

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 526**

21 Número de solicitud: 201631534

51 Int. Cl.:

A01N 43/78 (2006.01)

A01N 27/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

30.11.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.02.2017

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

24.05.2017

Fecha de concesión:

05.09.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.09.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT D'ALACANT / UNIVERSIDAD DE
ALICANTE (100.0%)**

**Edificio Torre de Control. Crta. San Vicente del
Raspeig, s/n**

03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG (Alicante) ES

72 Inventor/es:

LÓPEZ LLORCA, Vicente;

BIN JALINAS, Johari y

MARHUENDA EGEA, Frutos Carlos

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO BEAUVERIA
BASSIANA COMO REPELENTES DE INSECTOS**

57 Resumen:

Compuestos orgánicos volátiles del hongo entomopatógeno beauveria bassiana como repelentes de insectos.

La presente invención se refiere a compuestos orgánicos volátiles de B. bassiana seleccionados de entre metilbenceno, hexametil-ciclotetrasiloxanos, 1,4-dimetil benceno, etenilbenceno, dodecametil-pentasiloxano, benzaldehído, 5-metilundecano, aldehído cáprico, 1,4-bis(1,1-dimetiletil)-benceno, benzotiazol y 1-decanol, como repelente de Rhynchophorus ferrugineus.

ES 2 600 526 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *BEAUVERIA BASSIANA* COMO REPELENTES DE INSECTOS

Campo de la invención

- 5 La presente invención se encuadra en el campo general de la agrobiotecnología y en particular se refiere a compuestos orgánicos volátiles de *Beauveria bassiana* como repelentes de insectos.

Estado de la técnica anterior

- 10 El picudo rojo de las palmeras (PRP), *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) es una de las plagas más graves de la palmera datilera. La invasión por el PRP es cada vez peor en el sudeste de España. Amenaza a la supervivencia del Palmeral de Elche, Patrimonio de la Humanidad (UNESCO), y a los palmerales históricos de las ciudades de Alicante y Orihuela.
- 15 Actualmente, no se dispone de medidas eficaces contra esta plaga y el control biológico a gran escala de PRP con hongos entomopatógenos presenta costes elevados. En España, se utilizan insecticidas de síntesis química para el control del PRP. Su uso excesivo se ha ido acompañado por el desarrollo de resistencias en las poblaciones del insecto y por problemas de contaminación ambiental (Al-Samarrie, A. I., and Akela, A. A. 2011. Distribution of
- 20 injected pesticides in date palm trees. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 12: 1416-1426). Para minimizar los problemas causados por los tratamientos fitosanitarios actuales, el interés de la investigación se ha centrado en la búsqueda de nuevos compuestos con estrategias amigables con el medio ambiente que proporcionen un control efectivo de las plagas. Para ello es esencial la comprensión del comportamiento del picudo rojo en el medio.
- 25 Dicho conocimiento permitiría encontrar una solución sostenible para controlar y prevenir la invasión del PRP en nuevos huertos de palmeras.

La invasión y difusión del PRP se debe a su comportamiento de búsqueda para adquirir alimentos, pareja, oviposición y sitios de reproducción. Por otra parte, el PRP posee una elevada capacidad de vuelo y es capaz de infectar palmeras de gran altura y porte (con

30 múltiples hijuelos) de un elevado coste e importancia ambiental y patrimonial. En dicho proceso el PRP consigue recursos que son absolutamente esenciales para su crecimiento y desarrollo, y para asegurar la eficacia biológica de futuras generaciones. Estos eficientes

mecanismos de búsqueda del PRP se basan en sus antenas que funcionan como órganos químico- y mecanorreceptores primarios especializados. Estos precisos mecanismos de evaluación ambiental son cruciales para asegurar la supervivencia y reproducción del PRP en el medio.

- 5 Los quimiorreceptores de las antenas suelen detectar productos químicos volátiles. Estos compuestos generan alertas en el insecto sobre la presencia de posibles parejas, alimento, lugares adecuados para depositar sus huevos o peligros que deben evitar. Por lo tanto, cualquier producto químico que pudiese interrumpir y/o modificar el comportamiento del PRP y en general su capacidad de búsqueda del huésped (las palmeras) proporcionaría una
10 herramienta para su manejo sostenible.

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son sustancias carbonadas sólidas y líquidas que se evaporan a 20°C y 0.01 kPa. Los COV aparecen como productos intermedios y finales de diversas vías metabólicas y pertenecen a numerosas clases estructurales tales como mono- y sesquiterpenos, alcoholes, cetonas, lactonas, ésteres o compuestos C8 (Korpi, A.,
15 Järnberg, J., and Pasanen, A. L. Microbial volatile organic compounds. *Critical Reviews in Toxicology*. 39(2): 139-93. 2009). Los hongos producen numerosos COV (Müller, A., Faubert, P., Hagen, M., zu Castell, W., Polle, A., Schnitzler, J. P., and Rosenkranz, M. 2013. Volatile profiles of fungi - Chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genetics and Biology*. 54:25–33. 2013) que están implicados procesos biológicos, tales
20 como control biológico o la comunicación entre los microorganismos y su entorno. Se ha sugerido que las interacciones biológicas entre insectos y los hongos, están mediadas por COV. Los compuestos orgánicos volátiles fúngicos afectan, por ejemplo, a los gorgojos de maíz almacenado (Herrera et al. 2015), y desencadenan el comportamiento de aseo de la termita para evitar patógenos (Yanagawa, A., Yokohari, F., and Shimizu, S. The role of
25 antennae in removing entomopathogenic fungi from cuticle of the termite, *Coptotermes formosanus*. *Journal of Insect Science*. 9(6): 6. 2009). Estos estudios han puesto de manifiesto la importancia de que un organismo sea capaz de reconocer las señales químicas del ambiente que lo rodea, ya que si se produce una identificación incorrecta podría dar lugar a una mala nutrición, una intoxicación, o ser el blanco de un depredador.

- 30 Los COV fúngicos también están siendo investigados por sus actividades insecticidas y repelentes. Por ejemplo, los compuestos orgánicos volátiles producidos por *Muscodor* spp., incluyendo la nitrosoamida, son insecticidas (US2010285543). *Muscodor vitigenus* produce naftaleno, utilizado antiguamente en las "bolas de naftalina", y funciona como un eficaz

repelente de insectos.

Además, los perfiles de COV se han correlacionado con diferentes niveles de patogenicidad de los hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, estudiados por su potencial como agentes de biocontrol para reducir las poblaciones de termitas. El perfil de compuestos volátiles de las cepas virulentas contenía n-tetradecano y alquenos, mientras que las no virulentas contenían muchos alcanos ramificados (Hussain et al., Behavioral and electrophysiological responses of *C. formosanus* towards entomopathogenic fungal volatiles. *Biological Control*. 55: 166-173. 2010). La capacidad de los insectos para detectar y responder a los hongos entomopatógenos dentro del orden Hypocreales se ha evaluado ampliamente. Existen evidencias de evitación de los hongos en especies de coleópteros (Ormond et al., Avoidance of a generalist entomopathogenic fungus by the ladybird, *Coccinella septempunctata*. *FEMS Microbiology Ecology*. 77: 229-237. 2011), Isópteros, Hemipteros (Meyling y Pell. Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology*. 31: 162-171. 2006) y ortópteros (Thompson et al., Entomopathogenic fungi detection and avoidance by mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Environmental Entomology*. 36(1): 165-72. 2007). Además, los compuestos orgánicos volátiles de varios hongos han mostrado efectos neurotóxicos en *Drosophilla melanogaster* (Inamdar et al., Neurotoxicity of fungal volatile organic compounds in *Drosophilla melanogaster*. *Toxicological Sciences*. 117(2): 418-426. 2010).

Existe, pues, la necesidad de facilitar composiciones naturales respetuosas con el medioambiente que proporcionen un control biológico sobre los insectos que atacan las palmeras.

Breve descripción de la invención

La presente invención resuelve los problemas descritos anteriormente, ya que se refiere a compuestos orgánicos volátiles del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como agente repelente del PRP.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto orgánico volátil del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para su uso como repelente de *Rhynchophorus ferrugineus*.

En la presente invención por compuesto orgánico volátil se refiere a sustancias químicas carbonadas sólidas y/o líquidas que aparecen como productos intermedios y finales de las

vías metabólicas de *Beauveria bassiana*.

En una realización en particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención es seleccionados de entre metilbenceno, hexametil-ciclotetrasiloxanos, 1,4-dimetil benceno, etenilbenceno, dodecametil-pentasiloxano, benzaldehído, 5-metilundecano, aldehído cáprico,
5 1,4-bis (1,1-dimetil benceno), benzotiazol y 1-Decanol.

En una realización más en particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención es seleccionado de entre etenilbenceno y benzotiazol.

En otra realización en particular, el compuesto orgánico volátil se obtiene a partir del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

10 En otra realización en particular, el compuesto orgánico volátil es obtenido por síntesis química.

En una realización en particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención está en forma sólida.

En una realización en particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención está
15 en forma líquida. Más en particular, la formulación líquida está impregnada en una matriz.

En una realización en particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención está en forma gel.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto orgánico volátil de la presente invención para su uso como repelente de
20 *Rhynchophorus ferrugineus* (de aquí en adelante, composición de la presente invención).

En una realización más en particular, la composición de la presente invención comprende etenilbenceno y benzotiazol.

Descripción de las figuras

25 Figura 1. Respuesta de hembras de *Rhynchophorus ferrugineus* (%) en un olfactómetro (tubo "Y") (10 minutos) cuando se les da a elegir entre el aire ambiental (control) y estímulos olfativos (fragmento de palmera o formulación sólida del hongo entomopatógeno *B. Bassiana*). N = 20 individuos por ensayo.

Figura 2. Media de tiempo de visitas PRP (n = 3) en 60 minutos de grabación en olfactómetro
30 de tubo en Y, entre el brazo control y el brazo con *B. bassiana*

Figura 3. Análisis de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GCMS) para (A) Tenax (Resina Control) (B) muestra control (Tratamiento control arroz (*Oryza sativa*) autoclavado,) (C) de muestra de 10 gramos de formulado de *B. bassiana* (D) de muestra de 20 gramos de formulado de *B. bassiana*

- 5 Figura. 4 Diagrama de Venn que representa los COV identificados por GCMS en las muestras. A i) Tenax (azul), ii) Arroz (rojo), y iii) 10 gramos de *B.bassiana* (verde). B i) Tenax (azul), ii) arroz (rojo) iii) 20 gramos de *B. bassiana* (verde). C i) Tenax (azul) ii) Arroz (rojo) (rojo) iii) 10 gramos de *B. bassiana* (verde) iv) 20 gramos de *B. bassiana* (amarillo)

- 10 Figura 5. Respuesta de una hembra de *Rhynchophorus ferrugineus* en un olfactómetro (tubo “Y”) (10 minutos) cuando se le da a elegir entre el aire ambiental (control) y un estímulo de olor (estímulos químicos) i) etenilbenceno ii) benzotiazol en gel de sílice. N = 20 individuos por ensayo. * Indica diferencias significativas en un ensayo de elección (P<0,01, chi-cuadrado).

15 Descripción detallada de la invención

Insectos y pecíolos de palmera utilizados en los bioensayos

- Los adultos de PRP se recogieron en Dolores, Elche-Alicante, (SE España) mediante trampas de feromonas cebadas con 4-metil-5-Nonol y 4-metil-5 nonanona. Los insectos se
20 mantuvieron en cajas a $25 \pm 0,5$ °C en la oscuridad. Las cajas de plástico (40 por 30 por 21 cm) contenían un papel de filtro humedecido con finas rodajas de manzana verde que se reemplazaron tres veces por semana. Los adultos de la población fueron sexados mediante inspección visual de sus hocicos (Prabhu y Patil. Studies on the biological aspects of red palm weevil. *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv.). *Karnataka Journal of Agriculture Science*.
25 22: 732–733. 2009). Se seleccionaron al azar hembras sanas de PRP de la población stock para los experimentos con bioensayos de tubo en “Y”.

- Se recogieron al azar en la Universidad de Alicante pecíolos de palmera datilera (*Phoenix dactylifera*). Las espinas y los foliolos se retiraron y el raquis se cortó en fragmentos de 3 cm x 2 cm de longitud. Dichos fragmentos se utilizaron para los experimentos de bioensayo de
30 tubo en “Y” como máximo a las 3 horas.

Hongo entomopatígeno *Beauveria bassiana*

El Hongo entomopatígeno *B. bassiana* utilizado en los ensayos (cepa *Bb* 203), se aisló de adultos de *R. ferrugineus* infectados de forma natural en el sureste de España (Daimés, Elche, CBS 121097; Güerri- Agulló et al., Infection of the Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: A SEM study. *Microscope Research Technique*. 73: 714-725. 2010) y se mantiene en la colección de hongos del Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Alicante. El hongo se mantuvo en la oscuridad a 4 °C en agar harina de maíz (CMA; BBL Sparks, MD). Se preparó una formulación sólida de *B. bassiana* usando sustrato de arroz (*Oryza sativa*) de acuerdo con Güerri-Agulló et al., 2010.

Descripción del olfactómetro tubo en “Y”

Se construyeron olfactómetros de tubo en “Y” (Rhodes et al., The role of olfactory cues in the sequential radiation of a gall-boring beetle, *Mordellistena convicta*. *Ecological Entomology*. 37(6): 500-507. 2012) para los bioensayos de laboratorio para comprobar la respuesta de la hembra adulta del PRP a estímulos con compuestos volátiles. El olfactómetro se construyó en su totalidad a partir de secciones de tubo de vidrio resistente al calor conectadas cada una por un cono hermético (5 mm). Los tubos de vidrio poseían un diámetro interno de 30 mm, la rama principal medía 200 mm y los brazos de la unión en “Y” 150 mm de longitud. El ángulo entre cada brazo y el cuerpo principal fue de 75°. El extremo de cada brazo se unió a un contenedor de vidrio (60 mm de longitud, 25 mm de diámetro) en el que se colocan las fuentes de olor. El aire en el interior de cada brazo del olfactómetro se mantuvo constante para todos los experimentos con el flujo de aire natural. Los tubos de se cubrieron para evitar el escape de los insectos (Figura 1). Al cambiar las sustancias de los ensayos, los frascos se lavaron con agua y con n-hexano para eliminar todos los restos de los volátiles de muestras anteriores.

Bioensayos de Conducta (olfactómetro de tubo en “Y”)

El primer experimento para bioensayos de tubo en “Y” se llevó a cabo para observar la capacidad de la hembra del PRP *Rhynchophorus ferrugineus* para detectar y responder a su atrayente natural (pecíolo de palmera) o el olor del hongo entomopatígeno *B. bassiana* en dos experimentos de elección. Se realizaron tres series de experimentos con 20 individuos adultos del PRP cada uno. Los PRP se pusieron a prueba en un olfactómetro en tubo “Y” y se

registró durante un tiempo máximo de 10 minutos cuando se les dio a elegir entre el brazo control (sin muestras) y el brazo de estímulo (i) peciolo fresco de palmera (*Phoenix dactylifera*), ii) formulación sólida del hongo entomopatógeno, *B. bassiana* y iii) arroz).

El arroz (*Oryza sativa*) se utilizó para los dos experimentos de elección debido a que se utilizó como sustrato para la formulación sólida de *B. bassiana*. Se utilizó una cámara de vídeo (Carl Zeiss Tessar Logitech HD 1080P) para la grabación de vídeo del movimiento del PRP en el olfactómetro en tubo "Y" en una caja de plástico de 30 L (Curva Iberia S.A)

Para cada experimento, los datos obtenidos en las respuestas porcentuales de hembras adultas del PRP a cada estímulo en comparación con el brazo de control se sometieron a Pearson's chi cuadrado (X^2) se analizan para comprobar la desviación significativa a $p < 0,01$ se espera de un 1:1 (estímulo:control) de respuesta. En primer bioensayo el PRP eligió significativamente de forma preferente el brazo del control (ver el resultado) en lugar del brazo de estímulo con el hongo *B. bassiana*.

Para determinar si *B. bassiana* es el agente responsable del comportamiento de repulsión de las hembras de PRP, se realizaron otros ensayos. Se utilizó el olfactómetro de tubo en "Y" para comparar el comportamiento de las hembras del PRP ($n = 3$) entre el arroz inoculado con *B. bassiana* y el arroz solamente. Se grabó durante 60 minutos y después se analizó el tiempo dedicado por los PRP a visitar los brazos con cada estímulo.

Ejemplo 1: Las hembras del PRP evitan los compuestos volátiles del hongo entomopatógeno B. bassiana liberados pasivamente al aire.

Los resultados de olfactómetro (tubo en "Y") indicaron que las hembras del PRP ($n = 20$) mostraron atracción por los peciolos de palmera (*P. dactylifera*) en comparación con el brazo control ($\chi^2 = 14,2383$, $df = 1$, $p = 0,0001611$). Por otro lado, el comportamiento de las hembras del PRP ($n = 20$) no mostró diferencias significativas entre el arroz (*Oryza sativa*) y el brazo control ($\chi^2 = 4.0599$, $df = 1$, $p = 0,04391$).

Las hembras del PRP mostraron repulsión hacia los compuestos volátiles del hongo entomopatógeno, *B. bassiana* ya que eligieron de forma significativa el control ($\chi^2 = 12,8$, $df=1$, $p=0,0003466$) en experimentos de elección entre dos estímulos: hongo entomopatógeno (*B. bassiana*) y brazo control (aire) (Figura 1).

En otra serie de ensayos de tubo en "Y" se les ofreció a las hembras del PRP ($n = 10$) la posibilidad de elegir entre el arroz y *B. Bassiana*. Los resultados mostraron que el 80% de las hembras eligieron el arroz para evitar el hongo *B. bassiana* a los 10 minutos de la grabación

del video. En un estudio en el que se grabó durante 60 minutos se determinó que el tiempo de las visitas de las hembras del PRP a *B. bassiana* (0.083 ± 0.06 minutos) fue despreciable, frente a las del arroz (35.333 ± 13.172 minutos) (Figura 2).

5 **Análisis de los compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por el hongo entomopatógeno *B. bassiana*.**

El análisis de compuestos orgánicos volátiles, COV, a partir de hongos entomopatógenos precisa la utilización de una resina adsorbente para su captura. En nuestros experimentos, se utilizaron tubos de vidrio TD 7" para Gerstel (Supelco, Bellefonte, PA EE.UU.) con la resina adsorbente Tenax. Como materia prima se utilizaron cultivos del hongo entomopatógeno *B. bassiana* sobre el sustrato de arroz (de 1 mes contado a partir del día de inoculación, y conteniendo $3 \cdot 10^9$ conidios por gramo). El perfil testigo (control o blanco) para el análisis de compuestos orgánicos volátiles se obtuvo mediante columnas Tenax que se limpiaron con el sistema de Gerstel de termodesorción (TDS) ($300\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h en corriente de nitrógeno). El espectro de picos de masas de la Columna Tenax se utilizó como control para observar las diferencias analíticas con las muestras. Para conseguir una recolección rápida y captura de compuestos orgánicos volátiles (COV) del hongo entomopatógeno, *B. bassiana* se colocaron 10 gramos de una formulación sólida del hongo *B. bassiana* en sustrato de arroz, en un tubo de vidrio y se pasó aire durante 10 minutos usando una bomba de compresión. El extremo del tubo de vidrio estaba conectado con el tubo de Tenax para recoger y atrapar los COV emitidos por la muestra. Para descartar de los perfiles de COV producidos por *B. bassiana* los COV derivados del sustrato, los COV generados por 10 gramos de arroz esterilizado no inoculados se recogieron y capturaron utilizando los métodos ya descritos. Se operó de manera similar con las muestras de 10 ó 20 gramos de formulación sólida de *B. Bassiana*. Todo el proceso se repitió tres veces para comparar y confirmar los resultados consistentes de compuestos orgánicos volátiles de las muestras.

Los COV se separaron en un Cromatógrafo de gases (Agilent Technologies, 6890 Network GC System) usando una columna HP5-MS de $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ mm}$ (Agilent, Waldbronn, Alemania). Los compuestos orgánicos volátiles vaporizados de la muestra pasan a la cámara de ionización de un espectrómetro de masas. Dichos compuestos separados se identificaron posteriormente por espectrometría de masas (Agilent, 5973 Network Mass Selective Detector). A continuación, los compuestos se identificaron, utilizando una base de datos de espectros de masas, o por comparación con los tiempos de retención y espectros de masas

de estándares conocidos.

Ejemplo 2. Producción de COV por B. bassiana en formulado sólido

El análisis de GCMS para el testigo en blanco (Tenax) detectó sólo dos picos principales (Figura 3A y Tabla 1) y se encontraron siete picos a partir del análisis de GCMS para arroz no inoculado (substrato para formulación sólida, *B. bassiana*) (Figura 3B y Tabla 2). Se encontraron 11 picos a partir del análisis de GCMS para 10 g de *B. bassiana* (Figura 3C y Tabla 3). Finalmente se observaron 22 picos principales del análisis de GCMS para muestras de 20 g de la formulación de *B. bassiana* (Figura 3D y Tabla 4). Los picos 12 y 13 de 20 g de muestras de *B. bassiana* correspondieron al mismo compuesto presente en la muestra de Tenax (pico 1, Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos orgánicos volátiles (COV) detectados a partir de la muestra de Tenax (Control).

Pico	T. R	Corr.	Calidad	Compuesto
1	19.839	6625068	93%	Benzaldehído
2	29.179	6815159	91%	1-Decanol

Tabla 2. Los compuestos orgánicos volátiles (COV) detectados a partir de arroz (*Oryza sativa*).

Pico No	T. P	Anchura	Corr. area	Calidad	Compuesto
1	12.564	0.168	14636750	86%	Hexametil Ciclotrisiloxano
2	18.845	0.070	3652706	86%	Decametil ciclopentasiloxano
3	19.843	0.125	10330336	93%	Benzaldehído
4	21.137	0.073	3411857	58%	5-metil undecano
5	27.099	0.054	2619884	76%	Aldehído cáprico
6	27.877	0.062	5071929	87%	1,4-bis(1,1-dimethiletil)-benceno
7	29.179	0.074	8110175	91%	1-Decanol

Tabla 3. Compuestos orgánicos volátiles (COV) detectados a partir de muestras de (10 gramos) *B. bassiana*.

Pico No.	T. P	Calidad	Compuesto
1	11.08	93%	metilbenceno
2	12.564	86%	Hexametil Ciclotrisiloxano
3	15.186	94%	Benzene, 1,4-dimethyl
4	16.27	93%	Etenil benceno
5	18.84	86%	Dodecametil pentasiloxano
6	19.843	93%	Benzaldehído
7	21.137	58%	5-metil undecano
8	27.099	76%	Aldehído cáprico
9	27.877	87%	1,4-bis(1,1-dimethiletil)-benceno
10	28.485	93%	Benzotiazol
11	29.179	91%	1-Decanol

Tabla 4. Compuestos orgánicos volátiles (COV) detectados a partir de muestras (20 gramos) de *B. bassiana*.

5

Pico No.	T. P	Calidad	Compuesto
1	8.682	86%	Ácido Acético
2	10.202	62%	2,5-dimetil Hexano,
3	11.251	50%	3-metil 1-Butanol
4	12.448	78%	2,4-dimetil Heptano
5	14.097	81%	4-metil Octano
6	15.186	94%	1,4-dimetil Benceno
7	15.463	96%	2-Furancarboxaldehído
8	16.27	93%	Etenil Benceno
9	16.942	41%	Pentametil Disiloxano
10	18.84	86%	Dodecametil Pentasiloxano
11	19.63	46%	Undecano
12	19.843	93%	Benzaldehído
13	19.917	86%	Benzaldehído
14	21.137	58%	5-metil Undecano
15	22.987	87%	Fenol
16	23.588	95%	1 Fenil Etanona
17	24.01	64%	Decametil Ciclopentasiloxano
18	26.250	46%	3-Hexin-1-ol
19	27.099	76%	Aldehído Cáprico
20	27.877	87%	1,4-bis(1,1-dimethiletil)-Benceno
21	28.485	93%	Benzotiazol
22	29.179	91%	1-Decanol

Se realizó un análisis del diagrama de Venn para identificar los compuestos COV únicos presentes solamente en muestras de *B. bassiana* (Figura 4). Este diagrama fue muy útil para

ver la relación de intersección entre las muestras. En el diagrama de Venn se identificaron 5 compuestos únicos de muestras de 10 g de *B. bassiana* (Figura 4A) y 15 compuestos de muestras de 20 g de *B. bassiana* (Figura 4 B) que no estaban presentes en las muestras de Tenax y arroz.

- 5 A continuación, se identificaron tres compuestos únicos presentes en ambas muestras *B. bassiana* muestras (Figura 4C). Finalmente elegimos los compuestos químicos etenilbenceno y benzotiazol, de alta y baja de volatilidad respectivamente, producidos exclusivamente por *B. Bassiana*, para llevar a cabo bioensayos con tubo en “Y”.

10 **Bioensayos de comportamiento (olfactómetro, tubo en “Y”) utilizando los COV propuestos**

En este experimento, se utilizaron muestras comerciales (Sigma-Aldrich) de los 2 COV seleccionados (ver apartado anterior) para la medida de su capacidad de generar repulsión en el PRP, *R. ferrugineus*. Se ensayaron dos métodos: i) Evaporación libre (liberación rápida) y ii) Impregnación de matriz (liberación lenta). La técnica de liberación rápida se realizó mediante la inyección de 0,5 ml de los COV en el brazo de estímulos químicos. Posteriormente, un individuo hembra de PRP (de uno en uno) se liberó en la abertura del brazo central del tubo en “Y” de y se expuso a dos brazos: i) estímulo químico (COV a testar) y ii) testigo o control (sin muestra). Se utilizaron un total de 20 hembras seleccionadas al azar y aparentemente sanas de PRP para cada experimento (testigo y estímulos químicos (COVs).

Por otro lado, se utilizó la impregnación de COVs en gel de sílice como método de liberación lenta (Zada et al. 2009). Para ello se mezclaron 0,5 ml de COV con 2 g de gel de sílice sin indicador (70-230 mesh, 60 angstorm, Aldrich). El gel de sílice con COV se cubrió con algodón y se depositó en un recipiente de vidrio de laboratorio (60 mm de longitud, 25 mm de diámetro).

25 El ensayo se llevó a cabo con hembras del PRP como ya se ha indicado.

A las hembras se les dio un máximo de 10 minutos en el tubo en Y para hacer una elección. Se registró como comportamiento negativo (repulsión) cuando un PRP o bien se alejó del brazo con los estímulos químicos o sólo permaneció en el brazo control durante la grabación. Después de cada prueba, se eliminó el PRP, el tubo en “Y” se enjuagó con agua y jabón luego con n-hexano (Sigma-Aldrich) y finalmente se secó con papel.

Ejemplo 3. Respuesta de hembras del picudo rojo de las palmeras a compuestos volátiles liberados de los productos químicos seleccionados. (Técnica de liberación rápida)

Las hembras del PRP *Rhynchophorus ferrugineus* mostraron un comportamiento repulsivo frente a estímulos químicos cuando se expusieron a ellos durante 10 minutos usando la técnica de liberación rápida. Cuando se utilizaron tanto el etenilbenceno ($\chi^2 = 14,2383$, $df = 1$, $p = 0,0001611$) como el benzotiazol ($\chi^2 = 12,9258$, $df = 1$, $p = 0.0003241$) se observó que las hembras se alejaron inmediatamente de ambas sustancias químicas dirigiéndose al brazo control o hacia la entrada de tubo en “Y”. En algunos casos la hembra del PRP tardó mucho para llegar a la mitad del tubo en Y para tomar la decisión de a que brazo dirigirse. Además, las hembras del PRP que no lograron alejarse de los estímulos químicos disminuyeron su actividad cuando finalizó la grabación.

10 *Ejemplo 4. Respuesta de hembras del picudo rojo de las palmeras a compuestos volátiles liberados de los productos químicos seleccionados. (Técnica de liberación lenta).*

Los resultados mostraron que las hembras de *Rhynchophorus ferrugineus* mostraron un comportamiento repulsivo durante 10 minutos exposición a estímulos químicos generados por el etenilbenceno en gel de sílice ($\chi^2 = 15,0222$, $df = 1$, $p = 0,0001063$) *Rhynchophorus ferrugineus* hembras mostraron un comportamiento repulsivo hacia el benzotiazol en gel de sílice ($\chi^2 = 15,5215$, $df = 1$, $p = 0,00008$) (Figura 5).

Se observó que las hembras del PRP que eligieron brazos con estímulos químicos se movieron lentamente para alcanzar el medio del tubo en “Y” para la toma de decisiones en comparación con la técnica anterior de liberación rápida. Cuando, las hembras del PRP llegaron al brazo de control, se mantuvieron en el mismo. Por el contrario, las hembras del PRP mostraron efectos de repulsión cuando se elegía el brazo con estímulos químicos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un compuesto orgánico volátil del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* seleccionado de entre metilbenceno, hexametil-ciclotetrasiloxanos, 1,4-dimetil benceno, etenilbenceno, dodecametil-pentasiloxano, benzaldehído, 5-metilundecano, aldehído cáprico, 1,4-bis (1,1-dimetil benceno), benzotiazol y 1-Decanol para su uso como repelente de *Rhynchophorus ferrugineus*.
- 10 2. Uso del compuesto orgánico volátil según la reivindicación 1, donde el compuesto orgánico volátil es seleccionado de entre etenilbenceno y benzotiazol.
3. Uso del compuesto orgánico volátil según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el compuesto orgánico volátil es obtenido por síntesis química.
4. Uso del compuesto orgánico volátil según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el
- 15 compuesto orgánico volátil está en forma sólida.
5. Uso del compuesto orgánico volátil según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el compuesto orgánico volátil está en forma líquida.
6. Uso del compuesto orgánico volátil según la reivindicación 5, donde la formulación líquida está impregnada en una matriz.
- 20 7. Uso del compuesto orgánico volátil según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el compuesto orgánico volátil está en forma gel.
8. Uso de una composición que comprende al menos un compuesto orgánico volátil según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso como repelente de *Rhynchophorus ferrugineus*.
- 25 9. Uso de la composición según la reivindicación 8, que comprende etenilbenceno y benzotiazol.

FIG.1

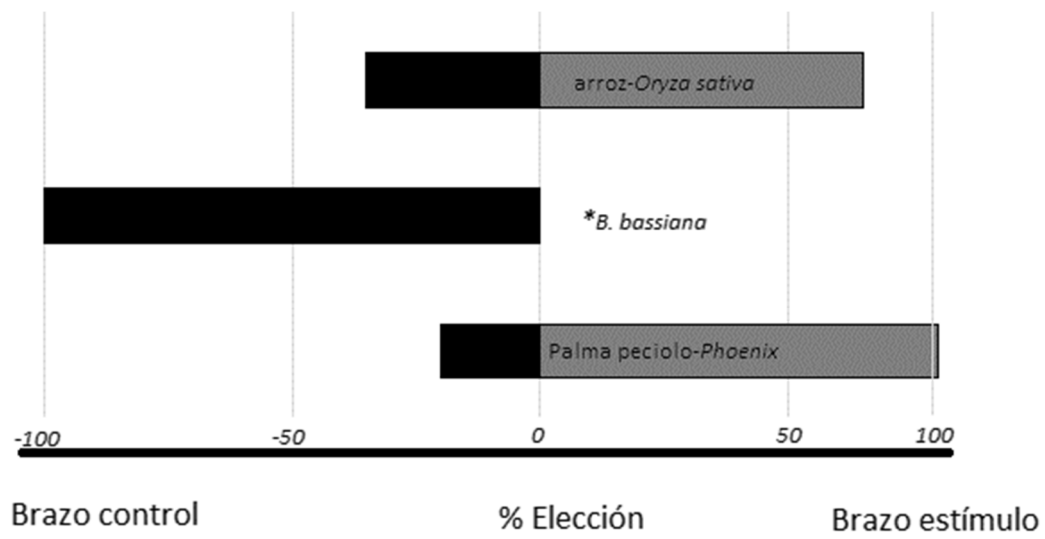
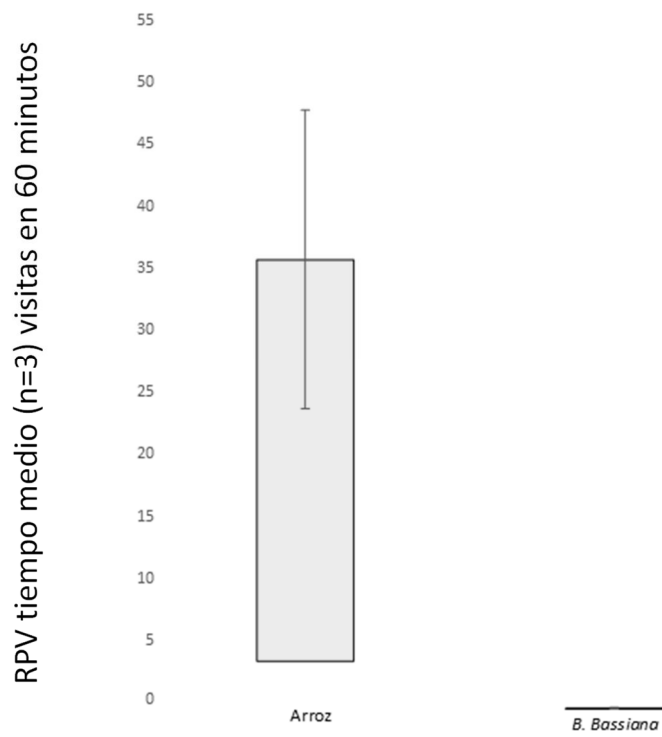


FIG.2



20

FIG. 3

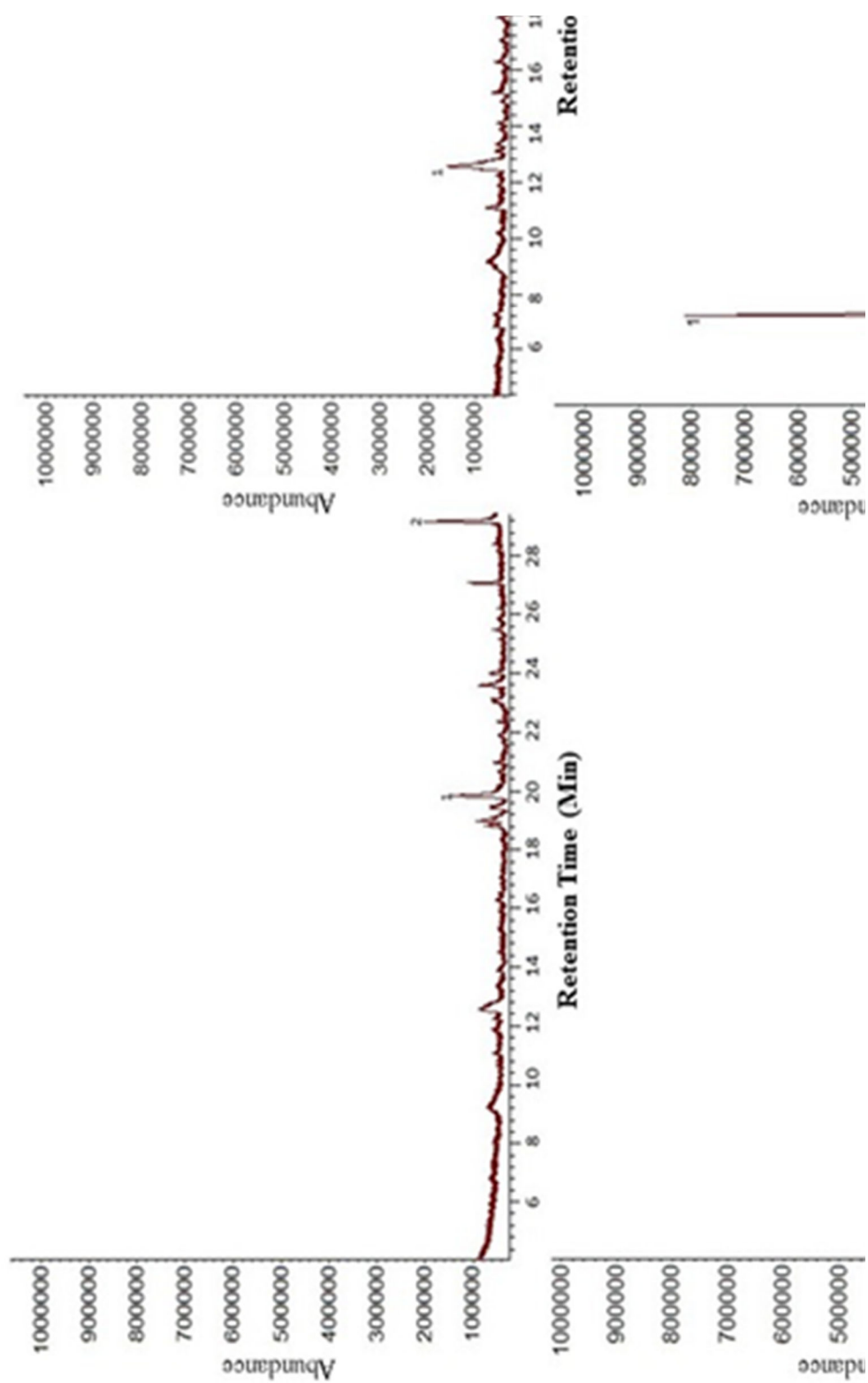


FIG. 4

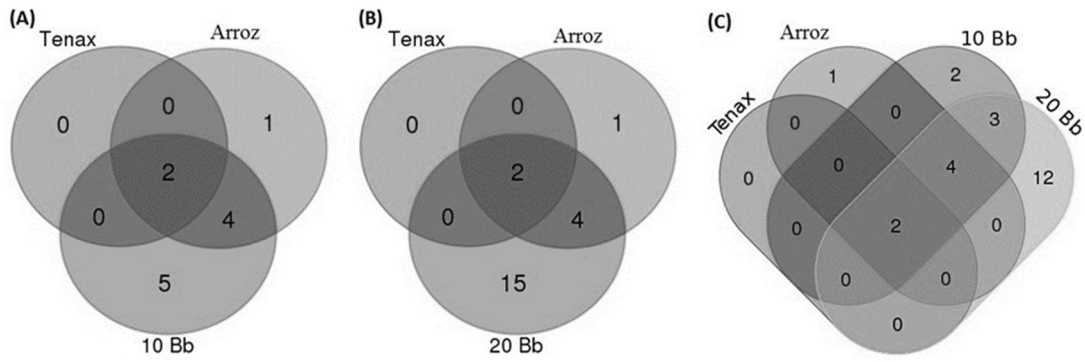
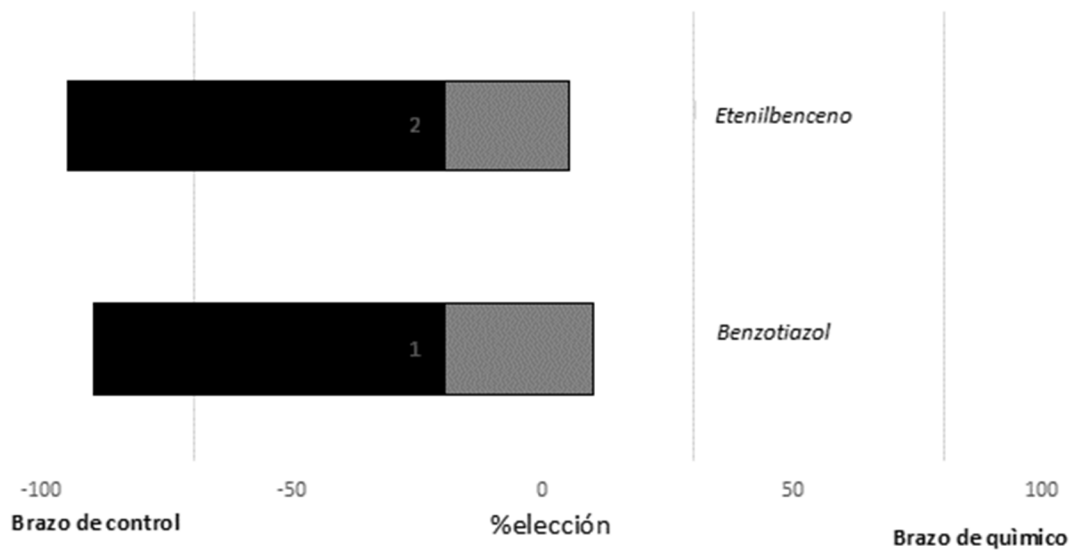


FIG.5





- ②① N.º solicitud: 201631534
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.11.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N43/78** (2006.01)
A01N27/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	AZEEM M. et al, Penicillium expansum volátiles reduce pine weevil attraction to host plants, J.Chem.Ecol. 39, páginas 120-128 (2013), ver resumen	1-9
X	VALLAT A. et al, Changes in volatile emissions from Apple trees and associated response of adult female codling moths over the fruit-growing season, Journal of agricultural and food chemistry, 53, páginas 4083-4090, (2005), ver tabla 1 y discusión	1-9
X	ZHANG M. et al, Volatile constituents of Charophytes as ovoposition deterrents of Culex Pipiens Pallens (Diptera: culicidae), J.Phycol. 46, páginas 390-395, (2010) ver resumen y tabla 3	1-9
X	TSUGITA T. et al, Volatile components in the steam distillate of rice bran: Identification of neutral and basic compounds, Agric.Biol.Chem. 42 (3) páginas 643-651 (1978) Ver resumen y tabla 1	1-10
A	RICAÑO J. et al, Evaluation of the pathogenicity of multiples isolates of Beauveria Bassiana on the Rhynchophorus Ferrugineus for the assessment of a solid formulation under simulated field conditions, Florida entomologist, 96(4), páginas 1311-1324, (2013)	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.01.2017

Examinador
M. Ojanguren Fernández

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.01.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-10	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	AZEEM M. et al, <i>Penicillium expansum</i> volátiles reduce pine weevil attraction to host plants, J.Chem.Ecol. 39, páginas 120-128 (2013), ver resumen	
D02	VALLAT A. et al, Changes in volatile emissions from Apple trees and associated response of adult female codling moths over the fruit-growing season, Journal of agricultural and food chemistry, 53, páginas 4083-4090, (2005), ver tabla 1 y discusión	
D03	ZHANG M. et al, Volatile constituents of Charophytes as ovoposition deterrents of <i>Culex Pipiens</i> Pallens (Diptera: culicidae), J.Phycol. 46, páginas 390-395, (2010) ver resumen y tabla 3	
D04	TSUGITA T. et al, Volatile components in the steam distillate of rice bran: Identification of neutral and basic compounds, Agric.Biol.Chem. 42 (3) páginas 643-651 (1978) Ver resumen y tabla 1	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere a compuestos orgánicos volátiles con actividad repelente de insectos, en concreto del *Rhynchophorus ferrugineus* (coleóptero curculionido).

El documento D1 divulga un estudio del efecto de los compuestos volátiles emitidos por el hongo *Pencillium expansum* sobre el comportamiento del gorgojo del pino, una especie de coleóptero curculionido. En este documento se demuestra que uno de los compuestos volátiles emitidos por este hongo, el etenilbenceno, reduce la atracción de este insecto hacia las trampas en las que se ha introducido este compuesto junto con acículas del pino.

Así mismo, los documentos D2 y D3 demuestran un efecto repelente del benzotiazol frente a insectos como la polilla del manzano o el mosquito común. Dicho compuesto (benzotiazol) es producido como compuesto volátil por las flores del árbol del manzano y por cierto tipo de algas.

Por último el documento D4 divulga un estudio de los componentes volátiles obtenidos de la destilación a vapor del salvado. Como se puede observar en la tabla 1 de la página 646, en la fracción neutra aparecen entre otros compuestos estireno (etenilbenceno) y benzotiazol.

Por lo tanto, a la vista de estos documentos, las características técnicas de la invención tal y como se definen en las reivindicaciones 1 a 10 de la presente solicitud carecen de novedad y de actividad inventiva (Art. 6.1 y 8. LP).