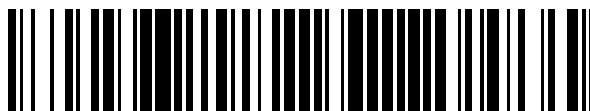


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 577**

51 Int. Cl.:

A01N 37/38 (2006.01)

C07C 51/42 (2006.01)

A01N 37/36 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2009 E 09707004 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 2237665**

54 Título: **Procedimiento de preparación de ácidos dicafeolquínicos, y su utilización en la lucha contra los pulgones**

30 Prioridad:

01.02.2008 FR 0800561

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.02.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (100.0%)
147, RUE DE L'UNIVERSITE
75338 PARIS CEDEX 07, FR**

72 Inventor/es:

**POËSSEL, JEAN-LUC;
COLLET, MARIE-HÉLÈNE y
RAHBE, YVES, NOËL, ELIE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 444 577 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de ácidos dicafeolquínicos, y su utilización en la lucha contra los pulgones.

- 5 La presente invención tiene por objeto la preparación del ácido 3,5-dicafeoilquínico, y de algunos de sus derivados, y su utilización en la preparación de productos fitosanitarios.

10 El ácido 3,5-dicafeolquínico (3,5-diCQ) y sus diferentes derivados se han identificado en numerosas especies de interés agronómico que pertenecen a diferentes familias botánicas (rosáceas, entre ellas los árboles frutales de pepitas y de hueso; solanáceas, entre ellas el tomate y la patata; asteráceas, entre ellas el girasol, la alcachofa y la lechuga; rubiáceas, incluyendo el café; convolvuláceas, entre ellas la batata, etc.).

15 Varios centenares de publicaciones describen la presencia de estas sustancias en estas diferentes especies y ponen en evidencia sus propiedades químicas y biológicas.

Estos compuestos presentan una fuerte actividad antioxidante, que les confiere un gran interés desde un punto de vista nutricional (Ohnishi *et al.*, (1994) *Phytochemistry*, 36: 579-583; Iwai *et al.*, (2004) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4893-4898; Kim & Lee, (2005) *Planta Medica*, 71: 871-876; Saito *et al.*; (2005) *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 4191-4199).

20 Muestran también múltiples propiedades medicinales, entre otras, como analgésicos (dos Santos *et al.*, (2005) *Journal of Ethnopharmacology* 96: 545-549), antihipertensivos (Mishima *et al.*, (2005a) *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28: 1909-1914), hipouricemiantes (Nguyen *et al.*, (2005) *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28: 2231-2234), hepatoprotectores (Basnet *et al.*, (1996) *Biol Pharm Bull* 19: 1479-1484), antiinflamatorios (Peluso *et al.*, (1995) *Journal of Natural Products* 58: 639-646) y anticancerosos (Mishima *et al.*, (2005b) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13: 5814-5818).

30 Estos compuestos están presentes en preparaciones utilizadas en medicina tradicional, en extractos vegetales actualmente comercializados (extractos a base de alcachofa o de equinácea) y en el própolis (Mishima *et al.*, (2005a) *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28: 1909-1914; Mishima *et al.*, (2005b) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13: 5814-5818; Basnet *et al.*, (1996) *Biol Pharm Bull* 19: 1479-1484). Poseen también importantes propiedades anti-infecciosas, en particular antivirales. Constituyen una nueva clase de antirretrovirus, en particular para el tratamiento del SIDA, por su acción inhibitoria sobre la integrasa del VIH (Mahmood *et al.*, (1993) *Antiviral Chem. Chemother.* 4: 235-240; Mc Dougall *et al.*, (1998) *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 42: 140-146; Zhu *et al.*, (1999) *J Virol* 73: 3309-3316).

40 La patente EP1008344 describe la utilización de este grupo de moléculas en el tratamiento de la hepatitis B, la solicitud internacional WO2006127525 describe su utilización en el tratamiento del sida, la solicitud japonesa JP2006213636 recomienda la utilización de este grupo de moléculas en el tratamiento de cánceres, la solicitud EP0577516 describe composiciones dermatológicas despigmentantes que los contienen y la solicitud EP1312373 evoca sus efectos anti-alérgicos.

45 Las propiedades fungicidas de estas moléculas han sido también frecuentemente mostradas (Bazzalo *et al.*, (1985) *Phytopathologische Zeitschrift* 112: 322-332; Kodoma *et al.*, (1998) *Phytochemistry* 47: 371-373; Stange *et al.*, (2001) *Postharvest Biology & Technology* 23: 85-92).

50 Sin embargo, las propiedades insecticidas han sido mucho más raramente estudiadas y los resultados son muy discordantes. Aunque algunos autores han establecido una correlación entre el contenido elevado en diCQ de las raíces de cultivos de lechuga y su resistencia a un pulgón (*Pemphigus bursarius*), no han mostrado nunca la actividad biológica directa de estas moléculas con respecto al insecto (Cole *et al.* (1984) *Annals of Applied Biology* 105: 129-145). Otros autores han mostrado que algunos derivados presentaban poca o ninguna actividad insecticida en los insectos masticadores (Beninger *et al.*, (2004) *J Chem Ecol* 30: 589-605; Schwarz *et al.* 1996). Algunos autores han mostrado incluso un efecto fagoestimulante de 3,5-diCQ sobre los insectos masticadores (Tamura *et al.* (2004); Mullin *et al.* (1991)).

55 El melocotonero *Prunus persica* (L.) Batsch (Rosáceas), árbol particularmente bien adaptado al clima mediterráneo, es principalmente cultivado en China, en América del Norte (California), en América del Sur (Chile y Argentina) y en Europa en los países que bordean la cuenca del Mediterráneo, donde los principales centros de cultivo son España, Italia, Grecia y Francia. En 2004, la producción mundial de melocotones era de 15,6 millones de toneladas, repartidas en una superficie de 1,4 millones de hectáreas. La producción francesa este mismo año era de 413.000 toneladas producidas principalmente a lo largo del Valle del Ródano, en Provenza, en el Rosellón y a lo largo del Valle de la Garona. Este cultivo representa para estas regiones meridionales una apuesta económica indiscutible.

65 Sin embargo, el melocotonero puede ser el objetivo de numerosos ataques parasitarios de origen animal o microbiano. Los principales patógenos y plagas cuyo hospedante es el melocotonero son los hongos: el oídio (*Sphaerotheca pannosa*), la herrumbre (*Taphrina deformans*) y la moniliosis (*Monilinia laxa*, *M fructigena* y *M*

fructicola); las bacterias que pueden provocar un debilitamiento (*Xanthomonas arboricola pathovar pruni*) y numerosos insectos y virus.

Un ataque particularmente preocupante es el del pulgón verde del melocotonero, *Myzus persicae* (Sulzer). Este insecto picador chupador es particularmente nocivo, no sólo por los daños directos que ocasiona, sino también porque es un vector potencial del Plum Pox Virus, agente que causa la enfermedad de la Sharka, que provoca deformaciones así como decoloraciones de los frutos, haciéndolos entonces no comercializables. Al no haber disponible ningún medio de lucha curativo, los árboles infectados deben ser arrancados.

Para luchar contra este parásito, el agricultor se encuentra entonces enfrentado a dos problemas:

- la lucha química contra el pulgón verde, que exige unos insecticidas potentes (frecuentemente nocivos y tóxicos) y cuya eficacia es por otra parte aleatoria, que conlleva un riesgo de aparición de resistencia al *Myzus persicae* (Guillemaud *et al.*, (2003) Bulletin of Entomological Research 93, 289-297), y
- la consideración de la preocupación medioambiental, que pretende por otra parte reducir los inputs fitosanitarios.

Esta problemática ha llevado a genetistas y entomologistas a buscar mejorar la resistencia del melocotonero frente a *Myzus persicae*.

El pulgón verde del melocotonero pertenece al orden de los Hemípteros y a la familia de las Aphididae. Mide de 1,2 a 2,5 mm de largo. Es un pulgón fitófago que se alimenta de savia elaborada, extraída a nivel del floema por unas piezas bucales de tipo picador-chupador (Huilé *et al.*, (1998) en ACTA y INRA ediciones, 77 paginas).

El ciclo anual de *Myzus persicae*, bajo un clima templado, se compone de una fase de reproducción sexuada, que conduce a la puesta de un huevo de invierno diapausante, seguida de una fase de reproducción partenogenética (ciclo completo u holocíclico). Estas dos fases tienen lugar en plantas hospedantes diferentes (ciclo dióico), denominadas respectivamente hospedante primario (el melocotonero) y hospedante secundario (plantas herbáceas, de las cuales algunas tienen una importancia económica mayor: patata, col, berenjena, remolacha, etc.).

Los huevos de invierno puestos en la base de las yemas de melocotonero eclosionan desde final de enero hasta final de abril, durante el brote y dan hembras partenogenéticas ápteras, las fundadoras. Estas fundadoras son el origen de varias generaciones de hembras partenogenéticas, las *fondatrigenes* sobre el hospedante primario. A partir del final de la primavera y en verano, cuando hay sobrepoblación sobre el melocotonero, las *fondatrigenes* dan origen a individuos alados que colonizan su hospedante secundario. Estos individuos alados engendrarán por reproducción asexual varias generaciones de ápteros o de alados, los *virginogénes*, que en otoño darán individuos machos y hembras sexuales y alados, los *sexupares*. Estos individuos volverán sobre el melocotonero para poner los huevos de invierno (Huilé *et al.*, (1998) ya citado; Sauge, (1999) Analyse des mécanismes de résistance du pècher Prunus persica (L.) Batsch au puceron vert Thèse Université Pierre et Marie Curie (Paris 6) 188 páginas).

Los daños directos causados por este pulgón se deben a las picaduras alimenticias de este que provocan la desecación de las yemas, la caída de las flores, unas deformaciones del follaje y de los brotes jóvenes, perturban el crecimiento y pueden inducir a unas reacciones necróticas (Massonié *et al.*, (1979) Revue de zoologie agricole et pathologie végétale 78, 1-5; Monet y Massonié, (1994) Agronomie 2 177-182; Monet y Guye, (1998) en Monet R. (Ed) Proc. Fourth Intern. Peach Symposium Acta Hort 171- 175). Además, *Myzus persicae*, tal como se menciona anteriormente, es un vector del plum pox virus (que provoca la enfermedad de la sharka), que pertenece al grupo de los potivirus que provocan daños indirectos, decoloraciones de las hojas y deformaciones de los frutos.

Teniendo en cuenta lo anterior, es necesario encontrar nuevos tratamientos para luchar de manera eficaz, pero respetuosa del medioambiente, contra los pulgones, en particular el pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*).

Ahora bien, los inventores han puesto en evidencia el efecto repulsivo y tóxico del 3,5-diCQ y de algunos de sus derivados sobre diferentes especies de pulgones.

Sin embargo, el 3,5-diCQ y sus isómeros, además del 1,3-diCQ (o cinarina), aislado de la alcachofa, no están fácilmente disponibles comercialmente. Por lo tanto, estos compuestos deben ser extraídos de diferentes vegetales. Además de la alcachofa, se puede citar el café (EP0299107) y el girasol, en el que se ha descrito la sobreproducción de compuestos fenólicos y más particularmente de ácidos dicafeoilquínicos utilizando un elicitador biótico, el patógeno *Sclerotinia* (EP1671535).

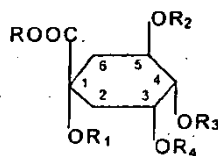
Otras fuentes de 3,5-diCQ y de sus derivados son las raíces de *Solidago altissima* (Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi, 2006, 13(3), 136-140), *Leontopodium alpinum* (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1993, vol. 21, páginas 217-232), *Echinacea angustifolia* (Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 2002, 10(2), 73-81), *Arcticum lappa* (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, vol. 43(10), páginas 2592-2595), *Ferula elaeochytris*

(Phytochemistry, 2008, vol. 69(17), páginas 2979-2983) y *Lychnophora ericoides* (Journal of Ethnopharmacology, 2005, vol. 96(3), páginas 545-549).

Existe por lo tanto una necesidad importante de desarrollar unos procedimientos de obtención de 3,5-diCQ y de sus derivados fáciles de realizar y que presenten un alto rendimiento.

Los inventores han buscado por lo tanto purificar esta molécula en cantidad suficiente. El aislamiento de 3,5-diCQ y sus derivados a partir del melocotonero no parecía satisfactorio debido a contenidos relativamente bajos de la sustancia y de la presencia de numerosos compuestos fenólicos que pueden obstaculizar la purificación (figura 1). Sin embargo, la *Ipomoea batatas* (convolvuláceas), cuya composición fenólica se ha estudiado en particular en el tubérculo comestible (batata) y las hojas por equipos japoneses (Islam *et al.*, (2002) Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 371-8-3722; Islam *et al.* (2003) Journal of Food Science 68: 111-116), demostró ser una fuente prometedora. Las raíces no tuberizadas de *Ipomoea batatas* han mostrado un contenido importante en 3,5-diCQ (aproximadamente 15 mg por g de materia seca) y un bajo contenido en formas isómeras contaminantes (figura 2). Estos contenidos son particularmente importantes en condiciones de carencia mineral, en particular en nitrógeno, y de cultivo de raíces en la luz. Los contenidos pueden alcanzar 90 mg por g de materia seca en cultivo sobre agua destilada a la luz.

Asimismo, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de compuestos de fórmula (I)



en la que

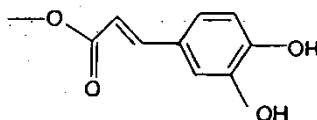
- R representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,
- R₁, R₂ y R₄ representan, cada uno independientemente unos de otros, un átomo de hidrógeno o un grupo cafeoil, y
- R₃ representa un hidrógeno, un grupo cafeoil o un grupo succinilo, con la condición de que por lo menos dos de entre R₁ a R₄ representen un grupo cafeoil, y que R₃ represente un grupo succinilo sólo si R₂ y R₄ representan un grupo cafeoil,

a partir de raíces no tuberizadas que comprenden las etapas siguientes:

- a) recogida de las raíces no tuberizadas o recuperación del exudado radicular,
- b) extracción por uno o varios disolventes orgánicos de los compuestos fenólicos,
- c) recuperación del extracto bruto,
- d) purificación eventual de dicho extracto obtenido en la etapa c),
- e) opcionalmente, isomerización espontánea de dichos extractos en condición de pH alcalino, pudiendo dichos compuestos de fórmula (I) estar en forma de regio- o estereoisómeros, o sus mezclas, siendo las raíces no tuberizadas procedentes de plantas del género *Ipomoea* (convolvuláceas) o de los géneros de la misma familia *Argyreia*, *Calycobolus*, *Calystegia*, *Convolvulus*, *Dichondra*, *Erycibe*, *Evolvulus*, *Iseia*, *Jacquemontia*, *Maripa*, *Merremia*, *Mina*, *Operculina*, *Porana*, *Stictocardia*, o *Turbina*.

Se entiende por raíz no tuberizada una raíz de estructura normal, que excluye las partes que presentan un fenómeno de tuberización que se caracteriza por la acumulación de reservas y el aumento de la raíz y conduce a la formación de un tubérculo consumible. En el caso de *Ipomoea batatas*, el tubérculo consumible es habitualmente denominado batata.

Se entiende por grupo cafeoil el grupo representado por la fórmula siguiente



Estos compuestos son extraídos de la raíz no tuberizada de una planta del género *Ipomoea* (convolvuláceas) o de los géneros de la misma familia *Argyreia*, *Calycobolus*, *Calystegia*, *Convolvulus*, *Dichondra*, *Erycibe*, *Evolvulus*, *Iseia*, *Jacquemontia*, *Maripa*, *Merremia*, *Mina*, *Operculina*, *Porana*, *Stictocardia*, o *Turbina*. Además de *Ipomoea batatas*, el género *Ipomoea* comprende aproximadamente 500 especies, entre ellas las plantas ornamentales como la volubilis (*Ipomoea purpurea*) o de uso alimenticio como el KangKong o la enredadera de agua (*Ipomoea aquatica*), consumida en Asia. El género *Convolvulus* comprende aproximadamente 250 especies, entre ellas la enredadera de campos (*Convolvulus arvensis*) y la dondiego de día (*Convolvulus tricolor*). El género *Calystegia* comprende aproximadamente 25 especies, entre ellas la enredadera de los setos (*Calystegia sepia*) y la enredadera de los bosques (*Calystegia silvático*).

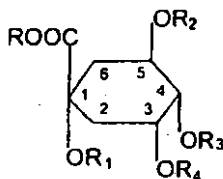
Particularmente, el ácido 3,5-dicafeoilquínico y sus derivados son extraídos de las raíces no tuberizadas de una planta seleccionada de entre el grupo que comprende la batata (*Ipomoea batatas*), la volubilis (*Ipomoea purpurea*), la enredadera de agua (*Ipomoea aquatica*), la volubilis de los jardines (*Ipomoea indica*), la Ipomea Scarlett O'Hara (*Ipomoea ril*) y la enredadera de los setos (*Calystegi sepium*).

En un modo ventajoso de realización del procedimiento de la invención, el ácido 3,5-dicafeoilquínico y sus derivados son extraídos de las raíces no tuberizadas de *Ipomea batatas*.

Las raíces no tuberizadas de *Ipomea batatas* pueden ser producidas a partir de siembras, de esquejes, de acodos o de tubérculos, cultivadas en cultivo hidropónico según la técnica descrita en la solicitud internacional EO 01/33942, sobre un sustrato horticola o en campo abierto, ventajosamente en condición de carencia mineral. Se pueden cosechar en cuanto su cantidad es suficiente para proceder a una extracción del 3,5-diCQ.

Ventajosamente, las raíces no tuberizadas son producidas por cultivo en un medio líquido, a la luz y en situación de carencia minera.

En un modo ventajoso de la invención, los compuestos de fórmula (I),



que son preparados, se seleccionan de entre el ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQ), las diferentes formas isómeras de 3,5-diCQ, en particular la cinarina (1,3-diCQ), el ácido 1,5-dicafeoilquínico (1,5-diCQ), el ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQ) y el ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQ), sus análogos triacilados como el ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (3,4,5-triCQ), sus análogos metilados como el 3,5-dicafeoilquinato de metilo, el 3,4-dicafeoilquinato de metilo, el 4,5-dicafeoilquinato de metilo, el ácido 4-succinil-3,5-dicafeoilquínico.

En un modo de realización particularmente ventajoso de la invención, el procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula (I), en particular del ácido 3,5-dicafeoilquínico comprende las etapas siguientes:

- a) recogida de las raíces de *Ipomoea batatas*, procedentes de tubérculos, esquejes, siembras o acodos,
- b) congelación en nitrógeno líquido de las raíces recogidas en la etapa a),
- c) liofilización de las raíces congeladas en la etapa b),
- d) trituración en nitrógeno líquido de las raíces liofilizadas y después liofilización para obtener un polvo seco,
- e) extracción de los compuestos fenólicos por un disolvente orgánico en 1 a 4 veces, por agitación en frío,
- f) aclarado del último residuo de la etapa e) por el mismo disolvente orgánico que el utilizado en la etapa e) y después evaporación del disolvente presente en el extracto hasta la obtención de una fase acuosa,
- g) opcionalmente, extracción líquido/líquido volumen a volumen por un disolvente apolar, mediante varias extracciones sucesivas después de la adición de una sal y de un ácido en la fase acuosa para facilitar la extracción de diCQ en el disolvente apolar,
- h) concentración en seco de la fase acuosa obtenida en la etapa f) o de la fase orgánica obtenida en la etapa opcional g) después de la adición de un agente de secado para eliminar el agua residual y filtración, después recogida del residuo seco por un disolvente orgánico,

- i) separación por CLHP semi-preparativa en fase inversa y recogida de la fracción que contiene el 3,5-diCQ,
- j) concentración de la fracción obtenida en la etapa i) hasta la obtención de una fase acuosa,
- k) extracción líquido/líquido por un disolvente orgánico (volumen a volumen) mediante varias extracciones sucesivas después de la adición de una sal, en la fase acuosa para facilitar la extracción en el disolvente apolar de 3,5-diCQ,
- l) concentración en seco de la fase orgánica, después de la adición de un agente de secado, y filtración para eliminar el agua residual, y recogida por un disolvente orgánico,
- m) precipitación en frío de la molécula por adición de agua (por lo menos 3 volúmenes para 1 volumen de disolvente orgánico utilizado en la etapa anterior), congelación del extracto en nitrógeno líquido y liofilización para obtener la molécula en forma de polvo seco.

En un modo de realización ventajoso de la invención, los disolventes orgánicos utilizados en la etapa e) son los clásicamente utilizados en la extracción de las plantas; se seleccionan en particular de entre el grupo que comprende etanol, metanol y acetona, pudiendo estos disolventes ser mezclados con agua, como por ejemplo el etanol al 70% utilizado en el ejemplo 1.

En un modo de realización particularmente ventajoso de la invención, la etapa g) se realiza por extracción mediante acetato de etilo o el dietiléter (volumen a volumen) después de la adición de NaCl o de sulfato de amonio (del 8% de saturación) y de ácido metafosfórico al 1-2% peso/volumen final), según unos protocolos adaptados de Macheix (1974) Thèse Doctorat Sciences Naturelles, Université Paris, VI, 168 p.

Las etapas de evaporación de los disolventes son realizadas mediante cualquier técnica clásicamente utilizada, en particular con la ayuda de un evaporador rotativo, y el agente de secado utilizado en las etapas h) y l) es ventajosamente un sulfato de sodio anhidro.

El disolvente orgánico utilizado en la etapa h) es generalmente el utilizado para la cromatografía semi-preparativa de la etapa i) y es ventajosamente metanol de pureza CLHP.

La cromatografía semi-preparativa de la etapa i) se realiza ventajosamente sobre una columna C18 mediante un gradiente de agua acidificada con pH 2,6/metanol.

El procedimiento según la invención permite obtener el ácido 3,5-dicafeoilquinico con una pureza superior al 90%, ventajosamente comprendida entre el 93 y el 95%. Las sustancias contaminantes son esencialmente unos isómeros de 3,5-diCQ.

En un modo de realización ventajoso de la invención, para conservar mejor durante la extracción las formas isómeras nativas presentes inicialmente en los tejidos vegetales, el conjunto de las etapas a) a m) se realiza en frío, preferentemente a una temperatura comprendida entre 3 y 5°C, protegido de una exposición prolongada a la luz y el pH ácido de los disolventes acuosos está preferentemente comprendido entre 5,0 y 6,0.

Los ácidos 3,4-dicafeoilquinico (3,4-diCQ) y 4,5-dicafeoilquinico (4,5-diCQ) pueden ser fácilmente producidos a partir del ácido 3,5-dicafeoilquinico por isomerización espontánea en condición de pH alcalino. Así, la isomerización del 3,5-diCQ puede realizarse en un tampón Tris-HCl (50 mM) de pH 8,5 durante 2 horas a 40°C según un método adaptado de Hanson (1965) Biochemistry 4: 2719-2731, y Moller y Herrmann (1982) Journal of Chromatography 241: 371-379. En estas condiciones, las tres formas isoméricas están presentes en contenidos comparables y pueden ser separadas por CLHP semi-preparativa según un protocolo idéntico al descrito anteriormente para la purificación del 3,5-diCQ.

La presente invención tiene también por objeto la utilización de por lo menos un compuesto de fórmula (I) o de su mezcla para luchar contra los pulgones.

Según la invención, los compuestos de fórmula (I) son utilizados en forma de composición que comprende una cantidad eficaz de dichos compuestos.

En el sentido de composición que comprende una cantidad eficaz de por lo menos un compuesto seleccionado de entre el ácido 3,5-dicafeoilquinico (3,5-diCQ), las diferentes formas isoméricas de 3,5-diCQ, en particular la cinarina (1,3-diCQ), el ácido 1,5-dicafeoilquinico (1,5-diCQ), el ácido 3,4-dicafeoilquinico (3,4-diCQ) y el ácido 4,5-dicafeoilquinico (4,5-diCQ), sus análogos triacilados como el ácido 3,4,5-tricafeoilquinico (3,4,5-triCQ), sus análogos metilados como el 3,5-dicafeoilquinico de metilo, el ácido 4-succinil-3,5-dicafeoilquinico, se entienden bien unos extractos brutos, o bien unos extractos purificados, pudiendo dichos extractos estar en forma líquida o sólida, o bien cualquier preparación que contiene dichos extractos.

En un modo de realización ventajoso de la invención, la mezcla preferida es la mezcla de 3,5-diCQ, 3,4-diCQ y 4,5-diCQ.

5 Las composiciones utilizadas en el procedimiento según la invención comprenden por lo menos un ácido dicafeoilquínico, sus análogos triacilados, sus análogos metilados, el ácido 4-succinil-3,5-dicafeoilquínico o una mezcla de estos a una concentración comprendida entre 0,01 y 5 mM, ventajosamente entre 0,1 y 2 mM, más ventajosamente entre 0,25 y 1 mM.

10 En un modo de realización ventajoso de la invención, los pulgones se seleccionan de entre el grupo que comprende *Myzus persicae* (pulgón verde del melocotonero), *Myzus varians* (pulgón cigarrero del melocotonero), *Myzus cerasi* (pulgón negro del cerezo), *Brachycaudus persicae* (pulgón negro del melocotonero), *Aphis pomi* (pulgón verde no migratorio del manzano), *Brachycaudus helichrysi* (pulgón verde del ciruelo), *Hyalopterus pruni* (pulgón harinoso del ciruelo), *Dysaphis plantaginea* (pulgón ceniciento del manzano), *Dysaphis pyri*, pulgón ceniciento (o malva) del peral), *Aphis gossypii* (pulgón del algodón o del melón), *Acyrtosiphum pisum* (pulgón del guisante), *Macrosiphum euphorbiae* (pulgón rosa y verde de la patata), *Aphis spiraecola* (*A. citricola*) (pulgón verde de los cítricos), *Aphis fabae* (pulgón negro del haba), *Rhopalosiphum maidis* (pulgón verde del maíz), *Rhopalosiphum padi* (pulgón del racimo de cerezo silvestre), *Sitobion avenae* (Pulgón de las espigas de cereales), *Diuraphis noxia* (pulgón ruso del trigo), *Brevicoryne brassicae* (pulgón ceniciento de la col), *Eriosoma lanigerum* (pulgón lanífero del manzano), *Nasonovia ribisnigri* (pulgón de la lechuga), *Amphorophora idaei* (pulgón del frambueso), *Toxoptera aurantii* (pulgón negro de los cítricos y pulgón del cafeto), *Elatobium abietinum* (pulgón verde de la picea) y *Pemphigus bursarius* (pulgón de la lechuga).

25 En un modo de realización particularmente ventajoso de la invención, el pulgón es *Myzus persicae* (pulgón verde del melocotonero).

Las composiciones utilizadas en el procedimiento según la invención se aplican sobre los pulgones o sobre un sitio habitado por dichos pulgones.

30 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de lucha contra el pulgón que comprende la aplicación de por lo menos un compuesto de fórmula (I) o su mezcla sobre los pulgones o sobre un sitio habitado por dichos pulgones.

Los ejemplos 1 a 6 y las figuras 1 a 24 siguientes ilustran la invención.

35 La figura 1 representa el cromatograma CLHP de 330 nm de un extracto de ápice de melocotonero (5 CQ: ácido 5-cafeoilquínico o ácido clorogénico, precursor metabólico del 3,5-diCQ). Los picos a, b y c representan respectivamente el ácido clorogénico, el control interno y el 3,5-diCQ. Cadena de análisis CLHP KONTRON: 2 micro bombas 420, inyector-pasador de muestras 460, detector UV doble longitud de onda 430. Pilotaje y adquisición por programa DIAMIR. Columna MERCK LiChro CART 250-4 - Superspher 100 RP18 endcapped, longitud 250 mm, diámetro 4 mm, colocada en un horno termostataado a 30°C. Fase móvil: disolvente A: agua ultrapura acidificada a pH 2,6 con el ácido ortofosfórico, disolvente B: metanol de calidad CLHP. Inyección: 10 µl de extracto solubilizado en metanol, filtrado sobre membrana PTFE 0,45 µm, detección a 330 y 280 nm.

45 El gradiente de elución es el siguiente:

	Tiempo (min)	Caudal ml/min.	% A	% B
Adquisición	0,00	0,5	97	3
	5,00	0,5	97	3
	13,00	0,5	92	8
	23,00	0,5	88	12
	30,00	0,5	88	12
	33,00	0,5	87	13
	38,00	0,5	87	13
	40,00	0,5	86	14
	46,00	0,5	86	14
	50,00	0,5	84	16
	55,00	0,5	84	16
	57,00	0,5	83	17
	67,00	0,5	83	17
	82,00	0,5	81	19
	87,00	0,5	79	21
	95,00	0,5	79	21
	105,00	0,5	77	23
	107,00	0,5	77	23

	Tiempo (min)	Caudal ml/min.	% A	% B
	109,00	0,7	77	23
	115,00	0,7	77	23
	170,00	0,7	40	60
	171,00	0,7	40	60
	173,00	0,5	40	60
	175,00	0,5	40	60
Aclarado	180,00	0,5	97	3
	210,00	0,5	97	3

En estas condiciones, el tiempo de retención del 3,5-diCQ es de aproximadamente 142 minutos.

La figura 2 representa diferentes cromatogramas CLHP de algunos extractos.

5

La figura 2A representa el cromatograma CLHP de 330 nm de un extracto de raíces de *Ipomoea batatas* no tuberizadas (5 CQ: ácido 5-cafeoilquínico o ácido clorogénico). Las condiciones CLHP son idénticas a las de la figura 1. Los picos a, b y c representan respectivamente el ácido clorogénico, el control interno y el 3,5-diCQ.

10

La figura 2B representa el cromatograma CLHP de 280 nm de un extracto de raíces de *Ipomoea aquatica* no tuberizadas. Las condiciones CLHP son idénticas a las de la figura 1. Los picos a, b, c y d representan respectivamente el ácido clorogénico, el control interno, el 3,4-diCQ y el 3,5-diCQ.

15

La figura 2C representa el cromatograma CLHP de 280 nm de un extracto de raíces de *Ipomoea indica* no tuberizadas. Las condiciones CLHP son idénticas a las de la figura 1. Los picos a, b y c representan respectivamente el ácido clorogénico, el control interno y el 3,5-diCQ.

20

La figura 2D representa el cromatograma CLHP de 280 nm de un extracto de raíces de *Calystegia sepium* no tuberizadas. Las condiciones CLHP son idénticas a las de la figura 1. Los picos a, b, c, d y e representan respectivamente el ácido clorogénico, el control interno, el 3,4-diCQ, el 3,5-diCQ y el 4,5-diCQ.

25

La figura 2E representa el cromatograma CLHP de 280 nm de un extracto de raíces de *Ipomoea nil* variedad "Scarlett O'hara" no tuberizadas. Las condiciones CLHP son idénticas a las de la figura 1. Los picos a, b y c representan respectivamente el ácido clorogénico, el control interno y el 3,5-diCQ.

30

La figura 3 representa el cromatograma CLHP de 330 nm del 3,5-diCQ purificado de raíces de *Ipomoea batatas* no tuberizadas. 3,4-diCQ, a y b son unos isómeros de 3,5-diCQ. Cadena de análisis CLHP KONTRON: 2 micro bombas 420, inyector-pasador de muestras 460, detector UV doble longitud de onda 430. Pilotaje y adquisición por programa DIAMIR. Columna MERCK LiChro CART 250-4 - Superspher 100 RP18 endcapped, longitud 250 mm, diámetro 4 mm, colocada en un horno termostatao a 30°C. Fase móvil: disolvente A: agua ultrapura acidificada a pH 2,6 con el ácido ortofosfórico, disolvente B: metanol de calidad CLHP. Inyección: 10 µl de extracto solubilizado en metanol, filtrado sobre membrana PTFE 0,45 µm, detección a 330 y 280 nm.

35

Gradiente de elución:

	Tiempo (min.)	Caudal ml/min.	%A	% B
Adquisición	0,00	0,7	65	35
	1,00	0,7	65	35
	23,00	0,7	62	38
	30,00	0,7	62	38
	35,00	0,7	0	100
Equilibración	40,00	0,7	0	100
	41,00	0,7	65	35
	51,00	0,7	65	35

En estas condiciones, el 3,5-diCQ es eluido a un tiempo de 18 a 20 minutos.

40

La figura 4 ilustra la influencia de las condiciones de cultivo sobre la cantidad de materia seca radicular producida (MS), el contenido en 3,5-diCQ de las raíces y la cantidad por esquejes de 3,5-diCQ producida en las raíces después de 4 semanas de cultivo (media de 5 esquejes) (ejemplo 2, experimento A).

45

La figura 5 representa la influencia de las condiciones de cultivo sobre (A) la cantidad de materia seca radicular producida, (B) el contenido en 3,5-diCQ de las raíces y (C) la cantidad por esquejes de 3,5-diCQ radicular producida después de 4 semanas de cultivo (media de 5 esquejes). Las condiciones de cultivo de los esquejes son indicadas en la tabla I del ejemplo 2 (experimento A). Las barras verticales representan la desviación típica. Las medias seguidas de una misma letra no son significativamente diferentes al límite del 5% (ensayo de Tukey).

La figura 6 ilustra la influencia de las condiciones de carencia mineral (nitrogenada y fosfatada) sobre la cantidad de materia seca radicular producida, el contenido en 3,5-diCQ de las raíces y la cantidad por esqueje de 3,5-diCQ producida en las raíces después de 3 semanas de cultivo (media de 3 esquejes) (ejemplo 2, experimento B).

La figura 7 representa la influencia de las condiciones de carencia mineral (nitrogenada y fosfatada) sobre (A) la cantidad de materia seca radicular producida, (B) el contenido en 3,5-diCQ de las raíces y (C) la cantidad por esqueje de 3,5-diCQ de radicular producida después de 3 semanas de cultivo (media de 3 esquejes) (experimento B). Las condiciones de cultivo de los esquejes son indicadas en la tabla II del ejemplo 2. Las barras verticales representan la desviación típica. Las medias seguidas de una misma letra no son significativamente diferentes al límite del 5% (ensayo de Tukey).

La figura 8 ilustra el desarrollo de un sistema de producción de raíces por acodadura. Representa la influencia de los medios de esquejado y de acodadura sobre la cantidad de materia seca producida, el contenido en 3,5-diCQ y la cantidad por plantas de 3,5-diCQ de raíces procedentes de esquejes (4 semanas de cultivo) y de acodaduras (2 semanas de cultivo) (media de 3 esquejes).

La figura 9 ilustra el desarrollo de un sistema de producción de raíces por acodadura. Representa la influencia de los medios de esquejado y de acodadura sobre (A) la cantidad de materia seca producida, (B) el contenido en 3,5-diCQ y (C) la cantidad por plantas de 3,5-diCQ de raíces procedentes de esquejes (4 semanas de cultivo) y de acodaduras (2 semanas de cultivo) (media de 3 esquejes). Las condiciones de cultivo de las plantas son indicadas en la tabla IV del ejemplo 3. Los medios de cultivo son el agua destilada o la solución mineral completa con 6 mM de nitrógeno (composición en la tabla III del ejemplo 2). Las barras verticales representan la desviación típica. Las medias seguidas de una misma letra no son significativamente diferentes al límite del 5% (ensayo de Tukey).

La figura 10 da la composición del medio de base denominado Ap3 utilizado en los ejemplos 2 y 3.

La figura 11 ilustra el dispositivo utilizado para evaluar el comportamiento de larvas de pulgón en condición de elección entre dos medios de composición diferente (Chen, (1996), Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées, Lyon, Francia: 158 p).

La figura 12 ilustra el índice de fagoestimulación frente a *Myzus persicae*, del ácido clorogénico (A), del ácido para-cumárico (B), del ácido cafeico (C), de la cinarina (D), del metiléster del ácido cafeico (E) y del ácido 3,5-dicafeoilquinico (F) disuelto a diferentes concentraciones en el medio de referencia Ap3 y ensayados contra el medio Ap3 (ensayo de elección). El efecto repulsivo (índice de fagoestimulación negativa) es significativo para los puntos experimentales acompañados de un asterisco ($P < 0,05$), de dos ($P < 0,01$) o de tres ($P < 0,001$) (ensayo de rangos de Wilcoxon). La dosis de 0 mM corresponde al medio control Ap3.

La figura 13 ilustra el índice de fagoestimulación del ácido 3,5-dicafeoilquinico (3,5-diCQ) y de su precursor el ácido clorogénico (AC) frente a *Myzus persicae*, ensayados contra el medio control Ap3 o el uno contra el otro. El efecto repulsivo (índice negativo) es significativo para los puntos experimentales acompañados de un asterisco ($P < 0,05$), de dos ($P < 0,01$) o de tres ($P < 0,001$) (ensayo de rangos de Wilcoxon). La concentración 0 mM (cuadrado negro) corresponde al medio control Ap3.

La figura 14 ilustra el índice de fagoestimulación del ácido 3,5-dicafeoilquinico (3,5-DiCQ) con 0,5 mM contra unas molaridades decrecientes de su precursor el ácido clorogénico (AC) frente a *Myzus persicae*. El efecto repulsivo (índice negativo) es significativo para los puntos experimentales acompañados de un asterisco ($P < 0,05$), de dos ($P < 0,01$) o de tres ($P < 0,001$) (ensayo de rangos de Wilcoxon).

La figura 15 ilustra el efecto fagorepulsivo sobre *M. persicae* del ácido 3,5-dicafeoilquinico (3,5-diCQ) (A), del isómero 4,5-diCQ (B) y de la mezcla 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ (C) con respecto al medio control Ap3. Para la mezcla de isómeros, la dosis indica el contenido total en diCQ. El efecto repulsivo (índice de fagoestimulación negativa) es significativo para los puntos experimentales acompañados de un asterisco ($P < 0,05$), de dos ($P < 0,01$) o de tres ($P < 0,001$). La dosis 0 corresponde al medio Ap3.

La figura 16 ilustra la mortalidad larvaria acumulada de *Myzus persicae* obtenida durante unos ensayos de evaluación de la toxicidad del ácido 3,5-dicafeoilquinico (3,5-diCQ), de su precursor el ácido clorogénico (AC), del medio control Ap3 y del extracto control obtenido a partir de los disolventes y aditivos utilizados para la purificación del 3,5-diCQ. El medio Ap3 se ajusta a pH 7,5.

La figura 17 ilustra el peso de los adultos ápteros (media + 1 desviación típica) de *Myzus persicae* elevados sobre el medio control Ap3, sobre el extracto control obtenido a partir de los disolventes y aditivos utilizados para la purificación del 3,5-diCQ y sobre el ácido 3,5-dicafeoilquinico (3,5-diCQ). Las medias seguidas de una misma letra no son significativamente diferentes al límite del 5% (ensayo de Student-Newman-Keuls).

La figura 18 ilustra el peso de los adultos ápteros (media + 1 desviación típica) de *Myzus persicae* elevados sobre el

medio control Ap3 y sobre el ácido clorogénico. Las medias seguidas de una misma letra no son significativamente diferentes al límite del 5% (ensayo de Student-Newman-Keuls).

La figura 19 ilustra la mortalidad diaria acumulada observada durante el desarrollo larvario de *Myzus persicae* (7 días) en presencia de ácido 3,5-dicafeoilquinico, de dos de sus isómeros (4,5-diCQ, 1,5-diCQ) y de la mezcla 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ. El intervalo de concentración de la sustancia ensayada varía de 0,03125 mM a 1 mM. La dosis 0 corresponde al medio control Ap3 sólo.

La figura 20 ilustra el peso medio (media $\pm$ 1 desviación típica) de un pulgón que ha llegado al estado adulto áptero al final del desarrollo larvario sobre un medio nutritivo Ap3 suplementado o no por el ácido 3,5-dicafeoilquinico, sus isómeros (4,5-diCQ, 1,5-diCQ) y la mezcla 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ. Las medias seguidas de una misma letra no son significativamente diferentes al límite del 5% (ensayo de Bonferroni/Dunn).

La figura 21 ilustra el efecto fagorepusivo del ácido 3,5-dicafeoilquinico frente a *Acyrtosiphon pisum*. El efecto repulsivo (índice de fagoestimulación negativa) es significativo para los puntos experimentales acompañados de un asterisco ($P < 0,05$), de dos ($P < 0,01$) o de tres ($P < 0,001$). La dosis 0 corresponde al medio control Ap3.

La figura 22 ilustra la mortalidad diaria acumulada observada durante el desarrollo larvario de *Acyrtosiphon pisum* en presencia de ácido 3,5-dicafeoilquinico. El intervalo de concentración en 3,5-diCQ varía de 0,03125 mM a 1 mM. La dosis 0 corresponde al medio control Ap3 sólo.

La figura 23 ilustra el efecto fagorepusivo del ácido 3,5-dicafeoilquinico frente a *Macrosiphum euphorbiae*. El efecto repulsivo (índice de fagoestimulación negativa) es significativo para los puntos experimentales acompañados de un asterisco ($P < 0,05$), de dos ($P < 0,01$) o de tres ($P < 0,001$). La dosis 0 corresponde al medio control Ap3.

La figura 24 ilustra la mortalidad diaria acumulada observada durante el desarrollo larvario de *M euphorbiae* en presencia de ácido 3,5-dicafeoilquinico. El intervalo de concentración en 3,5-diCQ varía de 0,03125 mM a 1 mM. La dosis 0 corresponde al medio control Ap3 sólo.

Ejemplo 1: Extracción del ácido 3,5-diCQ de la raíz no tuberizada de *Ipomoea batatas*

Se cultivaron unos tubérculos de batata (*Ipomoea batatas*) compradas en el comercio. El soporte de cultivo está constituido de un recipiente con una capacidad de 1,5 l aproximadamente, protegido de la luz. Los recipientes son llenados de agua destilada y los tubérculos son sumergidos al 80%. El cultivo se realiza en laboratorio con luz natural.

Las raíces no tuberizadas formadas por los tubérculos son recogidas aproximadamente 7 meses después de ser cultivadas, congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y liofilizadas. Las raíces son después trituradas en un mortero enfriado por nitrógeno líquido y después de nuevo liofilizadas para obtener un polvo seco. Este polvo se conserva a -20°C .

Se extraen 10 g de polvo seco tres veces con etanol al 70% con, en cada extracción, homogeneización con ultraturrax del polvo o del residuo en aproximadamente de 80 ml de disolvente, seguido de agitación durante 15 minutos en cámara fría (4°C) y filtración sobre vidrio sinterizado. Tras la última extracción, se aclara el residuo con 60 ml de etanol al 70%. El volumen total del extracto hidroalcohólico es por lo tanto de aproximadamente 300 ml. Se evapora el etanol con la ayuda de un evaporador rotativo para obtener una fase acuosa de 10 a 20 ml completada por agua destilada hasta un volumen de 50 ml. Se extrae esta fase acuosa con 100 ml de acetato de etilo después de la adición de cloruro de sodio (8%, peso/volumen final de la fase acuosa = 100 ml) y de ácido metafosfórico (1% peso/volumen final de la fase acuosa). Se realizan 4 extracciones sucesivas, se secan las trazas de agua residuales por adición en la fase orgánica de algunos mg de sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración sobre algodón de vidrio, se evapora en seco la fase orgánica en un evaporador rotativo y se recoge el residuo mediante 8 ml de metanol de calidad CLHP. Se filtra sobre membrana PTFE 0,45 μm . Se separa el 3,5-diCQ mediante 15 cromatografías sucesivas sobre una cadena CLHP semi-preparativa WATERS® 600 (disolventes: agua ultrapura acidificada a pH 2,6 por el ácido o-fosfórico (disolvente A) y metanol CLHP (disolvente B)) sobre una columna INTERCHIM (longitud de 250 mm; diámetro de 21,2 mm) llena de una fase estacionaria C18 Uptisphere 10 μm y termostata a 30°C . El caudal del sistema es de 18 ml/min. El volumen inyectado es de 500 μl . El gradiente utilizado es el siguiente: 0 min: 35% B; 10 min: 35% B; 23 min: 38% B; 33 min: 38% B. Se recoge el 3,5-diCQ en la fase móvil aproximadamente 25 minutos después de la inyección. Se reducen las fracciones recogidas por concentración con la ayuda de un evaporador rotativo hasta la obtención de una fase acuosa de 70 ml aproximadamente. Se ajusta a 100 ml con agua destilada y se extrae 3 veces con 200 ml de acetato de etilo después de la adición de cloruro de sodio (10% peso/volumen final de la fase acuosa = 200 ml). Se seca la fase orgánica por adición de algunos mg de sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración sobre algodón de vidrio, se evapora el acetato de etilo en seco y después se recoge el residuo en 10 ml de metanol. Se filtra sobre membrana PTFE 0,45 μm . Se añaden 30 ml de agua ultrapura fría para hacer precipitar la molécula, se congela en nitrógeno líquido y se liofiliza.

Se obtienen 91,9 mg de polvo blanco anhidro que contiene aproximadamente el 93% de 3,5-diCQ y el 7% de formas isoméricas (figura 3, cromatograma de control de pureza de la sustancia obtenida sobre cadena CLHP analítica).

Ejemplo 2: Condiciones de cultivo favorables a la producción de ácidos dicafeolquínicos en las raíces de *Ipomoea batatas*

2.1. Material y método

Se han realizado dos experimentos sucesivos (A y B) sobre una variedad de la batata de carne roja que proviene de Guadalupe (clon IbD) cultivada en contenedores de 7 l bajo túnel aislado de los insectos en Avignon. Se han extraídos unos esquejes de 40 a 50 cm de longitud, constituidos por el extremo de los tallos en crecimiento, deshojados en la parte basal para evitar el contacto de las hojas con el medio de cultivo, y colocados en unos recipientes de plástico transparente, de una capacidad de 1,25 l aproximadamente, llenos de los diferentes medios y sustratos de cultivo ensayados, y protegidos o no de la luz por una hoja de aluminio. Los recipientes que contienen un sustrato sólido están perforados en la base a fin de permitir el drenaje del medio aportado. Al desarrollarse las raíces a nivel de los nudos del tallo, un número igual de nudos de la base del esqueje se ha colocado en el medio de cultivo.

El experimento A ha permitido ensayar la influencia de tres factores diferentes sobre la producción de raíces y su contenido en 3,5-diCQ: la naturaleza del sustrato de cultivo, aireado o no (perlita o medio líquido), el efecto de la luz (cultivo de las raíces en la oscuridad o en la luz), y la influencia de la composición mineral del medio de cultivo (medio completo, medio carente de nitrógeno o agua destilada). Las diferentes condiciones de cultivo comparadas en el experimento A son ilustradas en la tabla I.

TABLA I

Condición	Medio de cultivo	Aportes nutritivos	Aporte de nitrógeno	Iluminación de las raíces
A	líquido	Agua destilada	0 mM	Oscuridad
B	líquido	Agua destilada	0 mM	Luz
C	líquido	Solución nutritiva	0,05 mM	Oscuridad
D	líquido	Solución nutritiva	6 mM	Oscuridad
E	perlita	Agua destilada	0 mM	Oscuridad
F	perlita	Solución nutritiva	6 mM	Oscuridad

El experimento B ha permitido comparar la influencia respectiva de las carencias totales en nitrógeno y en fosfato sobre la producción de raíces y su contenido en 3,5-diCQ. Las diferentes condiciones de cultivos comparadas en el experimento B son ilustradas en la tabla II.

TABLA II

Condición	Medio de cultivo	Aportes nutritivos	Aporte de nitrógeno	Aporte de fósforo	Iluminación de las raíces
E	líquido	Agua destilada	0 mM	0 mM	Oscuridad
F	líquido	Solución nutritiva	6 mM	1 mM	Oscuridad
G	líquido	Solución nutritiva	0 mM	1 mM	Oscuridad
H	líquido	Solución nutritiva	6 mM	0 mM	Oscuridad

Se han establecido 5 y 3 repeticiones por condición respectivamente para los experimentos A y B. Las plantas dispuestas de manera aleatoria se han cultivado en un recinto climatizado a una temperatura de 25°C y bajo un fotoperiodo de 16 horas de día y 8 horas de noche. El volumen de medio líquido es completado regularmente al nivel inicial y las plantas cultivadas sobre sustrato sólido se riegan frecuentemente con la solución de cultivo. Las raíces formadas han sido recogidas al final de cuatro semanas (experimento A) o tres semanas (experimento B) de cultivo, pesadas, colocadas en nitrógeno líquido, liofilizadas, trituradas en nitrógeno líquido y después liofilizadas de nuevo. Los polvos obtenidos se han analizado por CLHP para su contenido en compuestos fenólicos después de la extracción en el disolvente etanol/agua (70/30, v a v), evaporación en seco, recogida del extracto seco en el metanol y filtración.

En los dos experimentos, la solución nutritiva aportada es una solución nutritiva completa que comprende macro y micro-elementos, de los cuales se da la composición en la tabla III. Los contenidos en nitrógeno, aportado exclusivamente en forma de nitrato, y en fosfato varían según las situaciones de carencia estudiadas.

TABLA III

en mg (o µl) por L	Soluciones			
Producto	6 mM N*	0,05 mM N	0 N	0 P
K ₂ SO ₄	174	174	174	261

en mg (o µl) por L	Soluciones			
Producto	6 mM N*	0,05 mM N	0 N	0 P
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	708	6	0	708
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370	370	370	370
CaSO ₄ , 2H ₂ O	86	598	603	86
EDTA-Fe, 1H ₂ O	17	17	17	17
KH ₂ PC>4	136	136	136	0
Kanieltra 6 Fe (µl)	100	100	100	100

2.2. Resultados

Se dan en las figuras 4 a 7.

Los resultados del experimento A (figuras 4 y 5) muestran que las condiciones de cultivo ejercen una fuerte influencia sobre el contenido en 3,5-diCQ de las raíces.

Los contenidos máximos en 3,5-diCQ son observados en las raíces producidas en el agua destilada y a la luz (condición B) en las que superan el 9% de la materia seca. Los contenidos son mínimos en las raíces producidas sobre sustrato aireado de tipo perlita con una solución mineral completa (condición F). Sin embargo, estas continúan siendo elevadas, con aproximadamente el 1,5% de la materia seca, en estas condiciones de cultivo que comprende una solución mineral que contiene el nitrógeno únicamente en forma de nitrato. Los contenidos obtenidos en las otras condiciones de cultivo muestran que la producción de raíces en medio líquido y en situación de carencia nitrogenada tiende a aumentar los contenidos en 3,5-diCQ (figuras 4 y 5B).

La cantidad de raíces producidas a partir de los esquejes está también fuertemente afectada por las condiciones de cultivos. La cantidad de materia seca radicular en las condiciones de fertilización completa (condiciones D y F) es muy superior a la producida en las otras condiciones (figuras 4 y 5A). Esto conduce a una cantidad total de 3,5-diCQ producida por esqueje equivalente en las condiciones que permiten un fuerte contenido de 3,5-diCQ en las raíces pero que perjudica su crecimiento (condición A), y en las condiciones que dan un contenido más bajo de 3,5-diCQ, pero que permiten un crecimiento radicular fuerte (condiciones D y F) (figuras 4 y 5C).

Los resultados del experimento B (figuras 6 y 7) muestran que las condiciones de carencia mineral, nitrogenada o fosfatada, ejercen una influencia sobre el contenido en 3,5-diCQ de las raíces.

Como en el experimento A, los contenidos más fuertes en 3,5-diCQ son obtenidos en el cultivo en agua destilada y los más bajos en la solución mineral completa. En el cultivo en unas soluciones minerales carentes de nitrógeno o de fosfato los contenidos en 3,5-diCQ son intermedios (figuras 6 y 7B). Esto muestra que las condiciones de carencias en fosfato y en nitrógeno tienden la una y la otra a aumentar el contenido en 3,5-diCQ de las raíces con respecto a la condición de fertilización completa, pero de manera menos importante que la situación de carencia total en elementos minerales, en el agua destilada. A la inversa, estas condiciones de carencias nitrogenada y fosfatada limitan el crecimiento radicular con respecto a la solución mineral completa, de manera sin embargo menor que en el agua destilada (figuras 6 y 7A). Resulta que la cantidad de 3,5-diCQ producida en las raíces por esquejes es equivalente para todas las condiciones (figuras 6 y 7C).

2.3. Conclusión

Las condiciones de cultivo influyen fuertemente en el contenido en 3,5-diCQ de las raíces no tuberizadas de la batata *Ipomoea batatas*. El cultivo en un medio líquido, a la luz y en situación de carencia mineral, en particular nitrogenada y fosfatada, son unos factores que favorecen la acumulación del ácido 3,5-dicafeoilquínico en las raíces producidas por esquejes. Los contenidos máximos, superiores a 90 mg.g⁻¹ de materia seca, se han obtenido en raíces producidas en agua y a la luz. Estas condiciones de cultivo limitan fuertemente, sin embargo, la producción de las raíces obtenidas por esquejado de tallo. El cultivo de esquejes en una solución nutritiva completa que contiene nitrógeno en forma de nitrato únicamente, permite una producción de raíces más importante que presenta un contenido en 3,5-diCQ relativamente elevado, que varía de 20 a 25 mg.g⁻¹ de materia seca.

Ejemplo 3: Desarrollo de un sistema de producción de raíces por acodadura.

3.1. Material y métodos

Se han recogido unos tallos cuyo extremo está en crecimiento, de aproximadamente 110 cm de longitud, sobre el clon IbD de batata. Su base se ha deshojado sobre cuatro nudos, es decir una longitud de 20 cm aproximadamente, y se han puesto a esquejar en cámara climatizada en unos recipientes de 1,25 l aproximadamente, que contienen agua destilada o una solución mineral completa, y protegidos de la luz por una hoja de aluminio. La composición de las soluciones nutritivas utilizadas para la producción por esquejado de raíces de batata *Ipomoea batatas* es la ilustrada en la tabla III. Las plantas se cultivaron en un recinto climatizado a una temperatura de 25°C y bajo un

fotoperiodo de 16h de día y 8h de noche. El volumen de medio líquido se ha completado regularmente a nivel inicial. Después de 15 días de cultivo, las plantas han echado raíces y sirven de plantas madres para la producción de acodos. Para ello, en cada planta, se ha deshojado una porción de tallo de una decena de nudos y puesto en acodadura por inmersión en estos recipientes de 20 l aproximadamente, llenos de agua o de solución mineral y protegidos de la luz por una hoja de aluminio.

Se han establecido cuatro condiciones experimentales haciendo variar el medio de esquejado o de acodadura, agua o solución mineral completa. Estas condiciones experimentales son ilustradas en la tabla IV.

TABLA IV

Condición	Medio de esquejado (4 semanas de cultivo)	Medio de acodadura (2 semanas de cultivo)
A	Agua destilada	Agua destilada
B	Agua destilada	Medio nutritivo 6 mM de nitrógeno
C	Medio nutritivo 6 mM de nitrógeno	Medio nutritivo 6 mM de nitrógeno
D	Medio nutritivo 6 mM de nitrógeno	Agua destilada

Se han cultivado 3 plantas por condición. Las raíces se han recogido sobre la parte esquejada y sobre la parte acodada de cada planta 15 días después de la acodadura de los tallos, o bien 4 semanas después del esquejado.

Las raíces formadas han sido recogidas, pesadas, colocadas en nitrógeno líquido, liofilizadas, trituradas en nitrógeno líquido y después liofilizadas de nuevo. Los polvos obtenidos se han analizado por CLHP para su contenido en compuestos fenólicos después de la extracción en el disolvente etanol/agua (70/30, v a v), evaporación en seco, recogida del extracto seco en metanol y filtración.

3.2. Resultados

Estos se dan en las figuras 8 y 9.

Los resultados muestran claramente que el contenido en 3,5-diCQ depende del medio de cultivo utilizado localmente para la producción de las raíces, ya sea por esquejado o acodadura, y no está influenciado por la naturaleza del medio aportado para la producción del sistema radicular distante (figuras 8 y 9B).

Los contenidos medios de 3,5-diCQ de las raíces producidas en agua varían de 44,7 a 47,4 mg.g⁻¹ de materia seca en las raíces de esquejes y de 31,9 a 35,5 mg.g⁻¹ de materia seca en las raíces de acodos. Los contenidos medios en 3,5-diCQ de las raíces producidas en la solución mineral son tres veces más bajos. Varían de 15,5 a 16,2 mg.g⁻¹ de materia seca en las raíces de esquejes y de 10,2 a 11,6 mg.g⁻¹ de materia seca en las raíces de acodos.

La naturaleza del medio aportado localmente influye en la cantidad de materia seca producida (figura 8A). Sin embargo, de manera inesperada, parece también estar influenciada por el medio de cultivo utilizado para la producción de cultivo distante. En efecto, la cantidad media de raíces procedentes de esquejes producidas en la solución mineral (condición D) es significativamente superior cuando los acodos son efectuados en agua a la de los esquejes cuya parte acodada está en la solución mineral (condición C). Las cantidades medias totales de 3,5-diCQ producido en las raíces formadas por esquejes (31,1 mg.g⁻¹ de materia seca), por acodadura (26,2 mg.g⁻¹ de materia seca) y su suma (57,3 mg.g⁻¹ de materia seca) son las más elevadas en esta condición D (esquejado en la solución mineral y acodadura en agua).

3.3. Conclusión

El contenido en 3,5-diCQ de las raíces obtenidas por acodadura depende del medio de cultivo utilizado localmente para su producción y no está influenciado por las condiciones de cultivo de la planta madre. La acodadura en agua de plantas de batata normalmente fertilizadas permite la producción de raíces que presentan contenidos elevados en 3,5-diCQ. Este sistema permite conciliar un crecimiento importante de la planta madre por una alimentación mineral apropiada y la producción de raíces procedentes de acodos que presentan unos contenidos elevados en 3,5-diCQ. El interés de este sistema se ha validado en el cultivo exterior sobre dos clones de batata, cultivados en contenedor bajo túnel y normalmente fertilizados. Los tallos en acodadura en agua han producido en 15 días una masa radicular importante que presenta unos contenidos elevados en 3,5-diCQ (clon IbD: 32,7 mg.g⁻¹ materia seca; clon IbE: 40,4 mg.g⁻¹ materia seca).

Ejemplo 4: Medida de la repulsividad del 3,5-diCQ, de sus isómeros y de su mezcla frente al pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*)

4.1. Método de realización

El método utilizado es el desarrollado por Yvan Rahbé (Rahbé & Febvay (1993) Entomologia Experimentalis et

Applicata 67: 149-160; Chen (1996) Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées, Lyon, Francia: 158 p) en el ámbito de búsquedas sobre los determinantes químicos de la resistencia de las plantas a diversas especies de pulgones (*Aphis gossypii*, *Acyrtosiphon pisum*), y adaptado al pulgón verde *Myzus persicae*.

El objetivo es evaluar el carácter atractivo o repulsivo de una molécula candidata a diferentes concentraciones, bien con respecto a un medio de base control, o bien con respecto a otra sustancia. El medio de base utilizado, denominado Ap3 (composición en la tabla de la figura 10), se ha desarrollado en UMR INRA-INSA de Lyon para permitir un desarrollo óptimo de la especie de pulgón *Acyrtosiphon pisum* (Febvay *et al.* (1988) Canadian Journal of Zoology 66: 2149-2453). Permite asimismo el desarrollo de *Myzus persicae*. Este medio de base está suplementado o no por los diferentes ácidos fenólicos ensayados. El comportamiento de elección del pulgón, colocado en presencia de los dos medios, se estudia en un sistema cerrado en el que el insecto no tiene otra alternativa para alimentarse que elegir uno de los dos medios. El dispositivo se esquematiza en la figura 11.

El medio (35 µl) se vierte entre dos membranas de Parafilm® estiradas sobre un cono Eppendorf®. En una rejilla que comprende 6 jaulas experimentales, se dispone un medio control enfrente de un medio ensayado sobre cada jaula. Las repeticiones de una misma modalidad (medio control o medio ensayado) están dispuestas alternativamente a lo largo de la rejilla, para evitar cualquier sesgo sistemático durante el depósito de los pulgones. Seis larvas de pulgón (segundo o tercer grado) son depositadas al final del día en cada una de las jaulas de una rejilla. Las rejillas son introducidas después en una caja negra colocada en un recinto climático a 19°C durante 15 horas. Este paso a la oscuridad permite estabilizar más rápidamente la fijación de las larvas. A la mañana siguiente, se anota entonces el número de pulgones fijados sobre cada medio. Los ensayos son efectuados rutinariamente sobre 24 repeticiones de elección (comprendiendo 4 rejillas cada una de las 6 jaulas). Un índice de fagoestimulación, que representa el grado de apetencia para el pulgón del medio ensayado, se calcula de la siguiente manera:

Índice de fagoestimulación = (Nb ensayo - Nb control)/Nb total, en la que:

Nb ensayo = número de pulgones fijados en el medio ensayado,
Nb control = número de pulgones fijados en el medio control,
Nb total = número total de pulgones fijados.

Por construcción, el valor del índice está comprendido entre -1 y 1. Un índice negativo significa que el medio ensayado es repulsivo con respecto al medio control, y un índice positivo significa que el medio ensayado es atractivo. La hipótesis de que el efecto del medio ensayado es idéntico al del medio control se examina mediante el ensayo de los rangos de Wilcoxon.

Las sustancias fenólicas ensayadas, diferentes del 3,5-diCQ, tienen un origen comercial salvo el metiléster del ácido cafeico, que ha sido sintetizado. Las moléculas se han caracterizado por espectrometría de masa y resonancia magnética nuclear del protón. El contenido y la estabilidad de las moléculas disueltas son controlados por CLHP después de la disolución de las moléculas en el medio Ap3, al principio y al final del experimento.

4.2. Resultados

4.2.1. Efecto repulsivo del 3,5-diCQ

Éstos de dan en las figuras 12 a 14.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia un efecto repulsivo significativo del conjunto de los derivados cafeicos.

El 3,5-diCQ y el metiléster del ácido cafeico son los dos compuestos más repulsivos: tienen un efecto altamente significativo a partir de la más baja concentración (0,25 mM), mientras que los efectos del ácido clorogénico y de la cinarina son significativos sólo a partir de las concentraciones 0,5 mM y 1 mM respectivamente. El ácido paracumárico, que es una molécula fenólica mono-hidroxilada, no tiene ningún efecto repulsivo sobre *Myzus persicae* en el intervalo de concentración ensayado (figura 12). Se ha verificado igualmente que una solución control realizada con los disolventes y aditivos utilizados para la extracción y la purificación del 3,5-diCQ muestra un efecto repulsivo sólo a una concentración ampliamente superior a la utilizada durante la preparación de la molécula (datos no mostrados).

El 3,5-diCQ es significativamente repulsivo a partir de la concentración de 0,125 mM y el ácido clorogénico (AC) a 0,25 mM (figura 13). Para una misma molaridad, el pulgón elige sistemáticamente AC en lugar de 3,5-diCQ a partir de 0,125 mM. Se han obtenido unos resultados idénticos utilizando un medio Ap3 a pH 5,3, en el que las sustancias ensayadas no muestran ningún oscurecimiento, al contrario que en el medio Ap3 original ajustado a pH 7,5, en el que las sustancias cafeicas muestran un oscurecimiento importante (resultados no mostrados).

Cuando se hace variar la concentración de AC de 0,5 mM a 2 mM frente a 3,5-diCQ 0,5 mM, los resultados obtenidos muestran que el 3,5-diCQ con una molaridad de 0,5 mM sigue siendo repulsivo con respecto al ácido clorogénico a una concentración cuatro veces superior (2 mM) para un pH de 7,5 (figura 14). A pH 5,3 se han

obtenido unos resultados similares.

El conjunto de los resultados obtenidos muestra un claro efecto repulsivo del ácido 3,5-dicafeoilquinico frente al pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*). Este efecto es detectable a una concentración mínima de 125 μM (es decir 64,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). El efecto repulsivo de esta molécula es claramente más fuerte que el de su precursor metabólico, el ácido clorogénico.

4.2.2. Efecto repulsivo de los isómeros del 3,5-diCQ y de su mezcla sobre *Myzus persicae*

Los resultados son dados en la figura 15.

Los efectos repulsivos del 3,5-diCQ, del 4,5-diCQ y de la mezcla 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ (en proporciones iguales) se han ensayado a las mismas concentraciones. El intervalo de concentración de la sustancia ensayada o de la mezcla varía de 0,03125 a 1 mM.

El 3,5-diCQ y el conjunto de sus isómeros representan un efecto repulsivo significativo. El 3,5-diCQ, el 4,5-diCQ y la mezcla 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ tienen un efecto repulsivo altamente significativo a partir de la dosis 0,125 mM. Unos efectos repulsivos significativos se han podido detectar a partir de la dosis de 0,03125 mM para el 4,5-diCQ y la mezcla 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ.

El ácido 3,5-dicafeoilquinico, el ácido 4,5-dicafeoilquinico y la mezcla 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ presentan todos una actividad repulsiva sobre *Myzus persicae*. Esta actividad varía sin embargo en función de la molécula presentada al pulgón. Esto sugiere una influencia de la posición de acilación de los ácidos cafeicos sobre el ácido quinico sobre el carácter repulsivo de los ácidos dicafeoilquinicos.

Ejemplo 5: Medida de la toxicidad del 3,5-diCQ, de sus isómeros y de su mezcla sobre el desarrollo larvario del pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*)

5.1. Método de realización

El objetivo es cuantificar el efecto tóxico del 3,5-diCQ y sus derivados sobre el pulgón durante el tiempo de su desarrollo larvario, es decir de 8 a 10 días para *Myzus persicae* a 19°C. La molécula se añade a diferentes concentraciones al medio nutritivo Ap3.

El medio (75 μl) se vierte entre dos membranas de Parafilm® esterilizadas con UV y estiradas sobre un soporte cilíndrico de PVC (h = 1,5 cm, d = 2 cm), en condiciones estériles. El día D0, 20 larvas neonatas son depositadas en el interior del cilindro, el cual se gira después y se aplica sobre un cuadrado de Parafilm®. Las cajas son colocadas bajo luz tamizada (16h día/8h noche) y en un recinto a 19°C. El porcentaje de fijación se anota después de 1 hora como indicador de fagoestimulación a corto plazo y para verificar que no se produce ninguna anomalía en el momento del depósito de los pulgones. La mortalidad larvaria se anota diariamente al final de la jornada. El día D+3, las larvas son extraídas y divididas en dos en dos nuevas cajas. El día de su muda imaginal, los pulgones que han alcanzado el estado de adulto áptero son depositados sucesivamente sobre una balanza de precisión (d = 0,01 mg) y los pesos acumulados son anotados para cada concentración de cada molécula ensayada. Los pesos individuales son calculados ulteriormente. Durante el mismo ensayo, se evalúan simultáneamente los efectos de una misma molécula en todas las concentraciones y los efectos del medio control. Los ensayos son efectuados rutinariamente sobre 3 repeticiones.

5.2. Resultados

5.2.1. Efecto tóxico del 3,5-diCQ sobre *Myzus persicae*

5.2.1.1. Efecto sobre la mortalidad larvaria

Los resultados son dados en la figura 16.

Se observa un efecto muy marcado del 3,5-diCQ sobre la mortalidad larvaria del pulgón, que aumenta progresivamente durante el desarrollo del insecto. La mortalidad aumenta también con la concentración, para alcanzar prácticamente el 100% a 2 mM. Sin embargo, la mortalidad no excede jamás del 10% sobre el medio Ap3, sobre el extracto control obtenido a partir de los disolventes y aditivos utilizados para la purificación del 3,5-diCQ, y sobre el ácido clorogénico (incluso a las concentraciones más elevadas).

5.2.1.2. Efecto sobre el peso de los adultos ápteros

Los resultados son dados en las figuras 17 y 18.

Los pesajes de los adultos ápteros supervivientes obtenidos al final de su desarrollo ponen en evidencia un efecto

depresivo significativo del 3,5-diCQ a partir de la dosis 0,25 mM (figura 17) (ANOVA: $F = 32,86$, $P < 0,0001$). Las concentraciones 1 y 2 mM del 3,5-diCQ no están representadas ya que ningún pulgón alcanza el estado adulto áptero en estas modalidades. Este efecto depresivo sobre el peso de los pulgones no se observa para el ácido clorogénico, que parece ejercer más bien un efecto probiótico (Figura 18; ANOVA: $F = 3,31$, $P = 0,0063$).

Los ensayos *in vitro* muestran que el 3,5-diCQ provoca una fuerte mortalidad de las larvas durante su desarrollo y disminuye significativamente el peso de los adultos obtenidos, mientras que el precursor metabólico AC no muestra ningún efecto negativo sobre el desarrollo larvario.

5.2.2. Efecto tóxico de los isómeros del 3,5-diCQ y de su mezcla sobre *Myzus persicae*

5.2.2.1. Efecto sobre la mortalidad larvaria

Los resultados son dados en la figura 19.

Se observa un efecto tóxico muy marcado de todos los isómeros ensayados y de la mezcla de isómeros a la dosis 1 mM (del 80 al 100% de mortalidad acumulada observada a partir del 3^{er} día de desarrollo larvario). El 4,5-diCQ y el 1,5-diCQ muestran un efecto tóxico claro a la dosis 0,5 mM (mortalidad acumulada superior al 50% al 3^{er} día). La mezcla de isómeros provoca una mortalidad acumulada superior al 50% al 3^{er} día a partir de la dosis 0,25 mM.

5.2.2.2. Efecto sobre el peso de los adultos ápteros

Los resultados son dados en la figura 20.

Los pesajes de los adultos ápteros obtenidos al final de su desarrollo (figura 20) ponen en evidencia un efecto depresivo significativo a la dosis de 0,5 mM para el 3,5-diCQ (ANOVA: $F = 10,856$, $P < 0,0001$). Este efecto depresivo sobre el peso de los pulgones se observa a partir de la dosis de 0,25 mM para el 4,5-diCQ (ANOVA: $F = 38,61$, $P = 0,0001$) y la mezcla de isómeros (ANOVA: $F = 39,248$, $P < 0,0001$). Sin embargo, no se observa ningún efecto sobre el peso de los pulgones para la cinarina a la dosis de 0,25 mM (ANOVA: $F = 2,291$, $P = 0,068$).

El ácido 3,5-dicafeoilquinico, el ácido 4,5-dicafeoilquinico, el ácido 1,5-dicafeoilquinico y la mezcla de los ácidos 3,4-dicafeoilquinico/3,5-dicafeoilquinico/4,5-dicafeoilquinico presentan todos una actividad tóxica sobre *Myzus persicae*.

Ejemplo 6: Evaluación *in vitro* del efecto del ácido 3,5-dicafeoilquinico sobre otras especies de pulgones

6.1.1 Material animal y métodos

En este estudio, se utilizan dos especies de pulgones, entre ellos el pulgón verde o rosa del guisante, *Acyrtosiphon pisum* y el pulgón verde o rosa de la patata *Macrosiphum euphorbiae*.

Acyrtosiphon pisum (Harris) es un pulgón de gran tamaño que coloniza las leguminosas salvajes y cultivadas, tales como la esparceta, la alfalfa, el loto, la vicia, los guisantes, la judía y el trébol. El clon de pulgón proporcionado por UMR BF21 INRA/INSA de Lyon se cría en cámara climatizada sobre haba.

Macrosiphum euphorbiae (Thomas) es un pulgón de gran tamaño y fusiforme. Muy polífago y cosmopolita, se observa en particular en la patata, la remolacha, la col, las plantas de invernadero (lechuga, achicoria, pimiento, berenjena, pepino), las plantas salvajes y los cultivos florales: cineraria, crisantemo, dalia, clavel, etc. El clon de pulgón, proporcionado por el laboratorio de biología de las plantas y control de los insectos devastadores de la Universidad de Picardie Jules Verne en Amiens, se cría en cámara climatizada sobre patata.

El protocolo aplicado y el medio nutritivo son idénticos a los descritos anteriormente para *Myzus persicae* con la excepción del estado larvario utilizado. Teniendo en cuenta el tamaño de estas dos especies, a fin de dejar un espacio suficiente para las larvas en el dispositivo experimental, se utilizan unas larvas de primer estado (L1) para este tipo de ensayo.

En lo que se refiere a los ensayos de toxicidad, no se ha aportado ninguna modificación al protocolo para los ensayos sobre *Macrosiphum euphorbiae*. Sin embargo, teniendo en cuenta el tamaño y la sensibilidad al estrés de *Acyrtosiphon pisum*, el número de individuos por caja se dejó en 10, el número de repeticiones por dosis ensayada se elevó a 4, y no se ha efectuado ningún cambio de medio durante el ensayo, lo que hubiera tenido como consecuencia provocar una perturbación muy importante de los pulgones.

6.2.2 Resultados

6.2.1. Efecto repulsivo y toxicidad del 3,5-diCQ sobre *Acyrtosiphon pisum*

6.2.1.1. Efecto fagorepulsivo

Los resultados obtenidos (figura 21) ponen en evidencia un efecto repulsivo significativo del 3,5-diCQ a partir de la dosis de 0,03125 mM.

5 6.2.1.2. Efecto tóxico durante el desarrollo larvario

10 La figura 22 pone en evidencia un efecto muy marcado del 3,5-diCQ sobre el desarrollo larvario de *A. pisum* ya que la mortalidad supera el 50% a partir de 0,03125 mM en 2 días y alcanza el 100% a partir de 0,25 mM en 4 días. Sin embargo, no excede jamás el 20% sobre Ap3. Este porcentaje tan importante de mortalidad sobre un medio control con respecto al observado para *Myzus persicae* se explica por las pérdidas generadas por la manipulación de este pulgón tan frágil.

15 Estos resultados sugieren que la dosis mínima para detectar unos efectos repulsivos y tóxicos sobre esta especie de pulgón podría ser inferior a 0,03125 mM, dosis para la cual no se observa ningún efecto tóxico o repulsivo en *M. persicae*.

6.2.2. Efecto repulsivo y toxicidad del 3,5-diCQ sobre *Macrosiphum euphorbiae*

20 6.2.2.1. Efecto fagorepulsivo

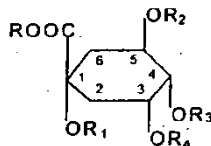
Los resultados obtenidos (figura 23) ponen en evidencia un efecto repulsivo altamente significativo del 3,5-diCQ sobre *M. euphorbiae* a partir de la dosis 0,125 mM.

25 6.2.2.2. Efecto tóxico durante el desarrollo larvario

La figura 24 pone en evidencia un efecto muy marcado del 3,5-diCQ sobre el desarrollo larvario de *Macrosiphum euphorbiae*, ya que la mortalidad alcanza el 100% en 3 a 7 días para las dosis de 0,5 y 1 mM, y casi del 100% en 6 días para la dosis de 0,25 mM.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de compuestos de fórmula (I)



en la que

- R representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,
- R₁, R₂ y R₄ representan, cada uno independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo cafeoil, y
- R₃ representa un hidrógeno, un grupo cafeoil o un grupo succinilo,

con la condición de que por lo menos dos de entre R₁ a R₄ representen un grupo cafeoil, y R₃ represente un grupo succinilo sólo si R₂ y R₄ representan un grupo cafeoil,

a partir de raíces no tuberizadas, comprendiendo las etapas siguientes:

- a) recogida de las raíces no tuberizadas o recuperación del exudado radicular,
- b) extracción por uno o varios disolventes orgánicos de los compuestos fenólicos,
- c) recuperación del extracto bruto,
- d) purificación eventual de dicho extracto obtenido en la etapa c),
- e) opcionalmente, isomerización espontánea de dicho extracto en condición de pH alcalino,

estando dichos compuestos de fórmula (I) en forma de regio- o esteroisómeros, o sus mezclas, procediendo las raíces no tuberizadas de plantas del género *Ipomoea* (convolvuláceas) o de los géneros de la misma familia *Argyrea*, *Calycobolus*, *Calystegia*, *Convolvulus*, *Dichondra*, *Erycibe*, *Evolvulus*, *Iseia*, *Jacquemontia*, *Maripa*, *Merremia*, *Mina*, *Operculina*, *Porana*, *Stictocardia*, o *Turbina*.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las raíces no tuberizadas proceden de plantas seleccionadas de entre el grupo que comprende la batata (*Ipomoea batatas*), la volubilis (*Ipomoea purpurea*), la enredadera de agua (*Ipomoea aquatica*), la volubilis de los jardines (*Ipomoea indica*), la *Ipomoea* Scarlett O'Hara (*Ipomoea nil*) y la enredadera de los setos (*Calystegia sepium*)

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque las raíces no tuberizadas proceden de *Ipomoea batatas*.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las raíces no tuberizadas son producidas por acodadura, esquejado o sembrado.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se producen unas raíces no tuberizadas por cultivo en un medio líquido, a la luz y en situación de carencia mineral.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre las diferentes formas isómeras de los ácidos dicafeoilquínicos, los análogos triacilados, sus análogos metilados, el ácido 4-succinil-3,5-dicafeoilquínico o sus mezclas.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque los isómeros de los ácidos dicafeoilquínicos se seleccionan de entre el ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQ), la cinarina (1,3-diCQ), el ácido 1,5-dicafeoilquínico (1,5-diCQ), el ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQ) y el ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQ).

8. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el análogo triacilado de los ácidos dicafeoilquínicos es el ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (3,4,5-triCQ).

9. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque los análogos metilados de los ácidos

dicafeoilquínicos se seleccionan de entre el 3,5-dicafeoilquinato de metilo, el 3,4-dicafeoilquinato de metilo, el 4,5-dicafeoilquinato de metilo.

10. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además las etapas siguientes:

- a) recogida de las raíces no tuberizadas procedentes de tubérculos, esquejes, siembras o acodos,
- b) congelación en nitrógeno líquido de las raíces recogidas en la etapa a),
- c) liofilización de las raíces congeladas en la etapa b),
- d) trituración en nitrógeno líquido de las raíces liofilizadas y después, liofilización para obtener un polvo seco,
- e) extracción de los compuestos fenólicos por un disolvente orgánico en 1 a 4 veces, por agitación en frío,
- f) aclarado del último residuo de la etapa e) por el mismo disolvente orgánico que el utilizado en la etapa e) y después, evaporación del disolvente presente en el extracto hasta la obtención de una fase acuosa,
- g) opcionalmente, extracción líquido/líquido volumen a volumen por un disolvente apolar, mediante varias extracciones sucesivas después de la adición de una sal y de un ácido en la fase acuosa,
- h) concentración en seco de la fase acuosa obtenida en la etapa f) o de la fase orgánica obtenida en la etapa opcional g) después de la adición de un agente de secado para eliminar el agua residual y filtración, y a continuación, recogida del residuo seco por un disolvente orgánico,
- i) separación por CLHP semi-preparativa en fase inversa y recogida de la fracción que contiene el 3,5-diCQ,
- j) concentración en evaporador rotativo de la fracción obtenida en la etapa i) hasta la obtención de una fase acuosa,
- k) extracción líquido/líquido por un disolvente orgánico (volumen a volumen) mediante varias extracciones sucesivas después de la adición de una sal, en la fase acuosa para facilitar la extracción en el disolvente apolar de 3,5-diCQ,
- l) concentración en seco de la fase orgánica, después de la adición de un agente de secado, y filtración para eliminar el agua residual, y recogida por un disolvente orgánico,
- m) precipitación en frío de la molécula por adición de agua (por lo menos 3 volúmenes para 1 volumen de disolvente orgánico utilizado en la etapa anterior), congelación del extracto en nitrógeno líquido y liofilización para obtener la molécula en forma de polvo seco.

11. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 10, caracterizado porque la etapa g) se realiza por extracción, bien mediante acetato de etilo o bien mediante dietiléter (volumen a volumen) después de la adición de NaCl o de sulfato de amonio y de ácido metafosfórico en la fase acuosa, y la etapa k) se realiza mediante extracción, bien por acetato de etilo o bien por dietiléter (volumen a volumen) después de la adición de NaCl o de sulfato de amonio en la fase acuosa.

Figura 1

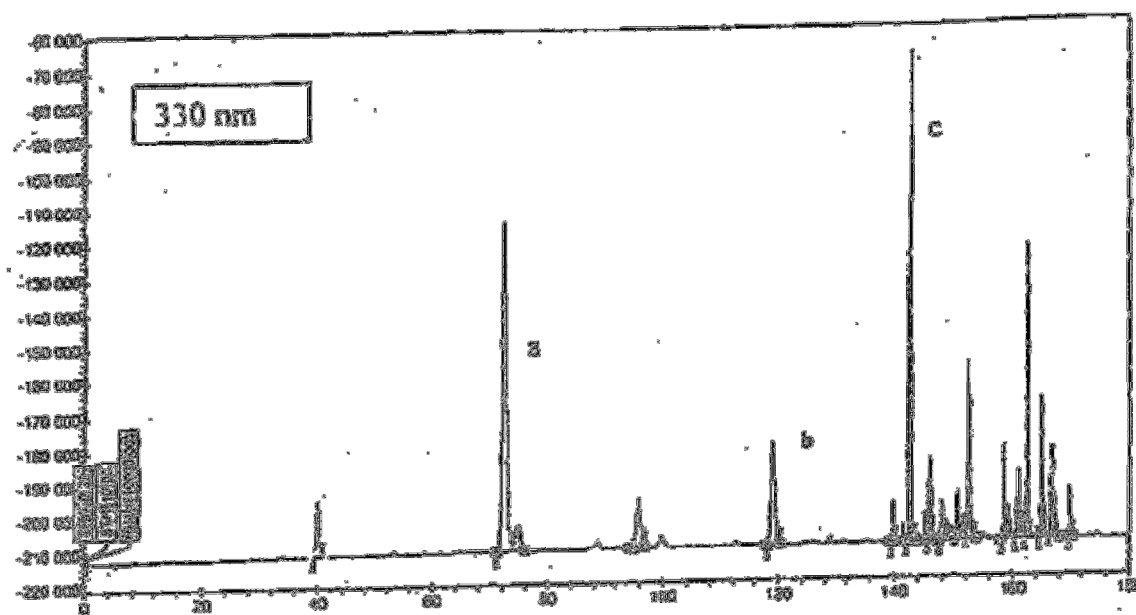
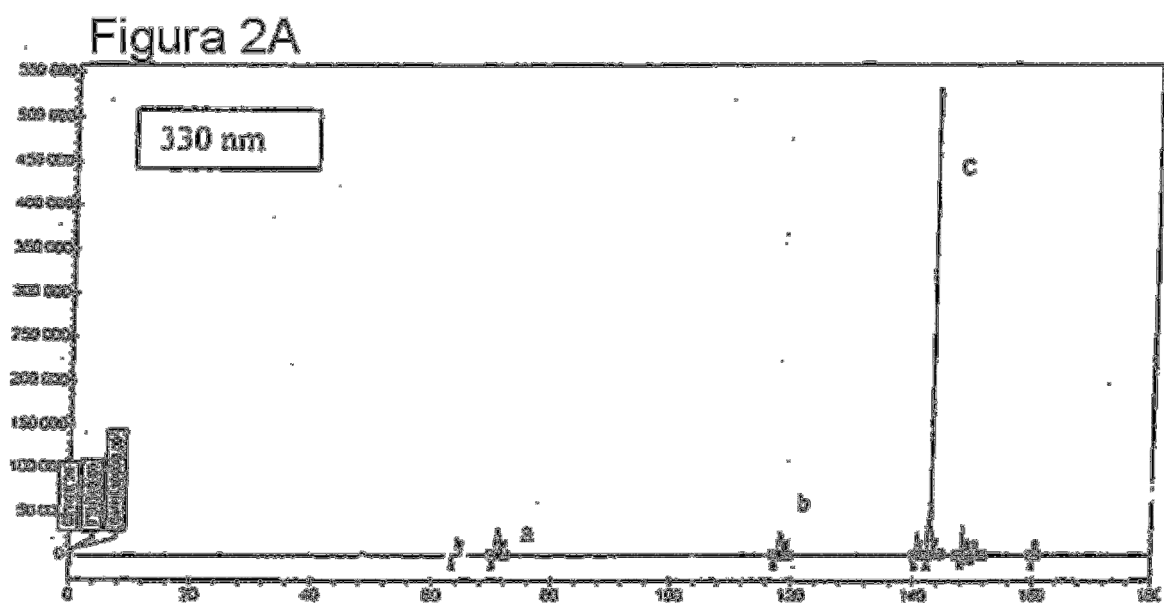


Figura 2



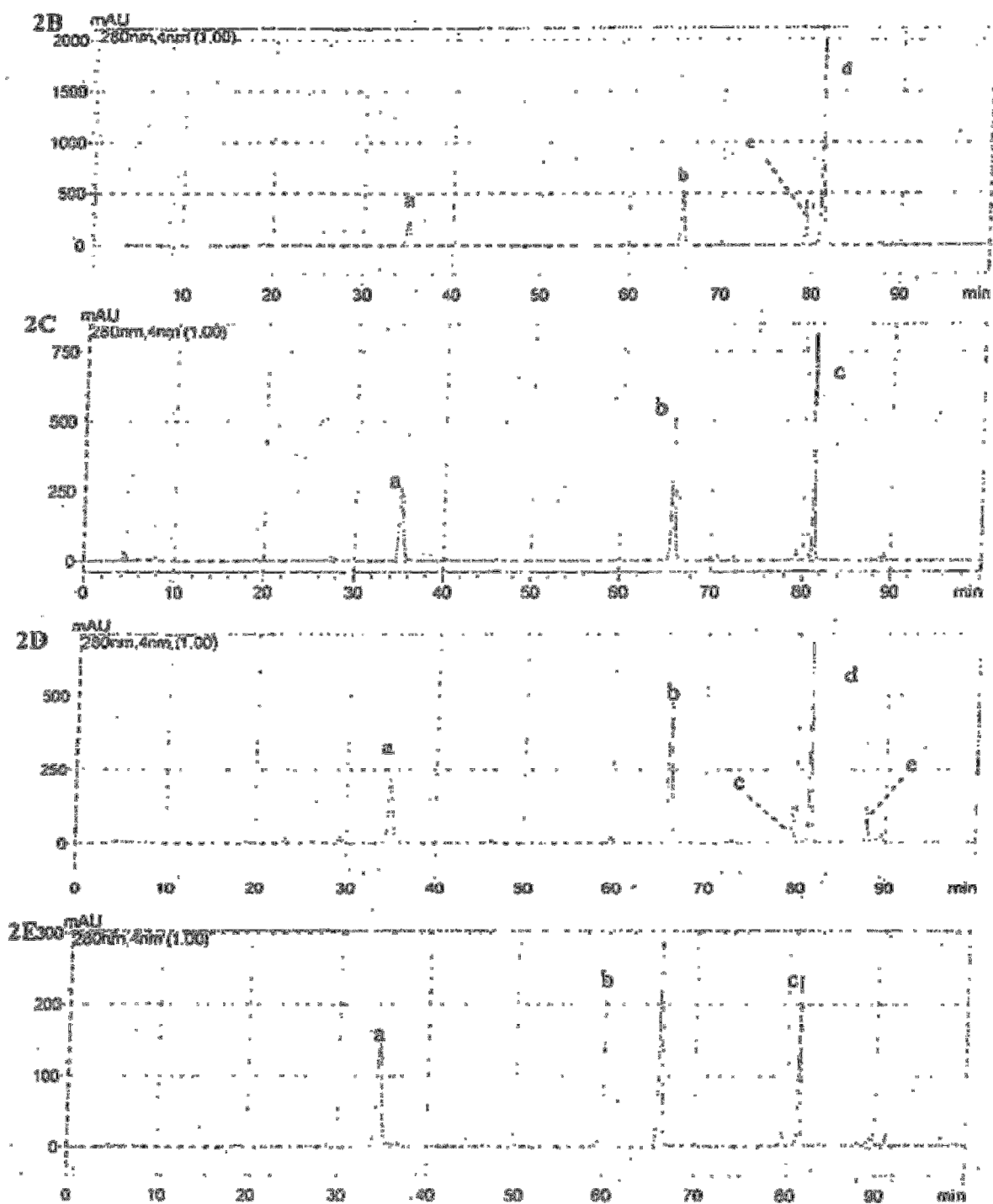


Figura 3

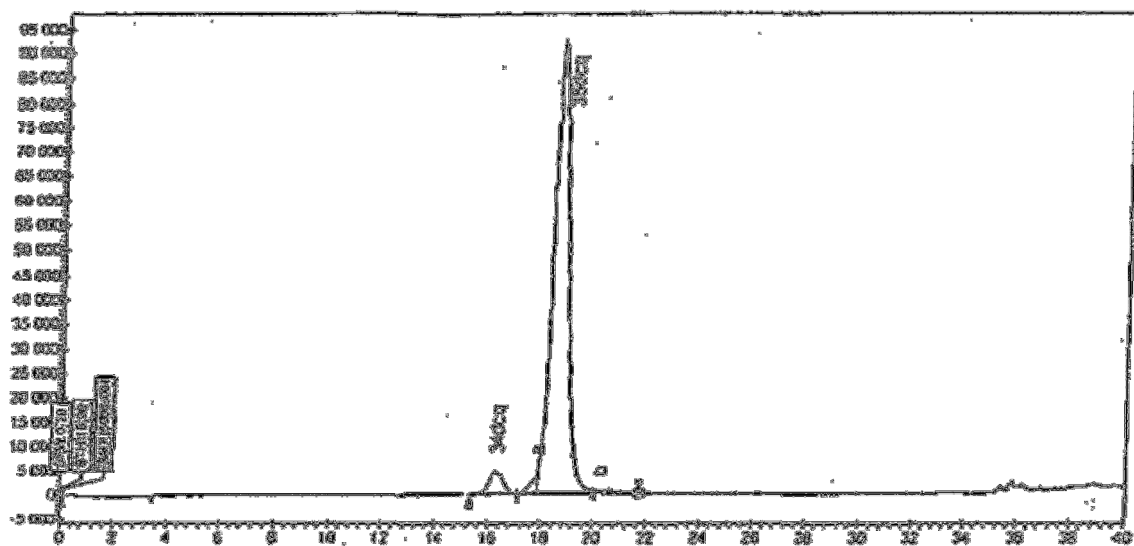


Figura 4

Condición		Materia seca de raíces (g)	Contenido en 3,5- diCQ (mg.g ⁻¹ MS)	Cantidad de 3,5-diCQ por planta (mg)
	Medio/solución/iluminación			
A	Líquido/agua/obs	0,30	45,7	13,9
B	Líquido/agua/lum	0,31	92,0	28,2
C	Líquido/sol 0,05 mM N/obs	0,33	30,9	10,0
D	Líquido/sol 6 mM N/obs	1,57	20,6	32,0
E	Perlita/agua/obs	0,68	36,3	24,9
F	Perlita/sol 6 mM N/obs	1,75	14,8	25,4

Figura 5

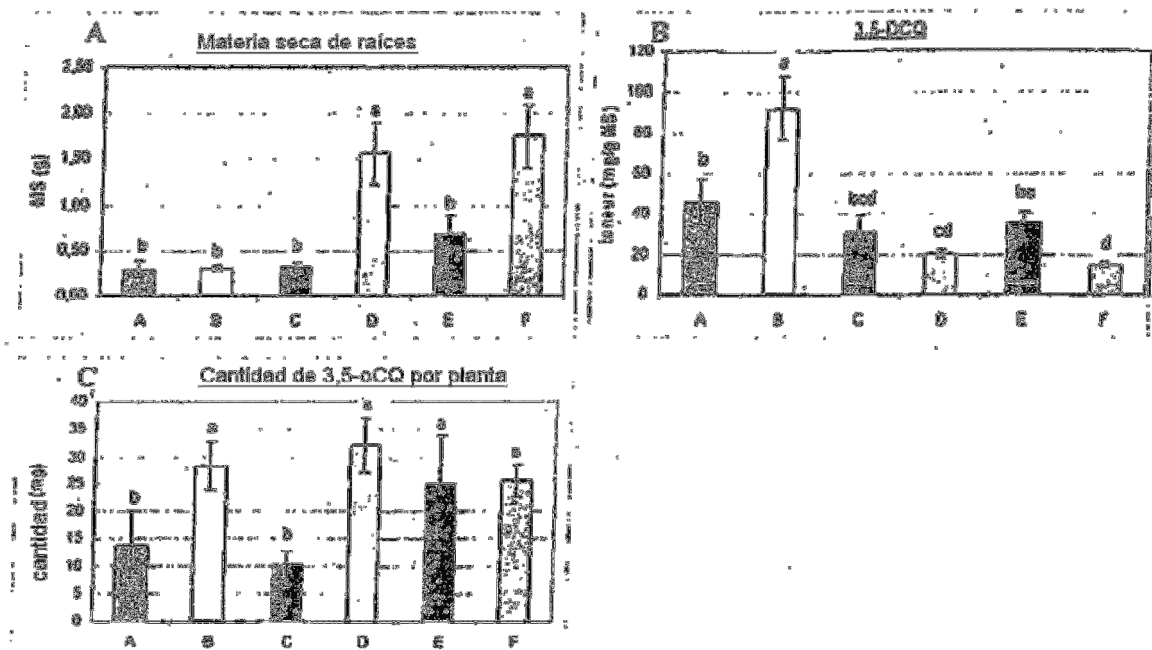


Figura 6

Condición		Materia seca de raíces (g)	Contenido en 3,5- diCQ (mg.g ⁻¹ IMS)	Cantidad de 3,5-diCQ por planta (mg)
	Medio/solución/iluminación			
E	Líquido/agua/obs	0,315	51,13	16,10
F	Líquido/sol 6 mM N, 1 mM P/obs	0,677	25,11	17,38
G	Líquido/sol 0 mM N, 1 mM P/obs	0,469	28,11	12,95
H	Líquido/sol 6 mM N, 0 mM P/obs	0,445	35,09	16,85

Figura 7

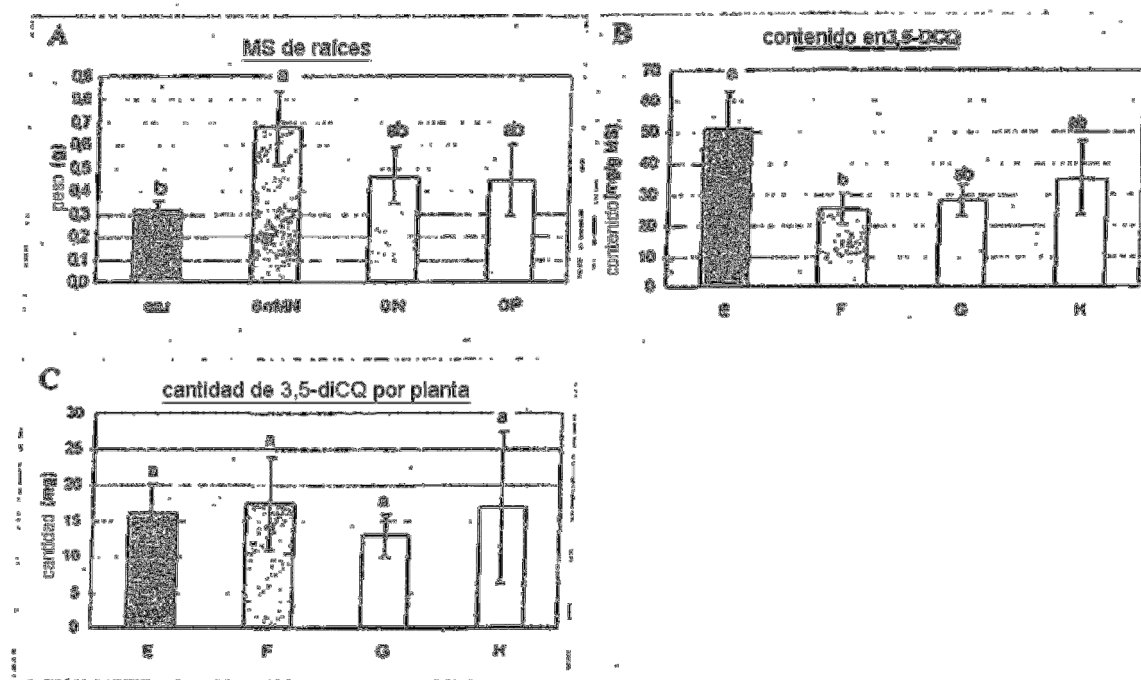


Figura 8

Condición			Materia seca (g)		Contenido 3,5-diCQ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS)		Q 3,5-diCQ/planta (mg)		Total por planta
	Esquejes	Acodos	Esquejes	Acodos	Esquejes	Acodos	Esquejes	Acodos	
A	Agua	Agua	0,36	0,77	47,4	31,9	16,8	24,5	41,3
B	Agua	Solución	0,31	1,25	44,7	11,6	13,6	14,7	28,3
C	Soluciones	Solución	0,99	1,22	16,2	10,2	17,4	13,6	31,0
D	Solución	Agua	2,03	0,74	15,5	35,5	31,1	26,2	57,3

Figura 9

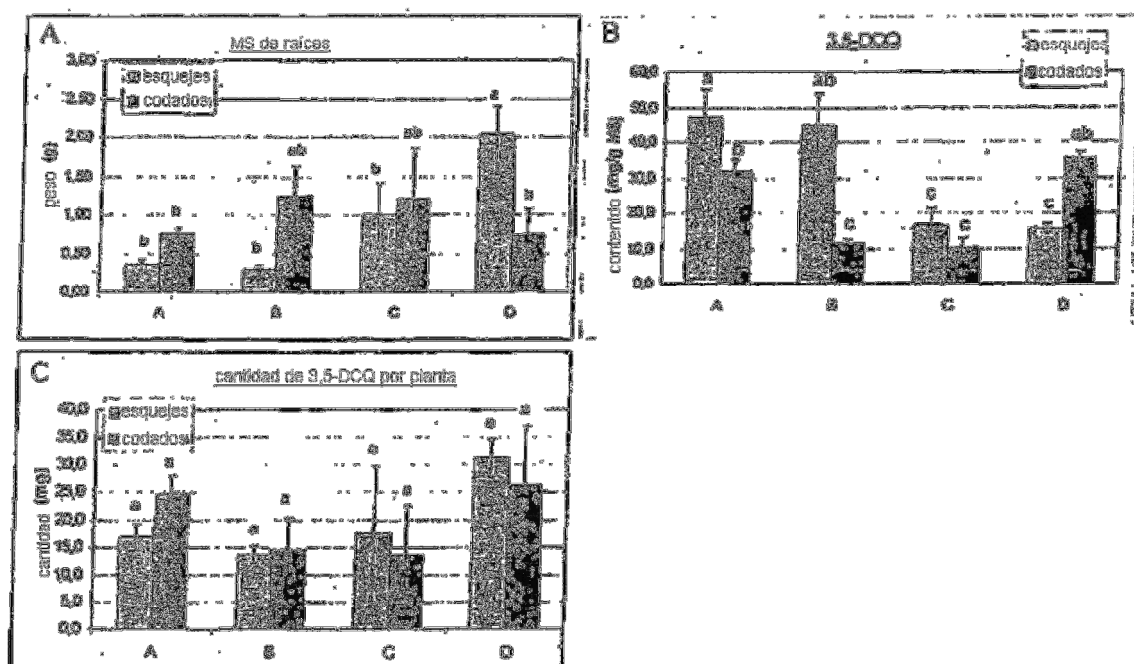


FIGURA 10

Aminoácidos (L)	Masa molecular	mM	Para 100 mL mg
Alanina	89,09	20,06	178,71
β-alanina	89,1	0,70	6,22
Arginina	174,2	14,06	244,90
Asparagina H ₂ O	150,14	19,88	298,55
Ácido aspártico	133,11	6,63	88,25
Cisteína	121,16	2,44	29,59
Ácido glutámico	147,13	10,15	149,36
Glutamina	146,15	30,49	445,61
Glicina	75,07	22,19	166,56
Histidina HCl H ₂ O	209,63	6,49	136,02
Isoleucina (ello free)	131,18	12,56	164,75
Leucina	131,18	17,65	231,56
Liina Cl	182,65	19,22	351,09
Liina Cl	149,21	4,85	72,35
Metionina	168,62	0,56	9,41
Omitina HCl	165,19	17,83	294,53
Fenilalanina	115,13	11,23	129,33
Prolina	105,09	11,83	124,28
Serina	119,12	10,67	127,16
Treonina (allo free)	204,23	2,09	42,75
Triptofano	181,19	2,13	38,63
Tirosina	117,15	16,29	190,85
Valina		260,01	3520,45
Total			
Sacarosa	342,3	584,28	20000,00
Relación Sacarosa/AA		2,25	
Vitaminas			(mg)
Ácido p-aminobenzoico			10,00
Ácido L-ascórbico			100,00
Biotina			0,10
D-Panhotenato de calcio			5,00
Cloruro de colina			50,00
Ácido fólico			1,00
i-Inositol anhidro			42,00
Amida nicotínica			10,00
Pirindoxina HCl			2,50
Riboflavina			0,50
Tiamina HCl			2,50
Metales (trazas)			(mg)
CuSO ₃ , 5H ₂ O			0,47
FeCl ₃ , 6H ₂ O			4,45
MnCl ₂ , 4H ₂ O			0,65
NaCl			2,54
ZnCU			0,83
Diversos			(mg)
Citrato de calcio			10,00
Benzoato de colesterol			2,50
MgSO ₄ 7H ₂ O			242,00
KH ₃ PO ₄			250,00

Figura 11

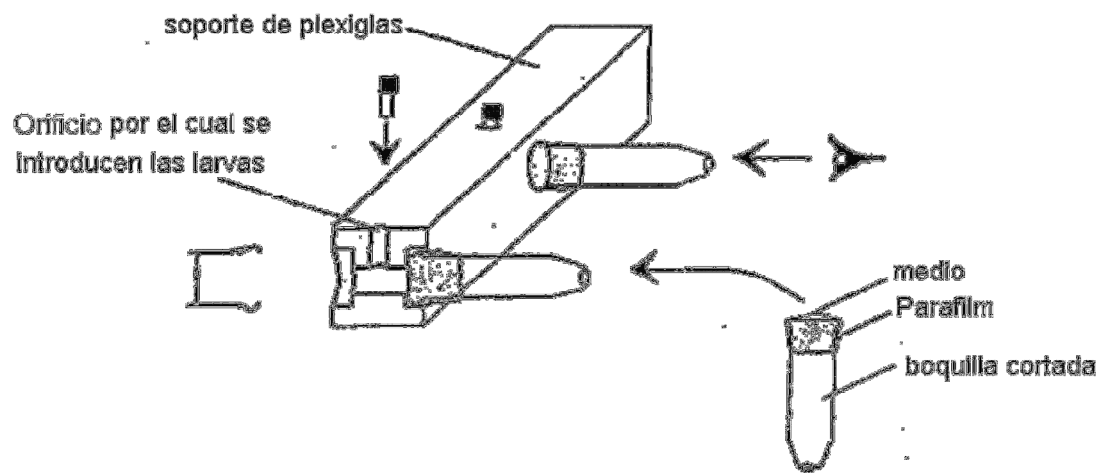


Figura 12

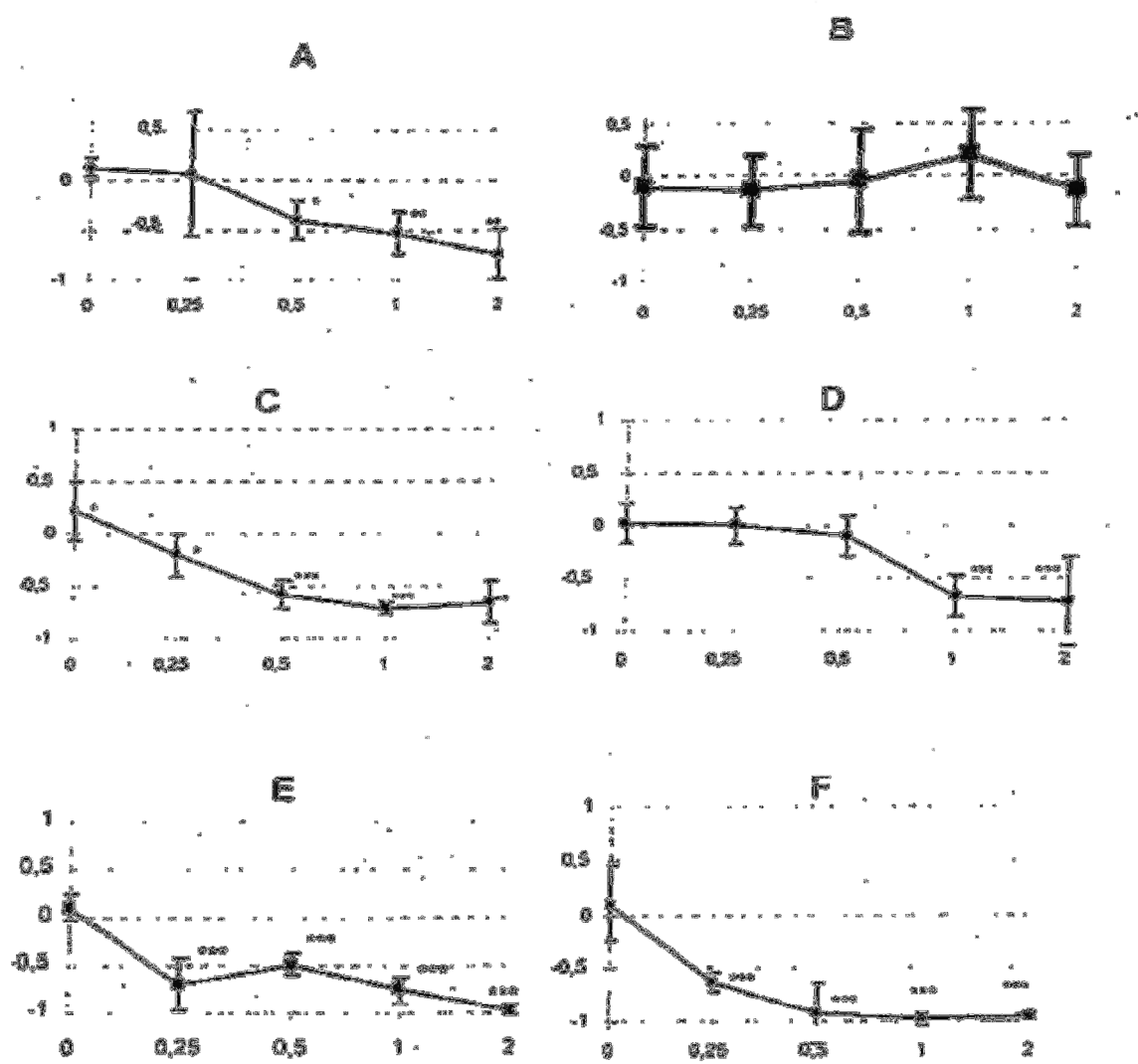


Figura 13

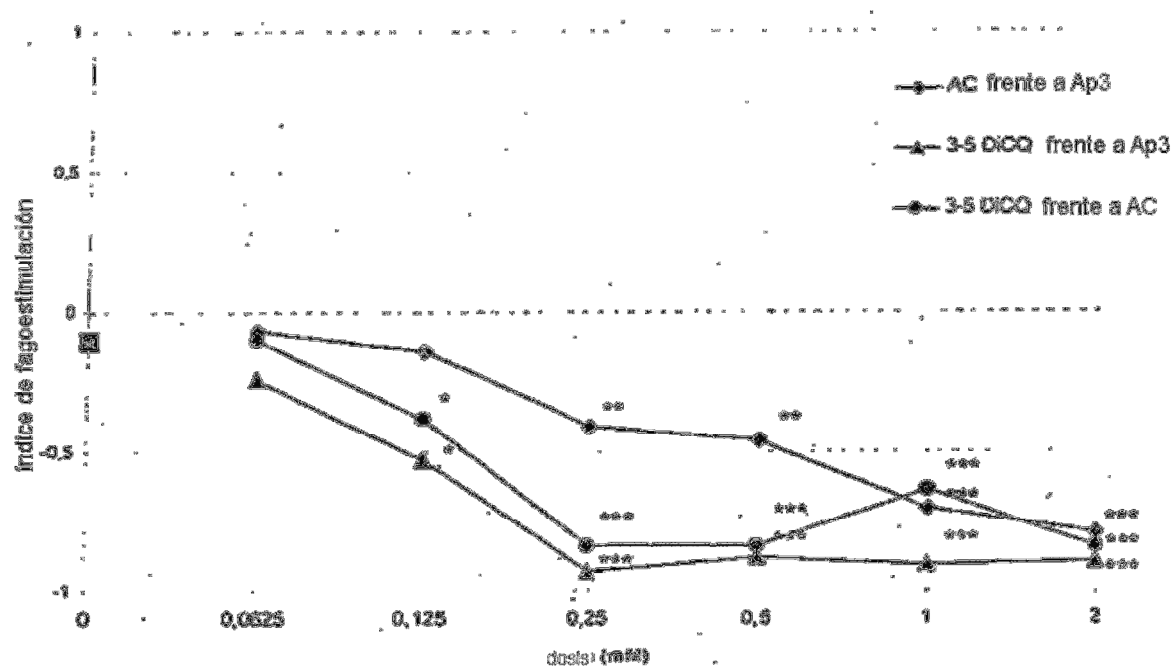


Figura 14

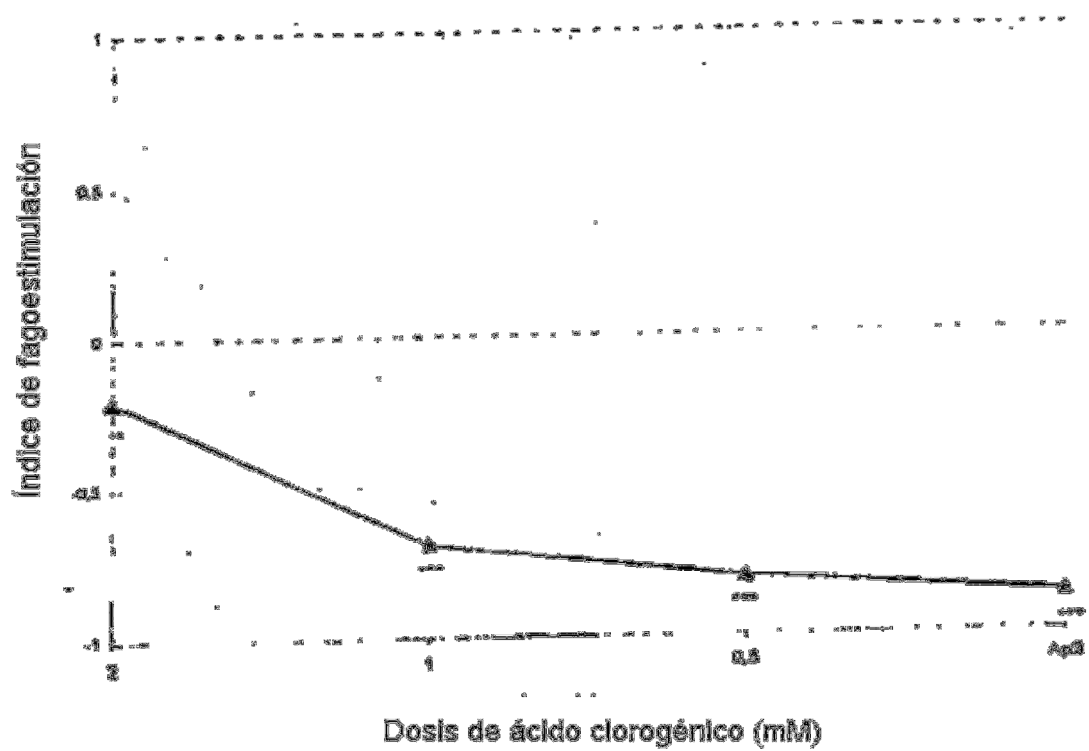


Figura 15

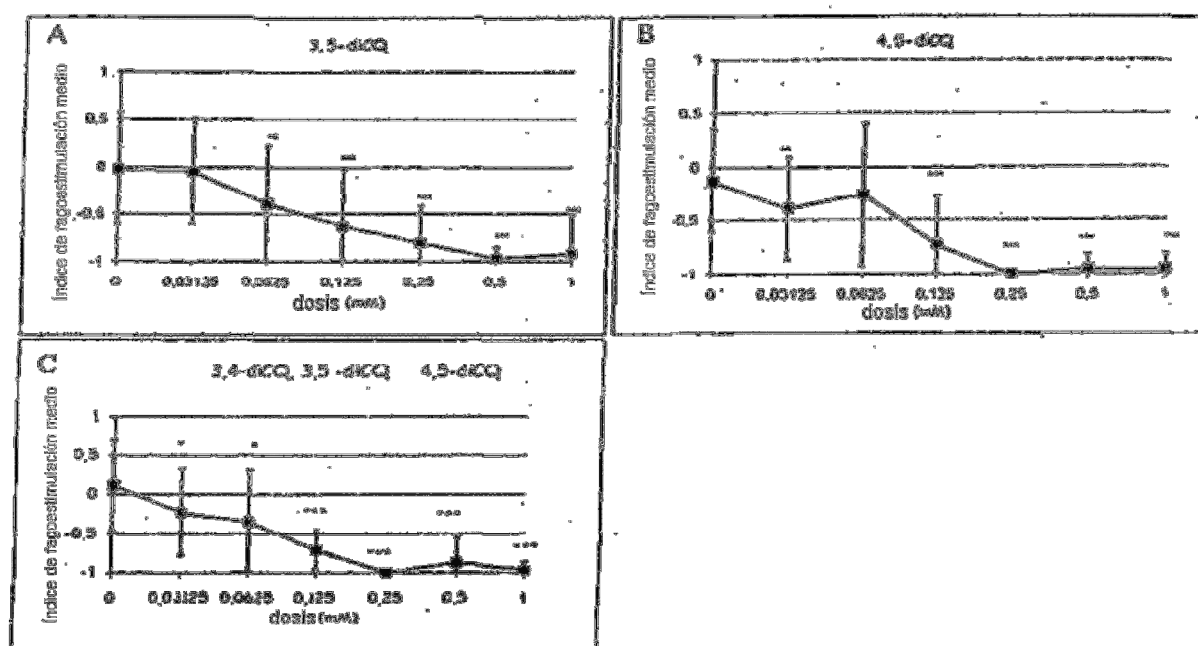


Figura 16

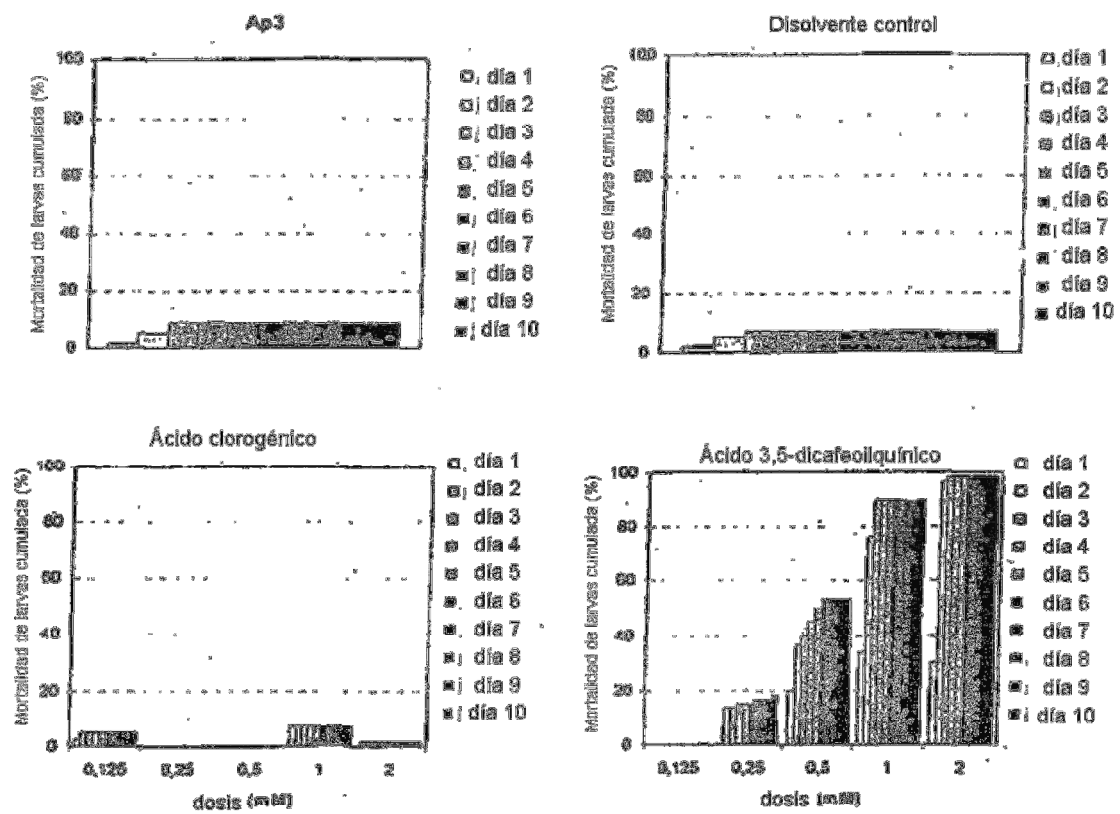


Figura 17

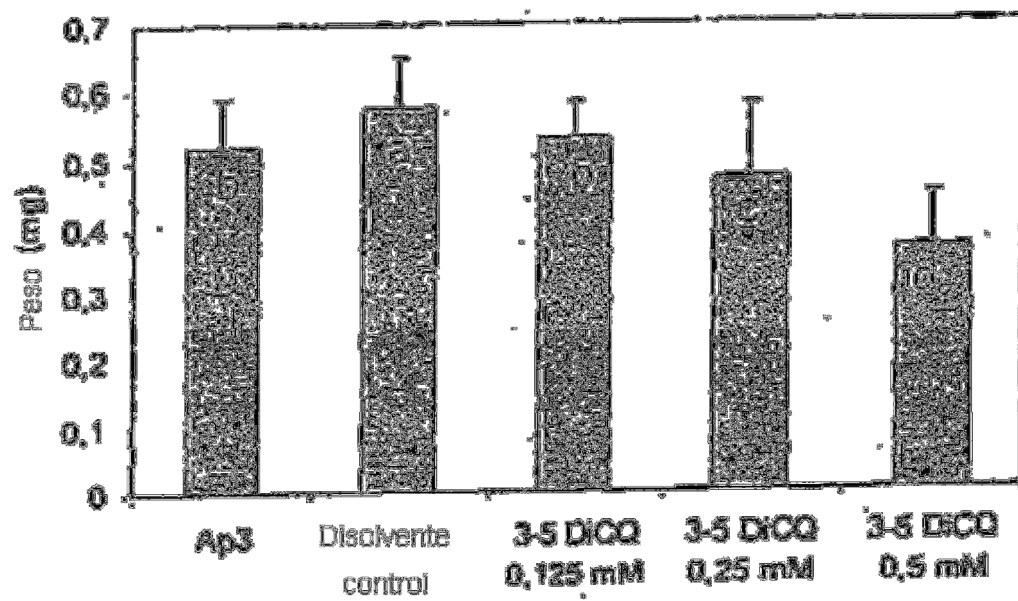


Figura 18

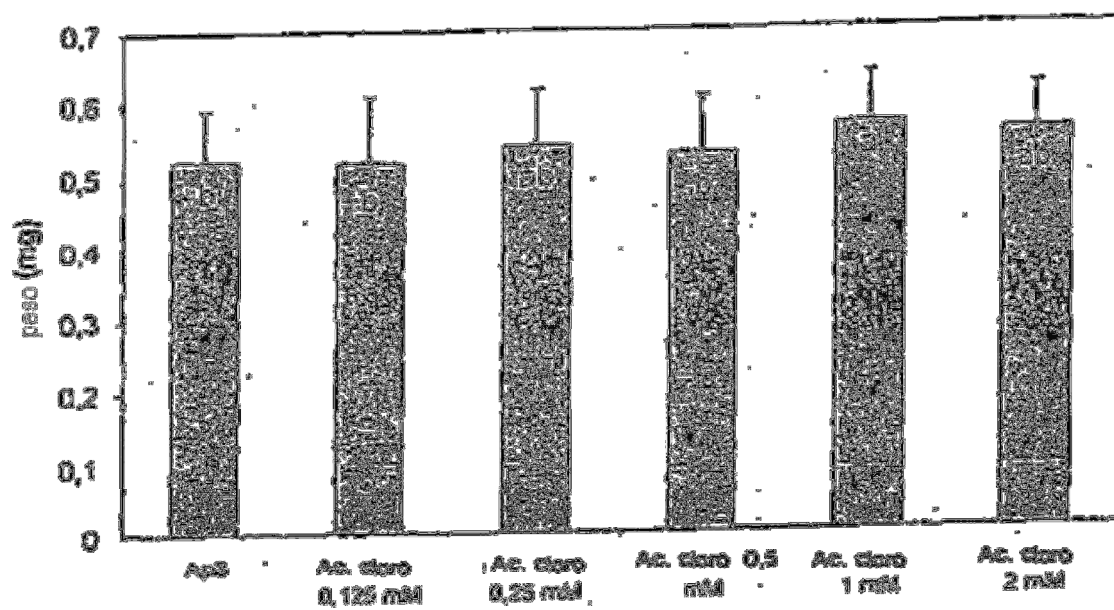


Figura 19

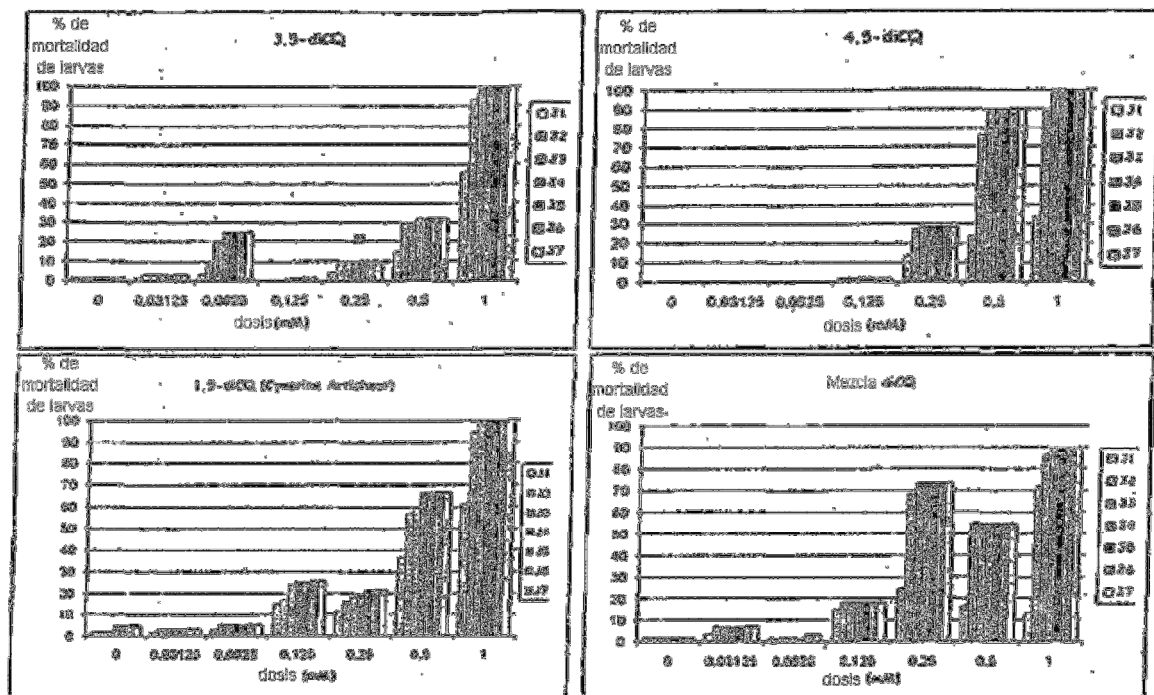


Figura 20

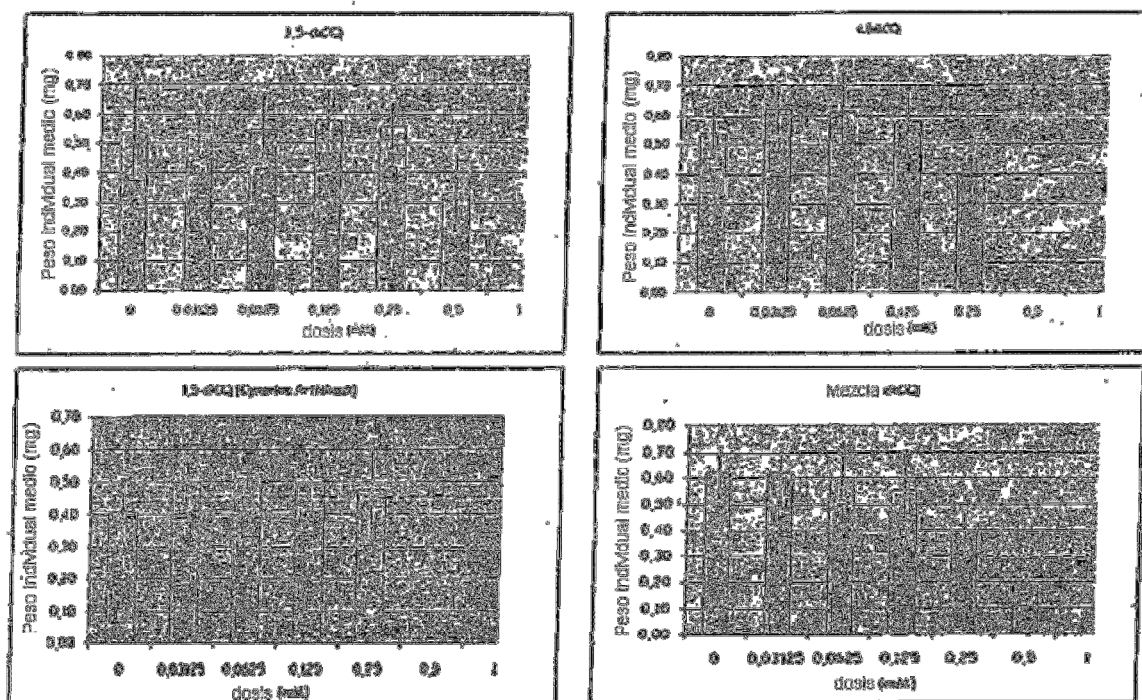


Figura 21

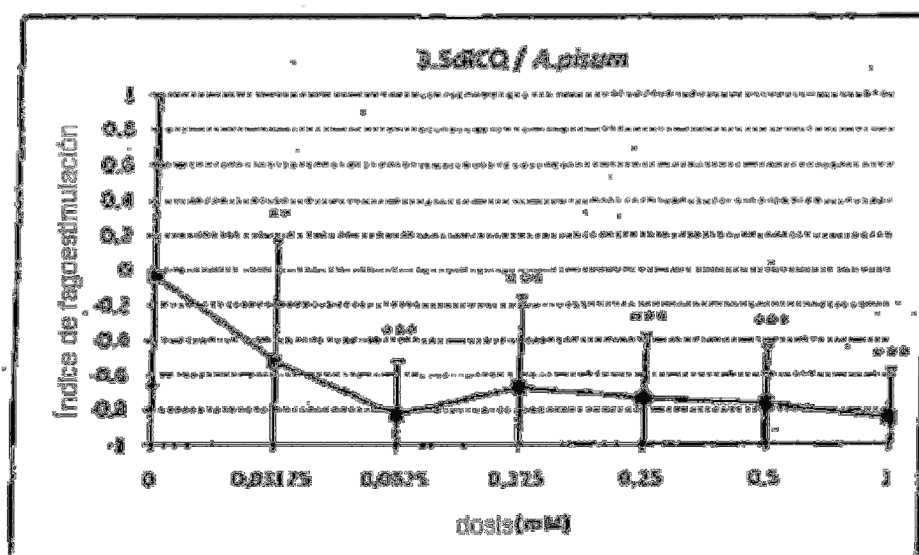


Figura 22

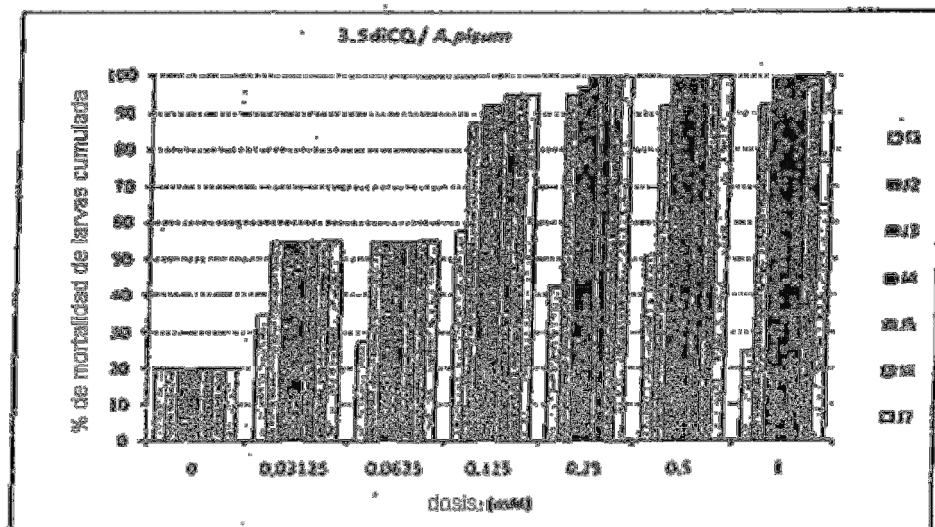


Figura 23

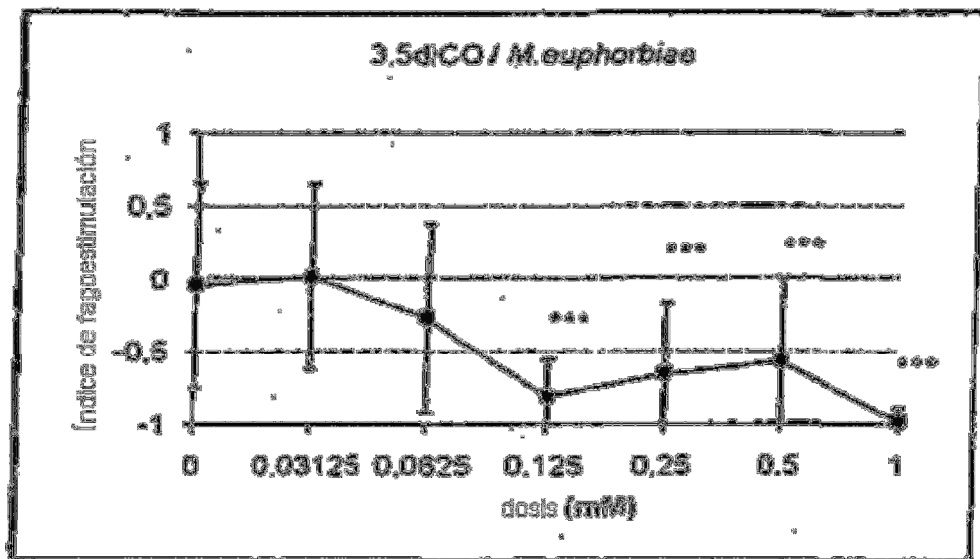


Figura 24

