



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 914**

51 Int. Cl.:
A01N 65/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03792616 .9**

86 Fecha de presentación : **22.08.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1530421**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2005**

54 Título: **Uso de harina de semillas como pesticida para suelos.**

30 Prioridad: **23.08.2002 IT BO02A0544**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

73 Titular/es: **Triumph Italia S.p.A.**
Via Pistoiese 43
50054 Fucecchio, FI, IT

72 Inventor/es: **Lazzeri, Luca;**
Leoni, Onofrio;
Manici, Luisa, M.;
Palmieri, Sandro y
Patalano, Giampiero

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 306 914 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de harina de semillas como pesticida para suelos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de harina de semillas como agente para mejorar el suelo, como agente citotóxico para patógenos y parásitos del suelo y como agente fungitóxico para patógenos fúngicos del suelo.

10 **Antecedentes de la técnica**

En el sector agrícola se utiliza normalmente bromuro de metilo para restringir el crecimiento de patógenos fúngicos, nematodos, elatéridos, insectos, bacterias y de la maleza. Sin embargo, el bromuro de metilo tiene un impacto ambiental relativamente alto: reacciona con el ozono presente en las capas superiores de la atmósfera, transformándolo en Br₂O y contribuyendo a su destrucción.

Recientemente, para sustituir al bromuro de metilo, se han propuesto moléculas de origen vegetal con actividad citotóxica sobre los patógenos y parásitos del suelo. Entre estas moléculas, se han propuesto derivados de glucosinolatos (GL) generados mediante hidrólisis catalizada por la enzima mirosinasa (MYR) o mediante termólisis. Los GL son compuestos tioglucosídicos aniónicos presentes en cantidades y proporciones variables en diversos organismos y tejidos vegetales. La estructura molecular de los aproximadamente 120 GL actualmente aislados y caracterizados consiste en un grupo funcional común y una cadena lateral que puede ser de tipo alifático, aromático o heteroaromático.

Los GL, en presencia de la enzima MYR (tioglucósido glucohidrolasa, EC 3.2.3.1), se hidrolizan con la formación de β-D-glucosa, ión sulfato y varios derivados como isotiocianatos, nitrilos o tiocianatos (véase, por ejemplo Tookey H. L., Van Etten C. H., Daxembichler M. E., *Toxic Constituent of Plant Foodstuffs*, editado por I. E. Liner, 1980, II edición, 4, 103-142).

Algunos de los derivados de los GL mencionados anteriormente, especialmente los isotiocianatos, han mostrado propiedades citotóxicas *in vitro* sobre nematodos (véase Lazzeri L., Tacconi R., Palmieri S., *In Vitro Activity of Some Glucosinolates and Their Reaction Products toward a Population of the Nematode Heterodera schachtii*, J. Agric. and Food Chem 1993, 41, 825-829) y patógenos fúngicos vegetales presentes en el suelo (véase, por ejemplo, Manici L.M., Leoni O., Lazzeri L., Galletti S., Palmieri S., *Fungitoxic Activity of Some Glucosinolate Enzyme Derived Products Against the Main Soil-Borne Pathogens*, Pesticide Science, 1999, 55, 486-488 y Manici L.M., Lazzeri L., Palmieri S., *In Vitro Fungitoxic Activity of Some Glucosinolates and their Enzyme-derived Products toward Plant Pathogenic Fungi*, J. Agric. and Food Chem. 1997, 45, 2768-2773).

Para obtener y utilizar los derivados de los GL mencionados anteriormente son necesarios procedimientos de extracción y/o producción, que son relativamente complejos y costosos, y además pueden causar problemas ambientales (por ejemplo, la eliminación de los productos derivados y/o de los disolventes usados). Además, generalmente algunos derivados importantes de los GL (por ejemplo, el alilisotiocianato) son relativamente difíciles de manejar ya que tienen una volatilidad relativamente alta. Para superar estos aspectos negativos se ha propuesto la técnica del abono verde de plantas que contienen tanto GL como la enzima MYR (es decir, contiene el sistema GL-MYR).

La técnica del abono verde de plantas que contienen el sistema GL-MYR tiene, sin embargo, algunos aspectos negativos típicos de esta técnica en general. En particular, la técnica del abono verde requiere trabajos de cultivo que determinan unos costes de mano de obra relativamente elevados y provocan la pérdida de al menos un ciclo de crecimiento con el consiguiente perjuicio para el agricultor debido a la pérdida de ingresos.

El resumen de la base de datos BIOSIS, número de acceso PREV199598265524 (& S.A. Tiyagi y col.: *Efficacy of oils-seed cakes against plant-parasitic nematodes and soil-inhabiting fungi on mungbean and chickpea*; BIORE-SOURCE TECHNOLOGY, 51 (2-3), 1995, 233-239) evalúa la eficacia de las tortas de semillas oleaginosas de, por ejemplo, *Eruca sativa* y *Brassica campestris* para controlar a los nematodos y hongos que habitan en el suelo.

El resumen de la base de datos BIOSIS, número de acceso PREV 1999900264863 (& L. Angelini y col.: *Antigerminative activity of three glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis*; SEED SCIENCE AND TECHNOLOGY, 26(3), 1998, 771-780) describe el control de la germinación de la maleza mediante glucosinolatos hidrolizados de, por ejemplo, *Eruca sativa*.

M. Sarwar y col.: *Biofumigation potential of brassicas*; PLANT AND SOIL, 201, 1998, 103-112, mencionan que estas modificaciones del suelo por las harinas de las semillas de *Brassica* tienen el potencial de suprimir plagas y organismos patógenos, y proponen la selección de brásicas que produzcan grandes cantidades de glucosinolatos precursores de los isotiocianatos más tóxicos.

65 **Descripción de la invención**

El objetivo de la presente invención es proporcionar el uso de una harina de semillas como mejorador de suelos para reducir las desventajas mencionadas anteriormente de manera relativamente sencilla y barata.

ES 2 306 914 T3

La presente invención proporciona el uso de una harina de semillas que contiene al menos un glucosinolato y al menos una enzima seleccionada entre el grupo compuesto por:

- enzimas glucosídicas y
- enzimas tioglucosídicas;

como mejorador de suelos; estando caracterizado el uso porque las semillas comprenden semillas de *Brassica carinata* A. B.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar el uso de una harina de semillas como agente citotóxico para patógenos y parásitos del suelo.

La presente invención proporciona el uso de una harina de semillas que contiene al menos un glucosinolato y al menos una enzima seleccionada entre el grupo compuesto por:

- enzimas glucosídicas y
- enzimas tioglucosídicas;

como agente citotóxico para patógenos del suelo y parásitos del suelo; estando caracterizado el uso porque las semillas comprenden semillas de *Brassica carinata* A. B.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar el uso de una harina de semillas como agente fungotóxico.

La presente invención proporciona el uso de una harina de semillas que contiene al menos un GL y al menos una enzima seleccionada entre el grupo compuesto por:

- enzimas glucosídicas y
- enzimas tioglucosídicas;

como agente fungitóxico para patógenos fúngicos del suelo; estando caracterizado el uso porque las semillas comprenden semillas de *Brassica carinata* A. B.

Otras características de la presente invención se aclararán mejor mediante la siguiente descripción no restrictiva.

Mejor modo de realizar la invención

Las semillas de *Brassica carinata* A. B. que contiene GL y al menos una enzima glucosídica o tioglucosídica se muelen para obtener una harina uniforme y fina. Las semillas contienen la enzima MYR.

Las semillas usadas son semillas de *Brassica carinata* A. B.

También debe apreciarse que, preferiblemente, para aumentar adicionalmente el contenido de GL y de enzima glucosídica o tioglucosídica, la harina de semillas mencionada anteriormente se desgrasa, en otras palabras, se trata para extraer al menos parte del aceite que contiene. La extracción se realiza preferiblemente a una temperatura relativamente baja, preferiblemente inferior a 75°C, en especial a temperatura ambiente, de modo que la enzima glucosídica o tioglucosídica no sufra deterioro térmico y que también después de la fase de extracción del aceite siga siendo capaz de realizar su actividad enzimática. A este respecto es importante subrayar que el aceite extraído puede usarse, por ejemplo, como lubricante o líquido hidráulico renovable y ecológicamente sostenible.

La harina, preparada en forma de pellas, puede distribuirse sobre el suelo de manera relativamente fácil y a un coste relativamente bajo. En presencia de agua, aparecen en el suelo derivados de los GL generados mediante hidrólisis catalizada por la enzima glucosídica o tioglucosídica. A este respecto, es importante subrayar que para la hidrólisis de los GL se necesita agua, que es un reactivo esencial para desencadenar y desarrollar la reacción bioquímica.

Por esta razón, la harina no hidratada tiene una estabilidad relativamente alta, puede transportarse bastante fácilmente, almacenarse durante periodos relativamente largos y utilizarse en cualquier ocasión, independientemente de las condiciones ambientales.

Una vez que la harina se ha distribuido en el suelo e hidratado, los derivados de los GL generados por hidrólisis enzimática son capaces de llevar a cabo su acción citotóxica incluso aunque la harina contenga aproximadamente el 50% de proteína. Por tanto, aunque puede temerse que los isocianatos generados por hidrólisis de los GL, catalizados por las enzimas glucosídicas o, más específicamente, por la enzima tioglucosídica MYR, puedan interactuar espontáneamente con los grupos NH₂ libres de las lisinas y argininas presentes en las proteínas, para producir productos de adición de un tipo diferente que pueden estar relacionados con derivados de tiourea, sorprendentemente, los productos

de hidrólisis de los GL libres siguen siendo capaces de realizar una acción de mejora de suelos relativamente alta. Los productos de hidrólisis de los GL llevan a cabo una acción fungitóxica, en especial sobre patógenos fúngicos del suelo pertenecientes a diferentes clases taxonómicas (por ejemplo Oomicetos: *Pythium* y *Phytophthora*; hongos escleróticos: *Sclerotium rolsii* y *Rhizoctonia solani*; Hifomicetos: *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*) y una acción citotóxica sobre patógenos y parásitos del suelo, en especial nematodos (en particular *Meloidogyne incognita*), insectos y sobre la malezas. Entre los insectos sobre los que se lleva a cabo una acción citotóxica, es especialmente interesante la actividad citotóxica sobre elatéridos (por ejemplo, *Agriotes sordidus*, *Agriotes ustulatus* y *Agriotes brevis*). La actividad fungitóxica sobre hongos del género *Fusarium* es también en particular interesante.

Es importante señalar que el uso de la harina permite el aprovechamiento de concentraciones de GL sustancialmente imposibles de alcanzar con la técnica del abono verde.

Obsérvese que es posible utilizar tanto harina de semillas de esta única variedad vegetal *Brassica carinata* A. B. como una mezcla de harinas de semillas de esta variedad y de otras variedades vegetales. En especial, las variedades utilizadas por sus semillas pueden elegirse de manera que se puedan obtener harinas formuladas con diferentes modos de acción, según la necesidad de persistencia o volatilidad de los derivados de GL y la acción citotóxica necesaria. De hecho, ambas características (volatilidad y acción citotóxica) pueden variar según el tipo de patógeno o parásito y la fase en la que se encuentra en ese momento: vegetación (como micelio) o conservación (esclerotia, oospora, clamidospora o micelio de hibernación). Por tanto, según los modos de aplicación (momento y tipos de cultivo) de los patógenos y/o parásitos diana y la necesidad de mejora, pueden variar las composiciones de los formulados. En este sentido también es posible obtener formulados para el control de patógenos y parásitos telúricos. Además, es posible utilizar la harina descrita anteriormente también en combinación con otros compuestos, que a su vez pueden ser de origen sintético o natural.

Otras características de la presente invención estarán claras tras la descripción de algunos ejemplos meramente ilustrativos y no restrictivos. Los ejemplos siguientes se refieren al uso de harinas de semillas de *Brassica carinata* A. G., *Eruca sativa* M. (ejemplos comparativos, que no forman parte de la invención) y *Barbarea verna* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) como agentes fungitóxicos, conteniendo todos los tipos de harina que pueden usarse para dicho fin GL y una enzima glucosídica o tioglucosídica (en especial, MYR). Además, la harina que contiene los GL y una enzima glucosídica o tioglucosídica (en especial MYR) puede usarse también como agente citotóxico para otros patógenos y parásitos del suelo (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención).

Es importante señalar que los resultados ilustrados en los ejemplos siguientes pueden variar en términos cuantitativos pero no cualitativos, según las variedades vegetales y las condiciones ambientales en las que se producen las semillas.

Ejemplo 1

En este ejemplo se describe un procedimiento para la obtención de harinas de semillas de *Brassica carinata* A. B., *Eruca sativa* M. (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) y *Barbarea verna* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención).

Las semillas de *Brassica carinata* A. B., *Eruca sativa* M. (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) y *Barbarea verna* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) se limpian y, a continuación, se muelen por separado con un laminador normal hasta que se obtiene una harina uniforme y fina. Cada tipo de harina se somete a desgrasado por separado con n-hexano (Carlo Erba®) a una concentración de 1:10 (peso/volumen), dejando agitar la suspensión en un agitador durante 12 horas a temperatura ambiente. Cada tipo de harina se filtra a continuación por separado en papel (filtro Omniafiltra Superverloxx, Cartiera del Torana Spa, Nápoles), se lava repetidamente de nuevo con n-hexano y se coloca en un entorno ventilado a temperatura ambiente durante 24 horas para eliminar todos los restos de disolvente.

Ejemplo 2

En este ejemplo se describe un procedimiento de análisis para determinar el contenido en GL y la actividad mirosinásica en la harina de semillas.

Se analizó cada tipo de harina, obtenida como se describe en el ejemplo 1, para determinar el contenido en GL usando el procedimiento establecido por la normativa 1864/90 de la Unión Europea para el análisis de las semillas de colza (Boletín Oficial de las Comunidades Europeas, L 170, 03/07/1990, págs. 0027-0034). El análisis se realizó con la técnica de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) usando un cromatógrafo Hewlett Packard® modelo 1090L con detector de diodos ($\lambda = 229$ nm) y una columna HP ODS Hypersil C18, 5 μ m, 200 x 4,6 mm. La fase móvil consistía en una mezcla de agua y acetonitrilo con un gradiente del 1% al 22% de acetonitrilo en 22 minutos y con un caudal de 2 ml/min. La temperatura de la columna era de 35°C.

Además, también se cuantificó la actividad total de la mirosinasa en la harina mediante el ensayo pH-stat (Palmieri S., Iori R., Leoni, O. *Comparison of Methods for Determining Myrosinase Activity*, J. Agric. Food Chem. 1987, 35, 617-621). Los análisis se repitieron tres veces, mostrándose en la Tabla I los resultados tras los cálculos de las medias y desviaciones típicas.

TABLA I

Harina	Contenido de GL ($\mu\text{moles.g}^{-1}$ TQ)	GL predominante	Actividad mirosinasa (U.g^{-1})
<i>B. carinata</i>	$141,6 \pm 4,8$	Alil GL (Sinigrina)	$34,7 \pm 0,4$
<i>E. sativa</i> (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención)	$161,1 \pm 2,1$	4-metiltiobutil GL (Glucoerucina)	$53,3 \pm 4,2$
<i>B. verna</i> (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención)	$143,7 \pm 0,6$	Fenil-etil GL (Nasturtina)	$2,4 \pm 0,5$

Los datos proporcionados en la Tabla I indican que después del triturado en frío y de la extracción con n-hexano, los GL y la enzima MYR en su forma activa están presentes en la harina. Por tanto, las harinas de semillas desgrasadas de *Brassica carinata* A. B., *Eruca sativa* M. (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) y *Barbarea verna* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) contienen el sistema GL-MYR y, por tanto, en presencia de agua, son capaces de producir derivados de GL generados por hidrólisis enzimática mediante la enzima MYR.

El procedimiento de análisis descrito anteriormente puede usarse para identificar las variedades vegetales cuyas semillas presentan el sistema GL-MYR.

Ejemplo 3

En este ejemplo se describe un procedimiento para evaluar la actividad fungitóxica.

El ensayo de actividad fungitóxica se realizó empezando a partir de un aislado de *Fusarium culmorum*, aislado e identificado como tal en Manici M.L. y Cerato C. (1992) - *Studio su alcuni funghi agenti di marciume dei tuberi di patata; Informatore Fitopatologico* 9: 41-46, y las referencias incluidas en éste. Este aislado se cataloga como prueba para hongos en el micotech del Instituto Experimental para el Cultivo Industrial (Bologna) y se eligió debido a la estabilidad y regularidad de crecimiento que lo caracterizan.

La prueba proporciona evaluación de la toxicidad de los compuestos volátiles que se liberan de la harina tras su hidratación.

Se ensayaron por separado dosis de 0,01 g, 0,025 g, 0,05 g y 1 g de las harinas de semillas de *Brassica carinata*, *Eruca sativa* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) y *Barbarea verna* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) analizadas en el ejemplo 2. El control, incluido para la evaluación de la actividad fungitóxica, consistía en pellas de mejorador de suelos orgánico comercial basado en estiércol de aves de corral y cuero torrefacto.

La prueba se basaba en la evaluación de la reducción de crecimiento de las colonias de *Fusarium culmorum* en presencia de los productos liberados por la harina tras su hidratación, con respecto al crecimiento del mismo hongo en presencia del control.

Se inocularon discos de colonias de 4 mm tomados de una colonia de una semana de edad de *Fusarium culmorum* en el fondo de una placa Petri sobre un sustrato de agar nutritivo (agar de dextrosa de patata) e, inmediatamente después se volcó la placa sobre el fondo de otra placa de Petri que contenía el control e, independientemente, la harina en las diferentes cantidades (en un volumen total de aproximadamente 174 cm^3) hidratada inmediatamente antes. Las dos partes de abajo de las placas Petri unidas como se describe anteriormente se sellaron con parafilm y las placas resultantes se incubaron durante el tiempo necesario para que la colonia del control se desarrollara e invadiera al

ES 2 306 914 T3

menos las $\frac{3}{4}$ partes de la placa. En este momento, se midieron los diámetros de las colonias crecidas en presencia de los vapores liberados a las diferentes dosis de harina y del control.

La actividad fungitóxica de la harina se expresó como eficacia de inhibición (EI) en porcentaje con respecto al control usando la fórmula:

$$EI (\%) = [(Diámetro del control - Diámetro de la muestra tratada) / Diámetro del control] \times 100.$$

La tabla II muestra los resultados de la prueba.

La prueba se repitió tres veces por tratamiento, por tanto, los datos mostrados en la tabla II son la media de los tres valores.

TABLA II

Tratamiento con harina desgrasada	Dosis (g/placa)	EI %
<i>Eruca sativa</i> (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención)	0,01	81
	0,025	100
	0,05	100
	0,25	100
	1	100
<i>Brassica carinata</i>	0,01	72
	0,025	100
	0,05	100
	0,25	100
	1	100
<i>Barbarea verna</i> (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención)	0,01	40
	0,05	100
	0,25	100
	1	100

Los datos anteriores indican que los productos liberados por las harinas de semillas de *Brassica carinata* A. B., *Eruca sativa* M. (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) y *Barbarea verna* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención), tras la hidratación que activa el sistema GL-MYR presente en las mismas, inhiben el crecimiento del hongo *Fusarium culmorum* en mayor grado.

Ejemplo 4

En este ejemplo se describe un procedimiento para evaluar la actividad nematocida sobre nematodos, en especial nematodos de las agallas.

ES 2 306 914 T3

La prueba de actividad nematocida se realizó con larvas de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwoody, del suelo del área de Ferrara.

La prueba se realizó en frascos con capacidad para 100 g de suelo a los que se habían añadido larvas en segunda edad de crecimiento para evaluar la toxicidad de los compuestos volátiles liberados tras la hidratación de la harina.

Se probaron por separado las dosis equivalentes a $20 \cdot 10^{-2}$, $40 \cdot 10^{-2}$ y $120 \cdot 10^{-2}$ Kg/m² de harinas de semillas de *Brassica carinata*, *Barbarea verna* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención y *Eruca sativa* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención). El control, incluido para evaluar la actividad nematocida, consistía en suelo no tratado y un fertilizante con dos compuestos orgánicos diferentes: estiércol de aves de corral y cuero torrefacto (aplicado a la dosis máxima de la prueba, es decir, $120 \cdot 10^{-2}$ kg/m²).

La prueba se basaba en la evaluación de la mortalidad de las larvas de *Meloidogyne incognita* en presencia de la harina biocida y no biocida, con respecto a la mortalidad en el suelo sin tratar.

La tabla muestra los resultados de la prueba. La actividad nematocida de la harina se expresó como el número de larvas que permanecían en el suelo 10 días después del tratamiento.

La prueba se repitió cuatro veces por tratamiento, por tanto, los datos mostrados en la tabla III son la media de los tres valores.

TABLA III

Tratamiento	Dosis Kg/m ²	Nº de larvas por 100 g de suelo
Control	-	14
Estiércol de aves de corral	$40 \cdot 10^{-2}$	8
Cuero	$40 \cdot 10^{-2}$	5
<i>B. carinata</i>	$20 \cdot 10^{-2}$	1
<i>B. carinata</i>	$40 \cdot 10^{-2}$	0
<i>Eruca sativa</i> (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención)	$20 \cdot 10^{-2}$	0
<i>Eruca sativa</i> (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención)	$40 \cdot 10^{-2}$	0
<i>B. verna</i> (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención)	$20 \cdot 10^{-2}$	2
<i>B. verna</i> (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención)	$40 \cdot 10^{-2}$	2

Los datos anteriores indican que los productos liberados por las harinas de semillas de *Brassica carinata* A. B., *Eruca sativa* M (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) y *B. verna* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención), tras la hidratación, que activa el sistema GL-MYR presente en las mismas, inhiben la presencia de larvas de *Meloidogyne* en el suelo en mayor grado.

Ejemplo 5

En este ejemplo se describe un procedimiento para evaluar la actividad insecticida, especial con respecto a elatérios.

La prueba de actividad insecticida se realizó con larvas de *Agriotes sordidus* Illiger, *Agriotes ustulatus* Schaller, Rossi y *Agriotes brevis* Candeze producidos en las granjas de cría de la región del Véneto.

La prueba se realizó en frascos con una capacidad de 1,4 l de suelo al cual se habían añadido larvas de elatéridos de las especies mencionadas anteriormente en las fases 6ª a 8ª de desarrollo para evaluar la toxicidad de los compuestos volátiles liberados por la harina tras la hidratación.

Se probaron por separado las dosis equivalentes a 20 y 40 quintales.ha⁻¹ de harinas de semillas de *Brassica carinata* y *Eruca sativa* (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención del ejemplo 2. El control, incluido para la evaluación de la actividad insecticida, consistía en suelo sin tratar.

La prueba se basaba en la evaluación de la mortalidad de las larvas de *Agriotes* en presencia de la harina que se había hidratado, con respecto a la mortalidad en el suelo sin tratar. La evaluación de la mortalidad se realizó una hora después de la adición de la harina al suelo.

La tabla II muestra los resultados de la prueba. La actividad insecticida de la harina se expresó como eficacia de inhibición (EI) como porcentaje con respecto al control usando la fórmula:

$$EI (\%) = [(Mortalidad\ del\ control - Mortalidad\ de\ la\ muestra\ tratada) / Mortalidad\ del\ control] \times 100.$$

La prueba se repitió cuatro veces por tratamiento, por tanto, los datos mostrados en la tabla IV son la media de los tres valores.

TABLA IV

Tratamiento con harina desgrasada	EI %
<i>Eruca sativa</i> (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención)	92
<i>Brassica carinata</i>	100

Los datos anteriores indican que los productos liberados por las harinas de semillas de *Brassica carinata* A. B. y *Eruca sativa* M. (ejemplos comparativos que no forman parte de la invención) tras la hidratación, que activa el sistema GL-MYR presente en las mismas, inhiben la presencia de larvas de *Agriotes* en el suelo en mayor grado.

En especial, se observó lo siguiente:

- una elevada acción insecticida de la harina de semillas mencionada anteriormente en el espacio de tan sólo unos minutos;
- una rápida desaparición de los compuestos activos (sin actividad insecticida en el espacio de tan sólo unos días);
- el consiguiente bajo impacto ambiental.

No se observaron interacciones negativas.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se incluye sólo para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente Europea. Incluso aunque se ha puesto un gran cuidado en la recopilación de las referencias, no podemos excluir errores u omisiones y la EPO se exime de toda responsabilidad a este respecto.

Bibliografía distinta a las patentes citada en la descripción

• TOOKEY H. L.; VAN ETEN C. H.; DAXEMBIHLER M. E. *Toxic Constituent of Plant Foodstuffs*. 1980, vol. 4, 103-142.

• LAZZERI L.; TACCONI R.; PALMIERI S. *In Vitro Activity of Some Glucosinolates and Their Reaction Products toward a Population of the Nematode Heterodera schachtii*. *J. Agric. and Food Chem.*, 1993, vol. 41, 825-829.

• **MANICI L.M.; LEONI O.; LAZZERI L.; GALLETTI S.; PALMIERI S.** Fungitoxic Activity of Some Glucosinolate Enzyme Derived Products Against the Main Soil-Borne Pathogens. *Pesticide Science*, 1999, vol. 55, 486-488.

5 • **MANICI L.M.; LAZZERI L.; PALMIERI S.** *In Vitro* Fungitoxic Activity of Some Glucosinolates and their Enzyme-derived Products toward Plant Pathogenic Fungi. *J. Agric. and Food Chem.*, 1997, vol. 45, 2768-2773.

• **S.A. TIYAGI** y col. Efficacy of oils-seed cakes against plant-parasitic nematodes and soil-inhabiting fungi on mungbean and chickpea. *BIORESOURSE TECHNOLOGY*, 1995, vol. 51 (2-3), 233-239.

10 • **L. ANGELINI** y col. Antigerminative activity of three glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *SEED SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 1998, vol. 26 (3), 771-780.

• **M. SARWAR** y col. Biofumigation potential of brassicas. *PLANT AND SOIL*, 1998, vol. 201, 103-112.

15 • *Boletín Oficial de las Comunidades Europeas*, 3 de Julio de 1990, vol. L 170, 0027-0034.

• **PALMIERI S.; IORI R.; LEONI, O.** Comparison of Methods for Determining Myrosinase Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 1987, vol. 35, 617-621.

20 • **MANICI M.L.; CERATO C.** Studio su alcuni funghi agenti di marciume dei tuberi di patata. *Informatore Fitopatologico*, 1992, vol. 9, 41-46.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una harina de semillas que contiene al menos un glucosinolato y la enzima mirosinasa como mejorador de suelos; estando **caracterizado** el uso porque las semillas comprenden semillas de *Brassica carinata* A. B.
2. Uso según la Reivindicación 1, en el que dicha harina de semillas ha sido desgrasada a una temperatura inferior a 75°C.
- 10 3. Uso según la Reivindicación 2, en el que dicha harina de semillas ha sido desgrasada a temperatura ambiente.
4. Uso según una cualquiera de las Reivindicaciones anteriores, en el que las semillas proceden de al menos dos variedades vegetales diferentes.
- 15 5. Uso de una harina de semillas según una cualquiera de las Reivindicaciones anteriores como agente citotóxico para patógenos del suelo y parásitos del suelo.
6. Uso de una harina de semillas según una cualquiera de las Reivindicaciones anteriores como agente fungitóxico para patógenos fúngicos del suelo.
- 20 7. Uso según la Reivindicación 5, en el que dichos parásitos del suelo se seleccionan entre el grupo compuesto por:
- nematodos y
 - elatéridos.
- 25 8. Uso según la Reivindicación 5, en el que dichos parásitos del suelo se seleccionan entre el grupo compuesto por:
- maleza e
 - insectos.
- 30 9. Uso según la Reivindicación 6, en el que dicha harina lleva a cabo una acción fungitóxica sobre los hongos del género *Fusarium*.
- 35 10. Uso según la Reivindicación 5, en el que dichos parásitos del suelo se seleccionan entre el grupo compuesto por:
- *Fusarium culmorum*;
 - *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwoody;
 - *Agriotes sordidus*;
 - *Agriotes ustulatus* y
 - *Agriotes brevis*.
- 45 11. Uso de una harina de semillas según una cualquiera de la Reivindicaciones anteriores como agente citotóxico para elatéridos.
- 50
- 55
- 60
- 65