(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 365 231**

(21) Número de solicitud: 201030356

(51) Int. CI.:

A01N 65/36	(2009.01)	***A61P 33/00***	(2006.01)
A01N 65/20	(2009.01)	***A61P 33/10***	(2006.01)
A61K 36/75	(2006.01)		
A61K 36/487	(2006.01)		
A01P 1/00	(2006.01)		
A01P 5/00	(2006.01)		
A01P 7/04	(2006.01)		

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **11.03.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2011**

Fecha de la concesión: **26.07.2012**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **07.08.2012**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **07.08.2012**

(73) Titular/es:

CENTRO ATLANTICO DEL MEDICAMENTO, S.A.
INSTITUTO TECNOLOGICO DE CANARIAS
Plaza de Sixto Machado, 3
38009 Sta. Cruz de Tenerife, Tenerife, ES;
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA y
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE G. CANARIA

(72) Inventor/es:

Ruiz Reyes, Antonio;
Molina Caballero, Jose Manuel;
Muñoz Ojeda, M. del Carmen;
Gutierrez Ravelo, Angel D.;
Zarate Méndez, Rafael;
Macnaugghton-Smith, Grant A.;
Hildebrandt , Ina y
López González , Adassa

(74) Agente/Representante:

Illescas Taboada, Manuel

(54) Título: **Extractos de plantas como antiparasitarios, antisépticos y fitosanitarios**

(57) Resumen:

Extractos de plantas como antiparasitarios, antisépticos y fitosanitarios. En la presente invención se describe el uso de extractos bioactivos, extraídos de plantas, preferentemente de las especies Ruta pinnata y Psoralea bituminosa, y que presentan actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria, frente a parásitos animales y humanos, y contra plagas agrícolas o domésticas. Además la presente invención describe el procedimiento de obtención de dichos extractos bioactivos con actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria, así como una composición en forma de piensos animales y/o una formulación galénica o farmacéutica que comprenda dichos extractos bioactivos y que presente también actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria. La invención también describe un método de tratamiento y prevención de infecciones parasíticas en animales incluyendo el hombre, que consiste en la administración de una dosis farmacéuticamente efectiva de los extractos vegetales activos descritos en la invención junto con excipientes a dosis farmacéuticamente aceptables.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

ES 2 365 231 B1

DESCRIPCIÓN

Extractos de plantas como antiparasitarios, antisépticos y fitosanitarios.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la obtención de extractos bioactivos de plantas para su utilización como agentes antiparasitarios, antisépticos y fitosanitarios. Por este motivo, la presente invención se podría englobaren los campos de la química orgánica de productos naturales, así como en la industria farmacéutica y agroquímica, para el uso de los extractos bioactivos de dichas plantas, tanto en medicina veterinaria como humana, así como en agricultura como fitosanitario.

Antecedentes

Entre las múltiples afecciones parasitarias que pueden afectar a los animales domésticos de abasto, las patologías originadas por los helmintos y coccidios (principalmente en las cabañas bovina, caprina y ovina, así como en aves en explotación) se extienden por todo el mundo y conforman una de las parasitosis más generalizadas y que inciden con más severidad en las explotaciones ganaderas, registrándose altas tasas de mortalidad y ocasionando cuantiosas pérdidas económicas (Waller, 1997).

La resistencia al arsenal terapéutico comercializado, para el control de las infecciones por los parásitos mencionados está abundantemente documentada como fenómeno creciente y global, resultado de la continua exposición y selección al tratamiento terapéutico (Taylor, 2002, Meinke, 2001, Norton y Joyner, 1975; Peek y Landman, 2005). Este fenómeno, junto con la intensificación de los sistemas de producción animal, ha llevado a una demanda creciente de antiparasitarios efectivos y de bajo costo para el control de las afecciones parasitarias como por ejemplo, helmintiasis y coccidiosis. Ante esta situación, los conceptos de agroecología y holística de la agricultura, que abogan por el uso de estrategias de gestión integrada, incluyendo el empleo de plantas medicinales, están experimentando un resurgimiento porque se trata de recursos más sostenibles. En esta línea destacan los intentos de búsqueda de nuevos fitofármacos para el tratamiento y control de *Haemonchus contortus*, considerado uno de los nemátodos productores de gastroenteritis parasitaria de mayor importancia en pequeños rumiantes (Assis *et al*., 2003; Ayers *et al*., 2007; Eguale *et al*., 2007; Oliveira *et al*., 2009) y del protozoo *Eimeria*, enfocado principalmente a las especies que infectan a la cabaña aviar (Arab *et al*., 2006). Otra ventaja del empleo de fitofármacos para el tratamiento de enfermedades antiparasitarias en el ganado de abasto, viene condicionada por la demanda, por parte de los consumidores de países industrializados y productores en general, de la utilización de métodos de producción ecológica, particularmente en los aspectos de producción animal, donde se busca mayor calidad y seguridad alimenticia. Se destaca así un interés muy marcado por encontrar alternativas a la medicina veterinaria alopática y en ese contexto, los fitofármacos se visualizan positivamente por parte de los productores, como un medio importante para aumentar la calidad de productos alimenticios como la carne y sus derivados, y por los consumidores por posibles beneficios que brinden la inclusión de moléculas funcionales en esos fitoterápicos que aumentan el valor nutricional final de los alimentos así producidos.

En este sentido, en la presente invención se describe el uso de extractos bioactivos con capacidad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria, extraídos de plantas de las especies *Ruta pinnata* y *Psoralea bituminosa*, para el tratamiento y control de las enfermedades parasitarias producidas por helmintos y protozoos *Apicomplexa* que son causantes de importantes pérdidas económicas en todos los sistemas de producción animal del mundo.

Los coccidios pertenecientes al género *Eimeria*, están muy próximos filogenéticamente a parásitos humanos pertenecientes al mismo *Phylum Apicomplexa*, como por ejemplo *Toxoplasma*, *Sarcocystis* o *Plasmodium*. Además, nemátodos gastrointestinales como *Haemonchus* pueden también encontrarse en humanos, como es el caso de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichura* o *Ancylostoma duodenalis*. Por este motivo, los extractos bioactivos descritos en la presente invención, pueden ser utilizados tanto en terapia como en profilaxis frente a parásitos de humanos, cuyo tratamiento convencional mediante productos farmacéuticos se está viendo cada vez más limitado a consecuencia de la creciente aparición de resistencia antiparasitaria, tal y como se indicó con los parásitos animales. Por lo tanto, los extractos bioactivos descritos en la presente invención son una alternativa e incluso, en muchos casos, pueden ser sustitutorios de los tratamientos con antiparasitarios de uso rutinario en medicina veterinaria y humana (por ejemplo: Levamisol, bencimidazoles, lactonas macrocíclicas, sulfamidas, sulfadoxina/pirimetamina, cloroquina, etc.) debido a su ineficacia, consecuencia del desarrollo de fenómenos de resistencia por parte de los parásitos, frente a dichos fármacos. Por lo tanto, los extractos bioactivos de las plantas *R. pinnata* y *P. bituminosa* constituyen una nueva herramienta terapéutica y profiláctica para el tratamiento y control de las enfermedades parasitarias producidas por helmintos y protozoos *Apicomplexa*, que son causantes de importantes pérdidas económicas en todos los sistemas de producción animal del mundo y graves trastornos patológicos, incluyendo la muerte, en la especie humana.

Por otro lado, la búsqueda de fitosanitarios para el tratamiento contra insectos y plagas en agricultura es muy urgente puesto que la legislación vigente obligará en un período de tiempo reducido, a la retirada de muchos de los productos sintéticos actualmente comercializados. De las plagas consideradas como muy devastadoras, se describe la plaga del insecto trips (*Frankliniella occidentalis*), también llamado trips de flores occidentales. Dicha plaga constituye una seria amenaza que afecta a un gran número de cultivos en todo el planeta, incluyendo cultivos de frutales y de plantas ornamentales. También afecta, de manera muy grave, a los cultivos de invernaderos, con serias consecuencias para la producción de los mismos (Mantel y van de Vrie, 1988; Hunter y Ullman, 1989). Por este motivo, la búsqueda

de nuevas estrategias y productos para su control es cada vez más urgente. En este sentido, la presente invención pone de manifiesto la capacidad fitosanitaria de los extractos bioactivos descritos en la invención, frente al insecto/plaga *Frankliniella occidentalis* y especies afines.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

En la presente invención se describe el uso de extractos bioactivos de plantas de las especies *R. pinnata* y *P. bituminosa* como antiparasitarios, anticoccidiósicos y antisépticos, frente a parásitos de animales, tanto de abasto como de compañía, y de seres humanos, además de su capacidad como fitosanitarios. En la presente invención se pone de manifiesto que los extractos bioactivos de *R. pinnata* mostraron una considerable actividad antihelmíntica, mayor que la de su homólogo *R. graveolens*, especialmente en lo referente al efecto larvicida, así como una importante capacidad para inhibir la esporulación de ooquistes, de lo que se deduce su actividad anticoccidiósica y antiséptica. La actividad antihelmíntica, anticoccidiósica y antiséptica de los extractos de *P. bituminosa* también fue considerable, aunque menor que la de *R. pinnata*, pero cabe destacar dicha actividad antihelmíntica, anticoccidiósica y antiséptica dado el uso de dicha planta como planta forrajera para el ganado.

La capacidad antihelmíntica, anticoccidiósica y antiséptica de los extractos bioactivos extraídos de las plantas mencionadas, se han evaluado y contrastado frente a los parásitos *Haemonchus contortus* (nemátodo) y *Eimeria bovis* (coccidio) utilizando múltiples y repetidos ensayos específicos que han sido:

Ensayos frente a nemátodos:

- *Ensayo de eclosión de huevos (EEH):* valora el porcentaje de larvas que eclosionan.

- *Ensayo de desarrollo larvario (EDL):* valora la inhibición del desarrollo larvario desde L1 (larvas de primer estadio) hasta L3 (larvas de tercer estadio).

- *Ensayo de parálisis larvaria (EPL):* valora la inhibición del movimiento y viabilidad de L3 (larvas de tercer estadio).

- *Ensayo de viabilidad de adultos (EVA):* valora la inhibición del movimiento y viabilidad de adultos del parásito.

Ensayos frente a coccidios:

- *Ensayo de esporulación de ooquistes (EEO):* evalúa la inhibición del proceso de reproducción asexual conocido como “esporulación”, necesario para que el ooquiste sea infectante por ingestión para otros hospedadores.

- *Ensayo de viabilidad de esporozoítos (EVE):* evalúa la capacidad para reducir la viabilidad del esporozoíto, que es considerado como el primer elemento parasitario que invade las células del hospedador en el ciclo endógeno del parásito.

La presente invención también describe el procedimiento de obtención de los extractos bioactivos descritos en la presente invención.

Otro objeto de la presente invención se refiere a una composición (piensos) y/o formulación veterinaria o farmacéutica que contiene los extractos vegetales bioactivos descritos en la invención y que se utiliza como antiparasitario y antiséptico.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método de tratamiento y profilaxis de infecciones parasíticas en animales, incluyendo el hombre, que consiste en la administración de una dosis farmacéuticamente efectiva de los extractos vegetales activos descritos en la invención junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

A efectos de la presente invención se define el término alimento funcional, incluyendo en este término los piensos animales, como aquél que aporta, además de su función nutricional intrínseca, una función adicional de profilaxis previniendo la aparición de infecciones o enfermedades, preferentemente atribuibles a parásitos.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de los extractos bioactivos descritos en la invención como fitosanitarios para el tratamiento contra diferentes especies de insectos que atacan a especies vegetales y de interés agrícola. A los efectos de la presente invención, el término fitosanitario debe entenderse como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir la acción de, o destruir directamente, insectos, ácaros, moluscos, roedores, hongos, malas hierbas, bacterias y otras formas de vida animal o vegetal perjudiciales para la salud pública y también para la agricultura (es decir, considerados como plagas y por tanto susceptibles de ser combatidos con plaguicidas); durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de productos agrícolas y sus derivados. Entre los productos fitosanitarios se incluyen también las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o fitorreguladores.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método de tratamiento y profilaxis de plagas agrícolas e insectos domésticos, que consiste en la administración de una dosis efectiva de los extractos vegetales activos descritos en la invención junto con excipientes aceptables.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Ensayo de eclosión de huevos (EEH) con los extractos bioactivos metanólicos extraídos de plantas *R. pinnata* (C) y *P. bituminosa* (D). Se evaluaron extractos bioactivos metanólicos extraídos de plantas de *R. pinnata* (C) y *P. bituminosa* (D), tras 24 de incubación de huevos de *H. contortus* con las diferentes concentraciones de extracto bioactivo metanólico de dichas plantas. En el eje X se representa la concentración de extracto expresada como mg/ml y en el eje Y se representa efecto ovicida expresado como porcentaje. Como control positivo se utilizó el antihelmíntico con efecto ovicida oxibendazol (B) y como control negativo dimetilsulfóxido (DMSO) al porcentaje empleado para realizar las correspondientes diluciones de los extractos (A) (% v/v). En el eje X de la gráfica A se representa la concentración de DMSO expresada como porcentaje y en el eje Y el efecto ovicida expresado como porcentaje. En el eje X de la gráfica B se representa la concentración del ovicida oxibendazol expresada como ng/ml y en el eje Y el efecto ovicida expresado como porcentaje. Se determinó el porcentaje de huevos no larvados (barras blancas), huevos larvados (barras negras), larvas L1 móviles (barras rayadas) y larvas L1 inmóviles (barras cuadriculadas). Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días.

Figura 2.- Ensayo de parálisis larvaria (EPL) con extractos metanólicos de plantas de *R. pinnata* (A) (barras blancas), *R. graveolens* (B) (barras negras) y *P. bituminosa* (C) (barras rayadas), 24 horas después de la incubación de larvas de tercer estado (L3) de *H. contortus* con las diferentes concentraciones de los extractos bioactivos metanólicos de dichas plantas se determinó el porcentaje de larvas L3 inmóviles. La figura D muestra el porcentaje de inhibición larvaria obtenido después del tratamiento de las larvas L3 con el control positivo Levamisol, antihelmíntico con efecto larvicida (barra cuadriculada) y con el control negativo DMSO (barra punteada), al porcentaje empleado para realizar las correspondientes diluciones de los extractos (% v/v). *R. graveolens* se emplea como control de extracto de plantas conocido en el estado de la técnica por sus efectos antiparasitarios. Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días. En el eje X de cada una de las gráficas se representa la concentración del extracto bioactivo, o de los controles positivos, o de los controles negativo, respectivamente y en el eje Y de cada una de las gráficas se representa la inhibición de la movilidad larvaria expresada como porcentaje.

Figura 3.- Ensayo de viabilidad de adultos (EVA) con extractos bioactivos metanólicos de *R. pinnata* (A), (barras blancas), *R. graveolens* (B) (barras negras) y *P. bituminosa* (C) (barras rayadas), tras 24 horas de incubación de gusanos adultos de *H. contortus* con diferentes concentraciones de extracto bioactivo metanólico de dichas plantas. La figura D muestra el porcentaje de inhibición de la movilidad de gusanos adultos tratados con el control positivo Levamisol, antihelmíntico con efecto adulticida (barra cuadriculada) y con el control negativo DMSO (barra punteada) al porcentaje empleado para realizar las correspondientes diluciones de los extractos (% v/v). *R. graveolens* se emplea como control de extracto de plantas conocido en el estado de la técnica por sus efectos antiparasitarios. Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días. En el eje X se representa la concentración del extracto bioactivo o de los controles positivo o negativo, respectivamente y en el eje Y el porcentaje de inhibición de la movilidad en adultos.

Figura 4.- Ensayo de esporulación de ooquistes (EEO) no esporulados de *E. ninakohlyakimovae* con diferentes concentraciones de extractos bioactivos metanólicos de *R. pinnata* (A), (barras blancas), *R. graveolens* (B) (barras negras) y *P. bituminosa* (C) (barras rayadas), tras 24 horas de incubación de los ooquistes con los extractos bioactivos metanólicos. La figura D muestra el porcentaje de esporulación de ooquistes después del tratamiento con el control Aquagen, antiséptico comercial (barra cuadriculada) y con el control negativo DMSO (barra punteada) al porcentaje empleado para realizar las correspondientes diluciones de los extractos (% v/v). *R. graveolens* se emplea como control de extracto de plantas conocido en el estado de la técnica por sus efectos antiparasitarios. Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días. En el eje X se representa la concentración del extracto bioactivo y de los controles positivo o negativo, respectivamente y en el eje Y el porcentaje de esporulación de los ooquistes.

Figura 5.- Efecto antihelmíntico del fruto de *R. pinnata*. Mediante ensayos de parálisis larvaria (EPL) se comparó la actividad antihelmíntica de extractos bioactivos metanólicos extraídos del fruto maduro y de la planta entera fructificada de *R. pinnata* (A) y la actividad de las fracciones hexánicas de frutos maduros y de frutos verdes (B) de dicha planta. La parálisis larvaria se evaluó tras 24 h de incubación con los diferentes extractos. Como control negativo se utilizó DMSO a las concentraciones utilizadas para diluir los correspondientes extractos (% v/v). Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días. Las barras blancas representan el extracto bioactivo extraído de frutos maduros. Las barras negras representan el extracto bioactivo extraído de frutos verdes. Las barras rayadas representan el extracto bioactivo extraído de partes de la planta entera fructificada. Las barras cuadriculadas representan el control negativo (DMSO). En el eje X se representa la concentración de los extractos bioactivos expresada como mg/ml y en el eje Y se representa la inhibición de la movilidad larvaria expresada como porcentaje.

Figura 6.- Efecto antihelmíntico de extractos bioactivos acuosos extraídos de frutos maduros de *R. pinnata*. Mediante ensayos de parálisis larvaria (EPL) se comparó la actividad antihelmíntica de extractos bioactivos acuosos de

frutos maduros de *R. pinnata* con el respectivo extracto bioactivo metanólico extraído de frutos maduros de la planta. Como control negativo se utilizó DMSO a las concentraciones utilizadas para diluir los correspondientes extractos (% v/v). La parálisis larvaria se evaluó tras 24 h de incubación con los diferentes extractos. Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días. Las barras blancas representan el extracto bioactivo metanólico. Las barras negras representan el extracto bioactivo acuoso. Las barras rayadas representan el control negativo (DMSO). En el eje X se representa la concentración de los extractos bioactivos extraídos de frutos maduros de *R. pinnata* expresada como mg/ml y en el eje Y se representa la inhibición de la movilidad larvaria expresada como porcentaje.

Figura 7.- Efecto antihelmíntico de extractos metanólicos obtenidos de cultivos *in vitro* de *R. pinnata*. El efecto antihelmíntico se determinó mediante ensayos de parálisis larvaria (EPL) evaluando la movilidad tras 24 h de incubación utilizando extractos metanólicos de cultivos *in vitro* de la planta (barras blancas). Como control negativo se utilizó DMSO (barras negras) a las concentraciones utilizadas para diluir el extracto (% v/v). Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días. En el eje X se representan las concentraciones ensayadas de extracto de *R. pinnata* expresado en mg/ml y en el eje Y se representa la inhibición de la movilidad larvaria expresada como porcentaje.

Figura 8.- Reversibilidad del efecto antihelmíntico de *R. pinnata* (A) y *P. bituminosa* (B). Para evaluar la reversibilidad del efecto antihelmíntico, tras una incubación durante 24 h con los respectivos extractos metanólicos de las plantas, se realizaron tres lavados y la recuperación de la movilidad larvaria se evaluó tras 24 h de incubación adicionales. Los resultados se compararon con la reversibilidad obtenida con el control positivo Levamisol (C). Como control negativo se utilizó DMSO a las concentraciones utilizadas para diluir los extractos y el control positivo (% v/v). Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días. Las barras blancas representan las muestras de las plantas tratadas con los extractos bioactivos, que no han sido sometidas a lavados. Las barras negras representan las muestras de las plantas tratadas con los extractos bioactivos, que han sido sometidas a lavados. En el eje X se representan las concentraciones ensayadas del extracto metanólico de fruto maduro de *R. pinnata* en mg/ml (A), del extracto metanólico de *P. bituminosa* (B) en mg/ml y de la concentración de Levamisol en μg/ml y en el eje Y se representa la inhibición de la movilidad larvaria expresada como porcentaje.

Figura 9.- Efecto fitosanitario de extractos bioactivos de fruto maduro de *R. pinnata* frente a insectos de interés agrícola (*Frankliniella occidentalis*). La figura muestra el porcentaje de mortalidad de larvas de *Frankliniella occidentalis* (Eje Y) en presencia de diferentes concentraciones de extracto bioactivo de fruto maduro de *R. pinnata* (Eje X). Las concentraciones ensayadas de extracto bioactivo disueltos en agua son 33,375 mg/mL (100%), 16,687 mg/mL (50%) y 6,675 mg/mL (20%). Como control (C) se expusieron las larvas a medio nutritivo convencional para el cultivo de insectos, sin presencia de extracto bioactivo. Para cada dilución se emplearon 30 larvas de primer estadio de trips (*F. occidentalis*). Se realizaron 3 repeticiones de cada ensayo y de cada dilución. Después de tres días, al final del primer estadio de desarrollo de las larvas, se registró el número de larvas supervivientes en los distintas diluciones y se compararon con la respuesta control.

Descripción detallada de la invención

El primer objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de extractos vegetales bioactivos con actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria que comprende los pasos de:

a) Recoger muestras de biomasa de plantas seleccionadas de las especies *R. pinnata* y *P. bituminosa*.

b) Procesar las muestras de biomasa del paso anterior, preferentemente mediante secado o congelación.

c) Homogeneizar las muestras de biomasa una vez procesadas.

d) Extraer los extractos bioactivos de la biomasa homogeneizada.

En una realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque las muestras de biomasa son recogidas preferentemente de la parte aérea de las plantas en diferentes estados de fructificación y/o de los frutos de dichas plantas en diferentes estados de fructificación.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque el procesado de la biomasa de las partes aéreas de las plantas se realiza preferentemente mediante secado a temperatura ambiente durante preferentemente 20-25 días, y el procesado de la biomasa de los frutos se realiza preferentemente mediante congelación, preferentemente en nitrógeno líquido.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la homogeneización se realiza preferentemente mediante trituración.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la biomasa puede obtenerse también de cultivos *in vitro* de las especies *R. pinnata* y *P. bituminosa*, haciendo uso de la tecnología conocida para el cultivo *in vitro* de material vegetal (células en suspensión, agregados celulares, tejidos, raíces, brotes, etc.) empleando

medios nutritivos tales como Murashige-Skoog (1962) o B5 (Gamborg *et al*.1968), así como la adición de reguladores de crecimiento tales como auxinas y citoquininas, cultivados en distintas condiciones de luz, temperatura y agitación.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la extracción de los extractos bioactivos se realiza mediante cualquiera de las técnicas seleccionadas preferentemente entre: extracción mediante superfluidos, extracción con CO_2, extracción asistida por microondas, y más preferentemente mediante la extracción con disolventes.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque los disolventes empleados en la extracción se seleccionan entre una combinación de cualquiera de los disolventes orgánicos, preferentemente: hexano, etanol, diclorometano y más preferentemente metanol; y disolventes acuosos, preferentemente agua.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la extracción de los extractos bioactivos con disolventes se utiliza preferentemente un extractor Soxhltex.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque opcionalmente, los extractos bioactivos obtenidos tras la etapa d) se purifican mediante un método de fraccionamiento que comprenda los siguientes pasos:

a) Separar la fracción aceitosa del extracto bioactivo mediante preferentemente decantación y presión reducida, preferentemente de 15 mm Hg, hasta obtener un pellet o precipitado.

b) Disolver el pellet o precipitado obtenido en un disolvente, preferentemente agua.

c) Extraer de la disolución del paso anterior mediante extracción líquido-líquido, una fracción acuosa que contiene los extractos bioactivos purificados.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la extracción líquido-líquido se realiza preferentemente empleando consecutivamente los disolventes hexano, cloroformo y acetato de etilo.

Otro objeto de la presente invención, son los extractos bioactivos de *R. pinnata* y *P. bituminosa* con actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria, obtenibles mediante el procedimiento descrito previamente.

En una realización preferida, los extractos bioactivos de la invención se caracterizan porque la actividad antiparasitaria que presentan la ejercen frente a parásitos de animales y de seres humanos, preferentemente nemátodos, más preferentemente helmintos, coccidios y parásitos filogenéticamente próximos del *phylum Apicomplexa*.

En otra realización preferida, los extractos bioactivos de la invención se caracterizan por su efecto antihelmíntico, preferentemente frente al género *Haemonchus* parásito de rumiantes, pero también frente a cualquiera de los géneros de nemátodos humanos siguientes: *Ascaris, Trichuris, Strongyloides, Enterobius*, entre otros.

En otra realización preferida, los extractos bioactivos de la invención se caracterizan por su efecto frente a los protozoos del *phylum Apicomplexa* de cualquiera de los siguientes géneros: *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Plasmodium*, *Isospora*, *Cryptosporidium* y más preferentemente el género *Eimeria*, así como géneros próximos filogenéticamente a los coccidios, como aquellos que se encuentran en el *phylum Apicomplexa*, y más preferentemente, el género *Plasmodium*.

En otra realización preferida, los extractos bioactivos de la invención se caracterizan porque la actividad antiparasitaria que ejercen, frente a nemátodos, se ejerce preferentemente mediante la inhibición de la eclosión de los huevos, inducción de la parálisis larvaria e inhibición de la viabilidad de los individuos adultos.

En otra realización preferida, los extractos bioactivos de la invención se caracterizan porque la actividad antiparasitaria que ejercen, frente a coccidios, se ejerce preferentemente mediante la inhibición de la esporulación de los ooquistes y la inhibición de la viabilidad de los esporozoítos.

En otra realización preferida, los extractos bioactivos de la invención se caracterizan porque la actividad antiséptica que ejercen, frente a coccidios y géneros filogenéticamente relacionados como *Plasmodium*, se ejerce, preferentemente de los seleccionados entre cualquiera de los siguientes géneros: *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Plasmodium*, *Isospora*, *Cryptosporidium* y más preferentemente el género *Eimeria*.

En otra realización preferida, los extractos bioactivos de la invención se caracterizan porque la actividad antiséptica que ejercen frente a coccidios, se ejerce preferentemente mediante la inhibición de la esporulación de los ooquistes.

En otra realización preferida, los extractos bioactivos de la invención se caracterizan porque la actividad fitosanitaria se ejerce preferentemente frente a insectos, y más preferentemente de la especie *Frankliniella occidentalis* y especies afines seleccionadas preferentemente entre el orden Thysanoptera y entre las familias Adiheterothripidae, Aelothripidae, Phaleothripidae, Thripidae, más preferentemente entre especies tales como *F. tritici, F. bispinosa,*

F. fusca, F. schultzei, Scirtothrips dorsalis, Heliothrips haemorrhoidalis, Thrips simplex, T. tabaci, T. palmi, T. hawaiiensis, Echinothrips americans, Gynaikothrips ficorum, G. uzeli, Chaetanaphothrips orchidii.

En otra realización preferida, los extractos bioactivos de la invención se caracterizan porque la actividad fitosanitaria frente a insectos se ejerce preferentemente mediante la inhibición de su crecimiento y viabilidad.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de los extractos bioactivos descritos anteriormente, como medicamentos.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de los extractos bioactivos descritos anteriormente, como antiparasitarios y antisépticos, particularmente frente a nemátodos y coccidios, así como su capacidad fitosanitaria frente a *Frankliniella occidentalis* y especies afines seleccionadas preferentemente entre el orden Thysanoptera y entre las familias Adiheterothripidae, Aelothripidae, Phaleothripidae, Thripidae, más preferentemente entre especies tales como *F. tritici, F. bispinosa, F. fusca, F. schultzei, Scirtothrips dorsalis, Heliothrips haemorrhoidalis, Thrips simplex, T. tabaci, T. palmi, T. hawaiiensis, Echinothrips americans, Gynaikothrips ficorum, G. uzeli, Chaetanaphothrips orchidii*.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de los extractos bioactivos descritos anteriormente, para la fabricación de formulaciones farmacéuticas o veterinarias útiles en el tratamiento de enfermedades parasitarias debidas preferentemente a nemátodos, coccidios y especies filogenéticamente relacionadas, pertenecientes particularmente al *phylum Apicomplexa*.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de los extractos bioactivos descritos anteriormente, para la fabricación de alimentos funcionales para animales o seres humanos, útiles para prevenir la aparición de enfermedades parasitarias, preferentemente debidas a nemátodos y coccidios.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de los extractos bioactivos descritos anteriormente como fitosanitarios.

Otro objeto de la presente invención se refiere a una formulación galénica, farmacéutica, veterinaria o fitosanitaria caracterizada por comprender los extractos bioactivos descritos previamente, y que presenta actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria.

A los efectos de la presente invención, el término "composición fitosanitaria" debe entenderse como cualquier composición que pueda aplicarse por cualquier medio conocido (abono, riego, pulverización, etc) sobre vegetales, para controlar plagas, preferentemente de insectos, que puedan afectara su crecimiento, viabilidad o productividad.

En una realización preferida, la formulación galénica, farmacéutica, veterinaria o fitosanitaria de la invención, se caracteriza porque además comprende otros excipientes galénicamente, farmacéuticamente o veterinariamente aceptables.

En otra realización preferida, la formulación galénica, farmacéutica, veterinaria o fitosanitaria de la invención, se caracteriza porque puede presentarse en cualquiera de las formas conocidas en el estado de la técnica, preferentemente: polvo, granulado, líquida, en suspensión, en aerosol, pomada, ungüento, cápsula, comprimido o gragea.

Otro objeto de la presente invención se refiere a los alimentos funcionales que comprenden los extractos bioactivos descritos en la presente invención.

Otro objeto de la presente invención se refiere al método de tratamiento y/o prevención de enfermedades parasitarias en hombres y animales caracterizado porque comprende la administración a los mismos, de una dosis farmacéuticamente efectiva de los extractos bioactivos descritos en la presente invención o de la formulación farmacéutica descrita en la presente invención.

En una realización preferida, el método de tratamiento y/o prevención, de la presente invención, se caracteriza porque la administración se realiza, preferentemente, mediante vía tópica, oral o parenteral.

Otro objeto de la presente invención se refiere al método de tratamiento y/o profilaxis de plagas agrícolas e insectos domésticos caracterizado porque comprende la administración a los mismos de una dosis efectiva de los extractos bioactivos descritos anteriormente o de la formulación fitosanitaria descrita anteriormente.

En una realización preferida, el método de tratamiento y/o prevención se caracteriza porque la administración preferentemente se realiza mediante pulverización, o disuelta en el agua de riego o mezclada con el abono.

Los ejemplos que se detallan a continuación tienen como objetivo ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1

Tratamiento y extracción del material vegetal para la obtención de extractos bioactivos

Para la extracción de los extractos bioactivos presentes en las plantas de las especies *R. pinnata*, *R. graveolens* y *P. bituminosa*, se emplearon muestras de la parte aérea de las mismas, tomadas de plantas maduras en distintos estadios de fructificación, además de muestras de frutos con diferentes grados de maduración presentes en dichas plantas.

Para la extracción de los extractos bioactivos presentes en las muestras recogidas de la parte aérea de las plantas mencionadas arriba, las muestras se secaron en umbría a temperatura ambiente (aprox. 20-22ºC) durante 25-30 días, asegurando una óptima aireación mediante volteos y sacudidas regulares de la biomasa para evitar infecciones con hongos y/o bacterias y evitando posibles fermentaciones del material vegetal. Una vez seca, la biomasa se homogeneizó empleando una máquina trituradora para obtener una muestra uniforme que se empleó posteriormente para la extracción de los extractos bioactivos de las plantas arriba mencionadas. La extracción se practicó empleando diferentes disolventes orgánicos, como por ejemplo hexano, diclorometano, etanol, metanol etc; o agua. También se puede realizar dicha extracción mediante cualquier método descrito en el estado de la técnica, aplicable para el tratamiento de biomasa vegetal, como por ejemplo la extracción por superfluidos, la extracción con CO_2, la extracción asistida por microondas, etc.

Para la extracción con los disolventes orgánicos de forma individual, la biomasa vegetal (aprox. 0,750 Kg) se empaquetó en una bolsa de papel de filtro, se introdujo en la columna de un equipo Soxhlet con 5,5 L de cualquiera de los disolventes orgánicos mencionados anteriormente y se extrajo en caliente (50-60ºC) hasta agotamiento (24-48 h). Posteriormente, el extracto bioactivo obtenido se secó a vacío utilizando un rota-vapor sobre un baño de agua a una temperatura de 38-40ºC.

Para la extracción de los extractos bioactivos utilizando como disolvente el agua, la biomasa homogeneizada (0,5 Kg) se hirvió en agua destilada (5,5 L) durante 40 min y luego se filtró para eliminar los restos vegetales. El extracto bioactivo acuoso obtenido se guardó en nevera (4ºC) para preservarlo y evitar la aparición de contaminantes.

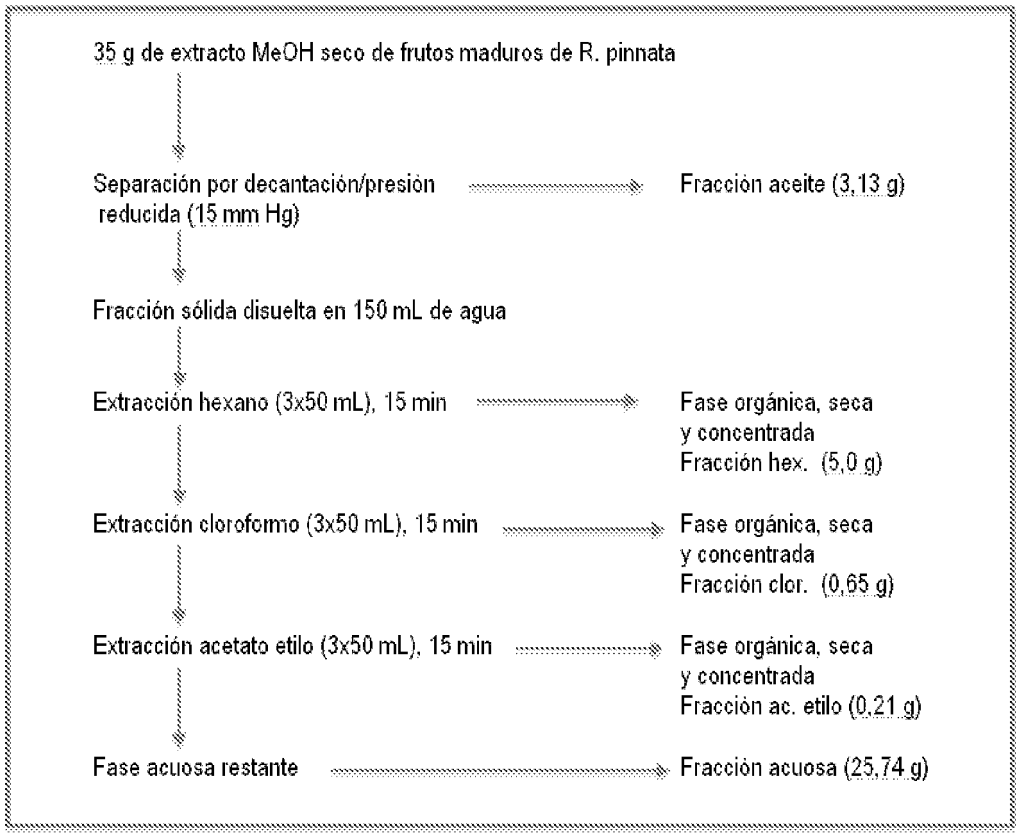
De la misma forma, se practicó también la extracción de los extractos bioactivos presentes en los frutos con distinto grado de maduración. Para ello, se tomaron aproximadamente 70 g de frutos maduros que se homogeneizaron tras congelarlos en nitrógeno líquido, con el fin de disgregarlos y así realizar una extracción más efectiva. El homogeneizado de los frutos se empaquetó en sobres de papel que se introdujeron en la columna de un equipo Soxhlet, como se mencionó anteriormente, empleando un volumen de disolvente orgánico de 1,5 L para extracción hasta agotamiento (24-48 h).

En el presente ejemplo se realizó la extracción de los principios activos presentes en los frutos de las plantas *R. pinnata*, *R. graveolens* y *P. bituminosa*, utilizando como disolvente el metanol. Los extractos bioactivos metanólicos de los principios activos obtenidos fueron además fraccionados (Esquema 1).

(Esquema pasa a página siguiente)

Esquema 1

Fraccionamiento realizado con el extracto bioactivo extraído de frutos de R. pinnata utilizando como disolvente metanol



La fracción aceitosa del extracto (sobrenadante) se separó por decantación y presión reducida, (15 mm Hg) primero mediante precipitación por gravedad y a continuación con la asistencia de una ligera centrifugación. (3000 rpm durante 6-8 min.) La parte semisólida (pellet) se disolvió en agua y posteriormente la disolución fue sometida a una extracción líquido-líquido empleando consecutivamente los disolventes: hexano, cloroformo y acetato de etilo, añadidos a igual volumen final que la fracción acuosa a extraer. De la extracción de los principios bioactivos metanólicos, con estos tres disolventes se obtuvo una fracción acuosa final. Los extractos obtenidos mediante este método, se utilizaron a diferentes concentraciones en los correspondientes ensayos *in vitro*, utilizando como disolventes todos aquellos sistemas compatibles tanto con los métodos de determinación de la actividad, como con su posible aplicación *in vivo*, como por ejemplo agua, DMSO, EtOH, etc. En la Tabla 1 se muestran los resultados de la eficacia de extracción de los extractos bioactivos metanólicos (al utilizarse como disolvente el metanol) en diferentes muestras y especies.

TABLA 1

Rendimiento de la extracción de los extractos bioactivos de diferentes partes de plantas utilizando como disolvente metanol

Especie Vegetal	Parte de la planta	Rendimiento (%)
Ruta pinnata	Frutos maduros	40,3
Ruta pinnata	Frutos inmaduros	14,0
Psoralea bituminosa	Parte aérea de la planta	18,1
Ruta graveolens	Parte aérea de la planta	20,4

Ejemplo 2

Obtención de los parásitos utilizados para los ensayos in vitro descritos en la presente invención

Las formas parasitarias utilizadas en los ejemplos de la presente invención para la realización de las pruebas *in vitro* en los ensayos bioguiados con nemátodos se obtuvieron mediante la inoculación en animales donantes ovinos mediante vía oral con larvas de estadio 3 (L3) de *Haemonchus contortus*, específicas para ganado ovino. La cepa se mantiene mediante pases sucesivos en animales donantes.

Las formas parasitarias utilizadas en la presente invención para los ensayos bioguiados con coccidios son de la especie *Eimeria ninakohlyakimovae*, mantenida igualmente en animales donantes caprinos mediante pases sucesivos.

2.1.- *Obtención de huevos, larvas y adultos de Haemonchus contortus*

Una vez inoculados los animales donantes y constatada la presencia de huevos de nemátodos en las heces, éstas se recogieron e incubaron a una temperatura de 22ºC durante dos semanas y posteriormente se aislaron las larvas de estadio L3 mediante el método de Baerman (MAFF, 1989). Para la obtención de huevos de *H. contortus*, se recogieron heces de los animales infectados en pequeños cubos y se disgregaron con una solución saturada de NaCl. La mezcla se filtró posteriormente por mallas de poro decreciente para eliminar el detritus y obtener una solución de huevos limpia. La determinación del número de huevos en solución se determinó mediante la técnica de McMaster (Sloss *et al*., 1994). Para la obtención de los vermes o gusanos adultos, los animales donantes se sacrificaron a las 2-3 semanas del comienzo de la eliminación de los huevos en las heces, obteniéndose los vermes o gusanos adultos del estómago glandular del animal donante sacrificado.

2.2.- *Obtención de ooquistes y esporozoítos de Eimeria ninakohlyakimovae*

La cepa de *E. ninakohlyakimovae* fue obtenida en 2006 a partir de un aislado de campo y ha sido mantenida mediante pases sucesivos en cabritos (baifos) hasta la actualidad. Para la producción de ooquistes, se inocularon cabritos de entre 4-5 semanas de edad con 200.000 ooquistes esporulados vía oral. Los ooquistes excretados se aislaron de las heces a partir del día 14 post-infección mediante flotaciones con solución de azúcar previa filtración a través de mallas de diferente calibre según el método de Jackson (1964). Los ooquistes no esporulados se mantuvieron a 4ºC durante no más de 3 días hasta la realización de los ensayos de inhibición de la esporulación. Otra parte de los ooquistes se incubó en dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) a temperatura ambiente y aireación periódica durante una semana para favorecer la esporulación. Los ooquistes esporulados se mantuvieron a 4ºC y se utilizaron en un periodo máximo de 5-6 meses para el mantenimiento de la cepa.

Ejemplo 3

Ensayo in vitro del efecto ovicida de extractos bioactivos de plantas R. pinnata y P. bituminosa, en nemátodos H. contortus

Para analizar el efecto ovicida de los extractos bioactivos metanólicos de las plantas *R. pinnata* y *P. bituminosa* se utilizó el ensayo de eclosión de huevos (EEH). El ensayo EEH se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la "World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology" (W.A.A.V.P) para determinar la resistencia antihelmíntica (Coles *et al*., 1992). Como tratamientos activos se utilizaron los extractos bioactivos metanólicos obtenidos de las plantas *R. pinnata* y *P. bituminosa*. Como control positivo se utilizó el antihelmíntico comercial de efecto ovicida oxibendazol (Oxibendaziven®, Laboratorios Iven) y como control negativo se utilizaron huevos no tratados que fueron diluidos en diferentes concentraciones de DMSO.

El ensayo EEH se realizó en placas de 96 pocillos añadiendo en cada pocillo 100 μl de una suspensión con aproximadamente 150-200 huevos a los cuales se añadió 100 μl de las distintas concentraciones de extracto bioactivo metanólico, control positivo o control negativo (DMSO) (Tabla 2).

TABLA 2

Concentraciones de extractos bioactivos obtenidos de R. pinnata y P. bituminosa, del control positivo (oxibendazol) y del control negativo (DMSO) utilizados en los ensayos de EEH

Producto	Disolvente	Concentraciones
R. pinnata[1]	DMSO 6%	5 – 0,02 mg/mL
P. bituminosa[2]	DMSO 6%	25 – 1,94 mg/mL
DMSO (control -)	dH_2O	3 – 0,1875%
Oxibendazol (control +)	DMSO 6%	1250 ng/mL – 0,25 ng/mL

(1) *Ruta pinnata* (extracto metabólico de parte aérea de planta fructificada)

(2) *Psoralea bituminosa* (extracto metabólico de parte aérea de planta)

Tras incubar las placas a una temperatura de 28ºC durante 24 horas, se determinó, mediante la utilización de un microscopio invertido, el porcentaje de:

a) Huevos no larvados;

b) Huevos larvados;

c) Larvas inmóviles;

d) Larvas móviles en un microscopio invertido.

La inhibición del desarrollo de los huevos puede verse sólo en las fases iniciales, ya que la sensibilidad de los extractos puede decrecer a medida que el desarrollo embrionario avanza, por lo que se utilizaron solamente huevos frescos para realizar este tipo de ensayo. Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días.

Tal y como puede apreciarse en la Fig. 1A, tras 24 h de incubación la mayoría (80-90%) de los huevos no larvados de *H. contortus* evolucionaron a larvas de primer estado (L1) móviles en los controles negativos (DMSO), mientras que prácticamente el 100% de los mismos permaneció sin evolucionaren el control positivo (oxibendazol) a todas las concentraciones ensayadas (Fig. 1B). Concentraciones finales de 5 mg/ml de extracto bioactivo metanólico extraído de *R. pinnata* presentaron un efecto similar al del control positivo (oxibendazol) y se mantuvo el efecto ovicida hasta la concentración de 1,25 mg/mL, aunque se observó que a la concentración de 0,3 mg/mL del extracto bioactivo metanólico de *R. pinnata*, el efecto también resultó atractivo pues a esta concentración sólo el 20% de las larvas fueron móviles (Fig. 1C). A partir de esta concentración de 0,3 mg/mL del extracto bioactivo metanólico de *R. pinnata*, se comprometió la viabilidad de las larvas de primer estadio (L1), que o bien permanecieron dentro del huevo o bien se encontraron inmóviles fuera de él. Así, el efecto ovicida y larvicida frente a larvas L1 de *H. contortus*, del extracto bioactivo metanólico extraído de *R. pinnata* fue por tanto dosis dependiente.

Los extractos bioactivos metanólicos de *P. bituminosa* no lograron inhibir el desarrollo del huevo completamente a ninguna de las concentraciones ensayadas, pero sí tuvo un efecto sobre la viabilidad de las larvas L1 de *H. contortus*, que fue aproximadamente 10 veces menor que el observado con los extractos de *R. pinnata* (Fig. 1D).

Ejemplo 4

Ensayo in vitro del efecto larvicida de extractos bioactivos metanólicos de plantas R. pinnata, R. graveolens y P. bituminosa, en nemátodos H. contortus

Para analizar el efecto larvicida *in vitro* de extractos bioactivos metanólicos extraídos de las plantas *R. pinnata*, *R. graveolens* y *P. bituminosa* sobre larvas del nemátodo *H. contortus*, se utilizó el ensayo de parálisis larvaria (EPL). El procedimiento seguido es similar a Kotzte *et al*. (2004). Brevemente, suspensiones de 100 μl de 150-200 larvas de tercer estadio L3 se mezclaron con concentraciones conocidas de los correspondientes extractos bioactivos metanólicos en placas de 96 pocillos incubadas a temperatura ambiente durante 24 horas. Como control positivo se incluyó el antihelmíntico comercial Levamisol (Cyver antihelmintíco®, Fort Dodge) y como control negativo DMSO a las correspondientes concentraciones (Tabla 3).

TABLA 3

Concentraciones de extractos de R. pinnata, R. graveolens, P. bituminosa, Levavisol (control positivo) y DMSO (control negativo) utilizados en los ensayos de EPL

Producto	Disolvente	Concentraciones
R. pinnata[1]	DMSO 6%	12,5 – 0,015625 mg/mL
R. graveolens[2]	DMSO 6%	12,5 – 0,0625 mg/mL
P. bituminosa[3]	DMSO 6%	12,5 – 0,0625 mg/mL
DMSO (control -)	dH_2O	1,5 – 0,001875%
Levamisol (control +)	dH_2O	37,5 – 0,009375 µg/mL

(1) *Ruta pinnata* (extracto metabólico de parte aérea de planta fructificada). (2) *Ruta graveolens* (extracto metabólico de la parte aérea de la planta fructificada). (3) *Psoralea bituminosa* (extracto metabólico de parte aérea de planta).

Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la movilidad larvaria, clasificándose el movimiento de la siguiente forma:

(0) larvas con movilidad normal;

(1) movilidad algo reducida;

(2) movilidad reducida;

(3) movilidad bastante reducida;

(4) movilidad muy reducida;

(5) larvas completamente inmóviles.

Se consideró que la larva estaba completamente inmóvil cuando no se observaba movimiento durante 5 segundos de observación. Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días.

En la figura 2A se observa que los extractos bioactivos extraídos de *R. pinnata* mostraron un alto porcentaje de inhibición del movimiento larvario y por tanto un importante efecto larvicida frente a larvas de tercer estado (L3), llegando a producir reducción significativa de la movilidad larvaria (34%) incluso a dosis de 0,015625 mg/mL (≈ 15 µg/mL). La inhibición de la movilidad larvaria en presencia de los extractos bioactivos metanólicos extraídos de la especie del mismo género *R. graveolens* fue considerablemente menor, aunque sí se observó inhibición de la movilidad larvaria, aproximadamente alrededor de un 30%, a mayores dosis de entre 12,5 y 3,125 mg/mL (Fig. 2B). Por el contrario, la reducción de la movilidad larvaria con el extracto bioactivo metanólico de *P. bituminosa* fue moderada y sólo se observó a la dosis más alta empleada (12,5 mg/mL).

El grado de movilidad larvaria en presencia de los extractos bioactivos metanólicos de *R. pinnata* osciló entre las categorías (3) y (4) y entre (0) y (2) en los extractos bioactivos metanólicos de *R. graveolens* y *P. bituminosa*. Prácticamente el 100% de las larvas presentaron movilidad normal (categoría 0) en los controles negativos (Fig. 2D). En los controles positivos (Fig. 2D), empleando el compuesto comercial Levamisol (Cyver antihelmintíco®, Fort Dodge), el grado de movilidad larvaria siguió un patrón similar a lo descrito para los extractos de *R. pinnata*, aunque para conseguir el mismo porcentaje de inhibición con Levamisol que con los extractos bioactivos extraídos de las plantas se necesitan mayores concentraciones del compuesto comercial. A concentraciones de Levamisol de 0,0187 µg/mL la inhibición fue del 80-100% y a partir de ahí se redujo hasta el 25-30%.

Ejemplo 5

Ensayo in vitro del efecto adulticida de extractos bioactivos metanólicos de plantas R. pinnata, R. graveolens y P. bituminosa, en nemátodos H. contortus

Para analizar el efecto adulticida *in vitro*, de extractos bioactivos metanólicos de plantas *R. pinnata*, *R. graveolens* y *P. bituminosa*, se utilizó el ensayo de viabilidad de adultos (EVA), siguiendo las recomendaciones descritas por

Sharma *et al*. (1971). Los gusanos o vermes maduros del nemátodo se recogieron del estómago glandular (abomaso) de los animales sacrificados. Tras sucesivos lavados, los gusanos se resuspendieron en medio RPMI 1640 con 1% penicilina-estreptomicina (P/E) a una concentración de 10 vermes/mL y se incubaron en placas de 12 pocillos a una temperatura de 37ºC y 5% de CO_2 con diferentes diluciones del extracto bioactivo metanólico extraído de las plantas antes mencionadas, con diferentes concentraciones del control positivo (Levamisol) y con diferentes concentraciones del control negativo (DMSO) (Tabla 4). Se determinó la movilidad de los gusanos a las 24 h de incubación. Las muestras se analizaron por triplicado y los ensayos se repitieron dos veces en condiciones idénticas.

TABLA 4

Concentraciones de extractos de R. pinnata, R. graveolens, P. bituminosa, control positivo (Levamisol) y negativo (DMSO) utilizados en los ensayos EVA

Producto	Disolvente	Concentraciones
R. pinnata[1]	DMSO 6%	25 – 0,0625 mg/mL
R. graveolens[2]	DMSO 6%	25 – 0,0625 mg/mL
P. bituminosa[3]	DMSO 6%	25 – 0,0625 mg/mL
DMSO (control -)	dH_2O	3 – 0,0075%
Levamisol (control +)	dH_2O	1500 – 12 µg/mL

(1) *Ruta pinnata* (extracto metabólico de parte aérea de planta fructificada). (2) *Ruta graveolens* (extracto metabólico de la parte aérea de la planta fructificada). (3) *Psoralea bituminosa* (extracto metabólico de parte aérea de planta).

El efecto adulticida de los extractos bioactivos metanólicos extraídos de *R. pinnata*, medido como el porcentaje de inhibición de la movilidad de individuos adultos, fue mucho mayor que el efecto larvicida, mostrado en el ejemplo anterior, utilizando las mismas dosis (Fig. 3A), siendo el porcentaje de inhibición del 100% a todas las concentraciones de extracto bioactivo utilizadas, incluso a la concentración de 0,625 mg/mL. Dicho porcentaje de inhibición disminuyó hasta el 90% cuando se empleó una concentración 10 veces menor (0,0625 mg/mL) de extracto bioactivo. Estos altos porcentajes de inhibición de los individuos adultos en presencia de los extractos bioactivos de la invención, podría deberse a varias razones, en primer lugar a que el estado adulto del parásito sea *per se* más susceptible que las larvas L3 (consideradas como elementos de resistencia en su ciclo biológico) al efecto del extracto bioactivo y en segundo lugar a que, aparte de la absorción del producto a través del tegumento, los gusanos o vermes adultos sean capaces de incorporarlo por ingestión (las larvas L3 no se alimentan del medio).

En el caso de los extractos bioactivos metanólicos extraídos de *R. graveolens*, el efecto adulticida fue similar al observado con los extractos bioactivos extraídos de *R. pinnata*, únicamente a la concentración más baja (0,0625 mg/mL) los extractos bioactivos extraídos de *R. pinnata* parecieron resultar más eficaces que los de *R. graveolens*, 90% de inhibición de la movilidad de adultos frente a 65% respectivamente (Fig. 3B). La mayor sensibilidad del estado adulto del nemátodo *H. contortus* se confirma con los resultados de los extractos bioactivos extraídos de *P. bituminosa*, que también fueron eficaces como adulticidas, aunque con menor efecto que los extractos de las dos especies de Ruta (Fig. 3C). El control positivo utilizado en los ensayos (Levamisol) inhibió totalmente la movilidad de los adultos a partir de las 3 h de incubación pero el efecto se revirtió a las 24 h (ver Ejemplo 10). El mecanismo de acción reconocido de este fármaco antihelmíntico, Levamisol, es precisamente la producción de una parálisis muscular del verme, que será retirado de su localización habitual mediante el movimiento peristáltico del hospedador y eliminado finalmente con las heces.

Ejemplo 6

Ensayo in vitro del efecto anticoccidiósico y antiséptico de extractos bioactivos de plantas R. pinnata, R. graveolens y P. bituminosa, en E. ninakohlyakimovae

Para analizar *in vitro* el efecto anticoccidiósico y antiséptico de los diferentes extractos bioactivos extraídos de las plantas *R. pinnata*, *R. graveolens* y *P. bituminosa*, se utilizó el ensayo de esporulación de ooquistes (EEO). Aproximadamente 5.000 ooquites de *E. ninakohlyakimovae* no esporulados se incubaron durante 24 horas en tubos Eppendorf con distintas concentraciones de extracto bioactivo metanólico extraído de cada una de las plantas arriba mencionadas, con diferentes concentraciones del control positivo, el desinfectante clorado Aquagen ® SDF (SUCITESA) y con diferentes concentraciones del control negativo (DMSO) (Tabla 5). Tras la incubación, se realizaron tres lavados para

eliminar los restos del cocktail de incubación. Posteriormente los ooquistes se transfirieron a placas microtiter de 24 pocillos con dicromato potásico al 2% para evaluar el progreso de la esporulación a intervalos de 24 horas incubados a una temperatura de 27ºC. Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días.

TABLA 5

Concentraciones de extractos bioactivos de R. pinnata, R. graveolens, P. bituminosa, control positivo (Aquagen ® SDF) y control negativo (DMSO) utilizados en los ensayos EIE

Producto	Disolvente	Concentraciones
R. pinnata[1]	DMSO 6%	12,5 – 0,0625 mg/mL
R. graveolens[2]	DMSO 6%	12,5 – 0,0625 mg/mL
P. bituminosa[3]	DMSO 6%	12,5 – 0,0625 mg/mL
DMSO (control -)	dH_2O	1,5 – 0,0075%
Aquagen ® SDF (control +)	dH_2O	25 – 0,05%

(1) *R. pinnata* (extracto metabólico de parte aérea de planta fructificada). (2) *R.graveolens* (extracto metabólico de planta fructificada). (3) *P. bituminosa* (extracto metabólico de parte aérea de planta).

En la figura 4A se observa que los extractos bioactivos metanólicos extraídos de *R. pinnata* son capaces de inhibir de forma considerable la esporulación de *E. ninakohlyakimovae* de manera dosis dependiente. Los mayores resultados de inhibición de la esporulación se obtuvieron a las concentraciones de 3,125-12,5 mg/mL, donde se obtuvieron porcentajes de inhibición de la esporulación entre el 65% y el 85% (Fig. 4A). Estos altos porcentajes de inhibición de la esporulación de *E. ninakohlyakimovae* no se observaron con los extractos de ninguna de las otras dos plantas analizadas, *R. graveolens* y *P. bituminosa*. Con los extractos bioactivos metanólicos extraídos de *P. bituminosa* (Fig. 4B) y *R. graveolens* (Fig. 4C) sólo se obtuvo una ligera inhibición de la esporulación a la concentración más alta (12,5 mg/mL).

El porcentaje de inhibición de la esporulación de ooquistes con la concentración más elevada del extracto bioactivo metanólico extraído de *R. pinnata* (12.5 mg/ml) fue comparable con el porcentaje de inhibición observado con el control positivo utilizado, Aquagen®SDF a cualquiera de las concentraciones utilizadas (Fig. 4D). Dado que el ooquiste se considera como el elemento de resistencia de éste y otros coccidios parásitos de los animales domésticos y del hombre, el resto de formas evolutivas del parásito serían necesariamente más sensibles al efecto de los extractos de *R. pinnata* por lo que, aparte del efecto antiséptico, se asume el efecto anticoccidiósico de la planta. Esta hipótesis ha sido contrastada de forma preliminar con la especie de coccidios de bovinos *Eimeria bovis*, cuyos esporozoítos demostraron ser también considerablemente sensibles al efecto de los extractos de *R. pinnata*. En este sentido, se ha observado que concentraciones de 0,1 mg/ml y 0,08 mg/ml de extracto metanólico de planta fructificada son capaces de inhibir en un 50% la esporulación de ooquistes y la viabilidad de esporozoitos en esta especie bovina de *Eimeria*, respectivamente.

Ejemplo 7

Actividad antiparasitaria de extractos bioactivos de frutos de R. pinnata analizada mediante EPL

En la presente invención se analizó también la actividad antiparasitaria de los extractos bioactivos extraídos de los frutos de *R. pinnata*, según se describe en el ejemplo 1, y dicha actividad fue comparada con la que presentaban los extractos bioactivos extraídos del resto de zonas de la planta *R. pinnata* fructificada.

Los resultados del porcentaje de inhibición de la movilidad larvaria obtenidos al comparar extractos bioactivos metanólicos extraídos de la planta entera fructificada, con extractos bioactivos metanólicos extraídos del fruto maduro, son indicativos de que gran parte de la actividad antihelmíntica de los extractos de *R. pinnata* se halla concentrada en el fruto maduro (Fig. 5A). Estos datos apoyan las observaciones de que los extractos metanólicos extraídos de la planta fructificada presentan más actividad antiparasitaria que similares extractos extraídos de la planta sin fructificar.

Además, al comparar la actividad de las fracciones hexánicas, obtenidas mediante el proceso de fraccionamiento de los extractos bioactivos metanólicos de los frutos maduros y de los frutos verdes de *R. pinnata* (Fig. 5B) se encontró mayor actividad antihelmíntica en el fruto maduro, lo que indicaría que a medida que el fruto madura se incrementa la concentración de producto activo.

Ejemplo 8

Actividad antiparasitaria de extractos bioactivos acuosos de R. pinnata analizada mediante EPL

Los extractos bioactivos de *R. pinnata* extraídos utilizando como disolvente agua, presentaron un efecto sobre la inhibición de la movilidad larvaria significativamente menor que los correspondientes extractos metanólicos, entre las concentraciones de 12,5 mg/mL y 3,125 mg/mL; mientras que no se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de inhibición de la movilidad larvaria a concentraciones de 0,352 mg/mL a 0,0625 mg/mL (Fig. 6). El efecto antihelmíntico del extracto acuoso obtenido de frutos de *R. pinnata*, aproximadamente un 90% de inhibición a la máxima concentración del mismo, es importante de reseñar debido a la facilidad de obtención de dicho extracto, lo que posibilita que macerados de la planta seca sin extracción alguna puedan ser utilizados como tratamiento antiparasitario directo.

Ejemplo 9

Actividad antiparasitaria de extractos bioactivos metanólicos de cultivos in vitro de R. pinnata analizada mediante EPL

Para la obtención de los cultivos *in vitro* de *R. pinnata*, se hizo uso de la tecnología conocida en el estado de la técnica, para los cultivos *in vitro* de material vegetal, (células en suspensión, agregados celulares, tejidos, raíces, brotes, etc.) empleando medios nutritivos tales como Murashige-Skoog (1962) o B5 (Gamborg *et al*.1968), así como la adición de reguladores de crecimiento tales como auxinas y citoquininas, cultivados en distintas condiciones de luz, temperatura y agitación. Los datos de inhibición de movilidad larvaria recogidos en la Fig. 7 demuestran que los extractos bioactivos metanólicos de cultivos *in vitro* de *R. pinnata* presentaron un efecto antihelmíntico considerable y dicho efecto fue claramente dosis dependiente. A la mayor concentración utilizada de extracto bioactivo (25 mg/mL) se obtuvo una inhibición de la movilidad de aproximadamente un 70%, una reducción sensiblemente menor que la observada con las mismas concentraciones de extracto metabólico de planta entera, donde la inhibición llegó a ser del 100%. En este sentido, esta fuente de obtención de biomasa de *R. pinnata* es también de gran interés.

Ejemplo 10

Ausencia de reversibilidad en la actividad antiparasitaria de extractos bioactivos de R. pinnata y P. bituminosa

Tal y como puede observarse en las Figuras 8A-B, el efecto antihelmíntico de los extractos bioactivos obtenidos de ambas plantas, prácticamente no se perdió tras los lavados, a diferencia de lo que ocurrió en el control positivo (Levamisol), donde a concentraciones de Levamisol de entre 3,75 y 0,01875 μg/mL, tras el lavado de éste del medio de incubación, se produjo una recuperación de la movilidad larvaria considerable (Fig. 8C). Este mismo fenómeno se observó también en los ensayos de viabilidad de adultos (Fig. 4), incluso sin realizar lavados. Como ya se discutió en el Ejemplo 5, la movilidad de los adultos de *H. contortus*, mermada en prácticamente un 100% a las 3 h de incubación con Levamisol se recuperó extraordinariamente cuando la incubación se prolongó hasta las 24 h. Estos resultados indicarían que, sorprendentemente, los extractos de *R. pinnata* y *P. bituminosa* causan parálisis irreversible o muerte de los parásitos.

Ejemplo 11

Mortalidad y efecto fitosanitario de extractos bioactivos de R. pinnata frente al insecto Frankliniella occidentalis

Para la obtención de los datos mostrados en el presente ejemplo, se utilizaron insectos trips (*Frankliniella occidentalis*), también llamado trips de flores occidentales. Dicha plaga constituye una seria amenaza que afecta a un gran número de cultivos en todo el planeta, incluyendo cultivos de frutales y de plantas ornamentales. También afecta, de manera muy grave, a los cultivos de invernaderos, con serias consecuencias para la producción de los mismos.

Se utilizaron placas multipocillo en las que se depositaron en el fondo de cada pocillo, 50 μL a diferente concentración, de los extractos bioactivos de frutos maduros de *R. pinnata* o en el caso de las muestras control, se depositó en el fondo de los pocillos medio nutritivo convencional para el crecimiento de los insectos, sin presencia de extracto bioactivo. Posteriormente se incluyeron las larvas de los trips. Las muestras de los extractos bioactivos de *R. pinnata* a diferentes concentraciones, se disolvieron en agua para llevar a cabo los estudios. La muestra de extracto de fruto maduro de *R. pinnata* se evaluó a tres concentraciones diferentes (100% = 33,375 mg/mL, 50% = 16,687 mg/mL y 20% = 6,675 mg/mL). Para cada dilución se emplearon 30 larvas de primer estadio de trips (*F. occidentalis*), tomán-

dose como parámetro de control. Se realizaron 3 repeticiones de cada ensayo y de cada dilución. Después de tres días, se registró el número de larvas supervivientes en los distintas diluciones y se compararon con la respuesta control.

Los resultados presentados en la Figura 9 muestran que la mortalidad registrada después de tres días de incubación fue casi del 100%, incluso a la concentración más baja analizada de 6,675 mg/mL (20%), por otro lado, el control (ensayo con larvas utilizando medio nutritivo sin extracto añadido) mostró valores casi despreciables de mortalidad de las larvas.

Bibliografía

Arab, H.A., **Rahbari**, S., **Rassouli**, A., **Moslemi**, M.H., **Khosravirad**, F., 2006. Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. *Trop Anim Health Prod*., 38:497-503.

Assis, L.M., **Bevilaqua**, C.M., **Morais**, S.M., **Vieira**, L.S., **Costa**, C.T., **Souza**, J.A., 2003. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*., 117:43-49.

Ayers, S., **Zink**, D.L., **Mohn**, K., **Powell**, J.S., **Brown**, C.M., **Murphy**, T., **Brand**, R., **Pretorius**, S., **Stevenson**, D., **Thompson**, D., **Singh**, S.B., 2007. Anthelmintic activity of aporphine alkaloids from *Cissampelos capensis*. *Planta Med*., 73: 296-297.

Eguale, T., **Tilahun**, G., **Debella**, A., **Feleke**, A., **Makonnen**, E., 2007. *Haemonchus contortus*: *in vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. *Exp Parasitol*. 116: 340-345.

Gamborg O.L, **Miller** R.A, **Ojima** K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*., 50,151-158.

Hunter W.B., **Ullman** D.E. 1989. Analysis of mouthpart movements Turing feeding of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and *F. schultzei* Trybom (Thysanoptera: Thripidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 18:161-171.

Mantel W.P., van de **Vrie** M. 1988. De californische trips, *Frankliniella occidentalis*, een nieuwe schadelijke tripssoort in de tuinbouw onder glas in Nederland. *Entomol ver* (Amst) 48:140-144.

Meinke P., 2001. Perspectives in animal health: old targets and new opportunities. *J. Med. Chem*. 44:641-658.

Murashige T, **Skoog** F 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-497.

Norton, C.C., **Joyner**, L.P., 1975. The development of drug-resistant strains of *Eimeria maxima* in the laboratory. *Parasitology* 71:153-165.

Oliveira, L.M., **Bevilaqua**, C.M., **Costa**, C.T., **Macedo**, I.T., **Barros**, R.S., **Rodrigues**, A.C., **Camurga-Vasconcelos**, A.L., **Morais**, S.M., **Lima**, Y.C., **Vieira**, L.S., **Navarro**, A.M., 2009. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol*. 159: 55-59.

Peek, H.W., **Landman**, W.J., 2005. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 y 2001. *Avian Pathol* 32: 391-401.

Taylor, M., **Hunt**, K., **Goodyear**, K., 2002. The effects of stage-specific selection on the development of benzimidazoles resistance in *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol*. 109: 29-43.

Waller, P.J., 1997. Nematode parasite control of livestock in the tropics/subtropics: the need for novel approaches. *Int J Parasitol*. 27:1193-1201.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de extractos vegetales bioactivos con actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria que comprende los pasos de:

a) Recoger muestras de biomasa de plantas seleccionadas de las especies *Ruta pinnata* y *Psoralea bituminosa*.

b) Procesar las muestras de biomasa del paso anterior preferentemente mediante secado o congelación.

c) Homogeneizar las muestras de biomasa una vez procesadas.

d) Extraer los extractos bioactivos de la biomasa homogeneizada.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque las muestras de biomasa son recogidas preferentemente de la parte aérea de las plantas en diferentes estados de fructificación y/o de los frutos de dichas plantas en diferentes estados de fructificación, preferentemente maduros.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque el procesado de la biomasa de las partes aéreas de las plantas se realiza preferentemente mediante secado a temperatura ambiente durante preferentemente 20-25 días, y el procesado de la biomasa de los frutos se realiza preferentemente mediante congelación, preferentemente en nitrógeno líquido.

4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** porque la homogeneización se realiza preferentemente mediante trituración.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado** porque la biomasa puede obtenerse también de cultivos *in vitro* de las especies *Ruta pinnata* y *Psoralea bituminosa*.

6. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la extracción de los extractos bioactivos se realiza mediante cualquiera de las técnicas seleccionadas preferentemente entre: extracción mediante superfluidos, extracción con CO_2, extracción asistida por microondas, y más preferentemente mediante la extracción con disolventes.

7. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque los disolventes empleados en la extracción se seleccionan entre una combinación de cualquiera de los disolventes orgánicos, preferentemente: hexano, etanol, diclorometano y más preferentemente metanol; y disolventes acuosos, preferentemente agua.

8. Procedimiento según la reivindicación 7 **caracterizado** porque la extracción de los extractos bioactivos con disolventes se utiliza preferentemente un extractor Soxhltex.

9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8 **caracterizado** porque opcionalmente los extractos bioactivos obtenidos tras la etapa d) se purifican mediante un método de fraccionamiento que comprenda los siguientes pasos:

a) Separar la fracción aceitosa del extracto bioactivo mediante preferentemente decantación y presión reducida, preferentemente de 15 mm Hg hasta obtener un pellet o precipitado.

b) Disolver el pellet o precipitado obtenido en un disolvente, preferentemente agua.

c) Extraer de la disolución del paso anterior mediante extracción líquido-líquido, una fracción acuosa que contiene los extractos bioactivos purificados.

10. Procedimiento según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la extracción líquido-líquido se realiza preferentemente empleando consecutivamente los disolventes hexano, cloroformo y acetato de etilo.

11. Extractos bioactivos de *Ruta pinnata* y *Psoralea bituminosa* con actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria obtenibles mediante el procedimiento descrito en las reivindicaciones 1 a 10.

12. Extractos bioactivos según la reivindicación 11 **caracterizados** porque la actividad antiparasitaria se ejerce frente a parásitos de animales y de seres humanos, preferentemente nemátodos, más preferentemente helmintos, coccidios y parásitos filogenéticamente próximos del *phylum Apicomplexa*.

13. Extractos bioactivos según la reivindicación 12 **caracterizados** porque los nemátodos se seleccionan preferentemente entre cualquiera de los siguientes géneros: *Ascaris, Trichuris, Strongyloides, Enterobius* y más preferentemente, el género *Haemonchus*.

14. Extractos bioactivos según la reivindicación 12 **caracterizados** porque los coccidios se seleccionan preferentemente entre cualquiera de los siguientes géneros: *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Plasmodium*, *Isospora*, *Cryptosporidium* y más preferentemente el género *Eimeria*, así como géneros próximos filogenéticamente a los coccidios, como aquellos que se encuentran en el *phylum Apicomplexa*, y más preferentemente, el género *Plasmodium*.

15. Extractos bioactivos según las reivindicaciones 12 y 13 **caracterizados** porque la actividad antiparasitaria frente a nemátodos se ejerce preferentemente mediante la inhibición de la eclosión de los huevos, inducción de la parálisis larvaria e inhibición de la viabilidad de los individuos adultos.

16. Extractos bioactivos según las reivindicaciones 12 y 14 **caracterizados** porque la actividad antiparasitaria frente a coccidios y géneros relacionados como *Plasmodium*, se ejerce preferentemente mediante la inhibición de la esporulación de los ooquistes y la inhibición de la viabilidad de los esporozoítos.

17. Extractos bioactivos según la reivindicación 11 **caracterizados** porque la actividad antiséptica se ejerce frente a coccidios y géneros próximos relacionados filogenéticamente, como *Plasmodium*, preferentemente de los seleccionados entre cualquiera de los siguientes géneros: *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Plasmodium*, *Isospora*, *Cryptosporidium* y más preferentemente el género *Eimeria*.

18. Extractos bioactivos según la reivindicación 17 **caracterizados** porque la actividad antiséptica frente a coccidios se ejerce preferentemente mediante la inhibición de la esporulación de los ooquistes.

19. Extractos bioactivos según la reivindicación 11 **caracterizados** porque la actividad fitosanitaria se ejerce preferentemente frente a insectos, y más preferentemente de la especie *Frankliniella occidentalis* y especies afines seleccionadas preferentemente entre el orden Thysanoptera y entre las familias Adiheterothripidae, Aelothripidae, Phaleothripidae, Thripidae, más preferentemente entre especies tales como *Frankliniella tritici, Frankliniella bispinosa, Frankliniella fusca, Frankliniella schultzei, Scirtothrips dorsalis, Heliothrips haemorrhoidalis, Thrips simplex, Thrips tabaci, Thrips palmi, Thrips hawaiiensis, Echinothrips americans, Gynaikothrips ficorum, Gynaikothrips uzeli, Chaetanaphothrips orchidii*.

20. Extractos bioactivos según la reivindicación 19 **caracterizados** porque la actividad fitosanitaria frente a insectos se ejerce preferentemente mediante la inhibición de su crecimiento y viabilidad.

21. Uso de los extractos bioactivos de las reivindicaciones 11 a 18 como medicamentos.

22. Uso de los extractos bioactivos de las reivindicaciones 11 a 18 como antiparasitarios y antisépticos, particularmente frente a nemátodos y coccidios.

23. Uso de los extractos bioactivos de las reivindicaciones 11 a 18 para la fabricación de formulaciones farmacéuticas o veterinarias útiles en el tratamiento de enfermedades parasitarias debidas preferentemente a nemátodos, coccidios y especies filogenéticamente relacionadas, pertenecientes particularmente al *phylum Apicomplexa*.

24. Uso de los extractos bioactivos de las reivindicaciones 11 a 18 para la fabricación de alimentos funcionales para animales o seres humanos, útiles para prevenir la aparición de enfermedades parasitarias, preferentemente debidas a nemátodos y coccidios.

25. Uso de los extractos bioactivos de las reivindicaciones 19 a 20 como fitosanitarios.

26. Formulación farmacéutica, veterinaria o fitosanitaria **caracterizada** por comprender los extractos bioactivos de las reivindicaciones 11 a 20 que presenta actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria.

27. Formulación según la reivindicación 26 **caracterizada** porque además comprende otros excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables.

28. Formulación según las reivindicaciones 26 y 27 **caracterizada** porque puede presentarse preferentemente en cualquiera de las formas: polvo, granulado, líquida, en suspensión, en aerosol, pomada, ungüento, cápsula, comprimido o gragea.

29. Alimento funcional que comprende los extractos bioactivos de las reivindicaciones 11 a 18.

30. Método de tratamiento y/o profilaxis de plagas agrícolas e insectos domésticos **caracterizado** porque comprende la administración a los mismos de una dosis efectiva de los extractos bioactivos de las reivindicaciones 11 a 20 o de la formulación fitosanitaria descrita en las reivindicaciones 26 a 28.

31. Método de tratamiento y/o prevención según la reivindicación 30 **caracterizado** porque la administración se realiza preferentemente mediante: pulverización, incluida en el agua de riego o incluida en el abono.

Figura 1

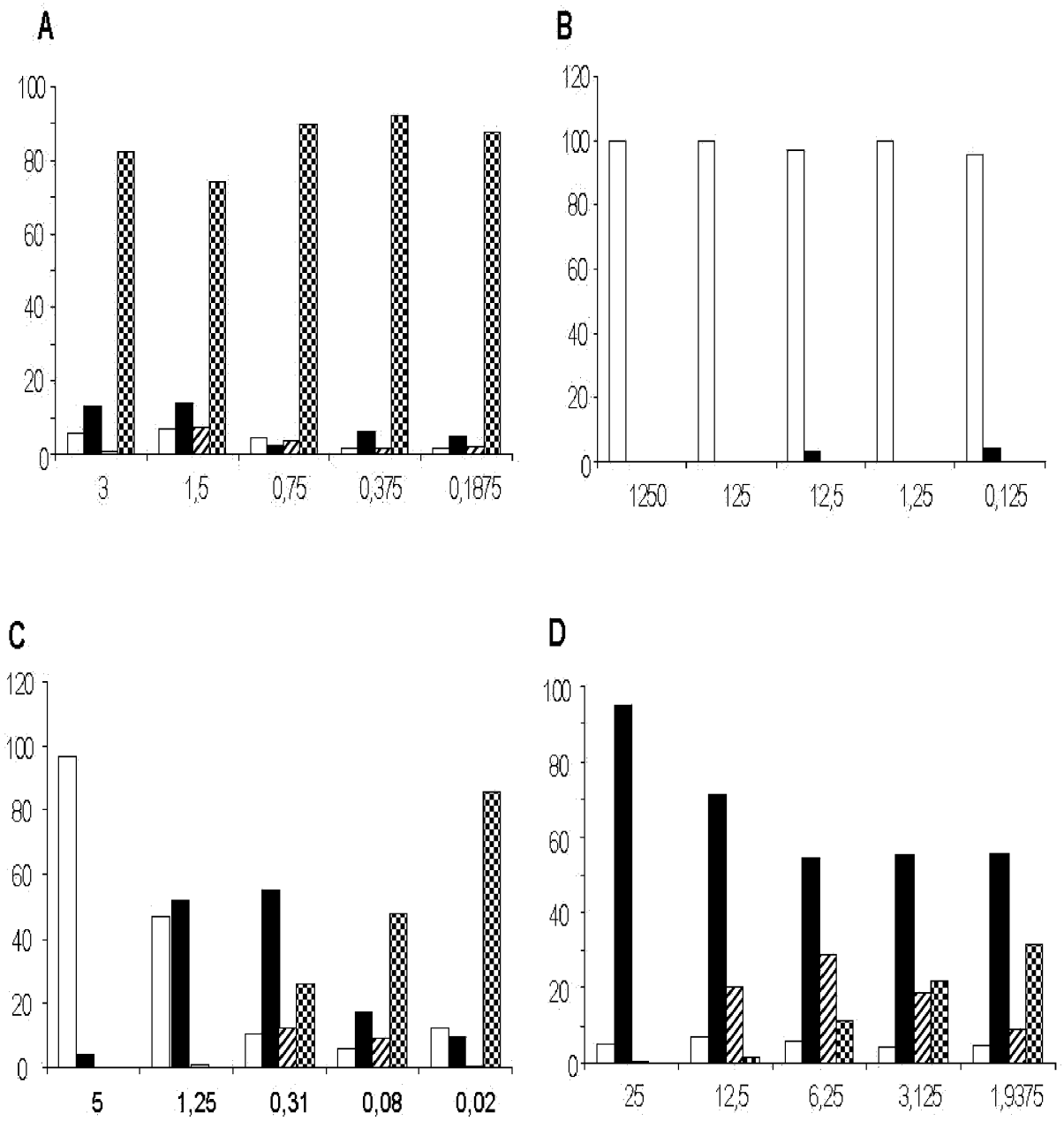

A
100
80
60
40
20
0
3
1,5
0,75
0,375
0,1875
B
120
100
80
60
40
20
0
1250
125
12,5
1,25
0,125
C
120
100
80
60
40
20
0
5
1,25
0,31
0,08
0,02
D
100
80
60
40
20
0
25
12,5
6,25
3,125
1,9375

Figura 2

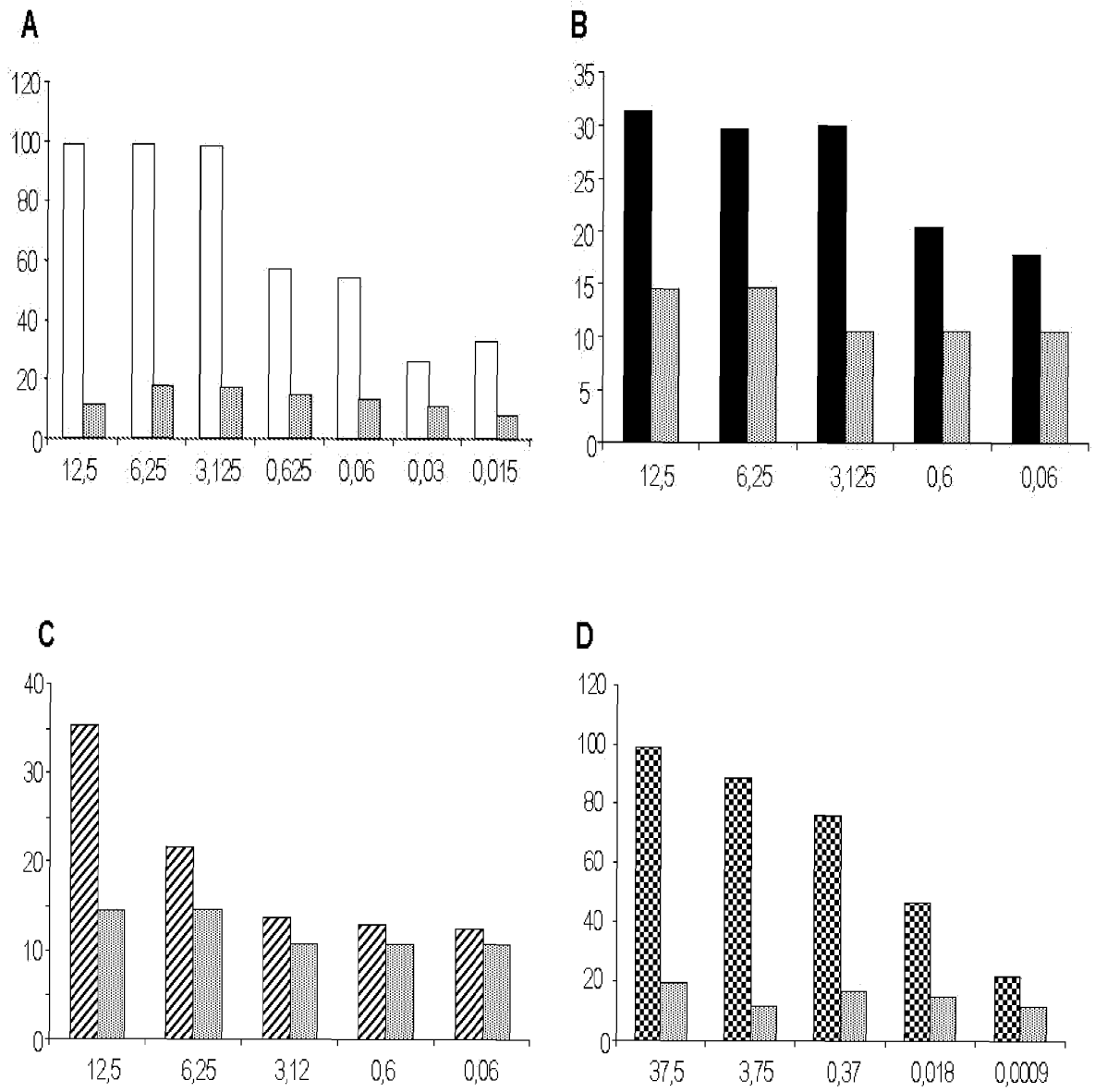

A
120
100
80
60
40
20
0
12,5
6,25
3,125
0,625
0,06
0,03
0,015
B
35
30
25
20
15
10
5
0
12,5
6,25
3,125
0,6
0,06
C
40
30
20
10
0
12,5
6,25
3,12
0,6
0,06
D
120
100
80
60
40
20
0
37,5
3,75
0,37
0,018
0,0009

Figura 3

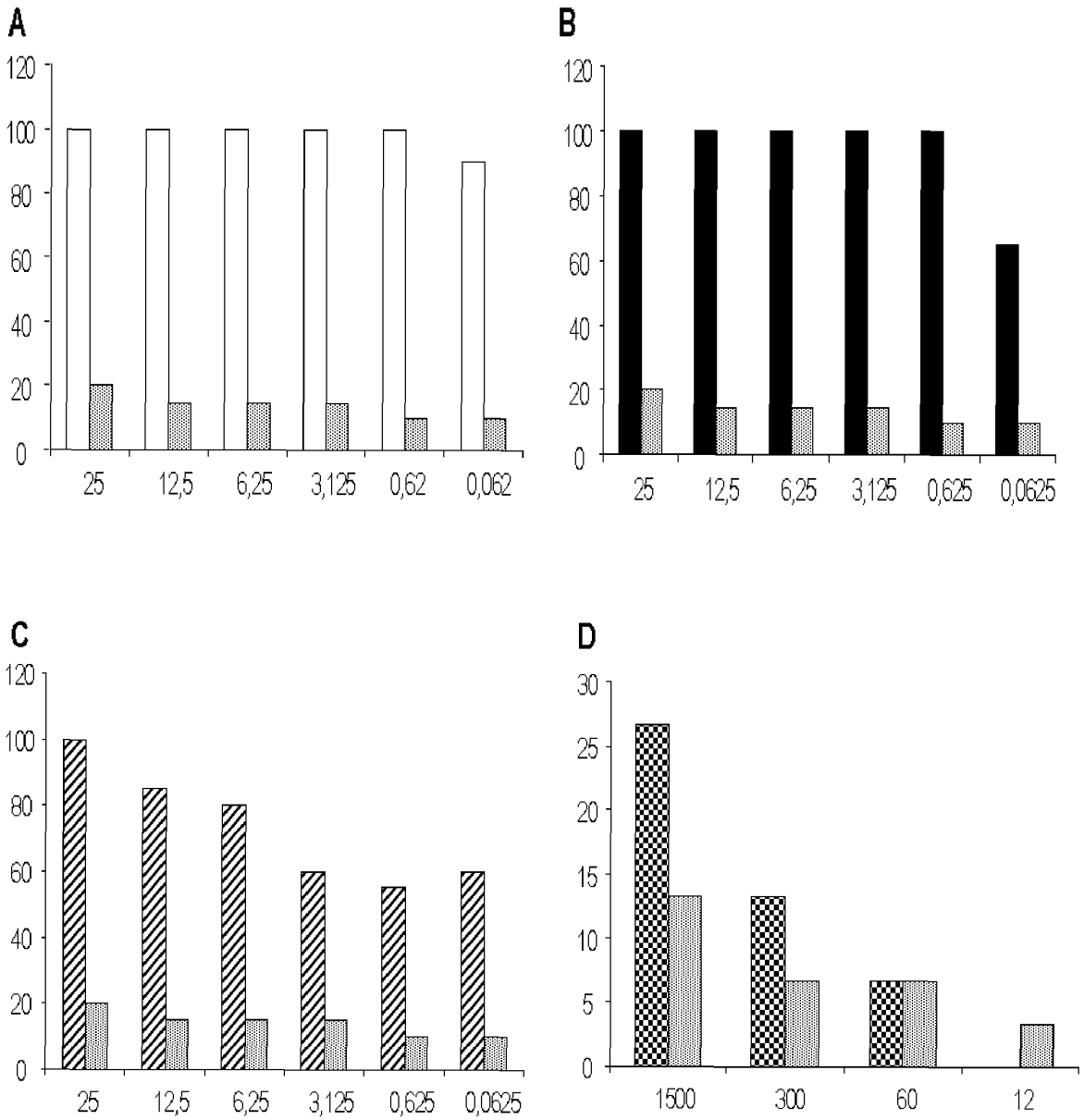

A
120
100
80
60
40
20
0
25
12,5
6,25
3,125
0,62
0,062
B
120
100
80
60
40
20
0
25
12,5
6,25
3,125
0,625
0,0625
C
120
100
80
60
40
20
0
25
12,5
6,25
3,125
0,625
0,0625
D
30
25
20
15
10
5
0
1500
300
60
12

Figura 4

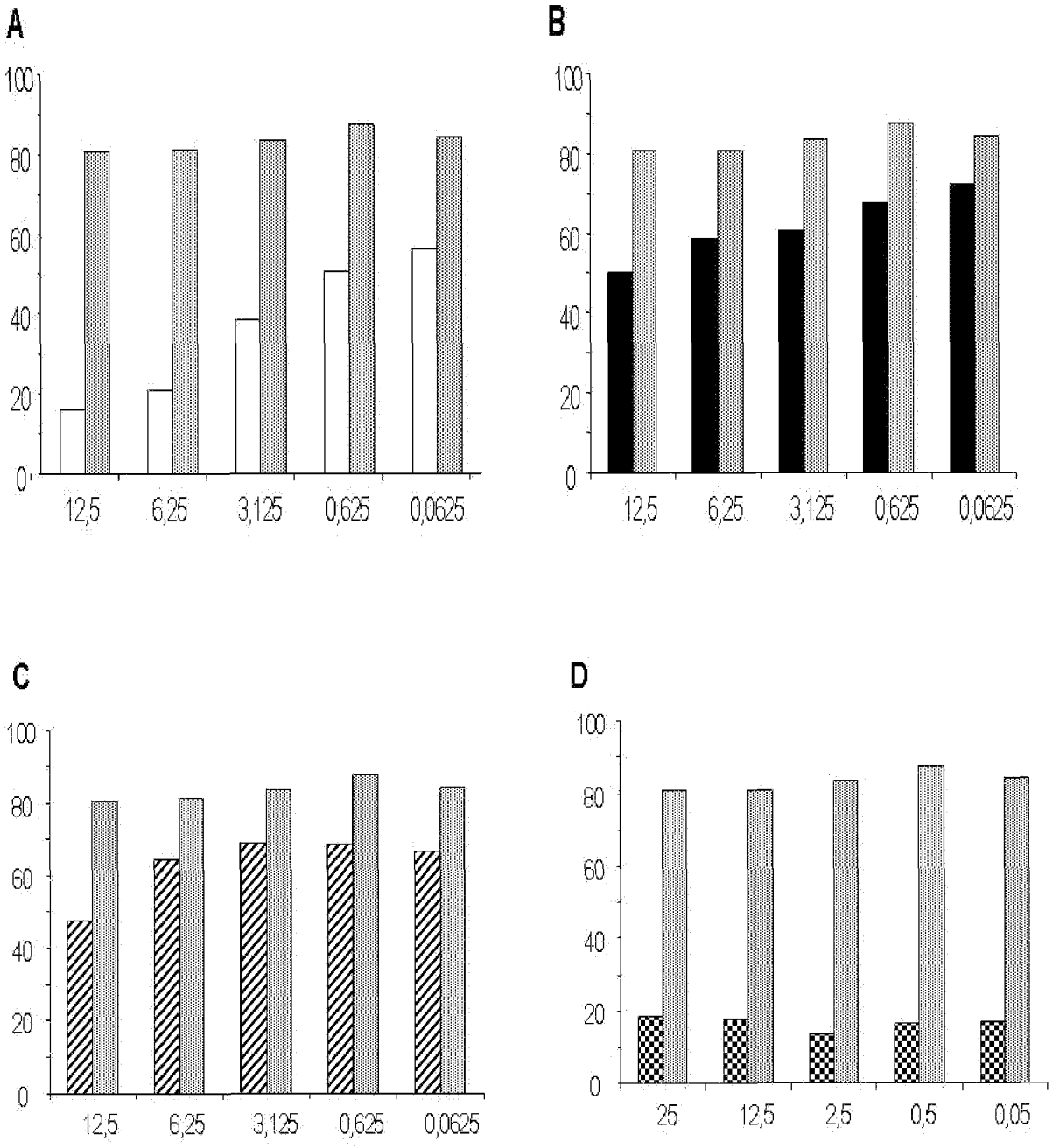

A
100
80
60
40
20
0
12,5
6,25
3,125
0,625
0,0625
B
100
80
60
40
20
0
12,5
6,25
3,125
0,625
0,0625
C
100
80
60
40
20
0
12,5
6,25
3,125
0,625
0,0625
D
100
80
60
40
20
0
25
12,5
2,5
0,5
0,05

Figura 5

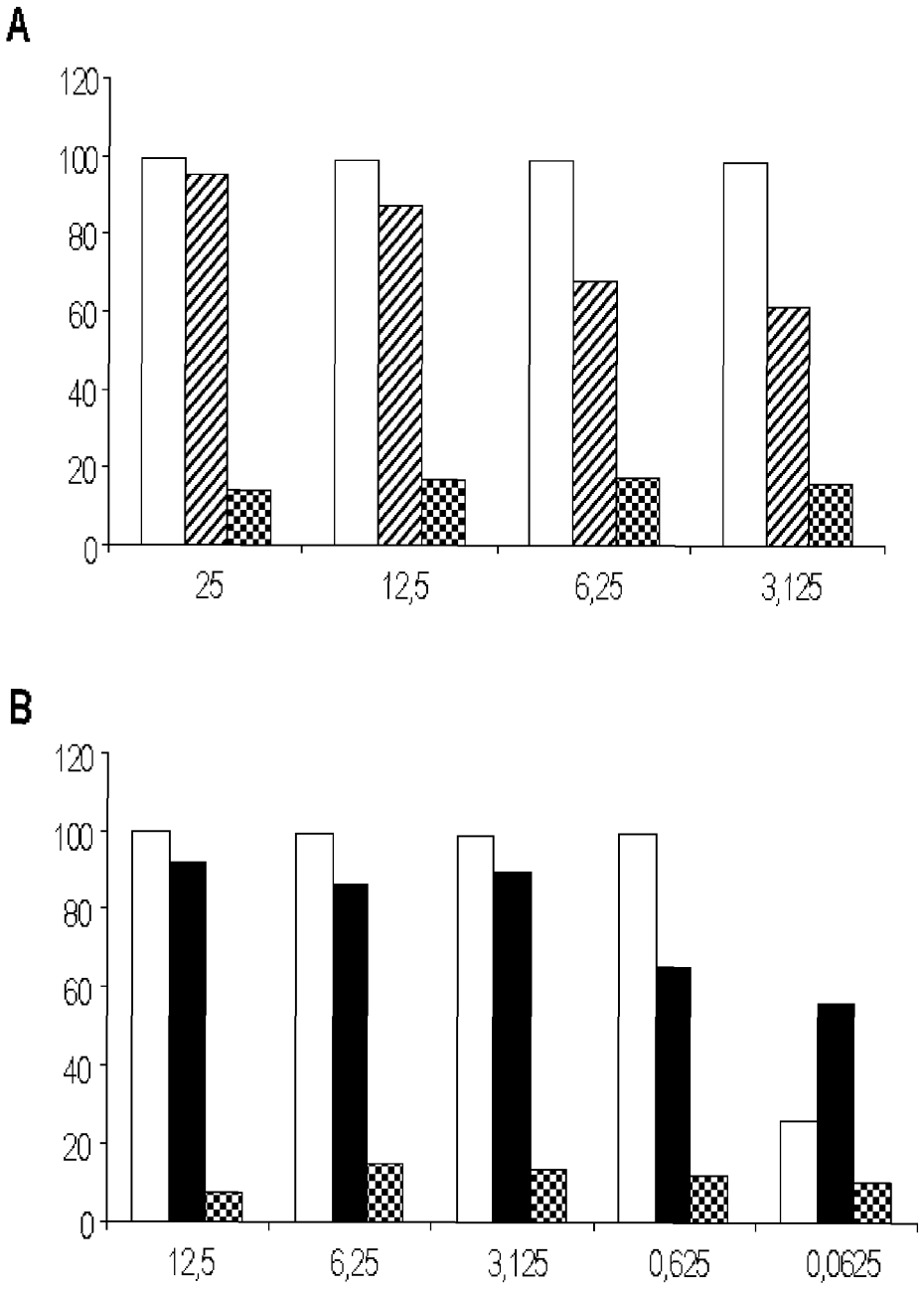

A
120
100
80
60
40
20
0
25
12,5
6,25
3,125
B
120
100
80
60
40
20
0
12,5
6,25
3,125
0,625
0,0625

Figura 6

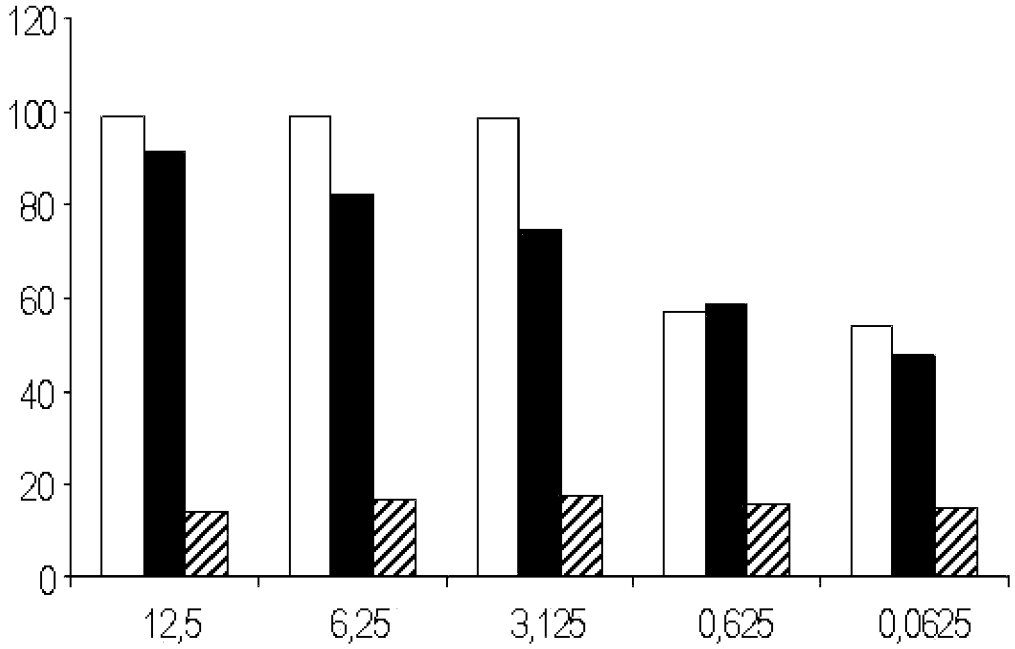


Figura 7

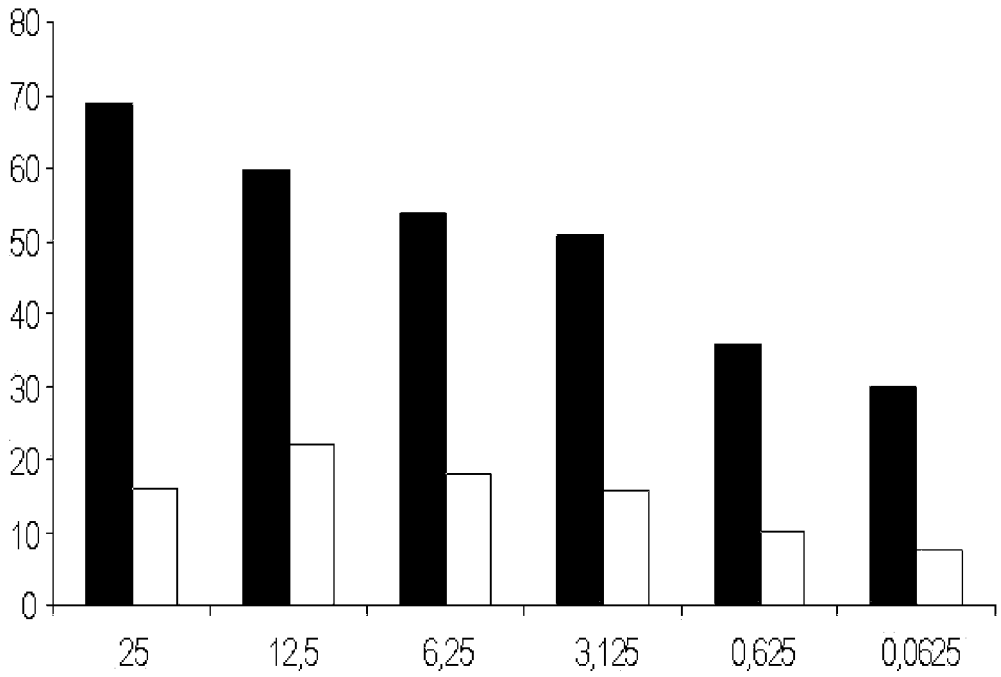


Figura 8

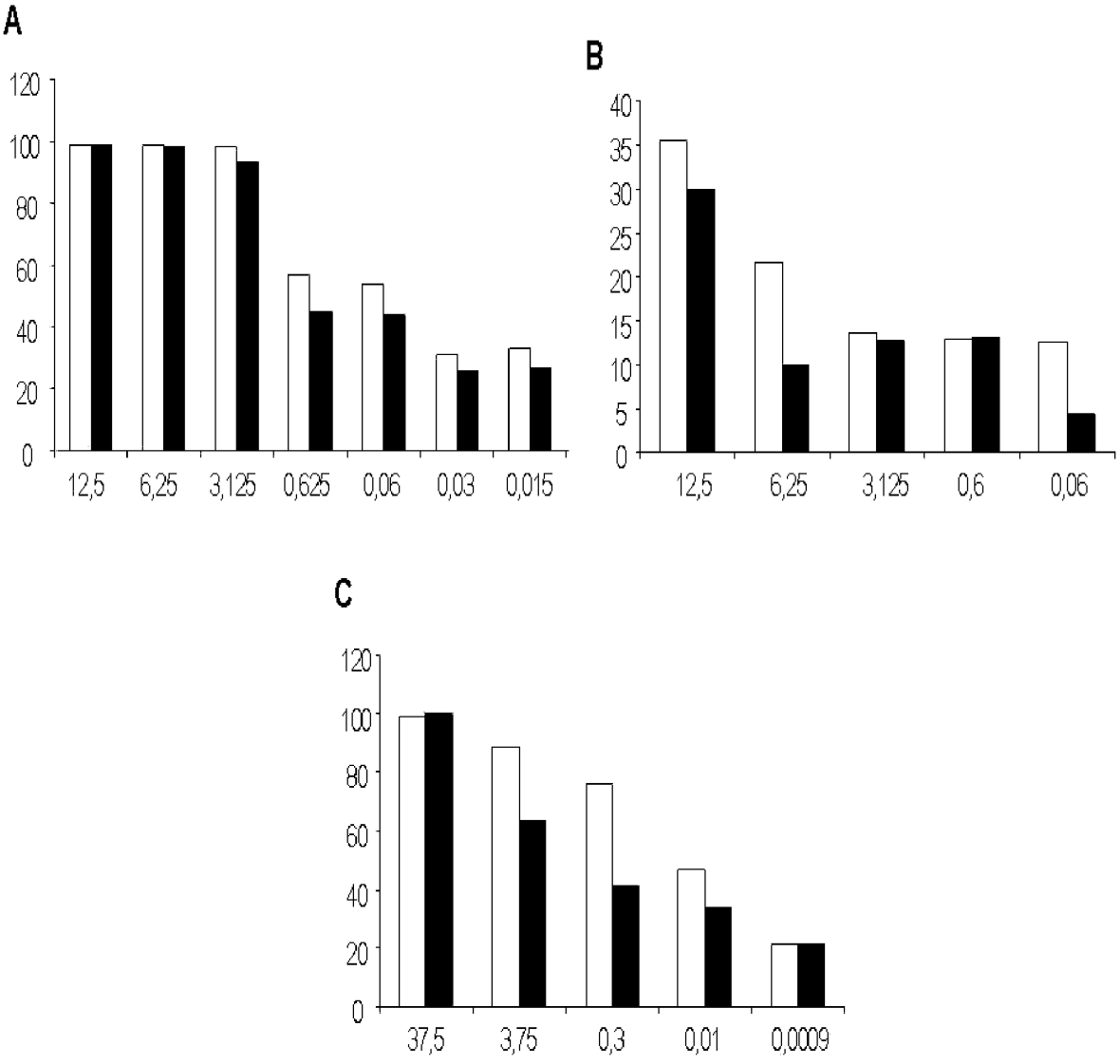
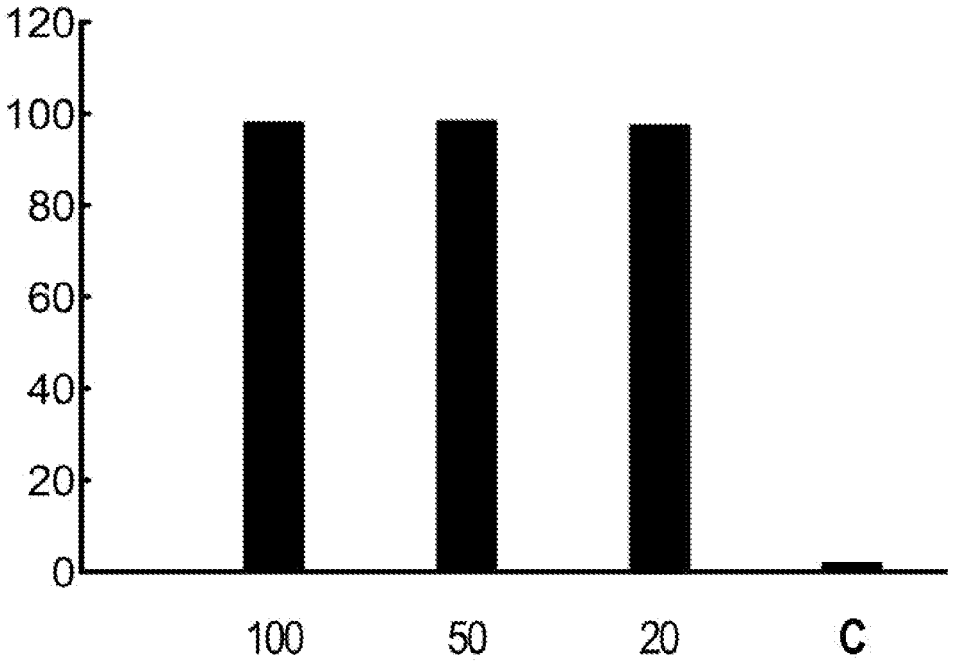

A
120
100
80
60
40
20
0
12,5
6,25
3,125
0,625
0,06
0,03
0,015
B
40
35
30
25
20
15
10
5
0
12,5
6,25
3,125
0,6
0,06
C
120
100
80
60
40
20
0
37,5
3,75
0,3
0,01
0,0009

Figura 9



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201030356

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 11.03.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2006194698 A1 (GWINN ET AL.) 31.08.2006, página 3, [0020]; página 4, [0025]; reivindicación 35, a), f)	1,2,11,12, 30,31
A	NAPOLI, Mariangela. "The plants, rituals and spells that 'cured' helminthiasis in Sicily". Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 2008. Vol. 4, nº 1. ISSN 1746-4269. doi:10.1186/1746-4269-4-21	1, 11-13
A	BR 9704164 A (SIBRÁS LABOTATÓRIOS L TDA.) 30.03.1999, página 1; reivindicación 1	
A	QAMARUDDIN, N. P. et al. Potential antifilarial activity of the leaves and seeds extracts of *Psoralea corylifolia* on cattle filarial parasite *Setaria cervi*. Journal of Ethnopharmacology, 2002. Vol. 82, páginas 23-28. ISSN 0378-8741	

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	Examinador	Página
06.04.2011	A. Sukhwani	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N65/36 (2009.01)
A01N65/20 (2009.01)
A61K36/75 (2006.01)
A61K36/487 (2006.01)
A01P1/00 (2006.01)
A01P5/00 (2006.01)
A01P7/04 (2006.01)
A61P33/00 (2006.01)
A61P33/10 (2006.01)

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

A01N, A61K, A61P

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, BIOSIS, X-FULL, NPL, CAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA, CROPU, SCISEARCH

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-31	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-31	**SI**
	Reivindicaciones		**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.

Consideraciones:

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la obtención de extractos vegetales bioactivos con actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria que comprende (reivindicación 1):

a) Recoger muestras de biomasa de plantas de *Ruta pinnata* y *Psoralea bituminosa*.
b) Procesar las muestras mediante secado o congelación.
c) Homogeneizar las muestras procesadas
d) Extraer los extractos bioactivos de la biomasa homogeneizada.

Se recogen la parte aérea de las plantas y/o de los frutos en diferentes estados de fructificación (reiv. 2). El procesado de las partes aéreas se realiza mediante secado a temperatura ambiente durante 20-25 días, y el procesado de los frutos mediante congelación, en nitrógeno líquido (reiv. 3). La homogeneización se realiza por trituración (reiv. 4).

La biomasa también puede obtenerse de cultivos in vitro de las especies *Ruta pinnata* y *Psoralea bituminosa* (reiv. 5).

La extracción de los extractos bioactivos se realiza en extractor Soxhltex (reiv. 8) mediante superfluidos, extracción con CO2, extracción asistida por microondas o con disolventes (reiv. 6) que puede ser una combinación de disolventes orgánicos como hexano, etanol, diclorometano, metanol y agua (reiv. 7).

Los extractos obtenidos en la etapa d) se purifican mediante un método de fraccionamiento con varios pasos que comprende extracción líquido-líquido con hexano, cloroformo y acetato de etilo (reivs. 9 y 10).

Son también objeto de protección los extractos bioactivos de *Ruta pinnata* y *Psoralea bituminosa* con actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria obtenido por el procedimiento en donde la actividad parasitaria se ejerce sobre nematodos de distintos géneros (reivs. 11-15) o sobre coccidios como *Plasmodium* (reiv. 16- 18). La actividad fitosanitaria se ejerce sobre insectos (reivs. 19-20).

También es objeto de protección el uso de los extractos bioactivos como medicamentos (reiv. 21), como antiparasitarios y antisépticos (reiv. 22), para la fabricación de formulaciones farmacéuticas o veterinarias (reivs. 23-25), las formulaciones obtenidas (reivs. 26-28) así como el alimento que comprende los extractos bioactivos (reiv. 29).

Por último, es objeto de protección el método de tratamiento y/o profilaxis de plagas agrícolas e insectos domésticos administrando dosis efectivas de los extractos en formulaciones fitosanitaria mediante pulverización, incluida en agua de riego o en el abono (reivs. 30-31).

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	US 2006194698 A1 (GWINN et al.)	31.08.2006
D02	NAPOLI, Mariangela. "The plants, rituals and spells that 'cured' helminthiasis in Sicily". Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 2008. Vol. 4, nº 1. ISSN 1746-4269. doi:10.1186/1746-4269-4-21	2008
D03	BR 9704164 A (SIBRAS LABOTARORIOS L TDA)	30.03.1999
D04	QAMARUDDIN, N. P. et al. Potential antifilarial activity of the leaves and seeds extracts of Psoralea corylifolia on cattle filarial parasite Setaria cervi. Journal of Ethnopharmacology, 2002. Vol. 82, páginas 23-28. ISSN 0378-8741	2002

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

NOVEDAD

Los documentos citados **D01** a **D04** se refieren a compuestos bioactivos de plantas, en efecto:

- **D01** se refiere al uso de hierbas en métodos para controlar malas hierbas, plagas de plantas o patógenos que comprende la aplicación de las hierbas en el suelo. Enumera varias decenas de plantas entre ellas la *Ruta graveolens* y la *Psoralea corylifolia* (página 3, [0020]; página 4, [0025]; reivindicación 35, a) y f)).

- **D02** divulga plantas que se utilizan en Sicilia para tratar la helmintiasis, entre ellas, cita la *Ruta chalepensis* (página 14, segunda columna) y en el apéndice enumera entre otras muchas plantas la *Bituminaria bituminosa*, sinónimo de *Psoralea bituminosa*, además de la ya mencionada *Ruta chalepensis* (páginas 17-18).

- **D03** se refiere a un medicamento fitoterapéutico con actividad antiparasitaria que comprende tres plantas, entre ellas la *Ruta graveolens* (página 1; reivindicación 1).

- **D04** se refiere a la potencial actividad de las hojas y semillas de los extractos *Psoralea corylifolia* contra parásitos de ganado, reconociendo también su actividad antihelmíntica y antibacteriana.

Ningunos de los documentos citados hace referencia a la *Ruta pinnata*, ni a los extractos de *Ruta pinnata* junto con *Psoralea bituminosa*.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D04, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 31** tienen novedad según el Artículo 6 LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El objeto de la invención de un procedimiento de obtención de extractos vegetales bioactivos con actividad antiparasitaria, antiséptica y fitosanitaria con plantas de *Ruta pinnata* y *Psoralea bituminosa* no resulta evidente para el experto en la técnica, puesto que los documentos citados no divulgan la utilización de la *Ruta pinnata* para esas actividades.

Por ello, a la vista de los documentos citados D01 a D04, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 31** tienen actividad inventiva según el artículo 8 LP 11/86.