

(19):



República Argentina  
Ministerio de Economía y Producción  
Secretaría de Industria, Comercio y de la  
Pequeña y Mediana Empresa  
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial

(11) No de publicación:

**AR 106443 A1**

(41) Fecha de publicación:

**17.01.2018**

(51) Int. Cl.:

**C07C 49/743, 39/08, A01N  
31/06, 31/16, A01P 3/00,  
5/00, 7/04, C12N 1/14,  
C12P 7/04, 7/26**

(12)

## Solicitud de Patente Independiente

(22) Fecha de presentación: **21/10/2016**

(71) Solicitante(s):

(21) Número de solicitud: **P160103222**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES**

(30) Prioridad/es: **ES P 201531527 23/10/2015**

**CIENTÍFICAS , C/ SERRANO, 117, E-28006 MADRID, ES**

(83) Depósito microorganismo N°: **CECT 20941**

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA , EDIFICIO CENTRAL**

**UNIVERSIDAD, PLANTA 0, C. DELGADO BARRETO,**

**S/Nº, E-38200 SANTA CRUZ DE TENERIFE, ES**

**THE ENERGY AND RESOURCES INSTITUTE (TERI) ,**

**DARBARI SETH BLOCK, HABITAT PLACE, LODHI ROAD,**

**NEW DELHI 110 003, IN**

(74) Representante: **195**

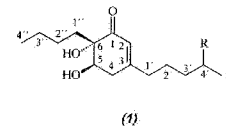
(54) Título:

### BIOCIDAS NATURALES DE AMPLIO ESPECTRO

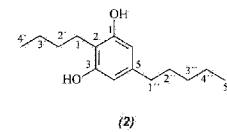
(57) Resumen:

En el campo de la agricultura los organismos perjudiciales para la vegetación constituyen un importante problema en relación con la productividad de las cosechas. Un producto de fermentación obtenido a partir de hongos endófitos de la familia Stemphylium solani, que puede comprender un compuesto de fórmula (1) y un segundo compuesto conocido de fórmula (2), y que presenta actividad biocida simultáneamente contra más de una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas y que preferentemente se seleccionan entre insectos - plaga, hongos y nematodos. Tanto el producto de fermentación, como los compuestos incluidos, se usan en la elaboración de una composición biocida de amplio espectro. Finalmente, también se incluye el procedimiento de obtención del producto de fermentación el compuesto de fórmula (1). Reivindicación 1: Producto de fermentación de un microorganismo fermentador que comprende un compuesto de fórmula (1), donde R se selecciona entre H y OH, o un isómero, o una sal o un solvato del mismo. Reivindicación 3: Producto de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende adicionalmente un compuesto de fórmula (2), o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

P16\_3222



(1)



(2)

En caso de ser Modificatoria indicar el N° de Acta

**INPI** Exp.: **20160103222**

PARA USU  
NACIONAL I



Trámite: 16203430 PATENTES Importe: \$8540.-

Fecha/Hora: 21/10/2016 14:44:27.240

Agente: ESTUDIO MARVAL & O'FARRELL

INSTITUTO NA  
ADMINIS



REPUBLICA ARGENTINA

**SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION**

**SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD**

Hoja **1** de **2**

<b>I. SOLICITANTE (S)</b>		<b>CANTIDAD DE SOLICITANTES</b>		<b>3</b>
<b>Consejo Superior de Investigaciones Científicas</b>			C.U.I.T. / C.U.I.L. / C.D.I.:	
Consignar Nombre y Apellido o Denominación Social (de uno de ellos el resto en ANEXO)			D.N.I.	
<b>Personas Físicas:</b>		<b>Estado Civil:</b>		<b>Nupcias</b>
Nombre y apellido del cónyuge:			D.N.I.	
C/ SERRANO, 117				
Domicilio Real: Calle: N°: Piso y Dpto				
Localidad:	MADRID,	C. P. N°	28006	País de Residencia: ES
AV. LEANDRO N. ALEM 882, 13° PISO, CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES			1001	
Domicilio Legal - Calle - N° - Localidad - Provincia			Codigo Postal	
Dirección de e-mail: patents@marval.com		Teléfono:		4310-0100

<b>II. OBJETO</b>				
Título de la invención	BIOCIDAS NATURALES DE AMPLIO ESPECTRO			
Cáncer de la Patente / Modelo de Utilidad	INDEPENDIENTE			
Adicional a:	Patente N°		Divisional de la Solicitud N°	
	Solicitud N°			

PRIORIDAD (LEY 17.011)		
PAIS	NUMERO	FECHA
ES	P201531527	23/10/2015

**INPI**  
**Administración Nacional de Patentes**  
**CONTROL ADMISIÓN**  
**INTIMACIÓN**  **NO**  **SI**

DEPOSITO DE MICROORGANISMOS	
FECHA DE DEPOSITO	25/09/2015
N° DE ACCESO AL DEPOSITO	CECT 20941
Colección Española de Cultivos Tipo	
Nombre de la Institución Depositaria	
	ES
Domicilio de la Institución	
	País
Datos del Depositante	
cepa Aa22 de S. solani	
Origen del Material Biológico y Genético	

Continúa en hoja anexa:

### III. SOCIEDADES

SOCIEDAD REPRESENTADA POR	IVAN ALFREDO POLI			QUIEN
DECLARA BAJO JURAMENTO QUE INVISTE EL CARÁCTER DE	Agente 563 APODERADO			QUE SU
MANDATO SE ENCUENTRA VIGENTE Y LA SOCIEDAD SE HALLA INSCRIPTA EN				
Datos de Inscripción en R.P.C. / I.G.J.	Fecha:	Numero	Nro Folio	Tomo:

### IV. MANDATO

Poder inscripto en el I.N.P.I. bajo el número: **18.229**, PODERES SUSTITUTOS: 4069, 4969, 11227, 18998, 27066, 30754, 56015, 56073, 56074 y 56075

EN ESTE ACTO SE AUTORIZA A: (Apellido y Nombre y N° de DNI )

O'Farrell, Miguel B. L.E. 4300751; Ellmann, Sergio M. DNI 16515914; Quadrio, Iris V. DNI 13615823; Bensadon, Martín DNI 16948579; Giay, Gustavo P. DNI 22362646; Poli, Iván A. L.E. 8426021; Chajchir, Martín G. DNI 25142351; Iribarne, Sebastián M. DNI 17737288; Sanchez Echagüe, Ignacio M. DNI 26281385 y/o López Mañán, Juan M. DNI 25430662

Para todas aquellas gestiones de mero tramite tales como practicar desgloses, retirar testimonios, certificados, títulos, copias y notificaciones en el expediente.

Contestar vistas, desistir solicitud, realizar peticiones (solamente cuando el Autorizado sea Agente de la Propiedad Industrial)

SE ACOMPAÑA PODER  AGENTE N°

### V. DECLARACION DE DIVULGACION PREVIA


A los efectos de lo indicado en el Art. 5° de la Ley 24.481, manifiesta que el presente invento ha sido divulgado previamente:  (SI /NO) En caso afirmativo en fecha:

### VI. OBSERVACIONES

DECLARA Y ACOMPAÑA CERTIFICADO DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS: 25/09/2015 CECT 20941//PIDE PLAZO DE 90 DIAS PARA ACOMPAÑAR COPIA CERTIFICADA DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD.

Se deja constancia que los datos vertidos en el presente formulario revisten el carácter de declaración jurada; cualquier falsedad inserta en el mismo acarreará las consecuencias legales correspondientes.

NOTA: El pago del arancel correspondiente deberá concretarse al momento de la presentación o durante, las dos primeras horas de atención del subsiguiente día hábil. De no ocurrir el pago en dicho plazo, de pleno derecho de tendrá por no efectuada la presentación, la que no producirá efecto alguno.

	 IVAN ALFREDO POLI Agente 563
Firma del / los autorizado / s	Firma del solicitante o su apoderado o representante legal

USO INTERNO			
LA PRESENTACION CONSTA DE <input type="text"/> FOJAS			
CAMBIO DE DOMICILIO/CORREO ELECTRONICO/TELEFONO:		FECHA <input type="text"/>	
Domicilio Real: Calle <input type="text"/> N° <input type="text"/>			
Localidad:	C. P. N°	País de Residencia:	
Domicilio Legal: Calle <input type="text"/> N° <input type="text"/> Localidad <input type="text"/> Provincia <input type="text"/>			Codigo Postal <input type="text"/>
Dirección de e-mail: <input type="text"/>		Teléfono: <input type="text"/>	
CAMBIO DE APODERADO / AUTORIZADO:		FECHA <input type="text"/>	
Nuevo Apoderado o Autorizado: <input type="text"/>			
TRANSFERENCIA O CAMBIO DE RUBRO: <input type="text"/>			

PARA USO  
NACIONAL DE

INPI Exp.: 20160103222



Trámite: 16203430 PATENTES Importe: \$8540.-

Fecha/Hora: 21/10/2016 14:44:27.240

Agente: ESTUDIO MARVAL & O'FARRELL



REPUBLICA ARGENTINA

INSTITUTO NACIONAL DE  
ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES



ANEXO TITULARES

Hoja 2 de 2

Título de la invención: BIOCIDAS NATURALES DE AMPLIO ESPECTRO

Cáncer de la Patente / Modelo de Utilidad: INDEPENDIENTE

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA C.U.I.T./C.O.I.L./C.D.I.:

Consignar Nombre y Apellido o Denominación Social D.N.I.:

Personas Físicas: Estado Civil: Nupcias:

Nombre y apellido del cónyuge: D.N.I.:

EDIFICIO CENTRAL UNIVERSIDAD, PLANTA 0, C. DELGADO BARRETO, S/N

Domicilio Real-Calle, Nº, Piso y Dpto.

Localidad: SANTA CRUZ DE TENERIFE, C. P. Nº 38200 País de Residencia: ES

Personas Jurídicas: Datos de Inscripción en R.P.C. / I.G.J. Fecha: Numero Nro Folio Tomo:

Dirección de e-mail: Teléfono:

Marval O'Farrell & Mairal, L.N. Alem 928 7º, CP 1001, C.A.B.A., **GESTOR DE NEGOCIOS, PODERES**  
SUSTITUTOS: 4069, 4969, 11227, 18998, 27066, 30754, 56015, 56073, 56074 y 56075,  
Patents@marval.com; E-195, 4310-0100

IVAN ALFREDO POLI  
Agente 563

Datos del representante legal

Firma del solicitante o su representante legal

THE ENERGY AND RESOURCES INSTITUTE (TERI) C.U.I.T./C.O.I.L./C.D.I.:

Consignar Nombre y Apellido o Denominación Social D.N.I.:

Personas Físicas: Estado Civil: Nupcias:

Nombre y apellido del cónyuge: D.N.I.:

DARBARI SETH BLOCK, HABITAT PLACE, LODHI ROAD

Domicilio Real-Calle, Nº, Piso y Dpto.

Localidad: NEW DELHI, C. P. Nº 110003 País de Residencia: IN

Personas Jurídicas: Datos de Inscripción en R.P.C. / I.G.J. Fecha: Numero Nro Folio Tomo:

Dirección de e-mail: Teléfono:

Marval O'Farrell & Mairal, L.N. Alem 928 7º, CP 1001, C.A.B.A., **GESTOR DE NEGOCIOS PODERES**  
SUSTITUTOS: 4069, 4969, 11227, 18998, 27066, 30754, 56015, 56073, 56074 y 56075,  
Patents@marval.com; E-195, 4310-0100

IVAN ALFREDO POLI  
Agente 563

Datos del representante legal

Firma del solicitante o su representante legal

# Memoria Descriptiva

de la

# Patente de Invención

*Sobre*

*"BIOCIDAS NATURALES DE AMPLIO ESPECTRO"*

*Solicitado por:*

*Consejo Superior de Investigaciones Científicas \**  
*UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA \* THE ENERGY AND*  
*RESOURCES INSTITUTE (TERI), residentes en c/ Serrano,*  
*117 (28006), Madrid, España \* Edificio Central Universidad,*  
*Planta 0, C. Delgado Barreto, S/N (38200), Santa Cruz de*  
*Tenerife, España \* Darbari Seth Block, Habitat Place, Lodhi*  
*Road (110003), New Delhi, INDIA*

## BIOCIDAS NATURALES DE AMPLIO ESPECTRO

### DESCRIPCIÓN

#### SECTOR DE LA INVENCION

La invención se sitúa dentro del campo de la agricultura, y más concretamente, en el sector de los biocidas que comprenden sustancias producidas o extraídas de microorganismos. Se propone un producto de fermentación con actividad biocida de amplio espectro y un método de obtención del mismo. El producto de fermentación se caracteriza por comprender al menos un nuevo compuesto de fórmula (I), que también se reivindica, y al compuesto de fórmula (II) que dotan al producto de fermentación de su característica actividad biocida. La invención también proporciona una cepa particular de *Stemphylium solani*, y composiciones biocidas que comprenden el producto de fermentación, el compuesto de fórmula (I) y/o la cepa de la invención. Finalmente, la invención también se refiere al uso del producto de fermentación, del compuesto de fórmula (I) y/o de la cepa de la invención, ya sea directamente o a través de una composición biocida que los comprenda, como biocidas y a un método de amplio espectro para el control de organismos perjudiciales para las plantas.

#### ESTADO DE LA TECNICA

Los hongos endófitos son un grupo polifilético con un alto grado de diversidad que se caracteriza funcionalmente por su capacidad para habitar en los tejidos de las plantas sin causar daños aparentes. La colonización por hongos endófitos puede contribuir a la adaptación de la planta huésped a situaciones de estrés y en muchos casos se ha correlacionado la tolerancia de la planta huésped a estrés biótico con la presencia de productos naturales fúngicos (Aly et al. 2010. *Fungal Diversity* 41, 1–16).

El género *Stemphylium* está compuesto por hongos filamentosos y saprofitos del grupo Hifomicetes que se distribuyen ampliamente en todo el mundo, asociados a vegetación en descomposición. En agricultura, las especies de *Stemphylium* son responsables de enfermedades en muchos cultivos, a los que causan daños foliares, y se dispersan a través de las semillas.

A partir de los metabolitos producidos por las especies de *Stemphylium* de mayor importancia fitopatogénica: *S. botryosum*, *S. herbarum*, *S. alfalfae*, *S. sarciniforme*, se

han identificado cinco compuestos mayoritarios, stemfilina, stemfiloxina II, stemfiperilenol, stemfol y un compuesto relacionado (Barash et al. 1975. *Plant Physiol.* 55, 646-651; Andersen et al. 1995. *Mycol. Res.* 99, 672-676; Solfrizzo et al. 1994. *Nat. Toxins* 2, 14-18). Por otro lado, se ha descrito la producción de taxol por una especie de *Stemphylium* sp. aislada como endófito de *Taxus baccata* (Mirjalili et al. 2012. *FEMS Microbiol. Lett.* 328, 122-9).

Varias especies de *Stemphylium* han sido aisladas como endófitos de distintas plantas, por ejemplo, en la planta endémica australiana *Eremophila longifolia* (Zaferanloo et al. 2013. *World J Microbiol. Biotechnol.* 29, 335-345); en *Vitis vinífera* (González y Tello. 2011. *Fungal Diversity* 47:29-42); e incluso se ha identificado alguna cepa de *S. solani* en *Arabidopsis thaliana* (García et al. 2012. *Fungal Diversity*. DOI : 10.1007/s13225-012-0219-0).

Por otra parte, a partir de los extractos de *Stemphylium globuliferum* procedentes de *Mentha pulegium* (Debbab et al. 2009. *J. Nat. Prod.* 72, 626-31), se han identificado los compuestos: alterporriol G y su isómero terporriol H, altersolanol, altersolanol L, stemfipirona, 6-metoxilalaternina, macrosporina, altersolanol A, alterporriol E, alterporriol D, alterporriol A, alterporriol B y altersolanol J.

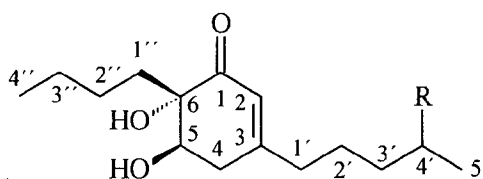
La agricultura se enfrenta constantemente a serios problemas relacionados con la incidencia de plagas y ataques de organismos patógenos con la consiguiente reducción de la productividad. Aunque tradicionalmente el método habitual para el control de organismos perjudiciales que afectan a plantas ha sido la aplicación de productos químicos de síntesis, que además de su alto precio económico implica un grave coste ambiental, el nuevo entorno regulatorio, véase por ejemplo tanto a nivel nacional como europeo el Reglamento (CE) N° 1107/2009, ha limitado drásticamente el número de materias activas y la disponibilidad de los productos fitosanitarios destinados al control de las enfermedades causadas por estos organismos perjudiciales.

Dentro de este escenario, la búsqueda de compuestos activos, alternativos y eficaces, que tengan poca persistencia en el medio, que reduzcan la aparición de resistencias cruzadas, que no presenten efectos citotóxicos indeseables y que tengan su origen en por ejemplo, hongos endófitos, parece ser una buena alternativa. Adicionalmente,

sería altamente deseable que estos compuestos fuesen de amplio espectro, es decir, fuesen activos contra diferentes organismos perjudiciales de forma simultánea.

### EXPLICACION DE LA INVENCION

La presente invención proporciona en un primer aspecto un producto de fermentación que comprende un compuesto de fórmula (I):

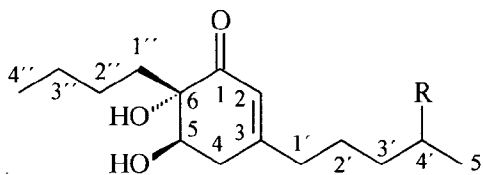


(I)

donde R se selecciona entre H y OH,

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

La presente invención también proporciona un producto de fermentación de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* con actividad biocida de amplio espectro, caracterizado por que comprende un compuesto de fórmula (I):

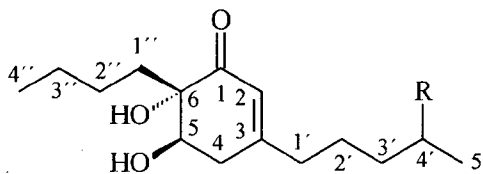


(I)

donde R se selecciona entre H y OH,

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

En un segundo aspecto, la invención proporciona el nuevo compuesto de fórmula (I)





(I)

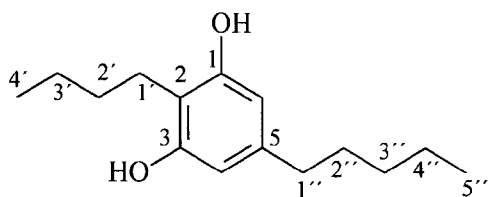
donde R se selecciona entre H y OH,

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento de obtención del producto de fermentación definido en el primer aspecto de la invención, que comprende (a) una etapa de fermentación que comprende cultivar el microorganismo fermentador en un medio de cultivo adecuado y en condiciones adecuadas; y opcionalmente (b) una o más etapas de extracción.

Preferentemente, el hongo endófito que se utiliza en el procedimiento de obtención es la cepa Aa22 de *S. solani* con número de depósito CECT 20941.

Aunque tanto los compuestos de fórmula (I) de la invención como el compuesto de fórmula (II)



(II)

por separado presentan actividad biocida de amplio espectro, los inventores de la presente invención han comprobado que el producto de fermentación resultante del procedimiento del tercer aspecto de la invención y que comprende el compuesto de fórmula (I) y, opcionalmente, el compuesto de fórmula (II) presenta una actividad manifiestamente mejorada (ver Ejemplos 4 a 6).

Así, en un cuarto aspecto, la invención proporciona un producto de fermentación, que es un extracto que comprende el compuesto de fórmula (I) según se define en el segundo aspecto de la invención, obtenible mediante el procedimiento según se define en el tercer aspecto de la invención.

En un quinto aspecto la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según se define en el segundo aspecto de la invención, que comprende la etapa de aislamiento del compuesto de fórmula (I) a

partir del producto de fermentación resultante de la etapa (b), (i.1.), (i.2) o (c) definidas más abajo.

En un sexto aspecto la presente invención proporciona una cepa aislada del hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT20941 o un mutante de la misma que mantiene la capacidad de producir el compuesto de fórmula (I).

Como se demuestra más abajo, los productos de fermentación de la invención, así como los compuestos de fórmula (I) muestran un efecto biocida de amplio espectro.

Por lo tanto, en un séptimo aspecto la presente invención proporciona el uso de un producto de fermentación según se define en el primer aspecto de la invención, o del producto de fermentación según se define en el cuarto aspecto de la invención, o del compuesto de fórmula general (I) según se define en el segundo aspecto de la invención, o del compuesto de fórmula (II) según se define más abajo, o de la cepa de *Stemphylium solani* del sexto aspecto de la invención como agente biocida de amplio espectro.

En un octavo aspecto, la invención se relaciona con el uso del producto de fermentación, o de los compuestos de fórmulas (I) o (II), aislados o en combinación, o de la cepa de *Stemphylium solani* de la invención para elaborar una composición biocida de amplio espectro.

En un noveno aspecto, la invención proporciona una composición biocida que comprende el producto de fermentación según se define en el primer aspecto de la invención, o el producto de fermentación según se define en el cuarto aspecto de la invención, o el compuesto de fórmula (I) según se define en el segundo aspecto de la invención, o el compuesto de fórmula (II) según se define más abajo, o la cepa de *Stemphylium solani* del sexto aspecto de la invención.

En un décimo aspecto la invención proporciona el uso del producto de fermentación de la invención, o del compuesto de la invención, o de un compuesto de fórmula (II) ya sea de forma aislada o en combinación, o de la cepa de *Stemphylium solani* de la invención para elaborar una composición biocida.

En un undécimo aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición biocida como agente biocida de amplio espectro para el control de al menos una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas, y que se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos, preferentemente todos ellos de forma simultánea.

En un último aspecto, la invención proporciona un método de control de organismos perjudiciales que afectan a plantas, en adelante método de control de la invención, que comprende administrar una dosis eficaz del producto de fermentación según se define en el primer aspecto de la invención, o del producto de fermentación según se define en el cuarto aspecto de la invención, o del compuesto de fórmula (I) según se define en el segundo aspecto de la invención, o del compuesto de fórmula (II) según se define más abajo, de la cepa de *Stemphylium solani* según se define en el sexto aspecto de la invención, o de la composición biocida según se define en el noveno aspecto de la invención.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

El problema técnico que resuelve la presente invención es la búsqueda de nuevos productos naturales que sean biocidas efectivos.

Sorprendentemente, los presentes inventores han identificado una serie de productos de fermentación, extractos y compuestos que tienen una actividad biocida de amplio espectro, lo que permite el control simultáneo de varios organismos perjudiciales que afectan a las plantas. Por lo tanto, la presente invención supone una alternativa efectiva a los biocidas químicos de síntesis.

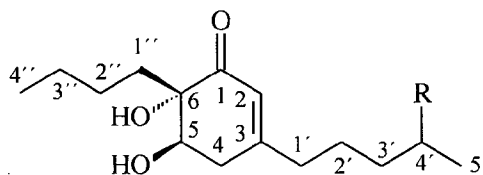
La presente invención se fundamenta en el descubrimiento de un producto de fermentación de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani*, que preferentemente es la cepa Aa22 de *S. solani* con CECT 20941, y que puede comprender simultáneamente al menos un compuesto de fórmula (I) y un compuesto de fórmula (II), que le dotan de una sorprendente actividad biocida de amplio espectro contra hongos fitopatógenos, insectos-plaga y el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne javanica* (ver Ejemplos 4 a 6).

Las principales ventajas técnicas del producto de fermentación, de su uso para el control de organismos perjudiciales que afectan a plantas y de su procedimiento de obtención, se enumeran a continuación:

- es de amplio espectro, actuando simultáneamente de forma efectiva contra insectos-plaga, hongos y nematodos,
- se obtiene de fuentes naturales, por procedimientos sencillos y económicos, y
- se puede obtener a gran escala por fermentación del hongo en biorreactores, pudiéndose manipular las condiciones de fermentación para aumentar la producción de componentes activos.

Los resultados generados son extrapolables a otros productos de fermentación que comprendan el compuesto de fórmula (I) y, opcionalmente, el compuesto de fórmula (II).

En un primer aspecto, la invención proporciona un producto de fermentación de un microorganismo fermentador que comprende un compuesto de fórmula (I):



(I)

donde R se selecciona entre H y OH,

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

En una realización de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones posteriores, por "producto de fermentación" se entiende un producto de fermentación que es el resultado de la acción de un microorganismo fermentador el cual, al crecer en un medio de cultivo adecuado, tiene la capacidad de sintetizar al menos un compuesto de fórmula (I). El concepto de "producto de fermentación" incluye el producto directamente obtenido del proceso de fermentación, así como los obtenidos tras someter el producto resultante del proceso de fermentación a etapas



(II)

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

De forma general, todos los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran las sales y solvatos aceptables de todos los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención o de cualquier otro compuesto que, cuando se aplica a un organismo perjudicial para las plantas, es capaz de proporcionar (directamente o indirectamente) un compuesto según se describe en el presente documento.

En otra realización del primer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones que se proporcionan arriba o abajo, el producto de fermentación es un extracto de fermentación.

En la presente invención el término "extracto" de fermentación se utiliza con su significado convencional para referirse a preparaciones de consistencia líquida, semisólida o sólida, que se presentan concentradas o sin concentrar, obtenidas sometiendo el producto obtenido del proceso de fermentación a una o varias etapas de extracción. Medios apropiados para llevar a cabo las etapas de extracción incluyen, por ejemplo, el uso de disolventes orgánicos, microondas o extracción con fluidos supercríticos.

En otra realización del primer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones que se proporcionan arriba o abajo, el producto de fermentación está libre del microorganismo fermentador.

En la presente invención por concepto "producto de fermentación libre de microorganismo fermentador" se entiende el producto resultante de someter al producto procedente de la etapa de fermentación y/o de purificación o concentración, a una etapa de eliminación del microorganismo, de manera que el producto de fermentación resultante carece de células viables, micelios o endosporas.

En otra realización del primer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones que se proporcionan arriba o abajo, el producto de fermentación comprende el microorganismo fermentador inactivado.

En la presente invención, el concepto "producto de fermentación que comprende el microorganismo fermentador inactivado" se refiere a un producto de fermentación según el primer aspecto de la invención en el que el microorganismo ha sido inactivado en una etapa posterior a la etapa de fermentación. El término "inactivado" significa que el microorganismo no es capaz de formar colonias. En una realización, los microorganismos inactivados tienen la membrana celular intacta o rota.

En otra realización del primer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones que se proporcionan arriba y abajo, el microorganismo fermentador es un hongo.

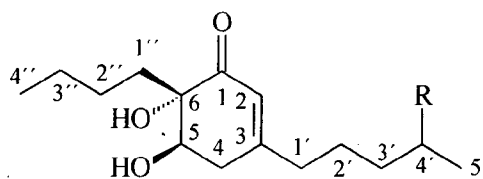
En otra realización del primer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones que se proporcionan arriba y abajo, el microorganismo fermentador es un hongo endófito.

En otra realización del primer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones que se proporcionan arriba y abajo, el microorganismo fermentador es un hongo endófito del género *Stemphylium*.

En otra realización del primer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones que se proporcionan arriba y abajo, el microorganismo fermentador es un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani*.

En otra realización del primer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones que se proporcionan arriba y abajo, el microorganismo fermentador es la cepa de *Stemphylium solani* CECT 20941.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



(I)

donde R se selecciona entre H y OH,

o un isómero, una sal o un solvato del mismo, que cuenta con actividad biocida de amplio espectro, en adelante compuesto de la invención, y que está comprendido en el producto de fermentación de la invención, ya sea solo o combinado con al menos el compuesto de fórmula (II) según se define en este documento.

Si bien el compuesto de fórmula (I) ha sido aislado de un producto de fermentación, el experto en la materia, haciendo uso de su conocimiento general, puede preparar dicho compuesto mediante otros medios.

En el ámbito de la presente invención, las expresiones "compuesto de fórmula (I) donde R=H", "*Stemfolona A*", y compuesto de fórmula (Ia), se utilizan indistintamente; del mismo modo "compuesto de fórmula (I) donde R=OH", "*Stemfolona B*" y compuesto de fórmula (Ib), se utilizan indistintamente; del mismo modo "compuesto de fórmula (II)" y "*Stemfol*" se utilizan indistintamente.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento de obtención del producto de fermentación definido en el primer aspecto de la invención, que comprende (a) una etapa de fermentación que comprende cultivar el microorganismo fermentador en un medio de cultivo adecuado y en condiciones adecuadas; y opcionalmente (b) una o más etapas de extracción.

En una realización particular, el procedimiento de la invención permite que el producto de fermentación de la invención comprenda un compuesto de fórmula (I) donde R es H y/o otro compuesto de fórmula (I) donde R es OH, o un isómero, o una sal o un solvato de los mismos.



En otra realización más particular de la anterior, el procedimiento de la invención consigue que adicionalmente, el producto de fermentación de la invención comprenda el compuesto de fórmula (II).

Si bien existen medios de cultivo comerciales útiles en procesos de fermentación, el experto en la materia puede diseñar el medio de cultivo más adecuado para el microorganismo fermentador particular que tiene la capacidad de producir el compuesto de fórmula (Ia), el de fórmula (Ib), o bien la capacidad de producir tanto (Ia) como (Ib), o la capacidad de producir (Ia), (Ib), o (Ia) y (Ib), junto con el compuesto de fórmula (II).

Así, para que tenga lugar la fermentación, el microorganismo requiere de una fuente de carbono de la cual extraer la energía necesaria para su metabolismo. Las fuentes de carbono más comunes son los hidratos de carbono, tales como almidón y azúcares. En la búsqueda de nuevas fuentes de carbono, se está estudiando, desde hace poco, la utilización de recursos lignocelulósicos (pajas de cereales, árboles y sus residuos, etc.), principal fuente de biomasa renovable.

Muchas de estas fuentes de carbono requieren un pretratamiento previo a su utilización; es el caso, por ejemplo, del almidón que debe ser cocido e hidrolizado hasta glucosa antes de ser transformado en etanol por los microorganismos que realizan esta transformación. Es también el caso de la celulosa y de los substratos lignocelulósicos en general, los cuales necesitan drásticos tratamientos físicos y/o químicos antes de ser utilizables con este fin.

Otros nutrientes que son necesarios en cantidades importantes para el crecimiento microbiano son el nitrógeno, el fósforo y el azufre. Estos elementos son incorporados en las moléculas estructurales y funcionales de la célula. El nitrógeno, en particular, debe ser provisto en proporciones variables bajo la forma de nitrógeno proteico obtenidos a partir de subproductos de la industria del maíz, extracto de levadura u otros, y no proteico (sales de amonio, urea, etc.). Los otros dos elementos son entregados como sales de fosfato y sulfato, respectivamente.

Por último, una serie de micronutrientes (vitaminas, hierro, cobalto, cobre, zinc, etc.), deben ser suministrados al medio.

La fermentación puede ser de varios tipos, incluyendo fermentaciones líquidas, fermentación en estado sólido (FES), o fermentación sólida sumergida (FSS).

En cuanto a las condiciones de la reacción de fermentación, el experto en la materia es capaz de ajustar las principales variables que son temperatura, acidez y presión de oxígeno, las cuales vienen determinados por la propia naturaleza del microorganismo.

En una realización del procedimiento del tercer aspecto de la invención, la etapa de fermentación se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo (incluyendo fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y micronutrientes (vitaminas, hierro, cobalto, cobre, zinc, etc)).

En una realización del procedimiento del tercer aspecto de la invención, cuando el microorganismo fermentador es un hongo, la etapa de fermentación se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo (incluyendo fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y micronutrientes (vitaminas, hierro, cobalto, cobre, zinc, etc)).

En una realización del procedimiento del tercer aspecto de la invención, cuando el microorganismo fermentador es un hongo, la etapa de fermentación se lleva a cabo en presencia de un producto vegetal sólido. En la presente invención, por "producto vegetal sólido", referido en esta realización del tercer aspecto de la invención, se entiende una parte de una planta (fruto, semilla (incluyendo granos de cereales como arroz, maíz, trigo, etc), hojas, tallos, raíces, tubérculos, productos derivados (harina, salvado, pulpa), así como subproductos (bagazo, paja, peladuras, cáscaras, pulpa, biomasa, licor, mucílago, alperujo, fibra, residuos lignocelulósicos). En una realización del procedimiento del tercer aspecto de la invención, cuando el microorganismo fermentador es un hongo, la etapa de fermentación se lleva a cabo en presencia de un producto sólido vegetal que es un cereal que puede estar entero (i.e., tal cual aislado de la naturaleza) o procesado (por ejemplo, molido). Ejemplos ilustrativos y no limitativos de cereales incluyen el arroz. La cantidad y tratamiento al que hay que someter al cereal previamente a su uso en el cultivo, son actos rutinarios para el experto en la materia.

En una realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, la etapa de fermentación se lleva a cabo en la oscuridad.

En una realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, la etapa de fermentación se lleva a cabo a temperatura ambiente (i.e., a una temperatura entre 20-27 °C). En una realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, la etapa de fermentación se lleva a cabo a temperatura ambiente (i.e., a una temperatura entre 24-27 °C).

En otra realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, la etapa (b) de extracción del producto de fermentación se lleva a cabo mediante extracción con disolventes orgánicos adecuados.

Existen tres tipos de disolvente, en función de su polaridad: (a) próticos (por ejemplo agua, ácidos carboxílicos, alcoholes, aminas), que se caracterizan por poseer un grupo funcional capaz de ceder protones (por ejemplo OH, NH, SH), así como por la capacidad de formar puentes de hidrógeno; (b) apróticos polares (por ejemplo DMSO, DMF, HMPA, nitrilos, cetonas, nitrocompuestos) que se caracterizan por carecer de grupos funcionales capaces de ceder protones y por tener una constante dieléctrica alta; y (c) apróticos apolares (por ejemplo (alifáticos, aromáticos, halogenados), éteres, ésteres, halogenuros de alquilo) que se caracterizan por carecer de grupos funcionales capaces de ceder protones y una constante dieléctrica baja.

En una realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el disolvente o mezclas de disolventes que se utilizan para llevar a cabo la extracción son de tipo polar aprótico. En otra realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el disolvente orgánico con el que se lleva a cabo la extracción del producto de fermentación es con acetato de etilo.

En una realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el procedimiento comprende una etapa previa a la etapa (a) en la que se hace crecer el microorganismo fermentador en un medio de cultivo adecuado hasta conseguir que se forme una cantidad de micelio óptima para iniciar la etapa (a).

En una realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el procedimiento comprende adicionalmente una etapa (i.1), en la que se elimina el microorganismo fermentador.

La eliminación del microorganismo del producto de fermentación se puede llevar a cabo usando técnicas bien establecidas, tales como ultracentrifugación o filtración.

En otra realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el procedimiento comprende adicionalmente una etapa (i.2.), en la que se inactiva el microorganismo fermentador.

La inactivación del microorganismo se puede llevar a cabo usando técnicas bien conocidas por el experto en la materia, tales como la lisis celular.

En otra realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el procedimiento comprende una etapa (d) posterior de purificación del producto de fermentación resultante de la etapa (b), (i.1.) o (i.2.). En otra realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, la etapa (d) de purificación se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas en donde el eluato corresponde con la fracción purificada del producto de fermentación de la invención. El eluyente para llevar a cabo la separación cromatográfica puede ser disolventes orgánicos de polaridades crecientes (por ejemplo, hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol, etc) o combinaciones de los mismos.

En otra realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el procedimiento comprende adicionalmente una etapa de secado del producto resultante de la etapa (b), (i.1.), (i.2.), y/o (d).

En otra realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, la etapa de secado del producto de fermentación comprende la extracción con solvente

orgánico y su concentración previa filtración del micelio; o, alternativamente, por secado al vacío (por ejemplo mediante uso de rotavapor).

Ejemplos de solventes orgánicos que se utilizan en el ámbito de la invención son diclorometano, eter etílico y, preferentemente, acetato de etilo.

En otra realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el microorganismo fermentador es un hongo. En otra realización del procedimiento del tercer aspecto, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el microorganismo fermentador es un hongo endófito.

El tipo de hongo y su interacción con la planta hospedadora confiere unas características determinadas que posibilitan la producción más o menos favorable de determinados compuestos.

En otra realización del tercer aspecto de la invención, el microorganismo es una especie de *Stemphyllum solani*, la cual debido a su interacción con la planta hospedadora, es eficiente en la producción de los compuestos de fórmula (I) y (II). Preferentemente, el microorganismo fermentador es la cepa Aa22 de *S. solani* aislada de hojas de *Artemisia absinthium* depositada en fecha 25 de septiembre de 2015 en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT 20941, siguiendo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

Se pueden aislar cepas de *S. solani* de otras plantas como por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*,

Ejemplos de medios de cultivo que permiten la fermentación por parte de los hongos del especie *Stemphyllum solani* son YMB (caldo extracto de levadura y extracto de malta), los medios citados en las referencias Molitor et al. (2012. *J. Nat. Prod.* 75, 1265–1269) y Buckel et al. (2013. *Phytochemistry* 89, 96–103); los que se citan en el documento W02002017937 A1 o cualquier otro medio de cultivo comercial para hongos fitopatógenos.

En una realización particular, el hongo endófito es la cepa Aa22 de *Stemphyllum solani* aislada de material vegetal de *Artemisia absinthium* depositada en la Colección

Española de Cultivos Tipo con CECT 20941 en fecha 25 de septiembre de 2015 se cultiva utilizando un YMB.

En una realización particular, el hongo endófito es la cepa Aa22 de *Stemphyllum solani* aislada de material vegetal de *Artemisia absinthium* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT 20941 en fecha 25 de septiembre de 2015 se cultiva utilizando un YMB en una etapa previa a la fermentación.

En otra realización particular del tercer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el hongo endófito es la cepa Aa22 de *Stemphyllum solani* aislada de material vegetal de *Artemisia absinthium* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT 20941 en fecha 25 de septiembre de 2015 el cual (1) se hace crecer en un medio de cultivo YMB, (2) posteriormente se somete a fermentación en presencia de arroz, y (3) el producto resultante de la fermentación se somete a una extracción con un disolvente orgánico adecuado. La etapa (1) se lleva a cabo hasta conseguir llevar al hongo al estadio óptimo para la inoculación de la etapa (2) y la producción, en la cantidad deseada en la etapa (2), del compuesto de fórmula (I) y, opcionalmente, del compuesto de fórmula (II). La etapa (3) se puede llevar a cabo en presencia de un disolvente o mezcla de disolventes polares apróticos. En otra realización, la etapa (3) se lleva a cabo en presencia de acetato de etilo.

En otra realización particular del tercer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el hongo endófito es la cepa Aa22 de *Stemphyllum solani* aislada de material vegetal de *Artemisia absinthium* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT 20941 en fecha 25 de septiembre de 2015 (1) se hacer crecer en YMB, posteriormente (2) se somete a fermentación en presencia de arroz, y (3) el producto resultante de la fermentación se somete a 1, 2 ó 3 etapas de extracción con un disolvente orgánico adecuado. Si se llevan a cabo dos ó tres etapas de extracción, cada una de ellas se lleva a cabo usando el mismo disolvente o diferentes disolventes. En otra realización de la etapa (3), cada etapa de extracción se lleva a cabo con un disolvente o mezcla de disolventes polares apróticos. En otra realización de la etapa (3), cada etapa de extracción se lleva a cabo en presencia de acetato de etilo.

En otra realización particular del tercer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el

procedimiento es uno en el que el hongo endófito es la cepa Aa22 de *Stemphyllum solani* aislada de material vegetal de *Artemisia absinthium* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT 20941 en fecha 25 de septiembre de 2015 y se lleva a cabo el cultivo del hongo en un medio YMB, la posterior fermentación en presencia de arroz, y la extracción del producto resultante de la fermentación que comprende 3 etapas de extracción con un disolvente orgánico adecuado. En otra realización particular del tercer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el procedimiento es uno en el que el hongo endófito es la cepa Aa22 de *Stemphyllum solani* aislada de material vegetal de *Artemisia absinthium* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT 20941 en fecha 25 de septiembre de 2015 y se lleva a cabo el cultivo del hongo en un medio YMB, la posterior fermentación en presencia de arroz, y la extracción del producto resultante de la fermentación que comprende 3 etapas de extracción con un disolvente polar aprótico adecuado. En otra realización particular del tercer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas arriba o abajo, el procedimiento es uno en el que el hongo endófito es la cepa Aa22 de *Stemphyllum solani* aislada de material vegetal de *Artemisia absinthium* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT 20941 en fecha 25 de septiembre de 2015 y se lleva a cabo el cultivo del hongo en un medio YMB, la posterior fermentación en presencia de arroz, y la extracción del producto resultante de la fermentación que comprende 3 etapas de extracción con acetato de etilo.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un producto de fermentación que comprende el compuesto de fórmula (I) según se define en el segundo aspecto de la invención, obtenible mediante el procedimiento según se define en el tercer aspecto de la invención.

En una realización del cuarto aspecto de la invención, el producto de fermentación comprende adicionalmente el compuesto de fórmula (II) según se define más arriba.

En un quinto aspecto la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según se define en el segundo aspecto de la invención o del compuesto de fórmula (II) según se define más arriba, que comprende la etapa de aislamiento del compuesto de fórmula (I) o del compuesto de fórmula (II) a partir del producto resultante de la etapa (b), (i.1.), (i.2) o (d) definidas más arriba.

El aislamiento de los compuestos (I) y (II) se puede llevar a cabo por técnicas de fraccionamiento, incluyendo cromatografía.

Técnicas de fraccionamiento conocidas por cualquier experto en el estado de la técnica, y que permiten obtener a los compuestos incluidos en el ámbito de la invención, son por ejemplo y sin limitarse, cromatografía líquida de vacío (VLC), cromatografía en columna (CC), cromatografía en columna (CC) empleando diferentes fases sólidas (Gel de Sílice, Sephadex LH-20) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), eluyéndose con distintos gradientes de polaridad mediante diferentes combinaciones de disolventes orgánicos.

En una realización del quinto aspecto de la invención, el aislamiento de los compuestos (I) y (II) se lleva a cabo por cromatografía. En otra realización del quinto aspecto de la invención, el aislamiento de los compuestos (I) y (II) se lleva a cabo por cromatografía en columna de sílica gel, usando mezclas de disolvente de polaridad creciente. En otra realización del quinto aspecto de la invención, el aislamiento de los compuestos (I) y (II) se lleva a cabo por separación cromatográfica en columna de sílica gel del producto resultante de la etapa (b), (i.1.) o (i.2.), usando mezclas de disolvente de polaridad creciente de n-hexano/acetato de etilo y acetona. En una realización del quinto aspecto, la separación cromatográfica se lleva a cabo en columna de sílica gel usando gradientes crecientes en polaridad desde n-hexano/acetato de etilo 90:10 (v/v) hasta 50:50 (v/v). En otra realización del quinto aspecto, la cromatografía en gel de sílice se lleva a cabo usando gradientes crecientes en polaridad desde n-hexano/acetato de etilo 90:10 (v/v) hasta 60:40 (v/v)). En otra realización del quinto aspecto de la invención, posteriormente a la elución con hexano/acetato de etilo, se somete al extracto cargado en la columna a una elución con acetona al 100%.

En la presente invención por "v/v" se entiende la relación de volúmenes de los disolventes que constituyen la fase móvil de la cromatografía necesaria para separar las fracciones con los compuestos de fórmula (I) y/o (II).

En la presente invención la "separación cromatográfica en columna de sílica gel usando mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo, acetona y/o metanol/agua" comprende llevar a cabo la separación en una columna de cromatografía de sílica gel usando n-hexano/acetato de etilo, acetona o metanol/agua,



o bien llevando a cabo la elución en varios estadios, combinando los eluyentes. El experto en la materia, haciendo uso de su conocimiento, puede optimizar relaciones entre los diferentes solventes y puede establecer el orden de los eluyentes en función de la naturaleza de la molécula a eluir.

En una realización del quinto aspecto, el procedimiento es de obtención de un compuesto de fórmula (1a) que comprende (i) someter el producto de fermentación resultante de la etapa (b) a separación cromatográfica en columna de sílica gel usando mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo y, posteriormente, acetona (ii) recoger la fracción eluida con acetona, (iii) someter el eluato resultante de la etapa (ii) a cromatografía de sílica gel con mezclas de polaridad creciente de n-hexano/acetato de etilo; y (iv) recoger las fracciones menos polares. En una realización del quinto aspecto, la etapa (i) comprende llevar a cabo una cromatografía en gel de sílice se lleva a cabo usando gradientes crecientes en polaridad desde n-hexano/acetato de etilo 90:10 (v/v) hasta 60:40. En otra realización del quinto aspecto de la invención, la etapa (i) comprende, posteriormente a la elución con hexano/acetato de etilo, la elución con acetona al 100%. En otra realización del quinto aspecto, la etapa (iii) comprende someter la fracción eluida con acetona a separación mediante cromatografía en gel de sílice usando gradientes crecientes en polaridad desde n-hexano/acetato de etilo 80:20 (v/v) hasta 10:90% (v/v) y, opcionalmente, someter a una etapa de secado.

En otra realización del quinto aspecto, el procedimiento es de obtención de un compuesto de fórmula (1b) que comprende la etapa (v) someter el producto de fermentación resultante de la etapa (b) a separación cromatográfica en columna de sílica gel usando mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo y, posteriormente, acetona (vi) recoger la fracción eluida con acetona, y (vii) someter el eluato resultante de la etapa (vi) a cromatografía de sílica gel con mezclas de polaridad creciente de n-hexano/acetato de etilo; y (viii) recoger las fracciones más polares y someterlas a cromatografía de exclusión molecular (Sephadex LH-20) con n-hexano/diclorometano/metanol (por ejemplo a una relación 2:1:1 (v:v:v)). En una realización del quinto aspecto, la etapa (v) comprende llevar a cabo una cromatografía en gel de sílice se lleva a cabo usando gradientes crecientes en polaridad desde n-hexano/acetato de etilo 90:10 (v/v) hasta 60:40 (v/v). En otra realización del quinto aspecto de la invención, la etapa (v) comprende, posteriormente a la elución con hexano/acetato de etilo la elución con acetona al 100%. En otra realización del quinto aspecto, la etapa (iii) comprende someter la fracción eluida con acetona a separación mediante cromatografía en gel de sílice usando gradientes crecientes en polaridad

desde n-hexano/acetato de etilo 80:20(v/v) hasta 10:90 (v/v). En otra realización del quinto aspecto, la etapa (iii) comprende someter la fracción eluida con acetona a separación mediante cromatografía en gel de sílice usando gradientes crecientes en polaridad desde n-hexano/acetato de etilo 50:50 (v/v) hasta 20:80 (v/v) y, opcionalmente, someter a una etapa de secado.

En otra realización del quinto aspecto, el procedimiento es de obtención de un compuesto de fórmula (II) que comprende la etapa (ix) someter el producto de fermentación resultante de la etapa (b) a cromatografía en columna de sílica gel usando mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo desde 90:10 (v/v) hasta 60:40; (x) someter el eluato resultante de la etapa (ix) a cromatografía en columna de sílica gel con mezclas de polaridad creciente de n-hexano/acetona desde 90:10 (v/v) a 100% de acetona; (xi) recoger la fracción más polar (correspondiente a las fracciones eluidas a 100% de acetona) y, opcionalmente, secar.

En otra realización del quinto aspecto, el procedimiento es de obtención de un compuesto de fórmula (II) que comprende la etapa (ix) someter el producto de fermentación resultante de la etapa (b) a cromatografía en columna de sílica gel usando mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo desde 90:10 (v/v) hasta 60:40; (x) someter el eluato resultante de la etapa (ix) a cromatografía en columna de sílica gel con mezclas de polaridad creciente de n-hexano/acetona desde 98:2 (v/v) a 90:10 de acetona; (xi) recoger las fracciones eluidas a 94:6 a 92:8 (v/v) de n-hexano/acetona y someterlas a cromatografía en columna de gel de sílice con mezclas de polaridad creciente de n-hexano/diclorometano, desde 50:50 (v/v) a 100% de diclorometano, y (xii) recoger las fracciones de menor polaridad (50:50); y opcionalmente, someterlas a una etapa de secado.

En otra realización del quinto aspecto, el procedimiento es de obtención de un compuesto de fórmula (II) que comprende la etapa (ix) someter el producto de fermentación resultante de la etapa (b) a cromatografía en columna de sílica gel usando mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo desde 90:10 (v/v) hasta 60:40 (xiii); someter el eluato resultante de la elución con n-hexano/acetato de etilo 80:20 (v/v) a cromatografía en columna de sílica gel con una mezcla de n-hexano/diclorometano/metanol (50:25:25 (v/v)); (xiv) recoger el eluato; y opcionalmente, someter a una etapa de secado

En otra realización del quinto aspecto de la invención, el procedimiento comprende una etapa adicional de purificación, concentración y/o secado de las fracciones

recogidas en las etapas (iv), (viii), (xi), (xii) y (xiv). Técnicas de purificación, concentración y secados son bien conocidas por el experto en la materia y se han referido también más arriba en el presente documento.

En un sexto aspecto la presente invención proporciona una cepa aislada del hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT20941 o un mutante de la misma que mantenga la capacidad de producir el compuesto de fórmula (I).

Por el término "mutante" se entiende un hongo que se obtiene a partir de la cepa CECT20941 de la invención y que se caracteriza por mantener la capacidad productora del compuesto de fórmula (I) de la invención y, opcionalmente del compuesto de fórmula (II). Un mutante de CECT20941 de *Stemphylium solani* se entiende como una "variante" CECT20941 de *Stemphylium solani*. El experto en la materia entenderá que los mutantes que retienen las características y ventajas de la cepa de la invención se pueden obtener de manera rutinaria, por ejemplo por mutagenesis espontánea o mutación dirigida, usando la cepa de la invención como material de partida.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un producto de fermentación según se define en el primer aspecto de la invención, o del producto de fermentación según se define en el cuarto aspecto de la invención, o del compuesto de fórmula general (I) según se define en el segundo aspecto de la invención, o del compuesto de fórmula (II) según se define más abajo, o de la cepa de *Stemphylium solani* del sexto aspecto de la invención como agente biocida.

Como se ha indicado más arriba, la presente invención proporciona productos de fermentación y compuestos (y en consecuencia la cepa depositada que también los produce) que dan lugar a una actividad biocida de amplio espectro.

Por "actividad biocida de amplio espectro" se entiende la capacidad de controlar simultáneamente a más de una categoría distinta de organismos perjudiciales para las plantas. Dicho control comprende la prevención de la acción o la destrucción directa de dichos organismos perjudiciales para la salud pública y también para la agricultura durante la producción, pero también se extiende al almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de productos agrícolas y sus derivados.

Ejemplos de categorías de organismos perjudiciales para las plantas, incluyen sin limitarse, insectos-plaga, hongos o nematodos.

Preferentemente, los insectos-plaga que se incluyen en el ámbito de esta invención, son insectos-plaga herbívoros con diferentes adaptaciones tróficas, ya sean masticadores o chupadores (áfidos), y que pueden presentar una alta incidencia sobre cultivos hortícolas provocando graves pérdidas económicas, desarrollar resistencias a insecticidas de síntesis y presentar capacidad de transmisión de virus. Ejemplos, a título ilustrativo y no limitativo, de insectos-plaga herbívoros con diferentes adaptaciones tróficas, son *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*.

La actividad contra estos insectos-plaga herbívoros se puede determinar mediante diferentes tipos de bioensayos que incluyen actividad antialimentaria (inhibición de la alimentación y/o asentamiento en el caso de áfidos), repelente o tóxica, entre otras.

Preferentemente, los hongos pertenecen a especies de hongos fitopatógenos. Ejemplos, a título ilustrativo y no limitativo, de hongos contra los que es efectivo el producto fermentado de la invención son *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani* y *Botrytis cinérea*.

La actividad contra hongos se puede determinar, por ejemplo, mediante ensayos de inhibición del crecimiento del micelio en placa.

Preferentemente, los nematodos que se incluyen en el ámbito de la invención son nematodos formadores de nódulos de las raíces (*Meloidogyne* sp). Un ejemplo de nematodo formador de nódulos es la especie *Meloidogine javanica*, polífaga, con capacidad de parasitar más de 3.000 especies de plantas de cultivo, que incluyen cultivos extensivos, hortícolas y frutales, afectando gravemente la producción (Agrios. 2005. *Plant Pathology*, Fifth edition, Elsevier/Academic, Amsterdam), y causando pérdidas económicas anuales de miles de millones de euros (Singh et al. 2013. *OEPP/EPPO Bulletin* 43 (2), 334–374).

La actividad contra nematodos se relaciona con la toxicidad, es decir, capacidad para interrumpir una fase concreta del ciclo de vida del nematodo impidiendo su desarrollo. En el ámbito de la invención, la actividad nematicida se puede determinar, por

ejemplo, a través de la determinación del porcentaje de juveniles infectivos (J2) muertos tras las 72 horas posteriores a la aplicación del producto de fermentación, compuesto de fórmula (I), cepa o composición biocida de la invención.

En un noveno aspecto, la invención proporciona una composición biocida que comprende el producto de fermentación según se define en el primer aspecto de la invención, o el producto de fermentación según se define en el cuarto aspecto de la invención, o el compuesto de fórmula (I) según se define en el segundo aspecto de la invención, o el compuesto de fórmula (II) según se define más abajo, o la cepa de *Stemphylium solani* del sexto aspecto de la invención.

La composición biocida de la invención adicionalmente puede comprender diversos vehículos y agentes que faciliten su conservación, manejo y aplicación.

Como el experto en el estado de la técnica conocerá, en la aplicación de fitosanitarios habitualmente se utilizan vehículos sólidos, vehículos líquidos, vehículos gaseosos, etc., y, si es necesario, agentes tensioactivos y agentes auxiliares para la formulación de composiciones fitosanitarias como, por ejemplo, un aditivo para formular formas tales como concentrados emulsionables, polvos humectables, líquidos fluibles, (v.g., suspensión en agua, emulsión en agua, etc.), polvos, aerosoles, ULV y similares.

Ejemplos de vehículo sólido que se incluyen en el ámbito de la invención son polvos finos o gránulos de arcillas (v.g. arcilla de caolín, tierra de diatomeas, óxido de silicio hidratado sintético, bentonita, arcilla Fubasami, arcilla ácida, etc.), talcos, cerámicas y otros minerales inorgánicos (v.g., sericita, cuarzo, azufre, carbono activo, carbonato cálcico, sílice hidratada, etc.), fertilizantes comerciales (v.g., sulfato amónico, fosfato amónico, nitrato amónico, urea, cloruro amónico, etc.) y similares.

Ejemplos de vehículo líquido que se incluyen en el ámbito de la invención son agua, alcoholes (v.g., metanol, etanol, etc.), cetonas (v.g., acetona, metil etil cetona, etc.), hidrocarburos aromáticos (v.g. benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, metilnaftaleno, etc.), hidrocarburos alifáticos (v.g. hexano, ciclohexano, kerosina, gas oil, etc), ésteres (v.g., acetato de etilo, acetato de butilo, etc.), nitrilos (v.g. acetonitrilo, isobutironitrilo, etc.), éteres (v.g. éter diisopropílico, dioxano etc.), amidas de ácido (v.g. N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, etc.), hidrocarburos halogenados (v.g., dicloroetano, tricloroetano, tetracloruro de carbono, etc. ), sulfóxido de dimetilo, aceites vegetales (v. g., aceite de soja, aceite de semilla de algodón, etc.) y similares.

Ejemplos de vehículo gaseoso que se incluyen en el ámbito de la invención son agente de pulverizado, incluyendo gas flon, gas butano, LPG (gas de petróleo licuificado), éter dimetilico, gas de dióxido de carbono y similares.

Ejemplos de agente tensioactivo que se incluyen en el ámbito de la invención son sulfatos de alquilo, sales de sulfonato de alquilo, alquil aril sulfonatos, ésteres alquil arílicos, compuestos de polioxietileno de los mismos, ésteres polietilen glicólicos, ésteres de alcohol polihidroxiílico, derivados de alcohol de azúcar y similares.

Ejemplos de agente auxiliar para la formulación como agente de fijación y agente de dispersión que se incluyen en la invención son caseína, gelatina, polisacáridos (v.g., polvo de almidón, goma arábiga, derivado de celulosa, ácido alginico, etc.), derivados de lignina, bentonita, azúcares, polímeros hidrosolubles sintéticos (v.g., polialcohol vinílico, polipirrolidona de vinilo, poliácidos acrílicos, etc.) y similares.

Ejemplos de estabilizantes que se incluyen en el ámbito de la invención son PAP (fosfato de ácido isopropílico), BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol), BHA (mezcla de 2-terc-butil-4-metoxifenol y 3-terc-butil-4-metoxifenol), aceites vegetales, aceites minerales, agentes tensioactivos, ácidos grasos o ésteres de los mismos y similares.

El producto de fermentación de la invención, el compuesto de la invención, el compuesto de fórmula general (II) y la composición biocida de la invención se pueden utilizar conjuntamente con al menos otro ingrediente activo adicional. Ejemplos de ingrediente activo adicional son nematicidas, insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, reguladores del crecimiento de la planta, sinérgicos, fertilizantes, acondicionadores del suelo y cebos para animales.

En un décimo aspecto la presente invención proporciona el uso del producto de fermentación de la invención, o del compuesto de la invención, o de un compuesto de fórmula (II) ya sea de forma aislada o en combinación, para elaborar una composición biocida.

En un undécimo aspecto, la invención se relaciona con el uso como agente biocida de amplio espectro para el control de organismos perjudiciales, que afectan a plantas, en adelante uso de la invención, del producto de fermentación de la invención, o del compuesto de la invención, de un compuesto de fórmula (II), de la cepa de la

invención, o de la composición biocida de la invención, ya sea de forma aislada o en combinación. Preferentemente, el uso de la invención es efectivo simultáneamente contra más de una categoría de organismos perjudiciales, que se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo.

En una realización particular, el uso de la invención como agente biocida de amplio espectro comprende al menos el producto de fermentación de la invención, el compuesto (I) de la invención, un compuesto de fórmula (II), o la cepa de la invención y es activo simultáneamente contra insectos-plaga y hongos.

En una realización particular, el uso de la invención como agente biocida de amplio espectro comprende al menos el producto de fermentación de la invención, el compuesto (I) de la invención, un compuesto de fórmula (II), o la cepa de la invención y es activo simultáneamente contra al menos, insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo.

En otra realización particular, el uso de la invención comprende al menos el producto de fermentación según se define en el primer y cuarto aspectos, y es activo simultáneamente contra insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo. En otra realización particular, el uso de la invención comprende al menos un compuesto de fórmula (I) y es activo simultáneamente contra insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo. En otra realización particular, el uso de la invención comprende al menos un compuesto de fórmula (Ia) y es activo simultáneamente contra insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo.

En otra realización particular, el uso de la invención comprende el compuesto de fórmula (II) y es activo simultáneamente contra insectos-plaga y hongos.

En un último aspecto, la invención se relaciona con un método de control de amplio espectro de organismos perjudiciales que afectan a plantas, en adelante método de control de la invención, que comprende administrar una dosis eficaz de la composición biocida de la invención, o del producto de fermentación de la invención, o del compuesto de la invención, de un compuesto de fórmula (II), o de la cepa de la invención, ya sea de forma aislada o en combinación, a la planta o al sustrato (entendido como el material que sirve de "asiento" para una planta). Preferentemente, el método de control de la invención es efectivo simultáneamente contra más de una

categoría de organismos perjudiciales, que se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo.

En una realización particular, el método de control de la invención es activo simultáneamente contra insectos-plaga y hongos.

En una realización particular, el método de control de la invención es activo simultáneamente contra al menos, insectos-plaga, hongos y al menos un nematodo.

La aplicación puede ser directamente por rociado donde se localice el organismo perjudicial (ya sea en la planta, o en el sustrato).

La "dosis eficaz" es la cantidad que muestra eficacia en el control de organismos perjudiciales. El experto en la materia puede determinar de manera rutinaria la dosis efectiva. Factores que determinan la cantidad necesaria a aplicar son: (a) si se utiliza la composición biocida de la invención, o el producto de fermentación de la invención, o el compuesto (I) de la invención, la cepa o un compuesto de fórmula (II), ya sea de forma aislada o en combinación, (b) el tipo de formulación, (c) el tiempo, (d) dónde y cómo se aplica, (e) tipo de organismo perjudicial que afecta a la planta y (f) del grado de daño.

En una realización, el método de control es un método preventivo, es decir, que se aplica el producto de fermentación, compuesto (I), compuesto (II), cepa o composición biocida en el sustrato o en aquellas zonas de la planta que son las que colonizan los organismos perjudiciales, dicha aplicación llevándose a cabo antes de que tenga los organismos perjudiciales inicien el daño en la planta.

Alternativamente, en otra realización, el método de control es un método de tratamiento, es decir que se aplica el producto de fermentación, compuesto (I), compuesto (II) cepa o composición biocida en aquellas zonas de la planta ya dañadas por la colonización por parte los organismos perjudiciales.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los ejemplos se



proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## **MODOS DE REALIZACION DE LA INVENCION**

### **A) OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO DE FERMENTACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOCIDA**

#### **Ejemplo 1. Aislamiento e identificación de la cepa Aa22 del hongo endófito *S. solani***

La cepa Aa22 del hongo endófito *S. solani* fue aislada de hojas de *Artemisia absinthium* recolectadas en Terceira (Islas Azores, región Macaronesia). El material vegetal fresco se esterilizó superficialmente con hipoclorito de sodio (65%), etanol (75%) y agua destilada estéril. Pequeñas muestras de explantos (hojas y tallos) se incubaron a 27°C en oscuridad en dos medios de cultivo (PDA y YMB) en placas petri con 50 mg/l de antibiótico para prevenir su contaminación. La cepa pura Aa22 de *S. solani* se obtuvo aislando individualmente una colonia crecida en medio YMB y se replicó en las mismas condiciones para su mantenimiento.

La identificación morfológica de la cepa del hongo se realizó en un microscopio atendiendo a las características del micelio, esporas y estructuras reproductivas, tiñendo pequeñas muestras de las colonias aisladas con azul de metileno. Así mismo, se llevó a cabo su identificación a nivel molecular con la amplificación (PCR) y secuenciación de la región ITS ribosomal del ADNr extraído de una muestra del micelio (Arenal et al. 2000. *Mycological Research* 104, 2000, 301–303; Giménez. 2006. Productos bioactivos de plantas canarias y sus hongos endófitos: detección de actividad y utilización en el control de plagas y enfermedades agrícolas. Tesis doctoral, Universidad de La Laguna). Se comparó la secuencia ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr con las publicadas en las bases de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (número de acceso GenBank JF913269.1). Una vez identificada la cepa Aa22 del hongo endófito *S. solani*, esta fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en fecha 25 de septiembre de 2015 correspondiéndole el número de acceso CECT 20941, siguiendo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

### **Ejemplo 2. Obtención del producto de fermentación de la cepa Aa22 de *S. solani***

De un cultivo de dos semanas en medio YMB (caldo extracto de levadura y extracto de malta al que se adiciona agar) en placa petri de la cepa Aa22 de *S. solani*, se tomaron seis muestras de fragmentos (2.5x2.5 cm) de micelio fresco y se inocularon en doce erlenmeyers esterilizados (6 fragmentos en cada erlenmeyer) con 100 g de arroz y 30 ml de agua destilada (para prevenir la deshidratación del arroz). Después de tres semanas de incubación en oscuridad a 25°C, el cultivo se extrajo tres veces con acetato de etilo. Para ello, se añadió acetato de etilo hasta cubrir totalmente el medio de cultivo (120 ml) y se dejó en maceración 48 horas. Posteriormente se filtró la suspensión a través de un embudo con papel de filtro recogiendo el contenido en un recipiente. Este proceso de extracción con acetato de etilo se realizó tres veces.

El filtrado se llevó a sequedad (para evaporar el acetato de etilo) a vacío en un rotavapor para obtener el extracto crudo (4.58 g).

### **Ejemplo 3. Aislamiento y caracterización de los compuestos con actividad biocida del extracto crudo**

#### *Técnicas experimentales*

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los compuestos identificados en las distintas fracciones del extracto crudo se registraron en espectrómetros Bruker Advance y AMX-500, a 400 y 500 MHz para el  $^1\text{H}$  y a 100 y 125 MHz para el  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Los productos se disolvieron en deuteriocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) que contenía tetrametilsilano (TMS) como patrón interno de referencia. La multiplicidad de las señales de  $^{13}\text{C}$  se determinaron con experimentos de desacoplamiento de banda ancha (DEPT, *Delay enhancement of polarization transfer*). Los programas bidimensionales (2D) usados en los experimentos de RMN (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) fueron los proporcionados por la firma Bruker. Los espectros de masas de alta y de baja resolución se registraron en un espectrómetro Micromass Autospec® utilizando la técnica de impacto electrónico (IE-MS) a 70 eV y una temperatura de 220°C. Las cromatografías preparativas y semipreparativas se llevaron a cabo en un equipo de cromatografía líquida flash (Flash Master Personal, Jones Chromatography) sobre columnas de sílica (*Isolute flash silica*, 20 g/70 mL, International Sorbent Technology Ltd. Tucson, USA). En las cromatografías líquidas a vacío (VLC) y en

columna (CC) se utilizó gel de sílice 0.025-0.04 y 0.040-0.015 mm (Macherey-Nagel GmbH&Co.KG, Düren, Germany) y como soporte en las cromatografías de exclusión molecular Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals). La visualización de los compuestos en las cromatografías en capa fina (TLC) se realizó con una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5%) y vainillina (5%) en EtOH.

Por su parte, el extracto crudo se analizó por LC-MS.

### 3.A. Aislamiento de compuestos con actividad biocida a partir del extracto crudo

La fracción soluble en metanol (4.09 g) del extracto crudo (4.58 g) obtenida según el Ejemplo 2, fue cromatografiada en sílica gel (0.3 kg) mediante una cromatografía líquida de vacío (VLC) utilizando como eluyente mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo, acetona y metanol/ agua dando lugar a 8 fracciones: H1-H2-H3-H4-H5-H6 y H8.

La fracción H2 (n-hexano/ AcOEt, 5:1, 0.575 g) fue cromatografiada en columna (CC) con gel de sílice empleando mezclas de n-hexano/acetona (del 2-10%). Identificada la fracción más polar se obtuvieron 42 mg de **stemfol** sometiéndola a secado en rotavapor (Stodola et al.1973. *Phytochemistry* 12, 1797-1798, Marumo et al. 1985. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1521-1522). Las otras fracciones se reunieron en 6 fracciones (H2A-H2F). La fracción H2E (0.053 g) (94:6 a 92:8 (v/v) de n-hexano/acetona) fue nuevamente cromatografiada sobre una columna de gel de sílice usando mezclas de n-hexano/diclorometano (50:50 (v/v) a 100 % de diclorometano).. En las fracciones de menor polaridad (50% de diclorometano) se obtuvieron, tras someterlas a secado rotavapor, 21 mg del **stemfol**.

De la fracción H3 (n-hexano/ AcOEt, 4:1, 107 mg) mediante cromatografía en Sephadex LH-20 con una mezcla de n-hexano/diclorometano/metanol (2:1:1) se aisló de nuevo el **stemfol**, tras someter las fracciones recogidas a sequedad en rotavapor (74.3 mg).

La fracción H6 (acetona 100%, 0,452 g) se cromatografió sobre una CC de sílica gel eluida con mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo 20-100% (80:20 (v/v) a 100% de acetato de etilo). En las fracciones menos polares (EtOAc 20-30%) obtenidas a partir de esta fracción 6 se aisló la **stemfolona A** (19 mg) mediante secado en rotavapor y de las más polares (EtOAc 50-80%) se obtuvieron, mediante

secado en rotavapor, 11 mg de la **stemfolona B** mediante cromatografía en Sephadex LH-20 con n-hexano/diclorometano/metanol (2:1:1).

### 3.B. Caracterización de los compuestos con actividad biocida

#### *Stemfol*

El stemfol se aisló a partir del extracto crudo como un sólido blanco. El espectro de masas de alta resolución mostró un ión molecular a 236.1772  $m/z$  (calcd. 236.1776) que estaba de acuerdo con la fórmula molecular  $C_{15}H_{24}O_2$ . Las bandas de absorción en el espectro de IR a 3300 y 1630  $cm^{-1}$  indicaban la presencia de grupos hidroxilos y dobles enlaces, respectivamente. Su espectro de RMN de  $^1H$  presentaba señales características de dos cadenas alquílicas (butilo y n-pentilo), la señal de un singulete que integraba por dos protones a  $\delta$  6.22 (H-4, H-6) y dos grupos hidroxílicos a  $\delta$  4.62 (2H, s, OH). El desplazamiento químico y la multiplicidad sugerían la presencia de un anillo 1,3-dihidroxifenilo-2,5-tetrasustituido. Esta propuesta fue confirmada por la similitud de sus datos espectroscópicos con los publicados para compuestos análogos (Pohanka et al. 2006. *J Nat Prod* 69, 654-657).

El espectro de RMN  $^{13}C$  mostró doce señales correspondientes a un grupo metilo, siete metilenos, un grupo metino y tres carbonos cuaternarios, que estaban de acuerdo con las correlaciones observadas en el experimento HSQC. Las señales a  $\delta$  108.1, 114.1, 142.1 y 154.4 debidas a carbonos aromáticos confirmaban la presencia del grupo fenilo 1,3-dihidroxi-2,5-tetrasustituido.

La posición relativa de los sustituyentes fue confirmada en el experimento HMBC, con las correlaciones observadas entre los protones a  $\delta$  2.58 (H-1') y  $\delta$  6.22 (H-4, H-6) con las señales a  $\delta$  154.4 (C-1, C-3) y  $\delta$  112.5 (C-2), y del protón a  $\delta$  2.44 (H-1'') con  $\delta$  108.1 (C-4, C-6) y  $\delta$  142.2 (C-5).

Estos datos están de acuerdo con el stemfol, compuesto aislado anteriormente de los hongos *S. majusculum* (Stodola et al. 1973. *Phytochemistry* 12, 1797-1798) y *S. botryosum* (Marumo et al. 1985. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1521-1522). Sus datos espectroscópicos de RMN 2D permitieron asignar todas las señales de protones y carbonos presentes en la molécula (ver Tabla 1) e identificar su estructura como la 5-butil-2-pentilresorcina.

Stemfol. IR (film)  $\nu_{\max}$ , 3300, 2850 1630 1588, 1430, 1270  $\text{cm}^{-1}$ ; para datos  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ver Tabla 1; para datos  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) ver Tabla 1; HREIMS  $m/z$  236.1771  $[\text{M}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ , 236.1776); EIMS 70 eV  $m/z$  (rel. int.): 236  $[\text{M}^+]$  (16), 194 (16), 193 (100), 180 (45), 137 (7), 123 (11), 91 (3), 77 (4).

Tabla 1. Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  NMR y  $^{13}\text{C}$  NMR del stemfol

H/C	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
1	---	154.4 s
2	---	112.5 s
3	---	154.4 s
4	6.22 s	108.1 d
5	---	142.2s
6	6.22 s	108.1 d
1'	2.58 t ( $J = 8.0$ Hz)	22.8t
2'	1.51 m	31.4t
3'	1.40 m	22.7t
4'	0.93 t ( $J = 7.0$ Hz)	13.9q
1''	2.44 t ( $J = 8.0$ Hz)	35.5t
2''	1.51 m	30.7t
3''	1.51 m	31.5t
4''	1.31 m	22.5t
5''	0.88 t ( $J = 7.0$ Hz)	13.9q

### Stemfolona A

La stemfolona A fue aislada a partir del extracto crudo como un sólido amorfo de color marrón. Su fórmula molecular se determinó como  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$  ( $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  254.1888) (calcd. 254.1882) por espectrometría de masas de alta resolución. El espectro de IR mostro bandas de absorción a 3443, 1673 y 1650  $\text{cm}^{-1}$  atribuibles a grupos hidroxilos, grupo carbonilo y dobles enlaces, respectivamente.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se observaron señales de dos cadenas alifáticas que integraban por un total de veinte protones, un grupo metileno a  $\delta$  2.47 (1H, *dd*,  $J = 18.0$  Hz,  $J = 10$  Hz, H-4ax) y  $\delta$  2.61 (1H, *dd*,  $J = 18.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, H-4ec), y un metino unido a un átomo de oxígeno a  $\delta$  3.98 (1H, *dd*,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, H-5).

Asimismo, se observó a campo bajo la señal de un protón olefínico a  $\delta$  5.89 (1H, *bs*, H-2), sugiriendo la presencia de un doble enlace trisustituido. El espectro de RMN de  $^1\text{H}$ -2D-COSY mostraba, como en el stemfol, la presencia de fragmentos alifáticos butilo y pentilo que se determinaron por las correlaciones observadas en los sistemas spin entre H-1''-H<sub>3</sub>-4'' y H-1'-H<sub>3</sub>-5', respectivamente. Otra serie de correlaciones que aparecen en este espectro estaban de acuerdo con un agrupamiento  $-\text{CH}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{O})-$ . Así, el sistema geminal a  $\delta$  2.47 (H-4'ax) y  $\delta$  2.61 (H-4 ec) mostraba un acoplamiento con las señales a  $\delta$  3.98 (H-5) y  $\delta$  5.89 (H-2).

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostró la presencia de quince señales que se asignaron a dos metilos, ocho metilenos, dos metinos y tres carbonos cuaternarios, de acuerdo con un experimento HSQC. Las resonancias a  $\delta$  73.9 (C-5) y  $\delta$  79.6 (C-6) indicaron la existencia de dos átomos de carbono unidos al oxígeno. Destacan también en este espectro los desplazamientos químicos a  $\delta$  122.5 (C-2) y 164.2 (C-3) debido a carbonos de un doble enlace unido a un grupo aceptor de electrones y la señal a  $\delta$  201.3 (C-1) de un grupo carbonilo.

La localización de los distintos grupos funcionales se estableció en base a las correlaciones mostradas en el experimento HMBC. Así, se observaron conectividades entre H-2 ( $\delta$  5.89), H-4 ( $\delta$  2.47 y 2.61  $\delta$ ) y H-5 ( $\delta$  3.98) con C-6 ( $\delta$  79.6), de H-1'' ( $\delta$  1.95) con C-1 ( $\delta$  200.1) y C-6 ( $\delta$  79.6), y de H-1' ( $\delta$  2.23) con C-2 ( $\delta$  122.5) y C-3 ( $\delta$  164.5).

Las correlaciones de los experimentos HMBC y RMN-2D-COSY de  $^1\text{H}$  sugerían la presencia de un esqueleto 6-butil-3-pentilciclohexeno. La estereoquímica de C-5 y C-6 se dedujo por los efectos NOE observados en la irradiación de H-4ax con H-1'' y de H-4ec con H-5. La posición relativa de las cadenas alquílicas butilo y pentilo fue confirmada por los efectos NOE observados entre los protones H-2 y H-1', H-4 y H-1'. Estos datos espectroscópicos permitieron determinar la estructura de un compuesto como el 6-butil-5,6-dihidroxi-3-pentylcyclohex-2-en-1-ona, no descrito anteriormente en la bibliografía y al que hemos denominado stemfolona A.

Stemfolona A.  $[\alpha]_D +4.4$  (c 0.08,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film)  $\nu_{\text{max}}$  3443, 2957, 2930, 2861, 1673, 1650, 1626, 1467, 1378, 1257, 1142, 1075  $\text{cm}^{-1}$ ; para datos  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ver Tabla 3; para datos  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) ver Tabla 3; HREIMS m/z 254.1888  $[\text{M}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$ , 254.1882); EIMS 70 eV m/z (rel. int.): 254  $[\text{M}^+]$  (5), 198  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8]^+$  (35), 179 (8), 169  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8-\text{C}_2\text{H}_5]^+$  (33), 151 (21), 139  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2]^+$  fragmentación retro-Diels Alder (100), 124 (22), 116 (58), 95 (20), 85 (54), 74 (55).

#### Stemfolona B

La stemfolona B se aisló a partir del extracto crudo como un sólido amorfo de color marrón. La fórmula molecular se determinó como  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_4$  a partir del ion molecular  $m/z$  270.1833 (calcd. 270.1831) en el espectro de masas de alta resolución. Las absorciones del espectro de infrarrojo a 3418, 1673, 1651  $\text{cm}^{-1}$  indicaron la presencia de grupos hidroxilo, grupo carbonilo y dobles enlaces, respectivamente. En su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observaron señales similares a las de la stemfolona A. La diferencia más significativa entre los dos espectros fue la presencia de una señal a  $\delta$  3.81 (1H, *td*,  $J = 12.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, H-4') que sugería la presencia de un grupo hidroxilo adicional que podría estar situado en C-3 o C-4. La correlación observada en el experimento HMBC entre los grupos metilo en  $\delta$  1.19 (3H, *d*, H-5') y la señal en  $\delta$  67.7 confirma la posición del grupo hidroxilo en C-4. Por otro lado, el efecto NOE entre H-1 y H-4, así como las constantes de acoplamiento de H-3 permitió determinar la estereoquímica relativa en C-2 y C-3. En base a los datos anteriores la estructura de este compuesto fue asignada como 6-butil-5,6-dihidroxi-3-(4-hidroxipentil)ciclohex-2-en-1-ona. Es la primera vez que este compuesto se aísla como producto natural y lo denominamos stemfolona B.

Stemfolona B.  $[\alpha]_D +12.5$  (c 0.056,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film)  $\nu_{\text{max}}$  3418, 295, 2931, 2872, 1673, 1667, 1651, 1626, 1433, 1377, 1260, 1138, 1076  $\text{cm}^{-1}$ ; para datos  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ver Tabla 3; para datos  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) ver Tabla 3; HREIMS m/z 270.1833  $[\text{M}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_4$ , 270.1831); EIMS 70 eV m/z (rel. int.): 270  $[\text{M}^+]$  (7), 252  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$  (14), 197  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-2\text{C}_2\text{H}_4]^+$  (35), 179  $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-2\text{C}_2\text{H}_4]^+$  (12), 167  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-2\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}_4\text{H}_9]^+$  (33), 155 (17), 149 (26), 137 (21), 125 (10), 116  $[\text{M}-\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_3]^+$  fragmentación retro-Diels Alder (100), 109(28), 95 (54), 85 (85), 74 (96).

Tabla 2. Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  NMR y  $^{13}\text{C}$  NMR de la stemfolona A y B.

H/C	Stemfolona A		Stemfolona B	
	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
1	----	201.3 <i>s</i>	----	201.3 <i>s</i>
2	5.89 <i>bs</i>	122.5 <i>d</i>	5.89 <i>bs</i>	122.6 <i>d</i>
3	----	164.2 <i>s</i>	----	163.6 <i>s</i>
4	2.61 <i>dd</i> ( $J = 18.0, 6.0$ Hz)	36.1 <i>t</i>	2.63 <i>dd</i> ( $J = 19.0, 6.0$ Hz)	36.0 <i>t</i>
	2.47 <i>dd</i> ( $J = 18.0, 10.0$ Hz)		2.47 <i>dd</i> ( $J = 19.0,$ 10.0Hz)	
5	3.98 <i>dd</i> ( $J = 10.0, 6.0$ Hz)	73.9 <i>d</i>	3.98 <i>dd</i> ( $J = 10.0, 6.0$ Hz)	73.8 <i>d</i>
6	----	79.6 <i>s</i>	----	79.6 <i>s</i>
1'	2.23 <i>dd</i> ( $J = 7.0, 3.0$ Hz)	37.7 <i>t</i>	2.23 <i>m</i>	37.6 <i>t</i>
2'	1.45 <i>m</i>	26.7 <i>t</i>	1.45 <i>m</i>	23.1 <i>t</i>
3'	1.30 <i>m</i>	31.3 <i>t</i>	1.30 <i>m</i>	38.6 <i>t</i>
4'	1.28 <i>m</i>	22.4 <i>t</i>	3.81 <i>td</i> ( $J = 12.0, 6.0$ Hz)	67.7 <i>d</i>
5'	0.88 <i>t</i> ( $J = 7.0$ Hz)	13.9 <i>q</i>	1.19 <i>d</i> ( $J = 6.0$ Hz)	23.8 <i>q</i>
1''	1.95 <i>dd</i> ( $J = 13.0, 6.0$ Hz)	29.3 <i>t</i>	1.95 <i>dd</i> ( $J = 10.0, 6.0$ Hz)	29.3 <i>t</i>
	1.45 <i>m</i>		1.45 <i>m</i>	
2''	1.28 <i>m</i>	24.5 <i>t</i>	1.28 <i>m</i>	24.5 <i>t</i>
3''	1.32 <i>m</i>	23.1 <i>t</i>	1.28 <i>m</i>	23.2 <i>t</i>
4''	0.85 <i>t</i> ( $J = 7.0$ Hz)	13.9 <i>q</i>	0.85 <i>t</i> ( $J = 7.0$ Hz)	13.9 <i>q</i>



## B) ACTIVIDAD BIOCIDA

### Ejemplo 4. Actividad contra insectos-plaga

La cría y mantenimiento de los insectos se llevó a cabo en una cámara de temperatura controlada a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 60-70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16:8 horas (luz:oscuridad). Las larvas de *S. littoralis* se mantuvieron con una dieta semisintética (Poitut y Bues. 1970. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 2, 79-91) y los áfidos *M. persicae* y *Rhopalosiphum padi* sobre sus plantas huésped, pimiento -*Capsicum annum* L.- y cebada -*Hordeum vulgare* L.- respectivamente. Los ensayos de actividad anti-alimentaria se realizaron con larvas recién emergidas del sexto estadio de *S. littoralis* y pulgones adultos ápteros. La superficie superior de discos de hoja ( $1.0 \text{ cm}^2$ ) de pimiento (*Capsicum annum* L.), fueron tratados con  $10 \mu\text{l}$  de una solución (10 mg/ml para extractos y 5 mg/ml para productos puros). Cada ensayo consistió en 5 placas Petri con dos larvas por placa (*S. littoralis*) o veinte cajas ( $2 \times 2 \text{ cm}$ ) con diez áfidos de *M. persicae* o *R. padi* incubados en una cámara de crecimiento en las mismas condiciones descritas para la cría de los insectos. Una vez consumido el 75% de la superficie de los discos control (*S. littoralis*) o después de 24 h (*M. persicae* o *R. padi*) se calculó el índice de consumo (%FI) o de asentamiento (% de SI), respectivamente.  $\% \text{ FI} = [1 - (T / C) \times 100]$ , donde T y C son el consumo de discos de hojas tratadas y control;  $\% \text{ de SI} = [1 - (\% T / C \%)]$ , donde % C y % T son el porcentaje de áfidos asentados en los discos de hojas control y tratadas (Burgueño et al. 2008. *J. Chem. Ecol.* 34, 766-771). Los compuestos con un FI / SI  $> 70 \%$  se ensayaron en un experimento de dosis - respuesta para calcular su potencia relativa ( $\text{EC}_{50}$ , es la dosis efectiva para una reducción de un 50 % de la alimentación).

Tabla 3. Actividad contra insectos-plaga del extracto crudo (100 µg/cm<sup>2</sup>), de las fracciones H1-H8 [100 µg/cm<sup>2</sup>] y de los compuestos con actividad biocida (50 µg/cm<sup>2</sup>).

Extracto crudo/fracción/ compuesto	<i>S. littoralis</i> % FI	<i>M. persicae</i> % SI	<i>R. padi</i>
Extracto crudo	97.21 ± 1.58	97.23 ± 1.27	40.02 ± 6.79
H1	57.70 ± 8.81	50.29 ± 10.21	55.16 ± 6.27
H2	65.22 ± 9.64	92.76 ± 2.59	72.57 ± 6.20
H3	34.54 ± 11.70	91.51 ± 3.28	86.57 ± 3.11
H4	32.83 ± 16.81	83.91 ± 4.06	38.17 ± 7.70
H5	54.27 ± 11.78	47.54 ± 10.06	68.36 ± 6.41
H6	78.51 ± 9.56	74.88 ± 6.77	34.29 ± 6.90
H7	98.22 ± 1.44	93.18 ± 2.15	95.46 ± 2.11
H8	79.98 ± 7.93	72.04 ± 5.65	59.68 ± 6.51
<b>Stemfol</b>	60.44 ± 8.7	85.35 ± 5.36 0.05 (0.01-0.301)*	72.41 ± 5.61
<b>Stemfolona A</b>	41.8 ± 7.9	81.42±5.61 0.15 (0.06-0.36)*	na
<b>Stemfolona B</b>	52.9 ± 5.9	83.87±6.89 0.02 (0.003-0.15)*	45.13 ± 9.09

\*EC50 (µg/cm<sup>2</sup>)

#### Ejemplo 5. Actividad antifúngica

Los hongos fitopatógenos *Fusarium moniliforme* (Sheldon) [CECT 2152], *F. oxysporum* *fs. lycopersici* (Escalda) [CECT 2715] y *F. solani* (Mart) [CECT 2199] proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CET). La cepa de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (B05.10) es una donación del Departamento de Bioquímica de la Universidad de La Laguna (ULL). Para su mantenimiento las cepas se cultivaron en medio sólido comercial PDA a 25°C (*Fusarium*) o temperatura ambiente (*Botrytis*), y posterior conservación a -30°C en viales con glicerol al 18%. Para determinar la actividad antifúngica se empleó el método de dilución en agar (Murabayashi et al. 1991. J.

*Pesticide Sci.* 16, 419-427). Muestras del extracto crudo seco obtenido según el Ejemplo 2 se incorporaron en el medio de cultivo (5 ml) a 5 concentraciones diferentes (1, 0,5, 0,1, 0,05 y 0,01 mg/ml). De forma paralela, se prepararon controles con etanol a una concentración del 2 %. La siembra de los organismos diana se realizó por picadura (*Fusarium*) o con discos de 5 mm de diámetro (*B. cinerea*). Las colonias cultivadas en placas de Petri e incubadas durante 48 h fueron digitalizadas y se midieron empleando el programa ImageJ 1.43. El porcentaje de inhibición (% I) se calculó como:  $\% I = (C-T/C) \times 100$ , donde C es el diámetro de las colonias del control y T de las colonias de las muestras ensayadas. La dosis efectiva de inhibición de crecimiento ( $EC_{50}$ ) se determinó por análisis de regresión lineal (% de inhibición del log de la dosis).

Tabla 4. Actividad antifúngica del extracto crudo, de las fracciones H1-H8 y de los compuestos (utilizando 0.5 mg/ml). <sup>a</sup>Ensayado a 0.1 mg/ml.

Extracto crudo/fracción/ compuesto	Actividad antifúngica (0.5 mg/ml)			
	$EC_{50}$ mg/ml (95% CL)			
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
	85.5±0.89	80.921±1.674	77.78±1.09	61.176±3.793
Extracto crudo	<b>0.144 (0.113- 0.183)</b>	<b>0.196 (0.195-0.196)</b>	<b>0.08 (0.07-0.08)</b>	<b>0.30 (0.31- 0.30)</b>
H1	10.90±2.59 50.44±9.40	3.52±0.78	1.126±1.625	9.61±3.66
H2	0.464(0.069- 0.952) 69.38±1.17	32.79±1.72	46.79±6.89	9.44±3.77 <sup>a</sup>
H3	0.179 (0.147- 0.218)	56.26±1.69 <sup>a</sup>	82.55±2.9 <sup>a</sup>	54.82±1.97 <sup>a</sup>
H4	3.61±1.18	0	15.262±2.782	1.03±1.13
H5	12.79±1.84	12.87±2.86	15.328±3.006	16.03±2.30
H6	22.68±2.62	22.93±3.48	36.459±3.545	22.83±2.72
H7	0	0	4.629±1.937 <sup>a</sup>	0.24±2.67
H8	0.23±1.65 70.22±2.04	0 67.35±2.05	4.585±2.432	3.87±2.81 44.74±1.35
Stemfol	<b>0.01 (0.005- 0.024)</b>	<b>0.02 (0.020-0.021)</b>	47.093±3.578	<b>0.53 (0.53- 0.54)</b>

Stemfolona				56.21±1.50
A2	na	na	na	<b>0.43 (0.42-0.43)</b>
Stemfolona B	-----	4.20±1.14 <sup>a</sup>	49.94±4.40 <sup>a</sup>	11.88±3.67
			<b>0.21 (0.21-0.22)</b>	

### Ejemplo 6. Actividad nematocida

La población de nematodos (*M. javanica*) se mantuvo en cámaras de crecimiento sobre plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* (var. Marmande)- a 25 °C y una humedad relativa del 70%. Los ensayos se realizaron según la metodología descrita para *M. javanica* (Andres et al. 2012. *Phytochem. Rev.* 11, 371-390) utilizando la fase biológica de juveniles infectivos (J2). La actividad del extracto crudo seco obtenido según el Ejemplo 2, de sus fracciones y de los compuestos con actividad biocida se cuantificó a una concentración final por pocillo de 1.0/0.5 y 0.25 mg/ml, respectivamente. Cada tratamiento se repitió cuatro veces y la actividad nematocida se determinó a partir del porcentaje de juveniles infectivos muertos después de 72h. En los casos en los que se determinó una tasa de mortalidad > 99% se realizaron experimentos de dosis-respuesta para determinar LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub>.

Tabla 5. Actividad nematocida del extracto crudo, de las fracciones H1-H8 y de los compuestos

Extracto crudo/fracción/ compuesto		<i>M. javanica</i> mg/ml % paralyzed
Extracto crudo	1	<b>94.82 ± 0.75</b>
H1	1	0.41 ± 1.60
H2	1	7.46 ± 1.79
H3	1	0.00 ± 0.00
H4	1	0.00 ± 0.00
H5	1	10.39 ± 1.87
H6	1	11.14 ± 3.23

40

H7	1	0.98 ± 1.42
H8	1	1.80 ± 0.65
<b>Stemfol</b>	0,5	1.24 ± 0.68
<b>Stemfolona A</b>	0,5	83.05 ± 3.15
	0,25	2.8 ± 0.5
<b>Stemfolona B</b>	0,5	1.24 ± 0.9

### Ejemplo 7: Ensayo de fitotoxicidad

La actividad fitotóxica del extracto crudo, fracciones y compuestos puros (obtenido según el Ejemplo 2 y 3) fue evaluado frente a semillas de *Lactuca sativa* Teresa (Fito, España)

Los experimentos se realizaron en placas de 12 pocillos (Falcon), aplicando 20 µl (10 µg/µl) sobre discos de papel de 2,5 cm de diámetro colocados en el fondo de cada pocillo. Se le añadió 500 µl de agua destilada, 10/5 semillas, y las placas se incubaron en una cámara de crecimiento a 25 °C, 70% humedad relativa y un fotoperiodo 16:08 L: O. La germinación de las semillas se contabilizó durante seis días y la elongación de las raíces al final del experimento. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Como control positivo de la inhibición de la germinación se empleó la juglona (5 µg/µl: germinación inferior al 5%).

Los resultados se resumen en la Tabla 6:

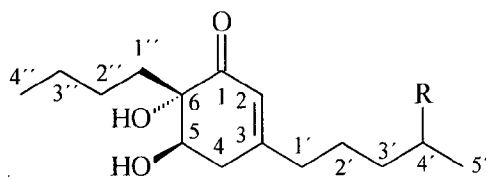
**Tabla 6.** Efectos fitotóxicos de los extractos y fracciones del hongo Aa22 (100 µg/µl) y compuestos (5 µg/µl) en *Lactuca sativa*

Muestra	Germinación	Crecimiento
	(%C)	(%C)
	72h	Ráiz
<b>Extracto completo Aa22</b>	100 ± 0,00	221,64 ± 19,78
<b>H1</b>	100 ± 0,00	104,77 ± 8,74
<b>H4</b>	100 ± 0,00	133,66 ± 13,09
<b>H5</b>	100 ± 0,00	137,41 ± 13,10
<b>H6</b>	102,63 ± 4,08	246,57 ± 13,61
<b>H7</b>	100 ± 0,00	197,65 ± 16,18
<b>H8</b>	100 ± 0,00	104,77 ± 9,29
<b>II</b>	100 ± 0,00	140,73 ± 13,16
<b>Ia</b>	97,50 ± 3,54	230,26 ± 21,33
<b>Ib</b>	100 ± 0,00	109,26 ± 9,57

Los ensayos muestran ausencia de efectos fitotóxicos del extracto, fracciones y compuestos Ia, Ib y II sobre la germinación y el desarrollo radicular de la planta *Lactuca sativa*. *L. sativa* (lechuga) se usa como modelo de planta dicotiledónea en ensayos de fitotoxicidad.

Por razones de exhaustividad, se exponen a continuación diversos aspectos de la invención en las siguientes cláusulas:

Cláusula 1.- Producto de fermentación de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* con actividad biocida de amplio espectro, caracterizado por que comprende un compuesto de fórmula (I):



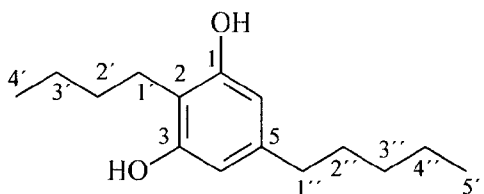
(I)

donde R se selecciona entre H y OH,

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

Cláusula 2.- Producto de fermentación según la Cláusula 1, caracterizado por que comprende simultáneamente un compuesto de fórmula (I) donde R es H, y otro compuesto de fórmula (I) donde R es OH, o un isómero, o una sal o un solvato de los mismos.

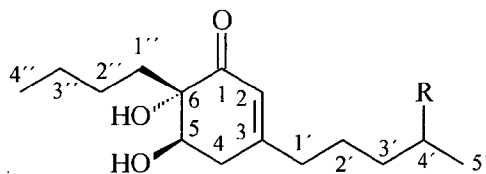
Cláusula 3.- Producto de fermentación según cualquiera de las Cláusulas 1 y 2, caracterizado por que adicionalmente comprende otro compuesto con actividad biocida de amplio espectro de fórmula (II):



(II)

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

Cláusula 4.-Compuesto de fórmula (I):



(I)

donde R se selecciona entre H y OH,

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

Cláusula 5.- Procedimiento de obtención del producto de fermentación definido según cualquiera de las Cláusulas 1 a 3, caracterizado por que comprende cultivar micelio de un hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* en un medio de cultivo.

Cláusula 6.- Procedimiento de obtención según la Cláusula 5, caracterizado por que adicionalmente comprende una etapa de secado que utiliza una técnica que se selecciona entre extracción con solvente orgánico previa filtración o bien liofilización.

Cláusula 7.- Procedimiento según la Cláusula 6, caracterizado por que el hongo endófito es la cepa Aa22 de *Stemphylium solani* con número de depósito CECT 20941.

Cláusula 8.- Uso de un producto de fermentación tal y como se define según las Cláusulas 1 a 3, de un compuesto de fórmula general (I) según se define en la Cláusula 4, o de un compuesto de fórmula (II) tal y como se define en la Cláusula 3 para elaborar una composición biocida de amplio espectro.


Cláusula 9.- Composición biocida de amplio espectro que comprende un producto de fermentación tal y como se define según las Cláusulas 1 a 3, o un compuesto de fórmula general (I) según se define en la Cláusula 4, o un compuesto de fórmula (II) tal y como se define en la Cláusula 3.

Cláusula 10.- Uso de la composición biocida según la Cláusula 9 como agente biocida de amplio espectro para el control simultáneo de más de una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas.

Cláusula 11.- Uso según la Cláusula 10, caracterizado por que las categorías de organismos perjudiciales que afectan a las plantas se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos.

Cláusula 12.- Uso según cualquiera de las Cláusulas 10 y 11, caracterizado por que las categorías de organismos perjudiciales son simultáneamente insectos-plaga, hongos y nematodos.





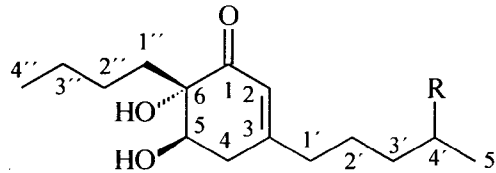
Cláusula 13.- Método para el control simultáneo de más de una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas, que comprende administrar una dosis eficaz de un producto de fermentación tal y como se define según las Cláusulas 1 a 3, o de un compuesto de fórmula general (I) según se define en la Cláusula 4, o de un compuesto de fórmula (II) tal y como se define en la Cláusula 3.

Cláusula 14.- Método de control según la Cláusula 13, caracterizado por que las categorías de organismos perjudiciales que afectan a las plantas se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos.

Cláusula 15.- Método de control según cualquiera de las Cláusulas 13 y 14, caracterizado por que las categorías de organismos perjudiciales son simultáneamente insectos-plaga, hongos y nematodos.

## REIVINDICACIONES

1.- Producto de fermentación de un microorganismo fermentador que comprende un compuesto de fórmula (I):

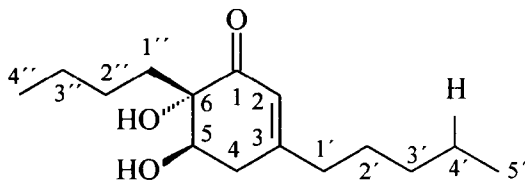


(I)

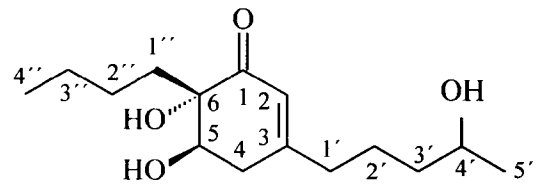
donde R se selecciona entre H y OH,

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

2.- Producto de fermentación según la reivindicación 1, que comprende un compuesto de fórmula (Ia), o un isómero, una sal o un solvato de (Ia), y un compuesto de fórmula (Ib), o un isómero, una sal o un solvato de (Ib):

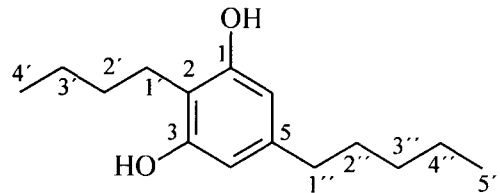


(Ia)



(Ib)

3.- Producto de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende adicionalmente un compuesto de fórmula (II):



(II)

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

4.- Producto de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es un extracto.

5.- Producto de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que está libre del microorganismo fermentador.

6.- Producto de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende el microorganismo fermentador inactivado.

7.- Producto de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el microorganismo fermentador es un hongo.

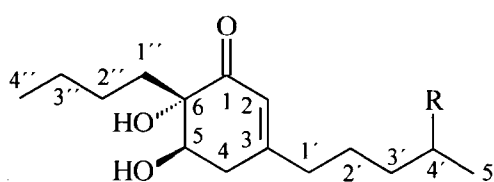
8.- Producto de fermentación según la reivindicación 7, en donde el hongo es un hongo endófito.

9.- Producto de fermentación según la reivindicación 8, en donde el hongo endófito es del género *Stemphylium*.

10.- Producto de fermentación según la reivindicación 9, en donde el hongo endófito es una cepa de *Stemphylium solani*.

11.- Producto de fermentación según la reivindicación 10, en donde el hongo endófito es la cepa de *Stemphylium solani* CECT 20941.

12.-Compuesto de fórmula (I):



(I)

donde R se selecciona entre H y OH,

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

13.- Procedimiento de obtención del producto de fermentación definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende (a) una etapa de fermentación que comprende cultivar el microorganismo fermentador en un medio de

cultivo que de lugar a la producción de un compuesto de fórmula (I); y, opcionalmente, (b) una o más etapas de extracción.

14.- Procedimiento según la reivindicación 13, en donde la etapa de fermentación se lleva a cabo en presencia de un cereal.

15.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en donde la etapa de fermentación se lleva a cabo en la oscuridad.

16.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde la etapa de fermentación se lleva a cabo a temperatura ambiente.

17.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde la etapa (b) de extracción del producto de fermentación se lleva a cabo mediante decantación usando un disolvente o mezcla de disolventes polares apróticos.

18.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, que comprende una etapa previa a la etapa (a) en la que se hace crecer el microorganismo fermentador en un medio de cultivo.

19.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, que comprende adicionalmente una etapa (i.1), posterior a la etapa(a) de fermentación, en la que se elimina el microorganismo fermentador.

20.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, que comprende adicionalmente una etapa (i.2) posterior a la etapa(a) de fermentación, en la que se inactiva el microorganismo fermentador.

21.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, que comprende una etapa (c) de purificación del extracto resultante de la etapa (b), (i.1.) o (i.2.).

22.- Procedimiento según la reivindicación 21, en donde la etapa (c) de purificación se lleva a cabo mediante cromatografía.

23.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, que comprende adicionalmente una etapa de secado del extracto resultante de la etapa (b), (i.1.), (i.2.), y/o (d).

24.- Procedimiento según la reivindicación 23, en donde la etapa de secado del extracto comprende es de secado al vacío.

25.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 24, en donde el microorganismo fermentador es un hongo, preferiblemente un hongo endófito, preferiblemente es una cepa de *Stemphylium*, preferiblemente una cepa de *Stemphylium solani*, preferiblemente es una cepa de *Stemphylium solani* con el número de depósito CECT 20941.

26.- Un producto de fermentación que comprende el compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 12, obtenible mediante el procedimiento según se define en cualquiera de las reivindicaciones 13-25.

27.- Producto de fermentación según la reivindicación 26, que comprende adicionalmente el compuesto de fórmula (II) según se define en la reivindicación 3.

28.- Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 12, que comprende la etapa de aislamiento del compuesto de fórmula (I) a partir del producto resultante de la etapa (b), (i.1.), (i.2) o (c) definidas en las reivindicaciones 13 a 24.

29.- Cepa aislada del hongo endófito de la especie *Stemphylium solani* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT20941 o un mutante de la misma que mantiene la capacidad de producir el compuesto de fórmula (I).

30.- Una composición biocida que comprende el producto de fermentación según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o el producto de fermentación según se define en cualquiera de las reivindicaciones 26-27, o el compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 12, o el compuesto de fórmula (II) según se define en la reivindicación 3, o la cepa de *Stemphylium solani* de la reivindicación 29.

31.- Uso de un producto de fermentación según se define en las reivindicaciones 1 a 11, o del producto de fermentación según se define en cualquiera de las reivindicaciones 26-27, o del compuesto de fórmula general (I) según se define en la reivindicación 12, o del compuesto de fórmula (II) según se define en la reivindicación 3, o de la cepa de *Stemphylium solani* de la reivindicación 28 como agente biocida.

32.- Uso de un producto de fermentación según se define en las reivindicaciones 1 a 11, o del producto de fermentación según se define en cualquiera de las reivindicaciones 26-27, o del compuesto de fórmula general (I) según se define en la reivindicación 12, o del compuesto de fórmula (II) según se define en la reivindicación 3, o de la cepa de *Stemphylium solani* de la reivindicación 28 o de la composición biocida según se define en la reivindicación 30, para el control simultáneo de más de una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas.

33.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 31-32, en donde las categorías de organismos perjudiciales que afectan a las plantas se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos.

34.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 31-33, en donde las categorías de organismos perjudiciales son simultáneamente insectos-plaga, hongos y nematodos.

35.- Método de control de organismos perjudiciales que afectan a plantas que comprende administrar una dosis eficaz del producto de fermentación según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o del producto de fermentación según se define en las reivindicaciones 26-27, o del compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 12, o del compuesto de fórmula (II) según se define en la reivindicación 3, o de la cepa de *Stemphylium solani* según se define en la reivindicación 28, o de la composición biocida según se define en la reivindicación 30.

36.- Método de la reivindicación 35, que es efectivo simultáneamente contra más de una categoría de organismos perjudiciales.

37.- Método de control según cualquiera de las reivindicaciones 35-36, en donde las categorías de organismos perjudiciales que afectan a las plantas se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos.

38.- Método de control según cualquiera de las reivindicaciones 35-37, en donde las categorías de organismos perjudiciales son simultáneamente insectos-plaga, hongos y nematodos.

**p.p.: Consejo Superior de Investigaciones Científicas \* UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA \* THE ENERGY AND RESOURCES INSTITUTE (TERI)**



IVAN ALFREDO POLI  
Agente 563



**RESUMEN**

En el campo de la agricultura los organismos perjudiciales para la vegetación constituyen un importante problema en relación con la productividad de las cosechas. La presente invención se relaciona con un producto de fermentación obtenido a partir de hongos endófitos de la familia *Stemphylium solani*, que puede comprender un nuevo compuesto de fórmula (I) y un segundo compuesto conocido de fórmula (II), y que presenta actividad biocida simultáneamente contra más de una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas y que preferentemente se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos. Tanto el producto de fermentación, como los compuestos incluidos en el ámbito de la invención, se usan en la elaboración de una composición biocida de amplio espectro. Finalmente, la invención también incluye el procedimiento de obtención del producto de fermentación y el nuevo compuesto de fórmula (I).



PARA USO EXCLUSIVO  
DE LA PROPIE

Trámite: 16203430 PATENTES Importe: \$8540.-  
Fecha/Hora: 21/10/2016 14:44:27.240  
Agente: ESTUDIO MARVAL & O'FARRELL



REPUBLICA ARGENTINA

INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL  
ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES



HOJA TECNICA

(10) PUBLICACION N°: AR

(12)  PATENTE DE INVENCION  MODELO DE UTILIDAD

(21) SOLICITUD N°

(51) INT. CL:

(22) FECHA DE SOLICITUD	<input type="text"/>	(71) SOLICITANTE(S):	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS C/ SERRANO, 117 (28006), MADRID, ES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA EDIFICIO CENTRAL UNIVERSIDAD, PLANTA 0, C. DELGADO BARRETO, S/N (38200), SANTA CRUZ DE TENERIFE, ES THE ENERGY AND RESOURCES INSTITUTE (TERI) DARBARI SETH BLOCK, HABITAT PLACE, LODHI ROAD (110003), NEW DELHI, IN
(30) DATOS DE PRIORIDAD	23/10/2015 ES P201531527	(72) INVENTOR(ES):	<input type="text"/>
(41) FECHA DE PUBLICACION	<input type="text"/>		
	BOLETIN N°:		
(61) ADICIONAL A:	<input type="text"/>		
(62) DIVISIONAL DE:	<input type="text"/>		
(74) AGENTE N°:	E-195		
(83) DEPOSITO DE MICROORGANISMOS:	25/09/2015 CECT 20941		

(54) TITULO DE LA INVENCION

(57) RESUMEN:

En el campo de la agricultura los organismos perjudiciales para la vegetación constituyen un importante problema en relación con la productividad de las cosechas. La presente invención se relaciona con un producto de fermentación obtenido a partir de hongos endófitos de la familia *Stemphylium solani*, que puede comprender un nuevo compuesto de fórmula (I) y un segundo compuesto conocido de fórmula (II), y que presenta actividad biocida simultáneamente contra más de una categoría de organismos perjudiciales que afectan a plantas y que preferentemente se seleccionan entre insectos-plaga, hongos y nematodos. Tanto el producto de fermentación, como los compuestos incluidos en el ámbito de la invención, se usan en la elaboración de una composición biocida de amplio espectro. Finalmente, la invención también incluye el procedimiento de obtención del producto de fermentación y el nuevo compuesto de fórmula (I).

FIGURA MAS REPRESENTATIVA N°:

AR