en combinación con el pirimetanil permite un control total de los hongos en todas las dosis testadas.

Monilinia fructicola, cepa resistente al pirimetanil:

35 **[0079]** El pirimetanil solo permite una eficacia del 45 % mientras que el aceite de clavo permite una eficacia comprendida entre el 70 y el 80 % en todas las dosis testadas.

[0080] La combinación de aceite de clavo y de pirimetanil permite un control casi total en las dosis testadas.

40 Pseudomonas syringae, cepa resistente a los compuestos de tipo amonio cuaternario.

[0081] La bacteria está presente en el 100 % de las placas Petri no tratadas.

45 **[0082]** El amonio cuaternario testado solo presenta una eficacia del 25 % mientras que el aceite de canela permite una eficacia de hasta el 80 % en 1000 ml/hl.

[0083] La combinación del amonio cuaternario con el aceite de canela permite un control total en todas las dosis testadas de aceite de canela y en una dosis inferior de más de la mitad en la dosis de comparación del compuesto amonio cuaternario (100 ml/hl frente a 250 ml/hl).

50

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de tratamiento fungicida de una o varias cepa/s de hongo/s fitopatógeno/s resistente/s a uno o varios agente/s fungicida/s sintético/s que comprende:
- 5 - la aplicación de una composición que comprende a título de aceite esencial el aceite de clavo y/o que a título de agente activo terpénico contiene eugenol; y
- la aplicación de pirimetanil a título de agente fungicida al que la/s cepa/s es/son resistente/s;
- 10 en plantas o productos alimenticios afectados por una dicha cepa.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 de forma que el pirimetanil se aplica simultáneamente al aceite de clavo y/o al eugenol, o de forma separada.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, de forma que el aceite de clavo y el pirimetanil se aplican en una proporción (parte aceite de clavo/parte pirimetanil) comprendida entre 0,3 y 3.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de forma que la/s cepa/s de hongo/s fitopatógeno/s resistente/s a uno o varios agente/s fungicida/s sintético/s es/son cepa/s resistente/s elegida/s entre la/s de los géneros *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Gloeosporium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Venturia*, *Rhizopus*, *Phoma* o *Helminthosporium*.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4 de forma que la/s cepa/s de hongo/s fitopatógeno/s resistente/s a uno o varios agente/s fungicida/s sintético/s es/son cepa/s resistente/s elegida/s entre la/s especies *Penicillium spp.*, como *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* o *Penicillium italicum*; *Botrytis spp.* como *Botrytis cinerea*, *Monilinia spp.* como *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena* o *Monilinia laxa*; *Gloeosporium spp.* como *Gloeosporium album*, *Gloeosporium fructigenum* o *Gloeosporium perennans*; *Phytophthora spp.*; *Fusarium spp.* o incluso *Alternaria alternata*; *Geotrichum candidum*; *Venturia inequalis*; *Rhizopus nigricans*; *Phoma exigua*; o *Helminthosporium Rhizoctonia solani*.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 5 de forma que la/s cepa/s de hongo/s fitopatógeno/s resistente/s a uno o varios agente/s fungicida/s sintético/s es/son cepa/s resistente/s elegida/s entre la/s de las especies *Penicillium spp.*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Botrytis spp.*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*.
- 30 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de forma que la aplicación se realiza antes o después de la cosecha.
- 35 8. Procedimiento de tratamiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de forma que la aplicación de dicha composición se hace por aspersión, duchado y/o inmersión.
- 40 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de forma que la composición comprende lecitina.
- 45 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de forma que la composición comprende además uno o varios emulsionantes.
- 50 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10 de forma que la composición es en forma de concentrado emulsionable y que el procedimiento comprende además la etapa previa de dispersión de dicho concentrado en agua antes de la aplicación.
12. Procedimiento según la reivindicación 11 de forma que la dilución de dicho concentrado antes de la aplicación se hace a razón del 0,5 al 2 % en agua.
- 55 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de forma que dicha composición antes de la dilución comprende entre 50 y 350 g/L en el caso del aceite de clavo y entre 20 y 250 g/L en el caso del eugenol, antes de una dilución eventual.

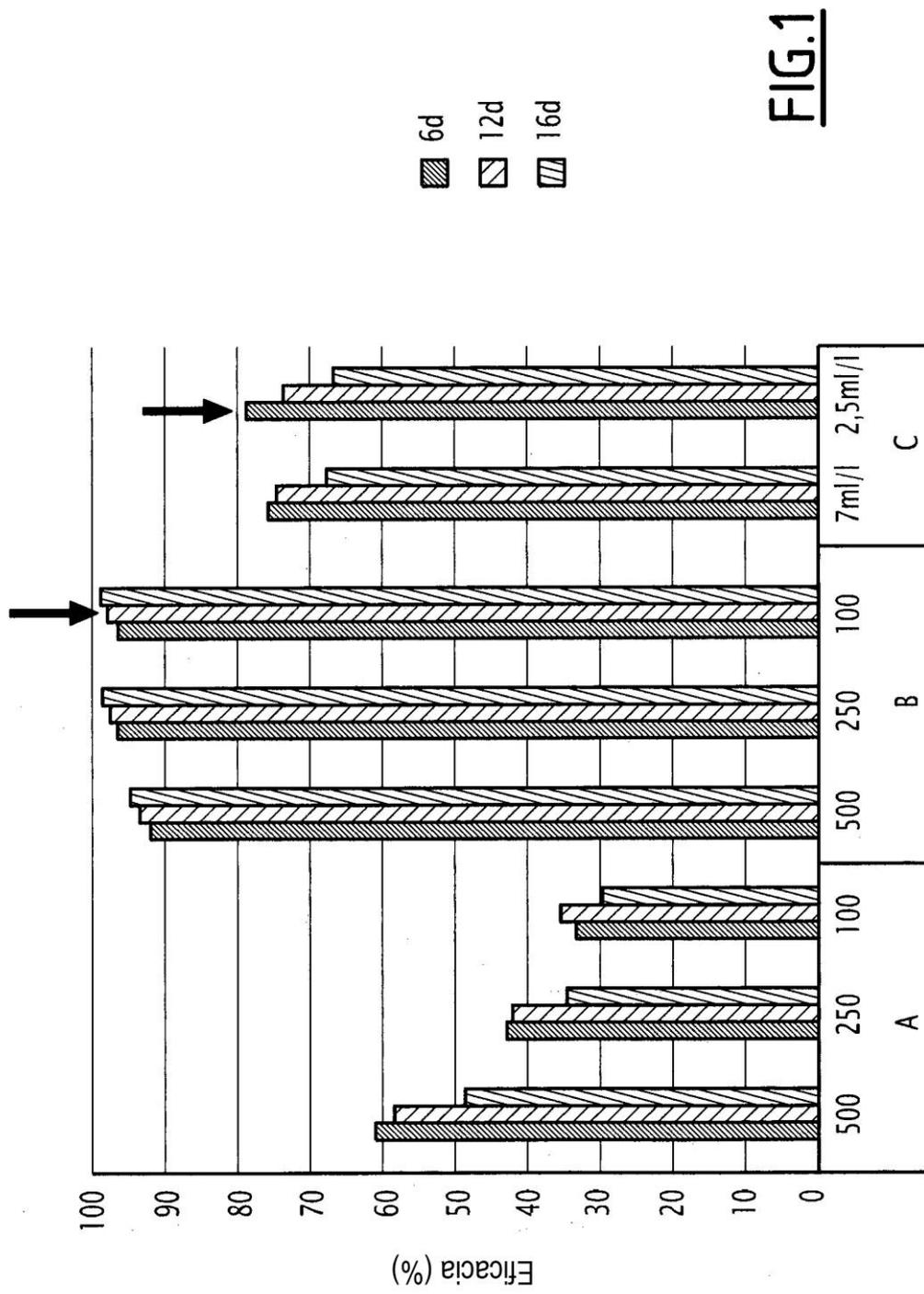


FIG.2

