

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 914**

51 Int. Cl.:

A01N 59/00 (2006.01)
A01N 25/02 (2006.01)
A01N 65/08 (2009.01)
A01N 65/12 (2009.01)
A01N 65/20 (2009.01)
A01N 65/44 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2015 PCT/IB2015/053274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15170252**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2015 E 15732941 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3139738**

54 Título: **Producto para activar los mecanismos de defensa en plantas**

30 Prioridad:
07.05.2014 IT BG20140014

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2020

73 Titular/es:
MULTIOSSIGEN S.P.A. (100.0%)
Via Roma, 77
24020 Gorle (BG), IT

72 Inventor/es:
FRANZINI, MARIANNO

74 Agente/Representante:
CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 773 914 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

Producto para activar los mecanismos de defensa en plantas

5 **Divulgación**

La presente invención se refiere a un procedimiento para activar los mecanismos de defensa en plantas, más específicamente para la defensa frente a bacterias, virus y mohos, aplicable en particular a plantas. El control de plagas se define genéricamente como un conjunto de operaciones destinadas a la eliminación, o por lo menos limitación, de los parásitos presentes en un medio dado, que en el presente caso particular se refiere principalmente al sector agrícola, que comprende tanto plantas como animales.

En la mayoría de casos, se utilizan productos químicos que resuelven el problema de la plaga pero que con frecuencia inducen otros problemas, tales como contaminación y/o toxicidad. Además, dichos productos presentan largos tiempos de descomposición y, por lo tanto, dejan residuos perjudiciales en el medio ambiente.

Además, entre las sustancias presentes en los tejidos de las plantas frutales (hojas, frutos) existen compuestos, con frecuencia cuantitativamente irrelevantes, que realizan una función protectora significativa para la planta misma y desempeñan un papel importante en términos de nutrición y salud. Las principales son determinados metabolitos secundarios, tales como polifenoles, vitaminas, microelementos y enzimas.

La presencia de dichas sustancias en los tejidos vegetales mejora la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico.

Por lo tanto, se ha prestado particular atención a las intervenciones que pueden maximizar el contenido de dichas sustancias, tanto en el fruto, para incrementar su valor nutracéutico, como en las hojas, a fin de fortalecer las defensas de la planta.

El documento nº WO2013/040721 da a conocer que los aceites naturales en primer lugar se tratan con alcoholes y posteriormente en un reactor mediante burbujeo con una mezcla de ozono y oxígeno, durante un determinado periodo de tiempo que garantice la producción de un aceite ozonizado para el tratamiento de las micosis y las infecciones bacterianas y víricas en seres humanos, animales o plantas.

El documento nº WO2012/120454 da a conocer una composición que comprende una cantidad eficaz de un aceite ozonizado y una cantidad eficaz de un aceite esencial extraído de la manzanilla y a los usos del mismo en el sector cosmético y farmacéutico.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la activación de los mecanismos de defensa en plantas que supera las desventajas de la técnica conocida.

Un objetivo adicional es proporcionar un procedimiento para la activación de los mecanismos de defensa en las plantas que no resulte perjudicial para los animales o plantas mismos.

Se describen características adicionales de la invención en las reivindicaciones dependientes.

La presente solución presenta diversas ventajas respecto a las soluciones de la técnica conocida.

La utilización de aceite vegetal, preferentemente de tipo alimentario, no contamina el medio ambiente y los productos alimentarios tratados, según la presente invención, pueden utilizarse en alimentos humanos sin ningún problema.

Se utiliza la característica desinfectante y pesticida del ozono, que es activa sobre bacterias, virus, hongos y esporas.

Además, mediante la adición de ozono al aceite, se crean ozónidos, obteniendo por lo tanto una mayor retención de los mismos dentro del aceite.

Los ozónidos son el resultado de la saturación de las moléculas de ácidos grasos contenidas en el aceite vegetal con los 3 átomos de oxígeno del ozono.

El ozono se mantiene dentro del aceite durante aproximadamente 2 años con únicamente un pequeño porcentaje de pérdida (1% a 3%) de contenido de ozono, al contrario que el agua, que retiene el ozono durante solo un tiempo corto, en particular a temperaturas más elevadas (superiores a 25-30°C).

Las características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente de una forma de realización práctica.

Según la presente invención, el procedimiento comprende aceite vegetal ozonizado, es decir, se añade ozono al aceite y dicho aceite ozonizado se utiliza como pesticida en agricultura.

5 El aceite de oliva, el aceite de girasol, el aceite de maíz, el aceite de cacahuete, el aceite vegetal combinado y los aceites vegetales grasos en general se consideran aceites vegetales.

10 Para ozonizar el aceite vegetal, se utiliza un aparato que produce de una manera conocida 1 a 1000 g/hora de ozono que se introduce en una cámara de mezcla con el aceite, de manera que se obtiene una concentración de ozono de 4/10 mg/l con una presión de mezcla de 0.1 a 6 bar durante un tiempo de entre 6 horas y 1 hora.

Por lo tanto, se obtiene un aceite que comprende ozono en una cantidad de entre 1% y 10% y más preferentemente en una cantidad de entre 1% y 5% del peso del compuesto (aceite y ozono).

15 Es decir, se forman ozónidos en cantidades de entre 100 y 1500 en cada litro de aceite.

20 En una forma de realización del aceite ozonizado, según la presente invención, se pone en contacto 1 l de aceite de oliva con un flujo de 10 g/hora de ozono durante un tiempo de 1 hora a una presión de 2 bar. Se utiliza un ozonizador de tipo conocido.

A continuación, se pulveriza el aceite ozonizado, con aparatos de pulverización conocidos, sobre las plantas que deben tratarse.

25 En una forma de realización ventajosa, el aceite ozonizado se mezcla con agua para obtener el porcentaje deseado de ozono en la mezcla.

30 En particular, el aceite ozonizado se mezcla con agua en proporciones de 1 a 1 y de hasta 1 a 100 (1 parte de aceite y 100 partes de agua), más preferentemente en proporciones de 1 a 50 y 1 a 10. Es decir, el aceite ozonizado en agua se encuentra en una cantidad de entre 1% y 100% del peso total, y más preferentemente en una cantidad de entre 1% y 15% del peso total.

35 Para la mezcla de aceite y agua con el fin de obtener una emulsión, preferentemente de aceite en agua, se utiliza un emulsionante en una cantidad comprendida entre 5% y 10% del peso total de la mezcla, tal como lecitina de soja, por ejemplo.

40 Pueden utilizarse otros emulsionantes, por ejemplo eucerina anhidra, lanolina anhidra, alcoholes de lanolina, fosfatidilcolina, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, alcohol cetil-estearílico, diestearato de glicol, cera de abeja, monoestearato de polietilenglicol, palmitato de cetilo, polisorbato, aceite de ricino hidrogenado y estearato sódico.

La utilización de la mezcla de aceite ozonizado y agua o aceite ozonizado solo depende del grado de activación requerido, si el tratamiento es sólo preventivo o es curativo, y del grado de infestación de las plantas que debe tratarse.

45 El aceite ozonizado, mezclado con agua en caso necesario, se pulveriza utilizando procedimientos tradicionales sobre plantas, flores y suelo.

50 Los ensayos de campo han demostrado que las plantas frutales infestadas con parásitos y tratadas con aceite ozonizado se liberan de las plagas en un tiempo comparable, o más corto, que otras plantas infestadas y tratadas con procedimientos tradicionales.

55 Asimismo se llevó a cabo un estudio en el Research Centre (CRA) for Agriculture and Mediterranean Crops en Acireale (CT). Se utilizaron árboles de naranja dulce (*Citrus sinensis*) de dos años de edad pertenecientes al cultivar 'Ovale' injertados en citrange Carrizo (*Poncirus trifoliata*). Las plantas se cultivaron con fines ornamentales en tiestos de polietileno de 8 litros llenos con una mezcla de turba rubia y suelo agrícola y, aunque pequeños, se desarrollaron por completo y fructificaron.

60 Se utilizaron 27 plantas divididas en tres bloques de 9 plantas cada uno. El primer bloque se consideró un control; el segundo bloque se trató según un primer procedimiento y el tercer bloque se trató según un segundo procedimiento.

Cada bloque (de 9 plantas) se dividió en subbloques de 3 plantas. Cada subbloque de 3 plantas se dispuso aleatoriamente entre los demás subbloques.

65 Se utilizó un aceite ozonizado con la composición siguiente.

ES 2 773 914 T3

Se puso en contacto (de una manera conocida) un litro de aceite de girasol con un flujo de ozono de 10 g/hora durante 1 hora a una presión de 2 bar.

5 El aceite preparado de esta manera (en una cantidad especificada posteriormente) se mezcló con 5 litros de agua y lecitina de soja de grado alimentario en una cantidad igual a 10% del peso total de la mezcla.

Las plantas se trataron mediante pulverización de la cantidad completa de mezcla utilizando un pulverizador portátil.

10 El primer bloque (control) se trató con solo agua.

El segundo bloque, según el primer procedimiento, se trató una vez con aceite ozonizado en un porcentaje de 4% del peso total de la mezcla.

15 Por lo tanto, la mezcla comprendía 4% de aceite ozonizado, 10% de lecitina de soja y 86% de agua, respecto al peso total de la mezcla.

20 El tercer bloque, según el segundo procedimiento, se trató dos veces (primer tratamiento en el tiempo T0 y segundo tratamiento en el tiempo T1 después de 7 días desde T0) con aceite ozonizado en un porcentaje de 2% del peso total de la mezcla.

Por lo tanto, la mezcla comprendía 2% de aceite ozonizado, 10% de lecitina de soja y 88% de agua, respecto al peso total de la mezcla.

25 Se analizaron las características siguientes antes y después del tratamiento y se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos.

30 Determinación del índice SPAD en las hojas; determinación del contenido de macroelementos, mesoelementos y microelementos en las hojas; determinación del contenido de vitamina C en las hojas; determinación del contenido de polifenoles totales en las hojas; calidad del fruto; determinación del contenido de ácido ascórbico (vitamina C) en el zumo y determinación del contenido de polifenoles totales en el zumo. Se observó a partir de los resultados que antes de los tratamientos no se observaban diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de hojas (procedimiento 1 y procedimiento 2) respecto al control, en términos tanto de nivel de clorofila (SPAD) como de contenido de polifenol y ácido ascórbico. Además, los datos de macroelementos y microelementos subrayan que las plantas sometidas al tratamiento se encontraban en condiciones nutricionales y fisiológicas óptimas.

35 En las plantas sometidas al tratamiento con aceite vegetal ozonizado al 4% (procedimiento 1), se observó un incremento del contenido de ácido ascórbico ya después de una semana (7 días) de tratamiento, con un incremento estadísticamente significativo ($p \leq 0.001$) de 40% respecto al control (tabla 1). La medición se realizó 7 días después del tratamiento T1.

40 Asimismo se produjo la misma tendencia en las plantas tratadas con aceite vegetal ozonizado al 2% (procedimiento 2) (tabla 2). Las mediciones se realizaron 7 días después del tratamiento T1 y 7 días y 4 horas después del tratamiento T2.

45 El contenido de polifenoles totales determinado en las hojas para el procedimiento 1 se muestra en la tabla 3 y para el procedimiento 2, en la tabla 4. Después de 4 horas del segundo tratamiento, el contenido de polifenoles totales se incrementó adicionalmente respecto al control y, finalmente, tras 8 horas, alcanzó un contenido de 438 mg/100 g de catequina, con una tendencia estadísticamente significativa de +10% respecto al control.

50 Las mediciones se obtuvieron 7 días después del tratamiento T1, 7 días y 4 horas después del tratamiento T2, y 7 días y 8 horas después del tratamiento T2.

55 Se determinó el contenido de ácido ascórbico mediante HPLC (5) utilizando un HPLC Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, MA) conectado a un detector Waters 996 PDA y controlado con el software Empower (Waters, Milford, MA). La columna utilizada era una C18 Hypersil ODS (Phenomenex, Torrance, CA) de 250 mm x 4.6 mm, d.i.: 5 μ m, mantenida a una temperatura de 35°C, y la elución se llevó a cabo con ácido ortofosfórico 0.02 a un caudal de 1.0 ml/min.

60 Se vertieron 5 ml de zumo centrifugado en un matraz y se llevaron a un volumen total de 50 ml con solución al 3% de ácido metafosfórico. Una parte de dicha solución se filtró con jeringa sobre un filtro de PTFE de 0.45 μ m y después se inyectaron 20 μ l de filtrado en la HPLC. La elución se llevó a cabo con ácido ortofosfórico 0.02 M a un caudal de 1.0 ml/min. Se fijó la longitud de onda en 260 nm. La concentración de vitamina C se expresa como mg/100 ml de ácido ascórbico.

65 Se determinaron los polifenoles totales en las hojas mediante el procedimiento espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (7).

Las muestras de hojas se lavaron con agua destilada, se congelaron a -80°C, se liofilizaron y después se molieron.

Una parte de 0.2 g de polvos molidos se extrajo en 10 ml de etanol al 95% durante 3 h en la oscuridad en un agitador oscilatorio. A continuación, se centrifugó y se mezcló una parte de la solución (1 ml) diluida apropiadamente, con 5 ml de reactivo comercial de Folin-Ciocalteau (previamente diluido 1:10 v/v con agua) y 4 ml de una solución al 7.5% de carbonato sódico. La mezcla se dejó en la oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente; posteriormente se obtuvo una lectura espectrofotométrica a 740 nm y se expresó la concentración de fenoles totales como mg/100 g de catequina.

Los parámetros físico-químicos tales como la acidez total (AT) y los sólidos solubles totales (SST), determinados en el zumo de fruta del cv 'Ovale' de naranja (datos no representados), subrayaron que antes del tratamiento, la fruta había alcanzado un nivel de maduración óptimo, y dichos parámetros no cambiaron después de realizar los diferentes tratamientos.

Con respecto al contenido de ácido ascórbico, la fruta mostró un contenido medio de ácido ascórbico de 25 mg/100 ml. Una semana después de los tratamientos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cualquiera de las muestras en comparación con el control.

Por lo tanto, se encontró que el aceite ozonizado, según la presente invención, potencialmente es capaz de mejorar las respuestas de las plantas sometidas a estrés biótico y abiótico.

De hecho, el tratamiento estimuló un incremento del contenido de dichos metabolitos secundarios en las hojas y, principalmente, en las plantas tratadas con 4% de una única solución.

Este incremento, asimismo observado en menor grado en las hojas de plantas tratadas dos veces con 2%, puede considerarse un efecto directo del tratamiento realizado.

El incremento de la concentración de dichas sustancias se obtuvo tras siete días del primer tratamiento, con diferencias significativas en comparación con las muestras no tratadas. Los resultados positivos obtenidos en las muestras 1 y 2 no pueden atribuirse a una condición nutricional y/o fitosanitaria mejorada de las plantas, ya que, tal como se informa en las tablas 1 a 3, ninguna de las muestras sometidas a ensayo para el índice SPAD y para el contenido de macroelementos, mesoelementos y microelementos mostró diferencias significativas.

En conclusión, considerando los efectos positivos observados en los tejidos vegetales estudiados y la falta de efectos negativos (quemadura, desecación, etc.) en las plantas tratadas, el aceite vegetal ozonizado ciertamente puede considerarse una sustancia con actividad corroborativa.

Tabla 1

	Control mg/100 g de ácido ascórbico	Muestra 1 (4%) mg/100 g de ácido ascórbico
T0	90 mg	
T1	100 mg	165 mg

Tabla 2

	Control mg/100 g de ácido ascórbico	Muestra 2 (2%) mg/100 g de ácido ascórbico
T0	90 mg	
T1	100 mg	120 mg
T2	100 mg	129 mg

Tabla 3

	Control mg/100 g de catequina	Muestra 1 (4%) mg/100 g de catequina
T0	338 mg	
T1	390 mg	430 mg

Tabla 4

	Control mg/100 g de catequina	Muestra 2 (2%) mg/100 g de catequina
T0	338 mg	
T1	400 mg	410 mg
T2 (7 días+ 4 horas)	400 mg	415 mg
T2 (7 días+ 8 horas)	390 mg	438 mg

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la activación de los mecanismos de defensa en plantas que comprende las etapas de:
 - 5 mezclar aceite vegetal y ozono para proporcionar aceite ozonizado, en el que el aceite obtenido comprende ozono en una cantidad comprendida entre 1% y 10% del peso total;
 - mezclar dicho aceite ozonizado con agua para proporcionar aceite ozonizado en agua en una cantidad comprendida entre 1% y 15% del peso total y un emulsionante en una cantidad comprendida entre 5% y 10%
10 del peso total para proporcionar un compuesto;
 - pulverizar dicho compuesto a dichas plantas.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho aceite vegetal es uno o más de los aceites siguientes: aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de cacahuete y aceite vegetal combinado.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho emulsionante es lecitina de soja.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho emulsionante es uno o más de los emulsionantes siguientes: lecitina de soja, eucerina anhidra, lanolina anhidra, alcoholes de lanolina, fosfatidilcolina, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, alcohol cetilestearílico, diestearato de glicol, cera de abeja, monoestearato de polietilenglicol, palmitato de cetilo, polisorbato, aceite de ricino hidrogenado y estearato sódico.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dichas plantas comprenden *Citrus sinensis*.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha fase de mezclar aceite vegetal con ozono comprende la formación de ozónidos en cantidades desde 100 a 1500 para cada litro de aceite.