

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 920 198**

21 Número de solicitud: 202130071

51 Int. Cl.:

C12N 1/14	(2006.01)	C12R 1/66	(2006.01)
C12P 7/42	(2006.01)		
C12P 7/44	(2006.01)		
C07C 57/13	(2006.01)		
C07D 307/16	(2006.01)		
A01N 37/06	(2006.01)		
A01N 63/34	(2010.01)		
A01P 5/00	(2006.01)		

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

29.01.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.08.2022

Fecha de concesión:

19.09.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

26.09.2023

73 Titular/es:

GRUPO AGROTECNOLOGIA, S.L. (50.0%)
Polígono Puente Alto Parcela 57
03330 ORIHUELA (Alicante) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS-OM (50.0%)

72 Inventor/es:

GONZÁLEZ COLOMA, Ana Azucena;
ANDRÉS REYES, María Fe;
DÍEZ HERNÁNDEZ, Carmen Elisa;
HERRERO ASENSIO, Noemí y
RIQUELME TERRÉS, Enrique

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

54 Título: **Cepa de *aspergillus tubingensis* y su uso para el aislamiento de compuestos nematocidas**

57 Resumen:

Cepa de *aspergillus tubingensis* y su uso para el aislamiento de compuestos nematocidas.

La presente invención pertenece al campo técnico de los compuestos para el control de plagas en cultivos, más específicamente compuestos nematocidas aislados de una nueva cepa de la especie *Aspergillus tubingensis* a la que también se refiere la presente invención. Otros aspectos de la invención son composiciones que comprenden los compuestos aislados de la cepa de la especie *Aspergillus tubingensis* y el procedimiento para el control de nematodos en cultivos.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 920 198 B2

DESCRIPCIÓN

Cepa de *aspergillus tubingensis* y su uso para el aislamiento de compuestos nematicidas

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo técnico de los compuestos para el control de plagas en cultivos, más específicamente compuestos nematicidas.

10 Se describe el aislamiento de compuestos de una nueva cepa de la especie *Aspergillus tubingensis*, a la que también se refiere la presente invención.

Otros aspectos de la invención son composiciones que comprenden los compuestos nematicidas aislados de la nueva cepa de la especie *Aspergillus tubingensis*, y el
15 procedimiento para el control de nematodos en cultivos.

Antecedentes de la invención

Es conocido el daño que causan los nematodos a los principales cultivos, tanto en
20 invernaderos y plantaciones agrícolas en campo abierto, como en jardines.

Con el fin de controlar la enfermedad producida por nematodos se puede utilizar un control químico sobre ellos. El control químico de nematodos se realiza mediante el tratamiento con agentes químicos como carbamatos, organofosforados y similares. Aunque los nematicidas
25 químicos, principalmente organofosforados o carbamatos, consiguen un alto control de los nematodos fitopatógenos, son altamente tóxicos cuando permanecen en el suelo, se acumulan en las plantas de cultivo y perjudican la salud humana y animal. También son causantes de contaminación ambiental debido a las acciones negativas que ejercen contra los microorganismos del suelo, que son beneficiosos para el crecimiento de los cultivos, y
30 gradualmente hacen que el suelo se vuelva estéril.

Por tanto, se ha evitado el uso de plaguicidas químicos debido a los problemas como la contaminación ambiental, la destrucción del ecosistema, la intoxicación por pesticidas de humanos y animales, y además ha aumentado paralelamente la demanda de productos que
35 respeten el medio ambiente.

En esta línea, existe una creciente demanda de desarrollo de nematocidas que sean más seguros para el medio ambiente y que puedan reemplazar a los pesticidas químicos mencionados anteriormente.

- 5 En los últimos años, entre los métodos para el control de nematodos respetuosos con el medio ambiente, son cada vez más numerosos los métodos que utilizan microorganismos.

Los estudios han demostrado que los microorganismos son capaces de producir diversos metabolitos que actúan directamente sobre los patógenos, disminuyendo sus efectos
10 negativos sobre los cultivos.

La patente europea EP3282007, se refiere a la cepa de *Aspergillus niger* F22 y su actividad nematocida contra nematodos parásitos de plantas y en concreto contra *Meloidogyne spp.* Este documento no describe ninguno de los compuestos activos producidos por la cepa F22.
15

La presente invención describe una nueva cepa de *Aspergillus tubingensis*, su caldo de cultivo y su extracto crudo, e identifica los compuestos con actividad nematocida producidos por la misma.

20 **Descripción de la invención**

La presente invención se refiere al aislamiento de compuestos nematocidas de una nueva cepa de *Aspergillus tubingensis*.

- 25 La nueva cepa de *Aspergillus tubingensis* es un microorganismo endófito. El primer aspecto de la invención es la nueva cepa de la especie *Aspergillus tubingensis*, (cepa de la invención o cepa de *Aspergillus tubingensis* de la invención referenciada como cepa BP3 en los ejemplos), que fue depositada el 15 de diciembre de 2020 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Burjassot, Valencia, España) y a la cual se le asignó el número de
30 acceso CECT 21186.

Otros aspectos de la invención son el caldo de fermentación y el extracto crudo extraído de la cepa de la invención.

- 35 El caldo de fermentación de la cepa de la invención se obtiene a partir de un cultivo de la cepa de la invención mediante un procedimiento que comprende:

- a) cultivar la cepa de *Aspergillus tubingensis* de la invención, hasta que se desarrolle el micelio;
- b) fermentar el micelio desarrollado en a) en medio líquido;
- c) separar el micelio para obtener el caldo de fermentación.

5

El extracto crudo de la cepa de la invención se obtiene cuando tras las etapas a)- c) arriba descritas se realiza una extracción a partir del caldo de fermentación.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención es el procedimiento de obtención del extracto crudo que comprende las etapas de:

10

- a) cultivar la cepa de *Aspergillus tubingensis* de la invención, hasta que se desarrolle el micelio;
- b) fermentar el micelio desarrollado en a) en medio líquido;
- c) separar el micelio para obtener el caldo de fermentación;
- d) realizar una extracción a partir del caldo de fermentación obtenido en c) para obtener el extracto crudo.

15

Esta cepa tiene actividad nematocida, por lo que otro aspecto de la invención se refiere a un agente nematocida que incluye el caldo de fermentación y/o un extracto crudo de la cepa de la invención.

20

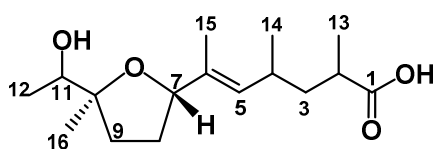
La invención incluye igualmente un método para controlar nematodos que comprende el siguiente paso, poner en contacto una planta, semilla, plantón, o sustrato con la cepa y/o el caldo de fermentación y/o un extracto crudo de la cepa de la invención.

25

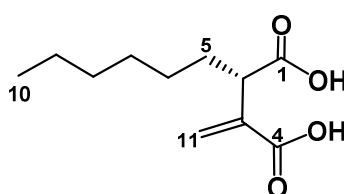
De esta cepa de la invención se aislaron una serie de compuestos de los que se comprobó su actividad nematocida.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención es el uso de la cepa de la invención para la obtención del compuesto de fórmula (I), y/o el compuesto de fórmula (II), y/o el compuesto de fórmula (III) y/o el compuesto de fórmula (IV);

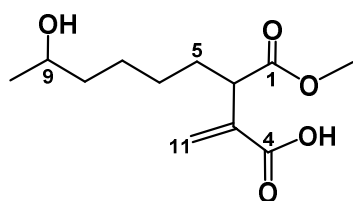
30



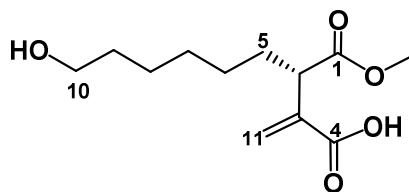
Fórmula (I)



Fórmula (II)



Fórmula (III)



Fórmula (IV)

y las sales y/o solvatos del mismo.

5

Igualmente forma parte de la invención el procedimiento de obtención del compuesto de fórmula (I) y/o el compuesto de fórmula (II) y/o el compuesto de fórmula (III) y/o el compuesto de fórmula (IV), procedimiento que comprende los pasos de:

10

a) cultivar la cepa de *Aspergillus tubingensis* de la invención, hasta que se desarrolle el micelio;

b) fermentar el micelio desarrollado en a) en medio líquido;

c) separar el micelio para obtener el caldo de fermentación;

d) realizar una extracción, a partir del caldo de fermentación obtenido en c) para obtener el extracto crudo;

15

e) aislar el compuesto de fórmula (I) y/o el compuesto de fórmula (II) y/o el compuesto de fórmula (III) y/o el compuesto de fórmula (IV).

20

Los compuestos de fórmula (I), fórmula (II), fórmula (III) y fórmula (IV) tienen actividad nematocida, por lo tanto, otro aspecto de la invención es el uso de dichos compuestos como nematocidas.

25

Con los compuestos de fórmula (I) y/o fórmula (II) y/o fórmula (III) y/o fórmula (IV) se pueden formular composiciones nematocidas y por lo tanto otro aspecto de la invención es una composición para el control de nematodos que comprende como ingrediente activo al menos uno de los compuestos seleccionados entre: compuesto de fórmula (I), compuesto de fórmula (II), compuesto de fórmula (III) y compuesto de fórmula (IV) o una sal o un solvato de estos, aceptables en agricultura.

30

Por último, es un aspecto de la invención un método para controlar nematodos que comprende el paso de poner en contacto una planta, semilla, plantón, o sustrato con el compuesto de fórmula (I) y/o el compuesto de fórmula (II) y/o el compuesto de fórmula (III) y/o el compuesto de fórmula (IV).

Descripción detallada de la invención

Como se ha dicho, un aspecto de la invención es la cepa de la especie *Aspergillus tubingensis* de la invención, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Burjassot, Valencia, España) con el número de acceso CECT 21186.

- 5 Como se ha dicho antes, el extracto crudo de la cepa de la invención se obtiene a partir de un cultivo de la cepa de la invención mediante un procedimiento que comprende:
- a) cultivar la cepa de *Aspergillus tubingensis* de la invención, hasta que se desarrolle el micelio;
 - b) fermentar el micelio desarrollado en a) en medio líquido;
 - 10 c) separar el micelio para obtener el caldo de fermentación;
 - d) realizar una extracción del caldo de fermentación para obtener un extracto crudo.

El procedimiento de obtención del caldo de fermentación comprende los pasos a) a c).

- 15 En materializaciones de la invención se puede cultivar la cepa en un medio líquido o en un medio sólido. Preferentemente en la etapa a) el cultivo se realiza en medio sólido PDA en la oscuridad.

Preferentemente en la etapa b) el medio líquido es un medio de cultivo Czapek-Dox modificado como el que se describe en el ejemplo 1. Preferentemente se fermenta entre 4 y 14 días, más preferentemente entre 5 y 8 días.

20

Preferentemente la separación de la etapa c) se realiza por filtración.

En la etapa d) el disolvente se puede seleccionar entre: diclorometano, éter etílico y acetato de etilo. De manera particular el disolvente de la etapa d) es acetato de etilo.

25

Como se ha dicho el extracto crudo de la cepa y el caldo de cultivo de la invención tienen actividad nematocida. En particular tienen actividad nematocida frente a nematodos, de manera particular del género *Meloidogyne* y, de manera más particular, *Meloidogyne javanica*

- 30 Los nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* son uno de los principales patógenos de especies vegetales y presentan una distribución mundial. Son endoparásitos obligados, de naturaleza polífaga, e infectan más de 3000 especies vegetales cultivadas a las que causan severos daños con las consiguientes pérdidas económicas. La infección se

produce cuando el juvenil de segunda edad (J2), móvil e infectivo, es atraído por el sistema radical de la planta huésped. Durante todo su ciclo vital el nematodo permanece en el interior de la raíz y la infección afecta al crecimiento de la planta, causa marchitamiento, aumenta su susceptibilidad a otros patógenos y en determinadas condiciones puede causar su muerte.

5

Como se ha dicho igualmente forma parte de la invención el procedimiento de obtención del compuesto de fórmula (I) y/o el compuesto de fórmula (II) y/o el compuesto de fórmula (III) y/o el compuesto de fórmula (IV), procedimiento que comprende los pasos a) a e) previamente descritos y una última etapa f) donde la etapa f) es aislar el compuesto de fórmula (I) y/o el compuesto de fórmula (II) y/o el compuesto de fórmula (III) y/o el compuesto de fórmula (IV).

10

Preferentemente el aislamiento se realiza por técnicas de fraccionamiento.

En materializaciones de la invención las técnicas de fraccionamiento se pueden seleccionar entre: cromatografía líquida de vacío, cromatografía en columna, cromatografía en columna 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.

15

Como se ha dicho otro aspecto, de la invención se refiere a una composición para el control de nematodos que comprende como ingrediente activo al menos uno de los compuestos seleccionados entre: compuesto de fórmula (I), compuesto de fórmula (II), compuesto de fórmula (III) y compuesto de fórmula (IV) o una sal o un solvato de estos, aceptables en agricultura.

20

25

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

Los vehículos se seleccionan entre: vehículos sólidos, vehículos líquidos, vehículos gaseosos.

30

En materializaciones de la invención se puede seleccionar los agentes entre tensioactivos y auxiliares para la formulación de composiciones de la invención.

Por ejemplo, se puede adicionar a la composición un aditivo para formular formas tales como concentrados, polvos humectables, líquidos fluidos, (ej. suspensión en agua, emulsión en agua, entre otros), polvos, aerosoles.

35

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

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

Ejemplos de vehículo gaseoso que se incluyen en el ámbito de la invención son agente de pulverizado, incluyendo gas butano, LPG (gas licuado de petróleo), éter dimetílico, gas de dióxido de carbono.

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 polietilén glicólicos, ésteres de alcohol polihidroxílico y derivados de alcohol de azúcar.

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 (ej., polvo de almidón, goma arábiga, derivado de celulosa, ácido algínico), derivados de lignina, bentonita, azúcares, polímeros hidrosolubles sintéticos (ej., polialcohol vinílico, polipirrolidona de vinilo, poliácidos acrílicos).

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.

El caldo de fermentación, el extracto crudo y las composiciones de la invención se pueden utilizar conjuntamente con al menos otro ingrediente activo adicional. Ejemplos de ingrediente activo adicional son insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, reguladores del crecimiento de la planta, fertilizantes, acondicionadores del suelo y cebos para animales.

5

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación del cultivo

Se comenzó con la realización de un cultivo en medio sólido PDA (Potato, dextrose y agar) de una muestra de la cepa del hongo *Aspergillus tubingensis* de la invención (denominada BP3 en los ejemplos) conservada a -80°C. La placa sembrada sellada con parafilm se incubó a 25°C en oscuridad en una cámara a cultivo durante 8 días. Posteriormente se prepararon varias réplicas que fueron cultivadas en las mismas condiciones para tener material e iniciar la fermentación en medio líquido.

Preparación de los pre-inóculos.

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio de cultivo Czapek-Dox modificado. [NaNO₃ (2 g/L), KH₂PO₄ (5 g/L), MgSO₄ (0,5 g/L), FeSO₄ (0,01 g/L), ZnSO₄ (0,003 g/L), extracto de levadura (1 g/L) y glucosa (60 g/L)]. Los matraces fueron esterilizados en autoclave durante 25 minutos a 121°C. Cada uno de ellos fue inoculado bajo condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar con el raspado del micelio de una placa a la que se le ha añadido sobre la superficie de la colonia 10mL de agua estéril. Finalizado el proceso de raspado se procedió a la incubación en una cámara de cultivo a 25°C y agitación continua en un agitador orbital (120 rpm) durante 3 días.

Proceso de fermentación

La fermentación se llevó a cabo en matraces de 500 ml con un volumen de 200 mL de medio de cultivo durante 5, 8 y 12 días en las mismas condiciones descritas de agitación y temperatura. Como inóculo se utilizó un volumen de 10mL del cultivo de los pre-inóculos por matraces.

Obtención del extracto crudo

Los extractos crudos se obtuvieron a partir de cultivos de 5, 8 y 12 días de la cepa BP3, el micelio se separó del medio por filtración a vacío sobre un embudo Büchner. Se registró el valor del pH del medio líquido (pH=4.31) y se realizó una extracción líquido-líquido con acetato

de etilo como disolvente orgánico. El proceso se repitió tres veces secando las fases orgánicas sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente a presión reducida en un rotavapor condujo a la obtención de los extractos crudos con rendimientos de 1,3, 2,8 y 2,4 g/L, respectivamente.

Ejemplo 2. Ensayo de la actividad biológica del extracto obtenido en el Ejemplo 1

5 Ensayo de actividad biológica

La especie de nematodo utilizada como especie diana en el ensayo de actividad biológica del extracto fue *Meloidogyne javanica*.

Actividad nematocida: Ensayos *in vitro* con juveniles infectivos (J2)

Se utilizaron placas estériles para cultivo celular de 96 pocillos con fondo en U. A cada pocillo se añadió 5 µl del extracto a una concentración de 20 µg/ µl y 95 µl de agua con aproximadamente 100 J2. La concentración final del extracto y/o tratamiento a ensayar fue de 1 µg/ µl. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. Los controles incluyeron 95 µl de agua con nematodos más 5µl de solución acuosa con el mismo disolvente utilizado (DMSO+Tween 0,6%) para los tratamientos. La distribución de las muestras se realizó en grupos de 4 al azar y dejando la fila y la columna externas rellenas de agua para mantener la humedad y evitar el efecto borde. La placa se incubó en oscuridad a 24°C durante 72 horas.

Pasado el periodo de incubación se realizó el recuento de nematodos muertos y vivos en un microscopio estereoscópico. Los datos de actividad nematocida se presentaron como porcentaje de mortalidad de J2 corregido según la fórmula de Scheider-Orelli.

Los extractos del Ejemplo 1 fueron activos sobre *M. javanica* con 100% de mortalidad.

Ejemplo 3. Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo

Técnicas utilizadas para el fraccionamiento y caracterización química

25

Cromatografía en columna (CC)

Para la cromatografía en fase normal se usó sílica gel y un gradiente de hexano-acetato de etilo-metanol de polaridades crecientes (5 cm diámetro, 15 cm h, Si 35-70 µm).

30

Cromatografía de HPLC preparativa

Se utilizó una bomba de HPLC (Varian ProStar 210) y una columna Interchrom KR5/25M. El flujo fue de 20 ml/min colectado en tubos de 10 ml a la mitad de su capacidad con un colector
5 Gilson FC203B.

Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó como soporte Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) para la fase estacionaria y como eluyente una mezcla de disolventes n-hexano:CH₂Cl₂:MeOH en distintas proporciones, dependiendo de la polaridad de la muestra a cromatografiar.

Cromatografía en Capa Fina (CCF)

El seguimiento de las columnas cromatográficas se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina, usando cromatofolios comerciales de gel de sílice 60 F254 con base de aluminio (20 x 20 cm, art. 5554) y óxido de aluminio neutro 60 F254 con base de aluminio (20 x 20 cm, art. 5550), adquiridas en la casa comercial Merck. En el sistema de elución se utilizaron los
15 mismos disolventes y polaridades que en las columnas cromatográficas. El revelado de los cromatofolios se realizó utilizando el reactivo óleum/vainillina para detectar los compuestos, mediante pulverización sobre los cromatofolios y calor.

OLEUM: está compuesto por una mezcla de ácido sulfúrico (4%), ácido acético (80%) y agua destilada (16%). Las placas se pulverizaron con este reactivo y se visualizaron aplicando calor
20 (110°C-130 °C).

VAINILLINA: 0,5 g vainillina, 100 ml ácido sulfúrico/etanol (40:10).

Cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS)

Para la determinación cualitativa y cuantitativa de los compuestos presentes en los aceites esenciales y fracciones volátiles se utilizó como metodología la cromatografía de gases
25 acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), se utilizó un equipo Shimadzu GC-2010 acoplado a un detector de masas Shimadzu GCMS-QP2010-Ultra con una fuente ionización por impacto electrónico a 70 eV y utilizando un analizador Quadrupolo Simple. Se utilizó Helio como gas portador. La cromatografía se llevó a cabo con una columna capilar Teknokroma TRB-5 (95%) Dimetil- (5%) diphenylpolisiloxane, 30 m x 0,25 mm ID y 0,25 µm de espesor de
30 fase. Las condiciones de trabajo utilizadas fueron: inyección en modo Split inyectando 1 µl de

muestra con una relación de división (20:1), temperatura del inyector 300°C, temperatura de la línea de transferencia conectada al espectrómetro de masas 250°C y temperatura de la fuente de ionización 220°C. La temperatura de la columna inicial fue de 70°C, calentando hasta 290°C a 6°C/min y dejando a 290°C durante 15 min. Los espectros de masas y el tiempo de retención fueron utilizados para identificar los compuestos por comparación con los encontrados en la base de datos Wiley (Wiley 275 Mass Spectra Database, 2001), mientras que para la cuantificación se utilizaron los % de área relativos de todos los picos obtenidos en los cromatogramas.

De forma general, los espectros RMN (^1H y ^{13}C) fueron obtenidos con espectrómetros Bruker Advance-AMX-500 (^1H 500 MHz/ ^{13}C 125 MHz). Para alta resolución MS se utilizó un espectrómetro de masas Micromass LCT Premier. Para los espectros IR se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer modelo 1600 FT-IR y las actividades ópticas $[\alpha]_D$ se midieron en un polarímetro Perkin Elmer, modelo 343 usando la línea D de una lámpara de sodio

15 **Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo**

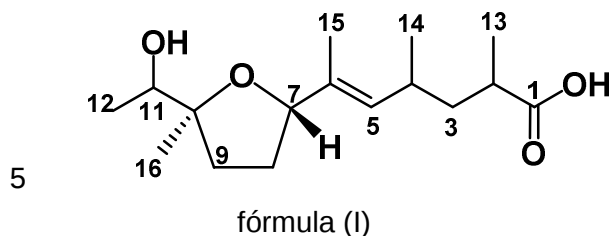
300 mg del extracto crudo obtenido a los 5 días de cultivo se fraccionaron en una columna Sephadex-LH-20 con una mezcla de n-hexano:DCM:MeOH (2:1:1). Se aisló el compuesto **2** de fórmula (II) (45 mg).

El fraccionamiento del extracto crudo obtenido a los 8 días (400 mg) se realizó en una columna cromatográfica de Sephadex-LH-20 con mezclas crecientes en polaridad de n-hexano:DCM:MeOH (3:1:1)-(2:1:1) y permitió identificar a partir de las fracciones activas los compuestos (**3**) (9 mg) y (**4**) (11 mg).

El fraccionamiento del extracto crudo de 12 días de cultivo se llevó a cabo en una columna cromatográfica flash de gel de sílice (5 cm diámetro, 15 cm h, Si 35-70 μm) con 4 gramos del extracto en 250 gramos de sílice. Se realizó una elución por gradiente con 4 volúmenes de 500 ml para cada polaridad empleando como eluyente mezclas de n-Hexano: AcOEt (20:80); AcOEt (100): AcOEt: MeOH (95:5) y AcOEt: MeOH (50:50) para obtener 8 fracciones. Las fracciones activas BP3 (B) y BP3 (E, F), se purificaron mediante una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Varian ProStar 210) con una columna Interchrom KR5/25M y un flujo fue de 20 ml/min lo que permitió identificar el compuesto **1** en la fracción activa BP3 (B)–4 (6,4 mg). Adicionalmente, el compuesto **2** fue identificado en las fracciones activas B2 y B3 con una abundancia relativa de un 40,5% y 28,6 % respectivamente (análisis de GC-MS).

Caracterización química del compuesto 1

La caracterización química mediante espectroscopía (^1H RMN, ^{13}C RMN) de la fracción activa B4 del cultivo de 12 días permitió la identificación del compuesto **1**.



El compuesto **1** se obtuvo en forma de aceite incoloro. Su fórmula molecular se determinó como $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_4$ por HRESIMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 307.1882, que muestra tres grados de insaturación en su molécula. Su espectro IR mostró dos bandas de absorción a λ_{max} 3459 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} debido a grupos hidroxilo y un grupo carbonilo, respectivamente. El espectro de ^{13}C NMR en combinación con los espectros bidimensionales ^1H - ^1H COSY y HSQC presentó señales características de cinco grupos metilos, cinco metinos, dos de ellos unidos a oxígeno a 72.1 (C-11) y 86.9 (C-7) y uno olefínico a 132.8 (C-5), así como las señales de tres grupos metilenos. Además, se observaron carbonos cuaternarios, uno unido a oxígeno a 87.4 (C-10), un olefínico a 133.8 (C-6) y otro de un grupo carbonilo a 181.3 (C-1). El análisis de estos datos espectroscópicos y las correlaciones observadas en los experimentos HMBC y NOESY confirmaron una estructura base de tetrahidrofurano para el compuesto **1** y permitió identificarlo como el **ácido aspérico (1)** (Varoglu M. et. al. **2000**. *J Nat Prod.* 63, 41-34).

20

El compuesto **1** se ha descrito previamente, pero no su actividad nematocida. Este compuesto en la presente invención se ha referenciado como fórmula (I).

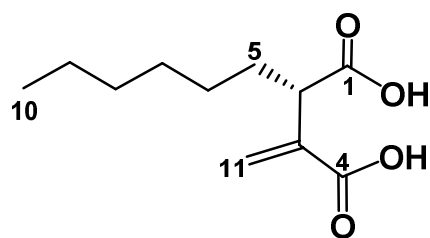
Ácido aspérico (1). $[\alpha]_D +4.05$ (c 0.37, CHCl_3); IR (film) λ_{max} 3459, 2094, 1640, 1530, 1423, 1342, 1330, 1131 cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 0.94 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-14), 1.12 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-12), 1.15 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-13), 1.18 (3H, s, H-16), 1.38 (1H, m, H-3a), 1.56 (1H, ddd, $J = 18.9, 7.8, 4.1$ Hz, H-9a), 1.62 (3H, d, $J = 1.4$ Hz, H-15), 1.69 (1H, m, H-3b), 1.88 (2H, m, H-8), 2.20 (1H, td, $J = 12.5, 7.7$ Hz, H-9b), 2.41 (1H, ddd, $J = 9.2, 7.2, 5.7$ Hz, H-2), 2.48 (1H, tt, $J = 10.0, 3.6$ Hz, H-4), 3.78 (1H, m, H-11), 4.33 (1H, dd, $J = 10.7, 5.3$ Hz, H-7), 5.16 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-5.); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 181.3 (C-1), 133.8 (C-6), 132.8 (C-5), 87.4 (C-10), 86.9 (C-7), 72.1 (C-11), 40.7 (C-3), 37.1 (C-1), 30.7 (C-8), 30.2 (C-9), 29.9 (C-4), 24.5 (C-16), 21.3 (C-14), 17.5 (C-12), 16.7 (C-13), 11.1 (C-15); HR-ESIMS m/z 307.1882 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Na}$, 237.1103).

25

30

Caracterización química del compuesto 2

El compuesto mostró una fórmula molecular $C_{11}H_{18}O_4$ establecida a través HR-ESIMS ($[M+Na]^+$, m/z 237.1102. La estructura química fue determinada por comparación de los datos espectroscópicos de RMN 1H y ^{13}C con los publicados previamente para el **(+)-ácido hexilitacónico** (Isogai, A. et al. **1984**, *Agr. Biol. Chem.*, 48, 2607-2609). La rotación óptica positiva ($\alpha_D +13.09$) indicó que se trata del estereoisómero S cuya configuración absoluta fue determinada por dicroísmo circular vibracional (Nakahashi et al. **2009**, *Bioorg Med Chem Lett.* 19, 3027-3030).

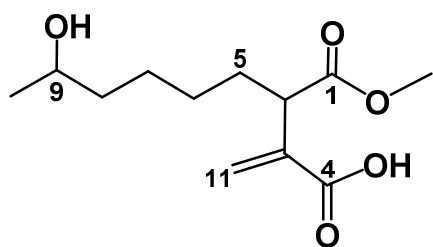


fórmula (II)

(+)-ácido hexilitacónico- (2). $[[\alpha]_D +13.09$ (c 0.1, $CHCl_3$); RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-10), 1.29 (4H, m, H-8 y H-9), 1.34 (4H, m, H-6 y H-7), 1.74 (1H, dq, $J = 14.3, 7.9, 6.6$ Hz, H-5), 1.94 (1H, dq, $J = 14.8, 7.7, 7.1$ Hz, H-5), 3.41 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2), 5.83 (1H, s, H-11a), 6.54 (1H, s, H-11b), 10.98 (2H, br s, 2 X COOH); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz): δ 179.8 (C-1), 171.9 (C-4), 137.3 (C-3), 129.7 (C-11), 46.9 (C-2), 31.6 (C-8), 29.8 (C-5), 29.0 (C-7), 27.3 (C-6), 22.6 (C-9), 14.0 (C-10); HR-ESIMS m/z 237.1102 $[M + Na]^+$ (calculado para $C_{11}H_{18}O_4Na$, 237.1103).

Caracterización química del compuesto 3.

Su fórmula molecular fue determinada como $C_{12}H_{20}O_5$ por HR-ESIMS ($[M+Na]^+$, m/z . 267.1203). El espectro de RMN 1H y ^{13}C indicó la presencia de una estructura relacionada con la del compuesto (2). La diferencia más significativa es la presencia de las señales correspondientes a un grupo hidroxilo de un alcohol secundario deducido de las señales RMN de 1H y ^{13}C a 3.70 δ_H (1H, q, $J=5.8$ Hz) y 68.5 δ_C , respectivamente, y una señal adicional de un grupo metoxilo en el C-1 (3.66 δ_H y 52.4 δ_C). Estos datos permitieron identificar el compuesto **3** como el **1-metil éster del ácido 9-hidroxi-hexilitacónico** (Klembe C. et al **2004**, *J. Nat. Prod.*, 67, 1058-1063).



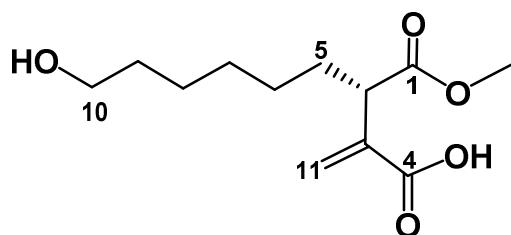
fórmula (III)

La duplicidad de las señales de algunos carbonos en su espectro de ^{13}C NMR indicó que se trata de mezcla de esteroisómeros en el C-2 del **1-metil éster del ácido 9-hidroxihexilitacónico**.

1-metil éster del ácido 9-hidroxi-hexilitacónico- (3). RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1.14 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-10), 1.36 (6H, m, H-6, H-7 y H-8), 1.69 (1H, m, H-5a), 1.87 (1H, m, H-5b), 3.48 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2), 3.66 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.70 (1H, q, $J = 5.8$ Hz, H-9), 5.73 (1H, s, H-11a), 6.32 (1H, s, H-11b); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 175.8 ($-\text{COOCH}_3$), 169.5 (C-1), 140.8 (C-3), 127.1 (C-11), 68.5 (C-9), 52.4 ($-\text{OCH}_3$), 48.10 (C-2), 48.05 (C-2), 39.9 (C-8), 32.09 (C-5), 32.07 (C-5), 28.62 (C-6), 28.60 (C-6), 26.6 (C-7), 23.5 (C-10); HR-ESIMS m/z 267.1203 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Na}$, 267.1208).

Caracterización química del compuesto 4

El ion molecular a m/z 267. 1201 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de acuerdo con una fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_5$ y las señales del espectro de RMN de ^1H indicaron que el compuesto **4** es un isómero del compuesto **3**. La comparación entre los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de ambos compuestos mostraba la desaparición señales del grupo metilo (1.14 δ_{H} y 23.5 δ_{C}) y la presencia de un nuevo triplete a 3.54 δ_{H} (2H, t, $J=6.6$ Hz) y 68.5 δ_{C} debido un grupo hidroximetileno terminal en la cadena alifática. Las correlaciones observadas en los espectros HMBC y COSY confirmaron la posición del nuevo grupo hidroxilo en C-10. Estos datos coinciden con los publicados para el **ácido asperitacónico A** y permiten identificar el compuesto **4** como el **1-metil éster del ácido 10-hidroxi-hexilitacónico** (Ding L. et al. 2018, *J Antibiot*, 71, 902-904).



fórmula (IV)

1-metil éster del ácido 10-hidroxi-hexilitacónico- (4). $[\alpha]_D^{25} +2.3$ (c 0.30, CHCl₃); RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 1.33 (6H, m, H-6,H-7 y H-8), 1.52 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, H-9), 1.69 (1H, m, H-5a), 1.87 (1H, m, H-5b), 3.48 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 3.54 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-10), 3.65 (5H, s, -OCH₃), 5.75 (1H, s, H-11a), 6.33 (1H, s, H-11b); RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ 175.7 (C-1), 169.3 (C-4), 140.6 (C-3), 127.2 (C-11), 62.9 (C-10), 52.4 (-OCH₃), 48.0 (C-2), 33.5 (C-9), 32.1 (C-5), 30.2 (C-7), 28.5 (C-6), 26.7 (C-8); HR-ESIMS m/z 267.1201 [M + Na]⁺ (calculado para C₁₂H₂₀O₅Na, 267.1208).

Tabla 1. Actividad nematocida de los compuestos **1-4**, expresada como media y error estándar (de cuatro repeticiones) de los porcentajes corregidos de mortalidad de J2 de *M. javanica*.

COMPUESTO	Concentración	Actividad nematocida
Ácido aspérico (1)	1 mg/ml	88,76 ± 2,40
(+) Ácido-hexil-itacónico (2)	0,5mg/ml	84,98±2,3
1-metil éster del ácido 9-hidroxi-hexilitacónico- (3)	0,5mg/ml	91,55 ± 3,58
	0,25mg/ml	15,73 ± 3,25
Ácido asperitaconico A (4)	0,5mg/ml	100 ± 0
	0,25mg/ml	36,56 ± 3,45

Ejemplo 4. Actividad nematocida *in vivo*

Nematodos:

La población de *Meloidogyne javanica* se mantuvo en invernadero en plantas de tomate muy susceptible (variedad Marmande), con inoculaciones periódicas. A los 60 días después de una de las inoculaciones se procesaron las raíces infectadas de las plantas de tomate y se aislaron manualmente las masas de huevos de las agallas bajo el microscopio estereoscópico. El inóculo de los juveniles infectivos (J2) se obtuvo durante tres días a partir de la incubación de las masas de huevos en agua a 25°C.

Tratamiento:

Extracto crudo de BP3 (4-5D). Se preparó una solución tratamiento a 0,5 mg/mL (en agua y etanol 1%). Los controles consistieron en agua destilada y etanol 1%.

Procedimiento:

Se aplicó el tratamiento al sustrato (75 ml por 600 gr de suelo arcillo arenoso) que después de ser homogeneizado se transfirió a macetas (5) de 800 mL y se humedeció con agua a saturación. El control consistió en 5 macetas con suelo no tratado. A continuación, cada maceta se inoculó con 1000 huevos y juveniles de *M. javanica* y se dejaron en incubación durante 5 días en una cámara de crecimiento vegetal (25 ± 2 °C, 60%RH). Después del periodo de incubación se procedió al trasplante de una plántula de tomate (var. Marmande) de 21 días de edad en cada maceta y se mantuvieron en las mismas condiciones controladas durante 45 días con aplicación de una solución fertilizante cada 10 días.

A los 45 días después de la inoculación se levantaron las plantas. Los sistemas radicales se lavaron y pesaron y se procesaron las raíces enteras para determinar los siguientes parámetros:

Índice de nodulación (IN): las raíces fueron analizadas visualmente para determinar el índice de nodulación sobre una escala de 0 a 5, donde 0 = sin agallas (sanas, sistema de raíces sin infestación), 1 = 25% del sistema radicular con agallas 2 = 26-50% del sistema radicular con agallas, 3 = 51 -75% del sistema radicular con agallas 4 = 76- 90% del sistema de raíces con agallas, 5= >91% del sistema radical con agallas (Hussey y Janssen,2002).

En la Tabla 2 se muestran los resultados del ensayo *In planta*. Los sistemas radicales de las plantas tratadas presentaron índices muy bajos de nodulación, al contrario que los de las plantas del control infestado.

Tabla 2 Incidencia de la infección de J2 de *M. javanica* en las raíces de las plantas de tomate tratadas y control.

	Índice de nodulación	Peso de las raíces (gr)
Tratamiento	2	7,12
	2	6,86
	1	6,89
	1	7,57
	1	7,51
Control	4	6,83
	4	6,48

	4	7,58
	3	7,63
	3	7,2

Así mismo el tratamiento aplicado no tuvo efectos de fitotoxicidad y no se apreciaron diferencias significativas respecto al peso o aspecto de los sistemas radicales tratados respecto al control.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de la especie *Aspergillus tubingensis* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 21186.

5

2. Caldo de fermentación extraído de la cepa definida en la reivindicación 1.

3. Procedimiento de obtención de un caldo de fermentación que comprende:

10 a) cultivar la cepa de *Aspergillus tubingensis* definida en la reivindicación 1, hasta que se desarrolle el micelio;

b) fermentar el micelio obtenido en a) en medio líquido;

c) separar el micelio para obtener el caldo de fermentación.

4. Extracto crudo extraído de la cepa definida en la reivindicación 1.

15

5. Procedimiento de obtención del extracto crudo que comprende las etapas de:

a) cultivar la cepa de *Aspergillus tubingensis* definida en la reivindicación 1, hasta que se desarrolle el micelio;

b) fermentar el micelio obtenido en a) en medio líquido;

20 c) separar el micelio para obtener el caldo de fermentación;

d) realizar una extracción a partir del caldo de fermentación obtenido en c) para obtener el extracto crudo.

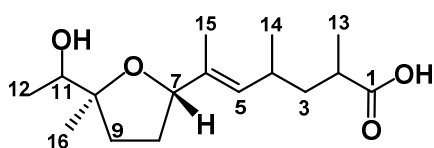
6. Agente nematocida que comprende el caldo de fermentación y/o un extracto crudo de la cepa definida en la reivindicación 1.

25

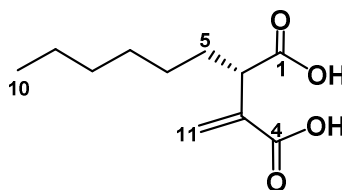
7. Método para controlar nematodos que comprende el paso de poner en contacto una planta, semilla, plantón, o sustrato con la cepa y/o el caldo de fermentación y/o un extracto crudo de la cepa definida en la reivindicación 1.

30

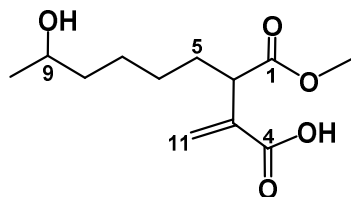
8. Uso de la cepa definida en la reivindicación 1 para la obtención del compuesto de fórmula (I), y/o el compuesto de fórmula (II), y/o el compuesto de fórmula (III) y/o el compuesto de fórmula (IV);



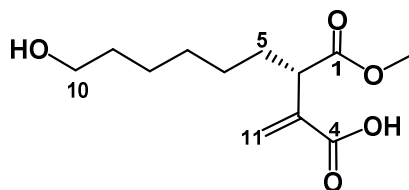
Fórmula (I)



Fórmula (II)



Fórmula (III)



Fórmula (IV)

5

y las sales y/o solvatos del mismo.

10 9. Procedimiento de obtención del compuesto de fórmula (I) y/o el compuesto de fórmula (II) y/o el compuesto de fórmula (III) y/o el compuesto de fórmula (IV), que comprende los pasos de:

a) cultivar la cepa de *Aspergillus tubingensis* definida en la reivindicación 1, hasta que se desarrolle el micelio;

15 b) fermentar el micelio obtenido en a) en medio líquido;

c) separar el micelio para obtener el caldo de fermentación;

d) realizar una extracción, a partir del caldo de fermentación obtenido en c) para obtener el extracto crudo;

e) aislar el compuesto de fórmula (I) y/o el compuesto de fórmula (II) y/o el compuesto de fórmula (III) y/o el compuesto de fórmula (IV).

20

10. Uso de los compuestos de fórmula (I) y/o fórmula (II) y/o fórmula (III) y/o fórmula (IV) como nematocida.

25 11. Composiciones nematocidas que comprenden como ingrediente activo al menos uno de los compuestos seleccionados entre: compuesto de fórmula (I), compuesto de fórmula (II), compuesto de fórmula (III) y compuesto de fórmula (IV) o una sal o un solvato de estos, aceptables en agricultura.

12. Método para controlar nematodos que comprende el paso de poner en contacto una planta, semilla, plantón, o sustrato con el compuesto de fórmula (I) y/o el compuesto de fórmula (II) y/o el compuesto de fórmula (III) y/o el compuesto de fórmula (IV).