

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 228**

21 Número de solicitud: 201730726

51 Int. Cl.:

A01N 65/12 (2009.01)

A01P 7/02 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

24.05.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.11.2018

71 Solicitantes:

VILLAMAGNA SA (100.0%)

Avenida General Perón 34, Edificio Master's II

Piso 3º

28020 Madrid ES

72 Inventor/es:

GONZALEZ COLOMA, Azucena;

DIAZ HERNANDEZ, Carmen Elisa;

ANDRES YEVES, María Fe;

OLMEDA GARCIA, Angeles Sonia;

VALCARCEL SANCHO, Félix;

BURILLO ALQUEZAR, Jesús;

JULIO TORRES, Luis Fernando y

GONZALEZ GONZALEZ, Julia

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP

54 Título: **Método de obtención de extractos de *Dittrichia graveolens* y usos de dichos extractos**

ES 2 691 228 A1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 228**

21 Número de solicitud: 201730726

57 Resúmen:

Método de obtención de extractos de *Dittrichia graveolens* y usos de dichos extractos.

La invención proporciona un método para la extracción de compuestos orgánicos de la planta *Dittrichia graveolens* por arrastre de vapor. Ello permite obtener un aceite esencial y un hidrolato, sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos: Ambos muestran actividad biocida, destacando la actividad acaricida e insecticida del aceite esencial, particularmente la capacidad de repeler pulgones y garrapatas y de eliminar estas. La fracción orgánica del hidrolato también muestra capacidad para repeler o combatir pulgones y garrapatas, así como actividad insecticida y nematocida. Así, los extractos obtenidos pueden usarse para el control de plagas como garrapatas, insectos tales como pulgones o lepidópteros, o nematodos, con aplicaciones en el campo agrícola, veterinario, farmacéutico y otros. Se identifican también compuestos responsables de dichas actividades y se propone el uso biocida de extractos de la planta que los contengan o sus composiciones.

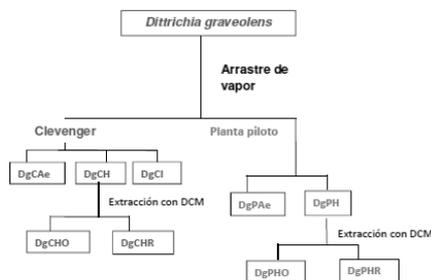


Fig. 1a

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de extractos de *Dittrichia graveolens* y usos de dichos extractos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo método para la obtención de extractos de la
5 planta *Dittrichia graveolens* y a usos de dichos extractos. Más específicamente, la
invención se refiere a la obtención de extractos de *Dittrichia graveolens* por arrastre de
vapor y al uso de los mismos como plaguicidas.

Antecedentes de la invención

El abuso en la utilización de productos químicos para el control de plagas agrícolas y
10 parásitos de los animales y del hombre ha generado problemas medioambientales,
desarrollo de resistencias y problemas de salud pública. Además, el contexto legislativo
de la UE (restricción en el uso de plaguicidas agrícolas, eliminación de ingredientes
activos de síntesis) hace necesaria la búsqueda de alternativas de control a nivel agrícola
y veterinario.

15 Las plantas representan una fuente de productos naturales bioactivos eficaces y
beneficiosos por su baja persistencia (residuos cero), porque sus extractos, al ser
mezclas complejas, impiden el desarrollo de resistencias y porque su producción puede
representar una alternativa a cultivos poco productivos y/o de zonas semiáridas.

Las especies del género *Dittrichia* (mencionado también en muchas publicaciones como
20 *Inula*) son ruderales y tienen una gran capacidad de propagación. Crecen en campos
baldíos, claros de bosques y márgenes de caminos, y generalmente se consideran malas
hierbas. Son originarias de la zona del mediterráneo.

En particular, *Dittrichia graveolens* es una planta silvestre que crece en distintos lugares
del mundo y que en los Estados Unidos y en Australia se considera especie invasora
25 perjudicial para la flora local. La germinación de *D. graveolens* carece de dormancia,
germina en otoño después de las precipitaciones. En ensayos de laboratorio se ha
comprobado que puede germinar en un rango amplio de luz y temperatura. Además, las
semillas maduras presentan elevada viabilidad (>80%). Por tanto se trata de una especie
oportunista que depende de la precipitación estacional (Brownsey et al., 2013).

30 Extractos de diversas especies del género *Dittrichia* (*Inula*) se han descrito como
insecticidas y acaricidas. Por ejemplo, extractos hexánicos de *D. viscosa* son repelentes
de pulgones (incluyendo *M. persicae* y *R. padi*), siendo los sesquiterpenos tomentosin e

inviscolide responsables de esta actividad (Mamoci et al., 2012). Extractos orgánicos de *I. helenium* interfieren con el crecimiento del insecto *Oncopeltus fasciatus* además de ser antialimentarios (Alexenizer and Dorn, 2007). Eudesmanolidas (alantolactona, isoalantolactona) aisladas de *I. helenium* son larvicidas frente a *Aedes aegypti* (Cantrell et al., 2010). Extractos de éter de petróleo de *I. británica* son acaricidas frente a *Tetranychus cinnabarinus*, siendo responsable de esta actividad el palmitato de etilo (Ma et al., 2012). Otras actividades biológicas descritas para este género incluyen el efecto antifúngico del aceite esencial de *D. viscosa* (dermatofitos, *Candida* spp.), siendo el carboxieudesmedieno el responsable de esta actividad (Cafarchia et al., 2002) y de sus extractos orgánicos (hexano, cloroformo y metanol) frente a *Trichoderma* y *Fusarium* sp. (Omezzine et al., 2011b).

En el caso de *Dittrichia graveolens*, se ha descrito la actividad fitotóxica de extractos orgánicos y acuosos (Abu-Irmaileh et al., 2015; Omezzine et al., 2011a), habiéndose identificado como responsables de esta actividad, en los extractos orgánicos, el ácido ilícico y la 2,3,11 β ,13-tetrahidroaromaticina (Abu-Irmaileh et al., 2015). También se han descrito efectos antioxidantes (Al-Fartosy, 2011) y antifúngicos (Omezzine et al. 2011b) de sus extractos orgánicos, particularmente del extracto metanólico. El aceite esencial de esta planta se ha descrito como antibacteriano (Guinoseaou et al., 2010), inhibidor de la actividad acetilcolinesterasa (Dohi et al., 20019). No se han descrito efectos acaricidas o insecticidas para ninguno de sus extractos.

Se ha estudiado la composición química de aceites esenciales de *D. graveolens* procedente de distintos lugares y partes de la planta, presentando acetato de isobornilo y borneol, T-cadinol y óxido de cariofileno como componentes mayoritarios con algunas variaciones cuantitativas en función del lugar de origen (Boudouda et al., 2013; Ghosn et al., 2006; Blanc et al., 2004). También se ha descrito la presencia de eudesmanolidas, guaianolidas, xanthanolidas, carabrones, ácidos sesquiterpénicos, flavononas, dihidroflavonoles, y compuestos aromáticos en la composición química de los extractos orgánicos (Abou-Douh, 2008; Topçu et al., 1993; Öksüz and Topçu, 1991).

Es conocido que el óxido de cariofileno afecta la supervivencia y fecundidad de *Myzus persicae* (Petrakis et al., 2014), tiene actividad antialimentaria frente a *Spodoptera littoralis* y *Leptinotarsa decemlineata* (Rodilla et al., 2008), tiene efectos larvicidas sobre *Anopheles gambiae* (Moussavi et al., 2015), *Aedes aegypti* (Ali et al., 2014) y *Spodoptera frugiperda* (Cárdenas-Ortega et al., 2015), adulticidas por contacto sobre *Lasioderma serricorne* (You et al., 2015) y fumigantes sobre *Sitophilus zeamais* y *Triboleum castaneum* (Liu et al., 2012). Además este compuesto tiene un gran interés en el control

de hormigas desfoliadoras (Boulogne et al., 2012). También se ha descrito como repelente de la garrapata *Ixodes ricinus* (Ashitani et al., 2015).

El α -cadinol tiene actividad antitermita (Chang et al. 2001a) acaricida frente a *Dermatophagoides pteronyssinus* (acaro del polvo) (Chang et al., 2001), y *D. farinae* junto
5 al T-cadinol, que tiene menor actividad (Chang et al., 2001b).

Como se ha comentado previamente, los extractos conocidos hasta ahora obtenidos a partir de *D. graveolens* son principalmente extractos orgánicos, obtenidos principalmente mediante el uso de compuestos orgánicos para los cuales es conocido un cierto nivel de toxicidad (metanol, cloroformo, hexano...), por lo que es recomendable la eliminación de
10 dichos compuestos antes de su manejo por parte de los seres humanos. Por otra parte, para los extractos acuosos sólo es conocida actividad fitotóxica.

Sería interesante encontrar un método alternativo de obtención de extractos de *D. graveolens* que no partiera de los disolventes orgánicos habituales, disminuyendo con ello el riesgo de toxicidad. Por otra parte, una preferencia especial sería que dicho
15 método alternativo, optativamente en combinación con etapas posteriores de extracción con uno o más disolventes orgánicos, permitieran llegar a extractos y/o composiciones específicas que mostraran actividades no descritas hasta ahora para los extractos de *D. graveolens*, particularmente si esas actividades permitieran aplicaciones biocidas no descritas hasta ahora para extractos de esta planta, tales como insecticidas, ixodicidas o
20 nematocidas.

La presente invención aporta una solución a dicho problema.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método de extracción de compuestos orgánicos de plantas o partes de plantas de *Dittrichia graveolens*, que comprende las
25 etapas de:

- a) recolectar plantas o partes de plantas de la especie *D. graveolens* para obtener el material vegetal sobre el que se efectúa la extracción;
- b) someter dicho material vegetal a un proceso de extracción por arrastre de vapor;
- 30 c) condensar el vapor obtenido en un condensador;
- d) dejar que se separen las fases orgánica y acuosa;

- e) recoger separadamente la fase orgánica superior y la fase acuosa situada por debajo de ella y, opcionalmente, una posible fase inferior situada bajo la fase acuosa;
- f) opcionalmente, someter la fase acuosa obtenida a un proceso de extracción con un disolvente orgánico y recoger el extracto orgánico obtenido.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un extracto obtenido por el método anterior, el método de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un extracto de la invención como biocida. Preferiblemente, el uso se elegirá entre uso como acaricida, ixodicida, insecticida o nematicida.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 se refiere al proceso de extracción efectuado sobre *Dittrichia graveolens*:

- La Fig. 1a muestra el esquema de extracción efectuado. Las abreviaturas que comienzan con las letras "DgC" se refieren a fracciones obtenidas habiendo realizado la extracción inicial en un aparato de Clevenger; las que comienzan con las letras "DgP" se refieren a fracciones obtenidas habiendo realizado la extracción inicial en una planta piloto. En concreto: DgCAe: Aceite esencial proveniente del Clevenger; DgCH: hidrolato proveniente del Clevenger; DgCI: fase inferior de compuestos inmiscibles en agua pero de densidad superior a la del agua; DgCHO: fracción orgánica obtenida tras extraer el DgCH con DCM (diclorometano); DgCHR: residuo obtenido tras extraer el DgCH con DCM; DgPAe: DgCAe: Aceite esencial proveniente de planta piloto; DgPH: hidrolato proveniente de planta piloto; DgPHO: fracción orgánica obtenida tras extraer el DgPH con DCM (diclorometano); DgPHR: residuo obtenido tras extraer el DgPH con DCM.
- La Fig. 1b es una esquematización de una planta de extracción como la utilizada con *Dittrichia graveolens* sobre la cual se indican los distintos elementos implicados: el vaso destilador (la cámara de destilación), los condensadores y el decantador (el recipiente de decantación). El vapor de agua proviene del depósito de agua anexo ligado a un generador de presión. Aparece también unos elementos opcionales adicionales (un vaso de extracción y un depósito de solvente) que permiten el acoplamiento de la extracción de vapor con métodos de extracción adicionales opcionales o alternativos a la extracción con vapor.

La Fig. 2 muestra curvas de repelencia del aceite esencial obtenido por hidrodestilación en Clevenger (DgCAe14LG, gráfico superior) o en planta piloto (DgPAe14LG, gráfico intermedio) y de la fracción orgánica del hidrolato de planta piloto (DgPHO14LG) obtenidos de plantas de *D. graveolens* recolectadas en 2014 en la finca La Garganta, sobre adultos de *H. lusitanicum*. La repelencia se expresa en porcentaje sobre el valor máximo, % RP.

La Fig. 3 muestra un gráfico de barras referido a la inhibición de la capacidad de infección de juveniles de segunda edad (J2) del nematodo *Meloidogyne javanica* tratados con la dosis LC₅₀ del hidrolato DgCH (0,052mg/ml). Se muestran los resultados de los dos ensayos realizados en raíces de tomate.

La Fig. 4 muestra la fórmula deducida para el compuesto 3 aislado del aceite esencial de *D. graveolens* (panel a), fórmula en la que se indica la asignación de los datos de desplazamientos observados en los resultados de 1H-RMN y 13C-RMN (panel b), así como los espectros de 1H-RMN y 13C-RMN (paneles c y d, respectivamente).

La Fig. 5 muestra la fórmula del T-cadinol, identificado como el compuesto 4 aislado del aceite esencial de *D. graveolens* (panel a), fórmula en la que se indica la asignación de los datos de desplazamientos observados en los resultados de 1H-RMN y 13C-RMN (panel b), así como el espectro de 13C-RMN (panel c).

La Fig. 6 muestra la fórmula del óxido de piperitenona, identificado como el compuesto 5 aislado del aceite esencial de *D. graveolens* (panel a), fórmula en la que se indica la asignación de los datos de desplazamientos observados en los resultados de 1H-RMN y 13C-RMN (panel b), así como el espectro de 13C-RMN (panel c).

La Fig. 7 muestra el esquema de fraccionamiento del aceite esencial de *D. graveolens*. El asterisco indica que el rendimiento se calculó a partir de la cantidad de compuesto obtenido de la fracción 8.

La Fig. 8 muestra la repelencia de la fracción VLC 7 sobre adultos de *H. lusitanicum*, expresada como porcentaje de la repelencia. (%RP).

La Fig. 9 muestra las estructuras de los compuestos identificados (**1**, **2**, **7**, **6**) o aislados (**5**, **3**, **4**) de la fracción VLC7, y la Piperitenona (**8**) de la DgPHO.

La Fig. 10 muestra la repelencia de los compuestos óxido de cariofileno (**6**), T-cadinol (**4**), borneol (**2**) y carvacrol (**7**) sobre adultos de *H. lusitanicum* expresado en porcentaje de repelencia (%RP).

Descripción detallada de la invención

En este trabajo se ha seleccionado *D. graveolens*, abundante en la flora espontánea de muchos puntos de España, para su estudio como fuente de agentes biocidas frente a ácaros e insectos de importancia económica.

5 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “biocida” incluye cualquier producto, compuesto o composición que está destinado o que es capaz de destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo considerado nocivo para el hombre. La definición, por tanto, incluye no sólo microorganismos como bacterias, levaduras o protozoos, sino también plantas y
10 metazoos (eucariotas heterótrofos pluricelulares y tisulares). Así, el término biocida, tal como se utiliza en la presente solicitud, tiene un significado muy próxima a la definición del término “plaguicida” dada por la FAO (*Food and Agricultural Organization: Organización para la Alimentación y la Agricultura*), que es: cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies
15 indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. A diferencia de dicha definición de la FAO, y para los efectos de la presente invención, la definición de biocida incluye también la posible administración a seres humanos para combatir infecciones o
20 parásitos internos y no está necesariamente ligada a su uso durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, sino que se incluye también la aplicación en cualquier otra industria o incluso en el campo veterinario o clínico.

Por su parte, el término “plaga” se utiliza en la presente memoria en un sentido muy
25 próximo al de su definición en el Diccionario de la Real Academia, refiriéndose a la presencia masiva de una especie de ser vivo (animal, vegetal o microorganismo), que se encuentra en tal densidad que pueden llegar a dañar o ser una amenaza para el bienestar de poblaciones humanas, animales o vegetales. El animal que constituye la plaga puede ser cualquier metazoo, incluidos insectos, arácnidos o nematodos. El
30 término “poblaciones animales”, por su parte, incluye a los animales criados y mantenidos por seres humanos para la obtención de alimento y/o de otros artículos de consumo o para ayudar en distintas labores.

El término “acaricida”, tal como se utiliza en la presente solicitud, incluye cualquier producto, compuesto o composición que está destinado o que es capaz de destruir,

contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo de la subclase Acari que pertenece concretamente a uno de los siguientes superórdenes de dicha subclase: el superorden de los Acariformes (que incluye los organismos a los que comúnmente se denomina ácaros), el de los

5 Opilioacariformes o el de los Parasitiformes (que incluye, dentro del orden Ixodida, a las especies a las que comúnmente se conoce como garrapatas). Por su parte, los términos “ixodocida” y “garrapaticida” se utilizan como sinónimos y como un caso especial dentro de los acaricidas, pues se refieren a cualquier producto, compuesto o composición que está destinado o que es capaz de destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o

10 ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo del orden Ixodida. Dicha definición incluye, como se ve, tanto la capacidad de “matar” o “destruir” las garrapatas como la capacidad de impedir su acción por actuar como repelente. En localizaciones posteriores de la presente memoria se distingue entre ambas actividades específicas. Para evitar confusiones, en distintos puntos de la presente memoria se alude también al

15 uso para o la capacidad de controlar plagas de organismos del orden Ixodida para incluir ambas actividades.

El término insecticida se refiere a cualquier producto, compuesto o composición que está destinado o que es capaz de destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo de la clase Insecta de animales

20 invertebrados artrópodos, es decir, los animales comúnmente conocidos como insectos. Los animales de dicha clase se caracterizan por presentar un par de [antenas](#), tres pares de [patas](#) y un máximo dos pares de [alas](#) (que pueden ser un solo par o estar ausentes). Aunque hay distintas clasificaciones para dividir los organismos de la clase Insecta, comúnmente se consideran incluidos en ella, entre otros, los órdenes con mayor número

25 de especies dentro de dicha clase: los de los coleópteros (escarabajos), dípteros (como las moscas), himenópteros (como las abejas y las hormigas) y lepidópteros (mariposas y polillas), así como también otros como los hemípteros (las chinches, por ejemplo). A este último orden pertenecen también los insectos fitopatógenos de la familia Aphidoidea, que es la de los áfidos o pulgones. Como en el caso del término ixodocida, el término

30 insecticida incluye tanto la capacidad de “matar” o “destruir” insectos como la capacidad de impedir su acción por actuar como repelente. En localizaciones posteriores de la presente memoria se distingue entre ambas actividades específicas. Para evitar confusiones, en distintos puntos de la presente memoria se alude también al uso para o la capacidad de controlar plagas de insectos para incluir ambas actividades

El término nematocida se refiere a cualquier producto, compuesto o composición que está destinado o que es capaz de destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo del filo Nematoda, es decir, los invertebrados también conocidos como nematodos, nematodos o nematelmintos y que vulgarmente se denominan también gusanos redondos. Se trata de organismos esencialmente acuáticos, aunque también existen en ambientes terrestres. Entre las especies que pertenecen a este filo, las hay de vida libre, tanto en ámbitos acuáticos como en el suelo, pero también especies parásitas de plantas y animales, incluido el hombre, en el que provocan enfermedades como la triquinosis (causada por especies del género *Trichinella*) o la anisakiasis (provocada por larvas del género *Anisakis*). Análogamente a los términos anteriormente definidos, el término nematocida incluye tanto la capacidad de “matar” o “destruir” nematodos como la capacidad de impedir su acción por actuar como repelente. En localizaciones posteriores de la presente memoria se distingue entre ambas actividades específicas. Para evitar confusiones, en distintos puntos de la presente memoria se alude también al uso para o la capacidad de controlar nematodos para incluir ambas actividades, principalmente en lo que se refiere a su posible uso en el sector agrícola. Dada la importancia de algunas de las enfermedades provocadas por nematodos, se considera también su uso terapéutico para seres humanos y/o animales, aunque en ese caso se prefiere aludir a dicho uso como uso para la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad o alteración de la salud provocada por un nematodo.

En cuanto a las técnicas empleadas debe comentarse que, tal como se utiliza en la presente memoria, se entiende por extracción por arrastre de vapor, aplicado sobre plantas o partes de plantas, el proceso en el cual el material vegetal se pone en contacto con vapor de agua, generalmente proveniente de una caldera anexa. Cuando el vapor de agua entra en contacto con el material vegetal, hace que los compuestos volátiles, que generalmente tienen un punto de ebullición más bajo que el agua, se vaporicen y sean arrastrados juntos con el vapor a un condensador, donde se condensan junto con el vapor de agua, recogién dose todo ello en un separador, tal como un tanque de decantación. Habitualmente, el producto inmediato del proceso es un sistema en dos fases de agua y un destilado orgánico, en el que habitualmente se encuentran compuestos de densidad menor que el agua y que quedan por encima de ella tras un tiempo de reposo, lo que permite separar los componentes por decantación, reparto u otros métodos. A la fase orgánica de menor densidad se la conoce por lo general como “aceites esenciales” (término que se utiliza en la presente memoria), pues la extracción por arrastre de vapor fue un método muy usado para extraer ese tipo de compuestos de

plantas y utilizarlos, por ejemplo, en perfumería. La fase acuosa inferior se suele denominar hidrosol o hidrolato (término utilizado en la presente memoria), y a menudo contiene también compuestos orgánicos de interés, que pueden ser extraídos por otros métodos, como puede ser el uso de disolventes orgánicos (Dellacassa, 2010).

- 5 Tal como se utiliza en la presente memoria, se considera como una variante de la extracción por arrastre de vapor la llamada hidrodestilación, que es el proceso en el que el material se sumerge y empapa de agua durante un tiempo, tras el cual se calienta la mezcla hasta el punto de ebullición del agua, con lo que los compuestos orgánicos volátiles son arrastrados por el vapor, condensándose en otro recipiente y dando lugar
- 10 igualmente a una fase orgánica de aceites esenciales y un hidrolato. A escala de laboratorio, es habitual llevar a cabo el arrastre de vapor mediante esta variante de la técnica, siendo muy común el uso de un aparato conocido como Clevenger (acogido a la farmacopea Europea). Esta técnica y el mencionado aparato se utilizaron en fases preliminares del desarrollo de la presente invención; su aplicación es compatible con el
- 15 método de la presente invención, de forma que se consideran posibles realizaciones del método de la presente invención aquellas en las que la etapa inicial de extracción inicial por arrastre de vapor se lleva a cabo en un aparato tipo Clevenger. La aplicación del método al material vegetal de *D. graveolens* da lugar a una fase superior de aceites esenciales, a la que se alude a menudo en la presente memoria como “aceites esenciales
- 20 de Clevenger” o DgCAe, una fase acuosa que se sitúa por debajo de esta, a la que se alude a menudo en la presente memoria como “hidrolato de Clevenger” o DgCH, y una fase inferior de compuestos inmiscibles en agua pero de densidad superior a la del agua (que sólo aparece en la extracción por Clevenger), que se conoce también como agua de infusión y a la que se alude en lo sucesivo mediante la abreviatura DgCI.
- 25 El término “extracto”, por su parte, tal como se utiliza en la presente memoria, incluye cualquiera de las fases o fracciones que se obtienen en una etapa del método de extracción de la invención. Por tanto, están incluidos dentro del término extracto tanto la fase orgánica de densidad inferior (fase de aceites esenciales) como la fase acuosa inferior (hidrolato) resultante de la etapa inicial de extracción por arrastre de vapor, así
- 30 como también las dos fases (la fase orgánica y la fase residual que se separa de la misma) que resultan de la etapa posterior opcional de extracción de compuestos orgánicos presentes en el hidrolato, bien mediante tratamiento con un disolvente orgánico, preferiblemente diclorometano, o bien mediante extracción con un sólido, ligada por ejemplo a carbón activo, la cual, tras el proceso de filtración y la extracción de carbón
- 35 activo, es la que da lugar a un extracto de menor volumen. Cualquiera de dichos

extractos, obtenidos por la aplicación del método de la presente invención, se considera un extracto de la presente invención.

En la presente solicitud se describe, por primera, la obtención de un aceite esencial y un hidrolato de arrastre de vapor de *Dittrichia graveolens*, en planta piloto. Esto supone una importante diferencia con los procesos de extracción efectuados hasta ahora sobre plantas o partes de plantas de *D. graveolens*, basados principalmente en la utilización de disolventes orgánicos en la fase inicial del proceso de extracción. Realizar la primera extracción por arrastre de vapor evita (al menos en la primera etapa), el uso de sustancias que a menudo son nocivas para la salud de los operarios y que, con frecuencia, suele ser necesario o conveniente eliminar antes de proceder al uso de los extractos obtenidos, eliminación que no siempre se puede garantizar que sea total. Además, la capacidad de extracción de un disolvente líquido (ya sea un disolvente orgánico o el agua), depende principalmente de la solubilidad que puedan tener las sustancias contenidas en el material de partida en dicho disolvente, por lo que algunos disolventes orgánicos dan lugar a la extracción de un número muy reducido de compuestos, o incluso uno solo, pudiendo ser igualmente muy reducidas las posibles aplicaciones del extracto orgánico obtenido. En ocasiones sucede también que algunos compuestos de interés reaccionan con el disolvente orgánico, sufriendo modificaciones, lo que da lugar a cambios que modifican su estructura química y, con ello, modifican sus propiedades, que pueden ser diferentes a las que presentan en el material de partida, que es en este caso las plantas o partes concretas de la misma. Por ello, la extracción por arrastre de vapor, hasta ahora no aplicada a *D. graveolens*, puede considerarse ventajosa respecto a los métodos de extracción con distintos disolventes orgánicos hasta ahora aplicados, especialmente si se tiene particular interés en la extracción de volátiles. Puede considerarse también ventajosa respecto a la extracción con agua líquida, pues el vapor consigue arrastrar compuestos orgánicos insolubles en agua cuyo punto de ebullición puede ser superior al de la propia agua y que consiguen extraerse del material vegetal de partida a una temperatura inferior a la temperatura a la que ocurre su descomposición.

En el Ejemplo 1 de la presente invención se describen realizaciones del método de la presente invención llevadas a cabo en un aparato tipo Clevenger (“hidrodestilación de Clevenger”), en el laboratorio, y ensayos llevados a cabo después en una planta piloto, a escala industrial, en una instalación de mayores dimensiones que incluye, entre otros elementos, una caldera en la que se genera el vapor que es conducido al recipiente en el que está el material vegetal, para que se produzca el fenómeno de arrastre de

compuestos orgánicos. La Fig. 1b muestra un esquema de lo que sería una instalación de una planta industrial de destilación adecuada para llevar a cabo el método de la invención, planta que en este caso incluye, además, elementos adicionales que permitirían acoplar la extracción por arrastre de vapor a métodos alternativos o complementarios de extracción. Por su mayor capacidad, se prefiere que el método de la invención se lleve a cabo en este tipo de instalaciones, que presentan una caldera o calderín anexo en el que se genera el vapor, con preferencia a la hidrodestilación en la que el vapor se genera a partir del agua presente en el mismo recipiente que el material vegetal, especialmente si se realiza a pequeña escala en aparatos tipo Clevenger. Preferiblemente, la planta industrial de destilación comprende una cámara de destilación (o un vaso destilador) y un recipiente de decantación.

Preferiblemente, la extracción con vapor en una planta industrial se lleva a cabo en condiciones similares a las utilizadas en los Ejemplos 1 y 2 de la presente solicitud, a una presión de entre 50 kPa y 190 kPa, con preferencia porque el valor sea de al menos 90 kPa y, más preferiblemente, de al menos 130-140 kPa, pues el aumento de la presión, según los ensayos realizados, aumenta el rendimiento en aceites esenciales y facilita la extracción. Otra posible realización preferida es aquella en la que la extracción se realiza en dos fases de presión: una fase inicial a 60 – 70 kPa, y una segunda fase a 80 – 120 kPa. La duración del proceso de extracción de la biomasa (el material vegetal, generalmente sin secar) con vapor puede ser, por ejemplo, de una hora, como en los Ejemplos 1 y 2 de la presente solicitud, durante la cual, como se acaba de mencionar, el valor de presión puede ser el mismo, o pueden establecerse tramos en los que se utilicen valores diferentes de presión, pudiendo ser cada tramo de igual duración (como en el Ejemplo 2) o diferente. Es también compatible con el método de la presente invención y queda comprendido dentro de su alcance que la duración del proceso de extracción del material vegetal tenga una duración mayor o menor que una hora.

Concretamente, en los Ejemplos mostrados en la presente solicitud, el material vegetal utilizado fueron partes aéreas – hojas y tallos- de la planta, recolectados durante la etapa de floración y sometidos a secado. Los ensayos iniciales llevados a cabo con partes aéreas de plantas recolectadas en distintos puntos de la finca La Garganta, así como con el testigo (partes de plantas recolectadas en Jaca) mostraron que cualquiera de las muestras podía utilizarse para llevar a cabo el método de la invención. El método de la invención puede también aplicarse sobre plantas domesticadas en zonas de la Península Ibérica distintas a las anteriores, (como muestran los ensayos realizados con las plantas

que se están cultivando en Ejea de los Caballeros, Zaragoza), dando lugar a resultados similares, químicamente, a los obtenidos con las plantas silvestres.

Tal como se describe más adelante en la sección de Ejemplos de la presente memoria, se realizaron ensayos de actividad biocida con los extractos obtenidos de la extracción por arrastre de vapor efectuada sobre el material vegetal de *D. graveolens*, o con composiciones preparadas a partir de dichos extractos. Sorprendentemente, los extractos obtenidos, particularmente las fases de aceites esenciales, demostraron una potente actividad biocida, particularmente acaricida e insecticida. Por tanto, el método de la presente invención permite llegar a extractos que presentan actividades no descritas hasta ahora para extractos de *D. graveolens*. Por ello, los extractos obtenidos por aplicación del método de la invención constituyen también un aspecto de la presente invención, así como las composiciones que comprenden al menos uno de dichos extractos o que se preparan incluyendo al menos uno de dichos extractos en su formulación.

Tal como se utiliza en la presente invención, se considera que una composición comprende un extracto de la presente invención cuando el extracto es uno de los componentes que forma parte de la formulación de la composición. Son realizaciones de interés de las composiciones de la presente invención aquellas que comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, y/o excipientes aceptables o de uso común en los sectores veterinario o agronómico. También son realizaciones de interés de las composiciones de la presente invención las que comprenden surfactantes, entendiendo como tales las sustancias tensioactivas que tienen un efecto sobre la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases, que muy frecuentemente son una fase acuosa y una fase lipídica, y las que comprenden coadyuvantes, que pueden estar en combinación con los surfactantes y/o con uno o más de los excipientes antes citados. Tal como se utiliza en la presente solicitud, se denomina coadyuvantes los coadyuvantes tecnológicos, es decir, las sustancias que se añaden a una composición tanto para facilitar su preparación (por ejemplo, emulsionantes, gelificantes), como para facilitar la estabilidad de la misma. Otra posible realización de las composiciones de la invención, compatible y combinable con cualquiera de las anteriores, son aquellas composiciones que comprenden también uno o más extractos de otra planta (una planta de una especie distinta de *D. graveolens*) o de varias plantas distintas, entendiendo en como extractos los obtenidos por cualquier método de extracción, no solo mediante extracción con vapor.

El uso como biocidas de los extractos de la presente invención o de las composiciones preparadas a partir de ellos es también otro aspecto de la presente invención. Dentro de

dicho uso, y dado que las especies con las que se han realizado los ensayos son plagas que dan lugar a pérdidas económicas en el sector agrícola en general, y especialmente en los cultivos hortícolas, los extractos de la invención, o las composiciones que los contienen o se preparan incluyéndolos en su formulación, se presentan como apropiados para su uso como plaguicidas en el sector agrícola en general y, especialmente, en el sector hortícola en particular.

Más concretamente, en la presente memoria se describe por primera vez la actividad acaricida, especialmente ixodicida (frente a varias especies de garrapatas) y repelente (de garrapatas y pulgones) del aceite esencial y de la fracción orgánica del hidrolato de la planta silvestre y de la planta cultivada de *D. graveolens*, así como la actividad postingestiva insecticida (probada en lepidópteros) de la fracción orgánica del hidrolato. Por ello, son realizaciones preferidas de la invención aquellas en las que se elige entre el aceite esencial y la fracción orgánica del hidrolato como el extracto que se usa bien como ixodicida o bien para el control de pulgones, especialmente como repelente de los mismos.

Es interesante señalar que el estudio de caracterización de los compuestos presentes en los extractos y de la actividad de los mismos permitió identificar el óxido de piperitona, T-cadinol, carvacrol y óxido de cariofileno como los componentes ixodicidas, con capacidad de matar animales del género *Ixodida*, del aceite esencial, con ese orden de potencia, aunque están presentes en cantidades pequeñas o traza, por lo que se concluyó que la actividad ixodicida del aceite esencial se debe a una acción sinergista de esos componentes; por su parte, la repelencia del aceite esencial sobre garrapatas parece deberse principalmente al borneol, sin descartar la contribución de otros compuestos minoritarios. Este efecto sinérgico entre compuestos difiere de las atribuciones de actividad realizadas hasta ahora, donde las actividades que se encontraban en distintos extractos eran generalmente atribuidas a un compuesto en concreto, lo que hace especialmente sorprendentes los hallazgos encontrados. Así, se tiene especial preferencia por que el extracto o composición del mismo que se use como acaricida o ixodicida, para el control de especies del orden *Ixodida*, sea entre un extracto de *D. graveolens* que comprende óxido de piperitenona, T-cadinol, carvacrol y óxido de cariofileno, o combinaciones de los mismos, y/o un extracto que comprende borneol, preferiblemente en combinación con los anteriores.

Por otro lado, el T-cadinol aparece como uno de los compuestos responsables de la repelencia frente a pulgones del aceite esencial de *D. graveolens*. Así, de nuevo, se tiene

especial preferencia por que el extracto, o composición del mismo, que se use para el control de una especie de áfido o pulgón sea un extracto que comprenda T-cadinol.

5 También se describe por primera vez la actividad nematocida (demostrada sobre el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne javanica*) de la fracción orgánica del hidrolato, por lo que son posibles realizaciones preferidas de la invención aquellas en las que se usa un extracto de *D. graveolens* como nematocida, con especial preferencia por su uso en el sector agrícola, particularmente cuando se usa la fracción orgánica del hidrolato y/o cuando se intenta controlar una o más especies del género *Meloidogyne*, muy especialmente *M. javanica*.

10 Teniendo en cuenta las actividades divulgadas para extractos de *D. graveolens* en la presente solicitud, es también un uso interesante aquel en el que se aprovecha la actividad biocida para el control de parásitos o plagas molestas, que afectan directamente a poblaciones animales o a los seres humanos. En ese sentido, tiene también especial interés el uso de uno cualquiera de los extractos de *D. graveolens* de la presente
15 invención, o combinaciones de los mismos, o de una composición de la presente invención, en la ropa o en la piel de un animal, incluyendo dentro de la definición de animal a los seres humanos, siendo una realización particularmente preferida de la anterior el uso en la piel de un ser humano. El uso en la ropa, o en la piel de un animal, incluidos los seres humanos, puede tener especial interés como repelente de ácaros,
20 insectos o nematodos, en particular garrapatas y/o pulgones, para los cuales hay ensayos específicos en la presente solicitud que muestran actividad repelente de tanto de los aceites esenciales como de la fracción orgánica del hidrolato extraídos de *D. graveolens*.

En cuanto a los compuestos activos identificados, debe comentarse que era conocido
25 que el óxido de piperitenona (PO) tiene efectos larvicidas en mosquitos (revisado en Božovic et al., 2015) y presenta toxicidad tóxica y fumigante sobre áfidos (*Toxoptera auranti. Sitophilus zeamais*) (Zekri et al., 2016; Herrera et al., 2015). Este compuesto es larvicida e inhibe el desarrollo de *Anopheles stephensi* (Tripathi et al., 2004). Sin embargo, no se le conocían efectos ixodicidas.

30 El óxido de cariofileno afecta la supervivencia y fecundidad de *Myzus persicae* (Petrakis et al., 2014). Tiene actividad antialimentaria frente a *Spodoptera littoralis* y *Leptinotarsa decemlineata* (Rodilla et al., 2008). Tiene efectos larvicidas sobre *Anopheles gambiae* (Moussavi et al., 2015). *Aedes aegypti* (Ali et al., 2014) y *Spodoptera frugiperda* (Cárdenas-Ortega et al., 2015), adulticidas por contacto sobre *Lasioderma serricorne*

(You et al., 2015) y fumigantes sobre *Sitophilus zeamais* y *Triboleum castaneum* (Liu et al., 2012). Además este compuesto tiene un gran interés en el control de hormigas desfoliadoras (Boulogne et al., 2012). También se ha descrito como repelente de la garrapata *Ixodes ricinus* (Ashitani et al., 2015). Tampoco se le conocía el efecto ixodicida
5 al que parece dar lugar en combinación con otros componentes del aceite esencial.

El α -cadinol tiene actividad antitermita (Chang et al. 2001^a) acaricida frente a *Dermatophagoides pteronyssinus* (acaró del polvo) (Chang et al., 2001) y *D. farinae* junto al T-cadinol, que tiene menor actividad (Chang et al., 2001b).

El carvacrol presenta toxicidad tóxica en áfidos (*Toxoptera auranti*) (Zekri et al., 2016) y
10 actividad fumigante e inhibición de la reproducción sobre el pulgón *Aphis gossypii*, el thrips *Frankliella occidentalis* y el ácaro *Tetranychus cinnabarinus* (Erler and Tunc. 2005). Sus efectos ixodicidas y repelentes se han descrito en varias especies de garrapatas incluyendo *Rhipicephalus microplus*, *R. turanicus*, *Dermacentor nitens*, *Hyalomma marginatum*, *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum* (Cruz et al., 2013. Koc et al.,
15 2013; Cetin et al., 2010; Dolan et al., 2009; Dietrich et al., 2006; Panella et al., 2005; Lwande et al., 1999), también actúa en sinergismo con timol frente a *Amblyomma sculptum* y *Dermacentor nitens* (Novato et al., 2015). Respecto al modo de acción, el carvacrol inhibe moderadamente la actividad acetilcolinesterasa en artrópodos incluyendo garrapatas (Anderson and Coates. 2012). Por otra parte estudios previos demuestran que
20 el carvacrol induce una alta mortalidad en *M. javanica* (Oka, 2001; Andres et al., 2012). Sin embargo, en el presente caso, como se ha comentado, la actividad nematocida observada no se explica por su contenido en carvacrol y timol

La piperitenona tiene toxicidad por contacto y actividad fumigante frente al insecto *Sitophilus zeamais* (Herrera et al., 2015); y es el componente mayoritario del aceite
25 esencial de *Lantana viburnoides*, con efecto repelente frente al mosquito *Anopheles gambiae* (Innocent and Hassanali, 2015). En el presente estudio se demuestra por primera vez la actividad nematocida de este compuesto.

Por tanto, puede concluirse que la extracción por arrastre de vapor permite la obtención de distintos extractos que incluyen compuestos que dan lugar a actividades de dichos
30 extractos que no eran esperables para los extractos de *D. graveolens* y que posibilita distintos usos de gran interés industrial para los mismos, lo que confirma el interés de la presente invención.

La invención se explicará con más detalle mediante los ejemplos y figuras que se presentan a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1.- Extracción inicial

1.1. Preparación de la biomasa

Las plantas de *D. graveolens* con las que se comenzó el estudio fueron plantas silvestres recolectadas en la finca La Garganta. La Garganta está localizada en España, en la zona mesomediterránea, al sur de la provincia de Ciudad Real (37°24'78"N 42°59'101" E).

Se recolectó la parte aérea (hojas y tallos) en el mes de octubre de 2014, en plena época de floración de la planta. La identificación de la planta fue realizada por el Dr. V. J. Aran, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Se recolectaron plantas silvestres de distintas zonas de la finca La Garganta, que diferían en el grado de floración de las plantas, oscilando entre el 40-50% y el 90-100%. A cada lote de plantas recolectadas se les asignó un número distinto, del 1 al 7, según la zona de recolección dentro de la finca. El orden de las zonas según su grado de floración, ordenadas de menor a mayor, era el siguiente: 4 – 3 - 1 – 2 – 5 - 6 – 7). Para cada lote se calculó el rendimiento en Materia Seca (%), separando una muestra del material fresco para realizar el proceso de secado, a la sombra, en un secadero, con corriente de aire, a temperatura ambiente (valor medio: 25°C), durante una semana. Los rendimientos obtenidos fueron similares, oscilando entre el 40% (lote 5) y el 55% (lote 6).

Como plantas de referencia testigo se recolectaron plantas de la misma especie en Jaca, Huesca (42°34'20" N, 0°33'1"W), que dieron lugar a rendimientos similares a materia seca (49%)..

Las muestras de plantas se sometieron a un proceso de extracción en laboratorio en aparato Clevenger (hidrodestilación) y luego en una Planta Piloto (arrastre de vapor), resultando en diferentes extractos y rendimientos. Los hidrolatos obtenidos en cada caso (DgCH y DgPH, respectivamente) se sometieron después a extracción con diclorometano, para separar la fracción orgánica presente en cada uno de ellos (DgCHO y DgPHO) del residuo. El esquema de extracción aplicado se muestra en la Fig. 1a.

1.2. Hidrodestilación en Clevenger

La hidrodestilación en Clevenger se realizó siguiendo las indicaciones de la Farmacopea Europea (<http://www.edqm.eu/en/Homepage-628.html>). Se extrajeron 100 g de hojas con 1 l de agua destilada durante 3 horas, a 100°C. Los rendimientos medio en aceite

esencial (fase superior), referidos a la biomasa verde (peso seco) de partida se muestran en la Tabla 1.-

Tabla 1.- Rendimiento medio de aceite esencial obtenido por hidrodestilación en Clevenger

Nº Muestra / Ubicación (zona recolección)	Aceite esencial (DgCAe) (% ¹)
1. Cerro Gaznateo	0,14
2.Olivar Cruz del Muerto	0,14
3.Pista de la avioneta	0,17
4.Arroyo de San Serafín	0,17
5.Era del Olivar	0,10
6.Paso de la Encinilla	0,15
7.Pantano de la cal	0,13
8.Jaca, Huesca (Testigo)	0,14

- 5 ¹ Valor medio resultante de los ensayos realizados con plantas recolectadas en tres años diferentes (2014, 2015, 2016).

1.3. Arrastre de vapor en planta piloto

El proceso se llevó a cabo en una planta de destilación de una cámara de destilación de 100 kg, un vaso de 500 litros y un rango de presión de vapor global de 0,5 a 1,4 bar (50 a
10 140 kilopascales, kPa) (ver más adelante las condiciones de presión específicas según el año). El agua recolectada después de decantar el aceite esencia se filtró para dar el hidrolato (DgPH). La fracción orgánica del mismo se extrajo con diclorometano (DCM) en proporción 1:1, (150 ml x 3 veces, a temperatura ambiente, durante 1 hora) para dar una fracción orgánica (DgPHO).

- 15 El material recolectado en la finca La Garganta fue destilado en planta piloto, en los años de 2014, 2015 y 2016. En el vaso se introducía el material vegetal verde hasta que la cámara se llenaba.

En el año 2014, el proceso se llevó a cabo a una presión de entre 0,5 y 1,3 bar (entre 50
20 y 130 kPa), observándose dificultades para la extracción de aceite en los lotes iniciales (7 y 4) tratados a una presión cercana a 0,5-0,6 bar (50-60 kPa) y para los cuales el aceite se depositó en las paredes del destilador. Por ello, se fue aumentando gradualmente la presión, extrayéndose entonces aceite, mejorando así el rendimiento y la operatividad del proceso.

El rendimiento de la destilación en planta piloto para el total de la biomasa (594,3 kg) fue 0,66 ml/kg de biomasa. Los cuatro lotes que dieron mayor rendimiento fueron los que presentaban menor floración en el momento de recoger las muestras, como puede verse en la Tabla 3.

5 Tabla 2.- Rendimiento en planta piloto de los lotes recolectados en la finca La Garganta en 2014.

Lote Nº	Presión (kPa)	Biomasa verde Peso (kg)	Aceite esencial (DgPAe) Rendimiento (%) (ml/100 kg biomasa)	Hidrolato separado (DgPH) (ml)	Fase intermedia (ml)
1	60 – 130	95,5	0,07	30	6
2	60 – 130	115	0,06	13	5
3	100 -120	54,2	0,01	102	5
4	60 – 70	44,4	0*	127	0
5	80 – 100	117,3	0,01	42	10
6	60 – 130	72,4	0,07	8,5	2
7	60	95,5	0*	117	0
*Restos limpieza (mayoritariamente aceite depositado en las paredes):			55 ml		

10 En años posteriores se siguió aumentando gradualmente la presión, llegando hasta 1,9 bar en el año 2016. obteniendo así un aumento visible de rendimiento año tras año (Tabla 3).

Tabla 3.- Rendimiento medio en planta piloto del material recolectado en la finca la Garganta según el año de recolección

Origen material	Rendimiento (%) de aceite esencial (ml/100 kg de biomasa)		
	Año de extracción		
	2014	2015	2016
Finca la Garganta	0,04	0,07	0,12

1.4. Extracción con diclorometano del hidrolato

Una vez obtenidos los hidrolatos anteriores, se procedió a la extracción con diclorometano (DCM) (150 ml x 3 veces, en proporción 1:1 volumen:volumen, a temperatura ambiente) de compuestos orgánicos presentes en los hidrolatos obtenidos en los dos procedimientos (hidrodestilación en Clevenger: DgCH, y destilación en planta piloto: DgPH). Tras la separación de las fases por decantación en embudo de decantación y eliminación del disolvente en rotavapor, se obtuvieron las fracciones orgánicas DgCHO y DgPHO, respectivamente, así como las correspondientes fracciones acuosas residuales DgCHR y DgPHR, tal como se esquematiza en la Fig. 1a

Tomando conjuntamente los datos de todos los lotes, los rendimientos de los distintos extractos obtenidos, bien partiendo de una hidrodestilación en Clevenger o bien realizando la destilación inicial por arrastre de vapor en planta piloto, fueron:

Tabla 4.- Resumen de los rendimientos de los extractos

Extracción inicial	Extracto	Rendimiento
Hidrodestilación en Clevenger	DgCAe DgCH DgCHO	0,012% (ml/100 kg biomasa) 20 ml/100 g de biomasa, en 1 hora 0,32 mg/ml de DgCH
Planta piloto	DgPAe DgPH DgPHO	0,04% (ml/100 kg biomasa) 25 l/100 kg de biomasa, en 1 hora 0.41 mg/ml de DgPH

Una vez obtenidos los extractos, se procedió a comprobar su posible acción biocida y a establecer un cultivo experimental de esta especie de planta, tal como se describe a continuación.

Ejemplo 2.- Cultivo experimental de plantas de *D. graveolens*

Para seleccionar el material vegetal y estandarizar la composición química del mismo, se procedió a realizar el cultivo experimental de plantas de *D. graveolens*, en la finca experimental del CITA (Centro de Investigación y Tecnología Alimentaria de Aragón) en Ejea de los Caballeros, Zaragoza.

Las semillas se originan a partir de plantas silvestres recogidas en la finca La Garganta en el mes de octubre. Como se ha comentado antes, La Garganta está localizada en la zona mesomediterránea, al sur de la provincia de Ciudad Real. Como semillas de referencia "testigo" se recolectaron plantas de Jaca, Huesca. Estas semillas pasaron por ensayos de multiplicación en placas Petri, sin medio de cultivo, sobre papel filtro

humedecido a temperatura y luz controladas (24°C-34°C; 22°C y 4°C-14°C), hasta que se produjo su germinación. Se observó que las semillas se multiplicaban mejor y muy rápidamente en el ensayo de calor (>22°C), por lo que su cultivo pareció factible. Las plántulas obtenidas de cada ensayo se trasplantaron a alveolos en invernadero, y de ahí, plántulas seleccionadas de cada lote fueron plantadas manualmente en la finca experimental de Ejea de los Caballeros (Zaragoza, España, 42°07'38" N, 1°08'18" W, situada a una altitud de 342 m., en una instalación de riego por goteo. En total se sembraron plantas de los 7 lotes originados en la finca La Garganta más un lote de plantas testigo procedentes de Jaca, con una media de 200 plantas por lote, dando lugar a un total aproximado de 1600 plantas. Las plantas de un mismo lote se plantaron formando una fila, en un marco de plantación de 0,255 m²/planta. Así, para cada lote procedente de La Garganta, se obtuvo una población de plantas cultivadas en Ejea de los Caballeros. La plantación tuvo lugar en mayo de 2015, recogándose en el mes de septiembre, controlándose la recolección por lotes. En el momento de su recolección, el grado de floración era del 0-50%. Además, plantas seleccionadas de cada población se cubrieron para producción de semillas (selección), utilizándose después para sembrar plantas de las mismas poblaciones en la siguiente temporada.

Las partes aéreas de las plantas recolectadas se secaron de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 1, separando de cada lote 2 kg de biomasa para el control de materia seca y la destilación en laboratorio en Clevenger. Con el resto se procedió a la extracción en planta piloto.

La extracción en planta piloto se realizó de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 1, sección 1.3., con la particularidad de que la extracción se realizó en dos fases de presión: la primera media hora entre 0,6 y 0,7 bares (entre 60 y 70 kPa), y la segunda media hora de 0,8 a 1,2 bares (de 80 a 120 kPa).

Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5.- Rendimiento de las distintas poblaciones (Pob) de *D. graveolens* cultivadas, tras extracción en planta piloto

Pob Nº ²	Presión (kPa) (fase 1 / fase 2)	Biomasa verde: peso (kg) ^a	Materia seca (MS) (%) ^b	Aceite esencial obtenido (ml)	Rendimiento aceite % BV ¹	Hidrolato separado (ml)
1	60-70 / 80-120	47,72	43,56	18	0,04	29
2	60-70 / 80-120	68,96	38,23	61,0	0,09	7

3	60-70 / 80-120	72,70	45,32	52	0,07	26
4	60-70 / 80-120	79,70	42,57	40	0,05	11
5	60-70 / 80-120	50,82	42,31	24	0,05	4
6	60-70 / 80-120	48,80	49,50	36	0,08	5
7	60-70 / 80-120	57,59	44,66	30	0,05	6
8 ^b	60-70 / 80-120	46,90	45,63	26	0,06	5

¹ Los números de las poblaciones (Pob) coinciden con los del lote de procedencia de La Garganta

² BV – Biomasa Verde

^a De cada lote se separan 2 kg de biomasa para el control de MS y destilación en laboratorio

^b Porcentaje en peso respecto al peso de la biomasa verde

^c Lote testigo

Para comprobar la existencia o no de diferencias debidas a la sesión de recolección, en septiembre de 2015 se recogieron también plantas silvestres en la finca La Garganta, que se trataron del mismo modo que las recogidas en Ejea de los Caballeros y se sometieron a extracción por arrastre de vapor en planta piloto en las mismas condiciones. En la Tabla 6 se resumen los rendimientos de los extractos de plantas de una y otra procedencia, pudiendo observarse que los rendimientos son similares.

Tabla 6.- Resumen de los rendimientos de los extractos según su procedencia

Muestra	Extracción	Extracto	Rendimiento
Silvestre (LG) (Finca La Garganta)	Clevenger	DgCAeLG	0,11%
		DgCHLG	20 ml /100 g planta (biomasa verde)
	Planta Piloto	DgCHOLG	0,32 mg/ml
		DgPAeLG	0,07%
Cultivada (E) (Finca experimental, Ejea de los Caballeros)	Clevenger	DgCAeE	0,10%
	Planta Piloto	DgPAeE	0,06%

Ejemplo 3.- Bioactividad de extractos de *D. graveolens*

Las plagas diana utilizadas en estos ensayos, particularmente los insectos y ácaros (garrapatas), se seleccionaron por la importancia económica de su incidencia sobre cultivos hortícolas, su capacidad de transmisión de virus (particularmente en el caso de los áfidos), así como su disponibilidad y facilidad de cría y mantenimiento en el laboratorio. Por lo demás, los resultados obtenidos con ellas pueden considerarse

extensibles a otras especies de su mismo grupo (los acáridos en general y dentro de ellos, las garrapatas, los insectos y los nematodos).

3.1. Efectos ixodicidas

- Los ensayos de toxicidad se realizaron en tres géneros distintos de garrapatas (5 *Hyalomma*, *Rhipicephalus* y *Haemaphysalis*), concretamente las especies: *Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus pusillus* y *Haemaphysalis hispanica*. Para garantizar la homogeneidad de los lotes se partió de hembras grávidas recogidas sobre animales silvestres, en condiciones de campo y áreas libres de tratamientos con acaricidas convencionales. Las hembras se incubaron hasta la oviposición y eclosión de las larvas.
- 10 Los ensayos de repelencia se realizaron sobre adultos de *Hyalomma lusitanicum* recogidos de vegetación en zonas libres de tratamientos acaricidas convencionales. Esta especie es la más abundante de la zona centro de España (Estrada-Peña et al., 2004) y ha cobrado gran interés en los últimos tiempos por su posible papel en la transmisión del virus Crimea Congo (Oteo Revuelta et al, 2010).
- 15 Tras la recolección las garrapatas se identificaron utilizando claves específicas (Gil Collado, 1979; Estrada y et al, 2004).
- Toxicidad: Para los ensayos de toxicidad, la preparación de los lotes se realizó inmediatamente antes de los ensayos mediante recuento manual de 20 larvas (3 lotes por producto a ensayar) de 15-16 días de vida, para garantizar su quitinización (Ouhelli et al 20 1984), seleccionando exclusivamente las que presentaban movilidad adecuada. Para garantizar la homogeneidad de los lotes, todo el ensayo se realizó con larvas de una misma puesta. Cada lote se mantuvo en tubo de ensayo de vidrio cerrado con una película plástica flexible (Parafilm M®, Sigma Aldrich) hasta la aplicación del tratamiento. Cada extracto a ensayar se preparó por triplicado en microtubos de 2 ml (Eppendorf 25 Ibérica) con 25 mg de celulosa (celulosa cristalizada, Merck). Sobre la celulosa se depositaron 50 µl de la solución stock a la concentración deseada (20, 15, 10, 5, 2,5 y 1 µg/µl de extracto). Por otro lado, se procedió de igual manera con el disolvente empleado, acetona, que se utilizó como control negativo, y con el producto ixodicida comercial (Acibelte® =0,5 % cipermetrina) utilizado como control positivo. A continuación se dejó 30 secar la celulosa con los productos a vacío y temperatura ambiente. El contenido de los microtubos (celulosa) de cada lote se aplicó al correspondiente tubo de larvas que se taponó con algodón hidrófilo. Se aseguró mediante movimientos rotatorios que la celulosa impregnaba las larvas y se dispusieron a condiciones de incubación (24°C y HR superior al 70%).

La mortalidad de las larvas se analizó a las 24h de aplicar el tratamiento, procediendo al recuento de larvas vivas y muertas de cada tubo de ensayo. Posteriormente se calculó el porcentaje de mortalidad con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Mortalidad} = (\% T - \% C / 100 - \% C) \times 100$$

5 donde

%T: Porcentaje de mortalidad en el tratamiento, y

%C: Porcentaje de mortalidad en el control.

- Repelencia: Se utilizaron 3 lotes, de 10 garrapatas adultas (5 machos y 5 hembras) por extracto/producto (a dosis de partida de 20 o 10 mg/ml), mantenidas en tubos de ensayo tapados con algodón. Los ejemplares se mantuvieron a 24°C y HR superior al 70%. Se emplearon discos de papel de filtro de 2 cm de diámetro impregnados con 20 µl de disolvente (control negativo) o extracto/producto a evaluar. El test se realizó en dos Erlenmeyer de 100 ml conectados y tapados con algodón, en uno se introdujo un disco con el extracto a testar y en el otro un disco control. Se contabilizaron las garrapatas, en función de su localización (Erlenmeyer con tratamiento, zona intermedia y Erlenmeyer control) a los 10, 20, 30, 40 y 50 minutos; 1, 2, 3 y 4 horas. Se calculó el porcentaje de repelencia. % RP, aplicándose la fórmula:

$$RP = [1 - (\% T / \% C) \times 100]$$

donde

20 % T: porcentaje de garrapatas en el Erlenmeyer con tratamiento, y

% C: porcentaje de garrapatas en el control.

Se consideró que un extracto es activo cuando su RP >75%.

En la Tabla 7 se muestran los efectos (mortalidad de larvas) de los extractos de aceites esenciales (Clevenger: DgCAe, y planta piloto, DgPAe) y de la fase orgánica del hidrolato de planta piloto (DgPHO) de *D. graveolens* frente a varias especies de garrapatas (*Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus pusillus*, *Haemaphysalis hispanica*). Se muestran los resultados para las recolecciones del 2014 (extractos con la anotación 14) y 2015 (extractos con la anotación 15) de la planta silvestre (abreviaturas terminadas en LG), y del cultivado (abreviaturas terminadas en E). Como puede observarse, todos los extractos fueron activos, con variaciones en el nivel de efectividad, correspondiendo la mayor efectividad a las fases orgánicas de los hidrolatos. También los hidrolatos como

tales mostraron actividad, de forma que los resultados de las fases orgánicas de los hidrolatos confirman que la actividad de éstos se debe a los compuestos orgánicos presentes en los mismos.

Tabla 7.- Mortalidad de larvas de garrapatas por extractos de *D. graveolens*

Origen	Extracto	Concentración % Mortalidad larvas				
		(mg/ml)	<i>H.</i>	<i>R.</i>	<i>H.</i>	
			<i>lusitanicum</i>	<i>pusillus</i>	<i>hispanica</i>	
Silvestre (La Garganta)	DgPAe14LG	20	100±0	100±0	100±0	
		10	100±0	100±0	100±0	
		5	23,2±7,9	30,7±13,4	36,6±9,5	
	DgPHO14LG	20	100±0	100±0	100±0	
		10	100±0	100±0	83,0±9,5	
		5	97,9±2,0	98,1±1,9	51,3±16,4	
		2,5	39,4±6,4			
	DgPAe15LG	20	100±0	100±0	98,4±1,6	
		10	65,8±6,3	100±0	91,4±8,6	
		5	0	0,24±9,5	63,1±1,2	
	DgPHO15LG	20	100±0	100±0	100±0	
		10	100±0	100±0	96,4±1,7	
		5	15,9±9,1	91,8±2,2	5,6±0,7	
	Cultivada (Ejea de los Caballeros)	DgPAe15E	20	100±0	100±0	98,3±1,7
			10	64,1±25,4	100±0	91,0±2,3
5			0	16,1±16,7	40,3±15,3	
DgPHO15E		20	100±0	100±0	100±0	
		10	100±0	100±0	89,5±10,5	
		5	54,9±21,2	100±0	46,8±10,2	

5

El estudio de la repelencia de estos extractos frente a adultos de *H. lusitanicum* (Fig. 2) dio resultados similares a los de toxicidad por contacto en larvas, siendo mayor la actividad de los extractos orgánicos de los hidrolatos que la de los aceites esenciales.

3.2. Efectos insecticidas

10 Los ensayos de efectos insecticidas se llevaron a cabo con un lepidóptero, *Spodoptera littoralis*, conocida también como rosquilla negra, y con dos especies de áfidos, *Myzus persicae* (pulgón verde del melocotonero) y *Rhopalosiphum padi* (pulgón de la avena o

pulgón de los cereales. Estas especies se seleccionaron por la importancia económica de su incidencia sobre cultivos hortícolas, su capacidad de transmisión de virus en el caso de los áfidos, su disponibilidad y su facilidad de cría y mantenimiento en laboratorio.

5 *Spodoptera littoralis* es un lepidóptero de la familia Noctuidae conocido por su extrema voracidad. Los principales cultivos a los que afecta son hortícolas: pimiento, alfalfa, maíz, algodón, tomate, patata, entre otros. Presenta seis estadios larvales y en su mayor desarrollo pueden alcanzar 4 cm de longitud. La oruga tiene actividad nocturna y come cualquier parte verde de la planta y los frutos. Su extrema voracidad y su alta capacidad reproductora y de migración les confiere una gran importancia económica en el Norte de
10 África y Europa meridional.

Myzus persicae es un pulgón de tamaño medio, de 1,2 a 2,3 mm, cuyo hospedador primario suele ser una planta del género *Prunus*, sobre todo *Prunus persica* L. (el melocotonero), aunque es muy polífago y presenta más de cuarenta familias de hospedadores secundarios, muchas de ellas de elevado interés económico. Es capaz de
15 transmitir más de 100 tipos de virus, que afectan a plantas de gran interés comercial, algunos persistentes, otros semipersistentes y también no persistentes. Al igual que su hospedador primario, es originario de Asia aunque actualmente se considera cosmopolita.

Rhopalosiphum padi (L) es uno de los 14 áfidos considerados dentro de los de mayor
20 importancia económica en el mundo y es altamente polífago. Como en el caso de *Myzus persicae*, el hospedador primario suele ser una planta del género *Prunus*, generalmente *Prunus padus* (L.). En lo que se refiere a sus hospedadores secundarios, es bastante polífago. Prefiere las gramíneas, incluidos los cereales y las plantas de pasto. En vector de virus vegetales persistentes y algunos no persistentes. Se distribuye por todo el
25 mundo.

La cría y mantenimiento de los insectos se llevó a cabo en una cámara de temperatura controlada a 24±1°C, 60-70% de humedad relativa y un fotoperíodo de 16:8 horas (luz:oscuridad). *S. littoralis* se crió en cajas de plástico de diferentes dimensiones dependiente del estadio larval, tamaño y número. Las larvas de *S. littoralis* se
30 mantuvieron con una dieta semisintética (Poitout & Bues. 1970) y los adultos con solución azucarada. Los áfidos se criaron sobre sus plantas hospedadoras, cebada (*Hordeum vulgare* L.) en el caso de *R. padi* y pimiento (*Capsicum annum* L.) para *M. persicae*, en cámaras climatizadas, en jaulones ventilados, transfiriéndose a plantas frescas cada 7-10 días.

-Actividad alimentaria: Los ensayos se realizaron con larvas recién emergidas de sexto estadio (L6) de *S. littoralis* y pulgones adultos ápteros. La superficie superior de discos de hoja (1,0 cm²) de pimiento (*Capsicum annum* L.) en el caso de *M. persicae*, o de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en el caso de *R. padi*, fueron tratados con 10 µl de la muestra a
 5 ensayar. Cada ensayo consistió en 5 placas Petri con dos larvas por placa (*S. littoralis*) o veinte cajas (2x2 cm) con diez áfidos de *M. persicae* y *R. padi*, incubados en una cámara de crecimiento en las mismas condiciones descritas para la cría de los insectos. Una vez consumido el 75% de la superficie de los discos control (*S. littoralis*) o después de 24 h (áfidos) se calculó el índice de consumo (% FI) o de asentamiento (% de SI),
 10 respectivamente, según las fórmulas:

$$\% \text{ FI} = [1 - (T / C) \times 100],$$

donde T y C son el consumo de discos de hojas tratadas y control; y

$$\% \text{ de SI} = [1 - (\% T / \% C)],$$

donde % C y % T son el porcentaje de áfidos asentados en los discos de hojas control y
 15 tratadas (Burgueño –Tapia et al. 2008). Cuando la solución ensayada dio lugar a un FI / SI > 70 %, se ensayó también en un experimento de dosis – respuesta para calcular su potencia relativa (EC50), que es la dosis efectiva para una reducción de un 50 % de la alimentación.

-Toxicidad: Se seleccionaron larvas de *Spodoptera littoralis* en estado L6 (con un peso
 20 entre 0,2 y 0,3 g). Se colocan 20 placas Petri por tratamiento y 25 para el control, en las que se coloca un disco de papel de filtro por placa. Se pesa entre 4-5 g de dieta por placa. Una vez pesadas dieta y larvas y anotados los pesos en cada placa, se canulan las larvas con 5 µl de producto a cada una. Una vez canuladas se dejan 72 horas en la cámara. Después se congelan durante otras 72 horas. Se pasan a la estufa a 60 °C
 25 durante 72 horas. Por último se pesan las larvas y la dieta (peso seco) y se calcula el peso fresco de ambos, una vez transcurrido el ensayo.

La Tabla 8 muestra la actividad antialimentaria (ensayos de elección) frente a insectos plaga (*Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*) de los extractos de *D. graveolens*, cuyos nombres se han abreviado siguiendo los mismos criterios que en la
 30 Tabla 7. Los aceites esenciales fueron activos como repelentes (actividad antialimentaria) frente a *S. littoralis* y frente a los pulgones, siendo *R. padi* el más sensible; también la fracción orgánica del hidrolato dio lugar a actividad frente a pulgones. Los extractos del

año 2015 de planta silvestre y cultivada no presentaron actividad significativa frente al pulgón.

Tabla 8.- Actividad antialimentaria frente a insectos herbívoros de extractos de *D. graveolens* en ensayos de elección.

Extracto	Plantas	Concentración (mg/mL)	<i>S. littoralis</i>	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>
			% FI	% SI	% SI
DgPAe14LG	Silvestre	10	72,2 ± 17,2 ^a	70,12 ± 5,91 ^a	95,86 ± 1,97 ^b
DgPHO14LG	(La	10	51,9 ± 14,4	88,49 ± 2,84 ^b	81,78 ± 6,18 ^b
DgPAe15LG	Garganta)	10	52,9±16,2	59,55 ± 7,95	41,32 ± 9,48
DgPHO15LG		10	62,7±17,6	51,26 ± 9,65	69,09 ± 6,79
DgPAe15E	Cultivada	10	64,9±16,1	58,40 ± 9,65	64,01 ± 6,95
DgPHO15E	(Ejea)	10	49,9±,8	44,85 ± 9,61	61,78 ± 7,05

5 ^a Moderadamente activo. ^b Muy activo

El estudio de los efectos postingestivos (inyección oral) en larvas de *S. littoralis* se muestra en la Tabla 9, donde la influencia en el crecimiento se expresa mediante ΔB (variación en peso seco del insecto respecto del control), y la variación en la ingesta mediante ΔI (variación en la ingesta en peso seco respecto del control). Como puede verse, el aceite esencial (DgPAe) no afectó al crecimiento (ΔB) o la ingesta (ΔI) de las larvas, mientras que la fase orgánica del hidrolato (DgPHO) redujo significativamente ambos parámetros, lo que sugiere interferencia en los procesos digestivos y de crecimiento del insecto. Es importante destacar que este extracto (DgPHO) no tuvo efectos antialimentarios en los ensayos de elección efectuados con este insecto (véase la Tabla 8), lo que permitiría la utilización de este extracto como retardador del crecimiento de poblaciones de insectos lepidópteros plaga.

Tabla 9.- Actividad postingestiva de extractos de *D. graveolens* sobre el insecto *S. littoralis* en inyección oral

Extracto	Dosis μg/larva	Inyección oral <i>S. littoralis</i>	
		ΔB (% Control)	ΔI (% Control)
DgPAe14LG	100	95,9	100,8
DgPHO14LG	100	77,4 ^a	94,4

^a Moderadamente activo

3.3. Efectos nematicidas

En el ensayo se utilizaron nematodos de la especie *Meloidogyne javanica*. Los nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* son uno de los principales patógenos de especies vegetales y presentan una distribución mundial. Son endoparásitos obligados, de naturaleza polífaga e infectan más de 3000 plantas cultivadas a las que causan severos daños, con las consiguientes pérdidas económicas. La infección se produce cuando el juvenil de segunda edad, móvil e infectivo, es atraído por el sistema radical de la planta hospedadora. Durante todo su ciclo vital el nematodo permanece en el interior de la raíz y la infección afecta al crecimiento de la planta, causa marchitamiento, aumenta su susceptibilidad a otros patógenos y, en determinadas condiciones, puede causar su muerte.

El inóculo de *M. javanica* se obtiene por la eclosión de juveniles de segunda edad (J2) a partir de las masas de huevos recogidas manualmente, bajo microscopio estereoscópico, de raíces infectadas de tomate. Dichas masas se colocan con la ayuda de pinzas en filtros semisumergidos en un pequeño recipiente con agua destilada. Los filtros se incuban en la cámara a 24°C para que los huevos comiencen a eclosionar.

-Ensayos in vitro con juveniles infectivos (J2): Se llevaron a cabo en placas de plástico de 96 pocillos (con fondo en U) con 4 réplicas para cada tratamiento, además del control. En cada pocillo se añadieron 95 µl de la solución de agua con nematodos más 5 µl del extracto analizado a una concentración de 20 µl, para de este modo obtener una concentración final del tratamiento de 1µg/µl. Asimismo los controles incluían 95 µl de la solución con nematodos más 5 µl del disolvente utilizado (DMSO+Tween 0,6%). La distribución de las muestras dentro de la placa se realizó en grupos de 4 al azar y dejando la fila y la columna externas rellenas de agua para mantener la humedad y evitar el efecto borde. Se incubó a 24°C durante 72 horas y a continuación se realizó el recuento de nematodos muertos y vivos en un microscopio estereoscópico. Como se puede ver más adelante, los datos de actividad nematicida se presentan como porcentaje de J2 muertos corregido según la fórmula de Scheider-Orelli (Püntener W., 1981). Las dosis letales eficaces (LC50 y LC90) se calcularon mediante análisis Probit con los resultados obtenidos en distintas concentraciones, empleando para ello el programa estadístico Statgraphics Centurion, versión 2010.

-Ensayos In vivo: Efectos en la capacidad de infección de nematodos (J2): En estos ensayos se evaluó la actividad del extracto sobre la capacidad infectiva en raíces de tomate. Para ello, se realizó un ensayo con nematodos J2 en placa de 96 pocillos tal y

como se especifica en el párrafo anterior de ensayos de actividad *in vitro*, pero en este caso con una dosis de tratamiento subletal. Tras 72 horas de incubación, el inóculo se filtró, se lavó y se aplicó a las plántulas de tomates que previamente habían sido transplantados en pequeñas macetas con arena estéril. Se realizaron 6 réplicas con el tratamiento, con sus respectivos controles inoculados con J2 sin tratar. Los tomates se mantuvieron en cámara (25 ± 2 °C, 60% HR, 16:8 Día:Noche) durante una semana, tras la cual se procedió al procesamiento de las raíces y su tinción. Estas se lavaron con una solución de lejía con 1% de hipoclorito sódico y sin detergentes, y posteriormente con agua., y se colocaron separadamente en vasos de precipitados pequeños a los que se añadieron 40 ml de agua y 1 ml de colorante fucsina. Se llevaron a ebullición en un microondas y se dejaron enfriar. Se lavaron las raíces y se conservaron en frío y tapadas durante 24 h. Una vez transcurrido ese tiempo, se cuantificó el número de J2 en el interior de las raíces bajo un microscopio estereoscópico

En la Tabla 10 se muestran los resultados de actividad de los aceites esenciales y fases orgánicas de hidrolato sobre el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne javanica*. El hidrolato obtenido en la extracción en planta piloto (DgPH) de la planta silvestre (La Garganta) no presentó actividad nematicida, pero si el procedente de la planta cultivada (Ejea) (Tabla 10) debido a una variación cuali/cuantitativa en la composición química, como se discutirá posteriormente.

El hidrolato indujo fuertes efectos nematicidas en juveniles infectivos. Así mismo el tratamiento de juveniles con hidrolato a dosis subletal produce una supresión significativa de su capacidad para infectar raíces de tomate (Fig. 3).

Tabla 10. Actividad de extractos de *D. graveolens* sobre la mortalidad de J2 de *M. javanica*

Extractos		Concentración		% Mortalidad J2		
				72h		^a LC ₅₀
		%	mg/ml			
DgPAe15LG	Silvestre		1,0	4,08 ± 11,55		
DgPH15LG	(La	100		1,18 ± 0,36		
DgPHO15LG	Garganta)		1,0	38,27 ± 0,69		
DgPAe15E	Cultivada		1,0	12,3 ± 3,8		
DgPH15E	(Ejea)	100		1,33 ± 0,77		
DgPHO15E			1,0	94,21 ± 5,19 ^a	0,6 ^{a,b}	1,1 ^{a,b}

^a Muy activo; ^b Valores de LC50 y LC90 (mg/ml) calculados por análisis Probit

Una vez establecido el valor biocida del aceite esencial de *D. graveolens* se ha procedido al estudio químico biodirigido del aceite esencial para determinar los principios activos.

Ejemplo 4.- Estudio químico biodirigido de extractos. Caracterización de principios activos

Para llevar a cabo la caracterización de los principios activos presentes en los extractos, se utilizaron las siguientes técnicas:

5 - Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los espectros de RMN se realizan en los espectrómetros Bruker Avance 400 MHz y Bruker AMX 500 MHz (500 y 400 MHz para ^1H y 100 y 125 MHz para ^{13}C). Los productos se disuelven en CDCl_3 , MeOD y DMSO- d_6 . Los valores de los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm), en relación al disolvente empleado como referencia interna que, salvo que se indique lo contrario, fue cloroformo deuterado ($\delta_{\text{H}}=7,26$ ppm y $\delta_{\text{C}}=77,16$ ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se midieron en Hertzios (Hz). Los experimentos bidimensionales de correlación homo y heteronuclear ($^1\text{H}-^1\text{H}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$): COSY, NOESY, HSQC y HMBC de los productos puros se realizan en equipos de espectroscopía de la marca Bruker AMX 500, utilizando el software estándar suministrado por la firma Bruker.

10 - Espectrometría de Masas (EM). Los espectros de masas de baja y alta resolución se realizaron en un equipo de espectrometría Vg-Micromass modelo Zab 2F (la temperatura de la fuente fue de 220 °C y la energía de ionización de 70 eV) y en un espectrómetro Micromass modelo LCT Premier XE, usando electroespray (ESI) como fuente de ionización de modo positivo y negativo. Para cada producto se indican las fragmentaciones más significativas y su intensidad relativa.

15 - Cromatografía en columna (CC). Para la separación de los compuestos se utilizaron columnas cromatográficas, donde se emplean como fase estacionaria diferentes tipos de gel de sílice y un tipo de óxido de aluminio de la casa comercial Merck:

- 25
1. Gel de sílice 60, Art. 7734 (0,063-0,200 mm).
 2. Gel de sílice 60 HF₂₅₄₋₃₆₆, Art. 7741 (5-40 μm).
 3. Gel de sílice 60 PF₂₅₄, Art. 7749.
 4. Óxido de aluminio, Actividad neutra. Art. 1076.

30 Como fase móvil se utilizaron mezclas de disolventes de n-hexano-acetato de etilo (AcOEt), CH_2Cl_2 -MeOH y AcOEt-MeOH en polaridades crecientes.

- Cromatografía líquida a vacío CLV. Se utilizó como fase estacionaria dos tipos de gel de sílice (art. 7734 y 7749), descritos en el párrafo anterior y como fase móvil un

gradiente de mezcla de disolventes n-hexano-AcOEt y AcOEt-MeOH en proporciones de polaridades crecientes.

- Cromatografía en Capa Fina (CCF). El seguimiento de las columnas cromatográficas se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina, usando 5 cromatofolios comerciales de gel de sílice 60 F₂₅₄ con base de aluminio (20 x 20 cm, Art. 5554) y óxido de aluminio neutro 60 F₂₅₄ con base de aluminio (20 x 20 cm, Art. 5550), adquiridas en la casa comercial Merck. En el sistema de elución se utilizaron los mismos disolventes y polaridades que en las columnas cromatográficas. El revelado de los 10 cromatofolios se realizó utilizando el reactivo óleum/vainillina para detectar los compuestos, mediante pulverización sobre los cromatofolios y calor. Oleum: está compuesto por una mezcla de ácido sulfúrico (4%), ácido acético (80%) y agua destilada (16%). Las placas se pulverizaron con este reactivo y se visualizaron aplicando calor (110-130 °C).

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

15 Se disuelve la vainillina en el etanol y luego se adiciona el ácido sulfúrico lentamente con agitación constante. Al adicionar el ácido sulfúrico la mezcla cambia de color. Con el paso del tiempo el etanol se evapora y el revelador se pone oscuro. Se adicionar más etanol hasta obtener el color inicial.

- Cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) Para la determinación 20 cualitativa y cuantitativa de los compuestos presentes en los aceites esenciales y fracciones volátiles se utiliza como metodología básica el acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), en un cromatógrafo de gases Agilent modelo 5973N acoplado a un detector de masas con fuente de ionización por impacto electrónico (IE) a 70eV.

25 Con este equipo se ha utilizado una columna capilar HP-1 (fase ligada de metil silicona) de Hewlett-Packard: 25 m de largo, 200 µm de diámetro interno y 0,2 µm de espesor de fase. Las condiciones utilizadas han sido: split (30:1); temperatura del inyector 260°C; temperatura de la columna 70°C, calentando hasta 270°C a 4°C/min. Los espectros de masas y el tiempo de retención han sido utilizados para identificar los compuestos por 30 comparación con los encontrados en la base de datos Wiley (Wiley 275 Mass Spectra Database, 2001) mientras que para la cuantificación se han utilizado los % del área de los picos obtenidos en los cromatogramas.

- Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (HPLC-MS). Los 35 extractos no volátiles se analizaron por HPLC-MS en un equipo Shimadzu con bomba LC-20AD acoplado a un espectrómetro de masas con cuadrupolo como analizador

(LCMS-2020 QP) y usando una interfase e ionización por electroespray (ESI). Para la separación se utilizó una columna Teknokroma Mediterranea Sea₁₈ column (250 mm x 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) con una pre-columna analítica ACE3 C18. Las soluciones stock de los extractos se analizan a 0,25 µg/µl y los compuestos puros a 0,05 µg/µl (patrones) disueltos en 100% MeOH para llevar a cabo su inyección (10 µl). Todos los disolventes utilizados son de grado HPLC-MS.

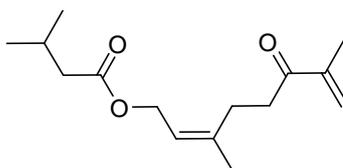
- Aislamiento de los compuestos El aceite esencial DgPAe14LG (30g) se fraccionó mediante cromatografía líquida de vacío (VLC) sobre sílica gel (Si-gel) usando mezclas Hx:DCM en gradiente de polaridad (100:0-0:100), obteniendo de esta manera 10 fracciones (VLC 1-10) claramente diferenciadas mediante TLC. El análisis de GC-MS de estas fracciones mostró que el componente mayoritario del aceite (Acetato de bornilo) se encontraba presente en las fracciones VLC 3-5.

La fracción VLC-8 se fraccionó mediante cromatografía Flash sobre Si-gel usando una mezcla de Hx:AcOEt (100:0-60:40). Mediante TLC semipreparativa y usando la misma mezcla de disolventes, se aislaron los compuestos 3, 4 y 5.

Estos compuestos se identificaron mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

Dentro del análisis realizado, deben destacarse los siguientes hallazgos:

COMPUESTO 3. En los datos espectroscópicos (¹H-RMN y ¹³C-RMN) se puede observar la presencia de cuatro metilos (dos de ellos sobre doble enlace). Cinco grupos metilenos (uno de ellos unido a un átomo de oxígeno y otro formando parte de un doble enlace). Dos metinos (uno de ellos olefínico) y cuatro carbonos cuaternarios (dos de ellos pertenecientes a dobles enlaces y los otros dos a grupos carbonilos). Teniendo en cuenta las correlaciones ¹H-¹H (Cosy) y las correlaciones ¹H-¹³C (HSQC y HMBC) fue posible identificar el compuesto 3 como isovalerato de (2Z)-3,7-dimetil-6-oxo-octa-2,7-dien-1-ilo (o, siguiendo la nomenclatura de la IUPAC, 3-metilbutanoato de (Z)-3,7-dimetil-6-oxoocta-2,7-dien-1-ilo), cuya fórmula se representa a continuación. La Fig. 4 muestra de las asignaciones de los desplazamientos, así como los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN.



3-metilbutanoato de (Z)-3,7-dimetil-6-oxoocta-2,7-dien-1-ilo

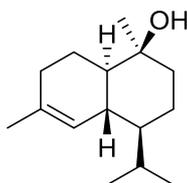
Este compuesto aún no ha sido descrito en la literatura. Aunque su ácido y la forma *trans* de su correspondiente alcohol sí lo están.

La forma *trans* del alcohol y su correspondiente acetato están descritos (Zdero. et al..1986). También han sido aislados de *Artemisia granatensis* con actividad frente a pulgones (Barrero. et al., 2013)

En el cromatograma de este compuesto aparece un pico minoritario con menor tiempo de retención que presenta un patrón de fraccionamiento muy similar en su espectro de masas, por lo que podría tratarse del isómero *trans*.

COMPUESTO 4 Dg II(23) = DGIII(21-32)

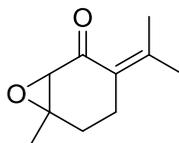
10



T-Cadinol

15 Los datos de ^{13}C coinciden con los publicados (Appendino et al., 1997). El ^1H -RMN y el $[\alpha]_D$ de este compuesto aparecen en Cheng. et al (1967), pero no coinciden tan fielmente como lo hace el ^{13}C antes mencionado.

COMPUESTO 5: Óxido de piperitenona (96 % Wiley) DgIII(10-12)-2bis = DGIII(13-16)bis



20

Óxido de piperitenona

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 3,24 (1 H, s), 2,43 – 2,54 (1 H, m), 2,33 – 2,42 (1 H, m), 2,05 – 2,21 (1 H, m), 2,11 (3 H, d, $J=2,5$ Hz), 1,88 (1 H, ddd, $J=14,6, 12,9, 5,9$ Hz), 1,80 (3 H, d, $J=1,5$ Hz), 1,48 (3 H, s),

^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 198,45, 149,26, 127,68, 63,46, 63,41, 27,94, 23,16, 23,13, 23,13, 21,81.

Los datos coinciden con los publicados por Thach. et al. (2013) y son muy parecidos a los publicados por Nakamura. et al (2014).

4.1. Análisis químico de los extractos de *Dittrichia graveolens*

Una vez realizado el aislamiento e identificación de los compuestos, según se ha indicado en la parte metodológica, se obtuvo la composición de los extractos volátiles que se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Composición química (abundancia relativa %) de los aceites esenciales obtenidos en planta piloto (PAe), y fases orgánicas de los hidrolatos (PHO) obtenidos de plantas recolectadas en la finca La Garganta (LG) (años 2014 o 2015, partes finales de abreviaturas 14LG o 15LG, respectivamente) o en el cultivo de Ejea de los Caballeros (E) (año 2015, parte final de abreviatura: 15E)

Tiempo de retención (tr)	Compuesto	Aceites esenciales			Hidrolatos		
		Silvestre (La Garganta)		Cultivada (Ejea)	Silvestre (La Garganta)		Cultivada (Ejea)
		PAe14LG	PAe15LG	PAe15E	PHO14LG	PHO15LG	PHO15E
4,16	Canfeno	1,4 – 4,3	3,04	1,8 – 3,7			
4,57	β -Pino		0,37	0,2 – 0,6			
8,12	Borneol	5,6 – 6,4	8,57	3,5 – 8,2	34,93	44,70	50,10
8,51	<i>p</i> -Cimen- α -ol						1,22
8,67	<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol						3,35
10,71	94/79/59/43/93/95/41/97/77/91*						9,71
10,81	Acetato de endobornilo	84,6 – 86,5	75,13	73,0 – 78,4	17,92	47,59	18,40
10,85	Timol						1,07
11,07	Carvacrol			0,4 – 3,0			7,50
11,14	59/94/79/43/95/93/77/58/137/41*						8,65
12,05	Piperitenona				9,34		
12,59	Óxido de piperitenona				4,17		
13,85	β -t-Cariofileno	1,2 – 1,7	2,69	6,0 – 7,6			
15,86	γ -Cadinene		1,32				
17,16	69/93/41/68/80/57/85/121/67/92*			1,5 – 1,8			
17,33	Oxido de cariofileno		1,38	1,7 – 2,3			
1845	T-Cadinol	2,6 – 1,2	5,03				
18,76	81/43/135/71/204/95/93/161/109/189*		2,47	2,8 – 3,5		2,04	
27,53	124/55/107/148/250/67/191/41/235/82*					2,58	

*Datos de ¹³C-RMN del compuesto

El aceite esencial de *D. graveolens* silvestre (DgPAeLG) y cultivado (DgPAeE) se caracteriza por su contenido en acetato de endobornilo y borneol. Las diferencias cualitativas entre esos dos aceites se centran en la presencia de pequeñas cantidades de carvacrol y un compuesto no identificado de tiempo de retención (rt) 17,16 en DgPAeE y la presencia de τ -cadinol en DgPAeLG. Las diferencias cuantitativas entre esos dos aceites afectan al contenido en β -cariofileno, óxido de cariofileno y un compuesto no identificado de rt 18,76 (mayor en DgPAeE).

La fase orgánica del hidrolato de la planta silvestre (DgPHOLG) y cultivada (DgPHOE) se diferencian cualitativamente por la presencia de p-cimeno, mentadieno, un compuesto no identificado de rt 10,71, timol, carvacrol y un compuesto no identificado de rt. 11,14 en DgPHOE. Además, en DgPHO14LG aparecen piperitenona, óxido de piperitenona, τ -cadinol y un compuesto no identificado de rt 18.76.

4.2 Estudio químico biodirigido del aceite esencial de *Dittrichia graveolens* (DgPAe)

El aceite esencial (DgPAe) obtenido por extracción en planta piloto de planta silvestre (La Garganta. 2014) se sometió a estudio químico biodirigido mediante cromatografía guiada por bioensayo (actividad ixodocida sobre *H. lusitanicum* y antialimentaria sobre *R. padi*) (Fig. 7).

La fracción VLC7 fue la más activa frente a la garrapata (Tabla 12: toxicidad de larvas, y Fig. 8: repelencia de adultos) y el pulgón (Tabla 13).

Tabla 12.- Actividad ixodocida (% mortalidad) de las fracciones VLC del aceite esencial de *D. graveolens* (DgPAe14LG) frente a larvas de *H. lusitanicum*.

Muestra	Concentración (mg/ml)				
	20	10	5	2,5	1,25
DgVLC1	<u>98,33 ± 1,7</u>	13,79 ± 9,12	5,45 ± 6,59		
DgVLC2	<u>100,00 ± 0,0</u>	<u>100,00 ± 0,0</u>	<u>100,00 ± 0,0</u>	30,51 ± 16,69	14,96 ± 1,53
DgVLC3	<u>100,00 ± 0,0</u>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		
DgVLC4	53,06 ± 6,4				
DgVLC5	20,82 ± 7,8				
DgVLC6	31,35 ± 17,9				
DgVLC7	<u>100,00 ± 0,0</u>	<u>100,00 ± 0,0</u>	<u>100,00 ± 0,0</u>	<u>96,43 ± 1,78</u>	38,41 ± 1,36
DgVLC8	<u>100,00 ± 0,0</u>	<u>100,00 ± 0,0</u>	75,26 ± 9,57	46,82 ± 4,89	19,21 ± 4,89
Dg VLC9	<u>100,00 ± 0,0</u>	<u>98,62 ± 1,38</u>	17,44 ± 9,29		
Dg VLC10	<u>100,00 ± 0,0</u>	<u>85,71 ± 11,12</u>	5,17 ± 1,72		

(Datos subrayados: concentraciones muy activas)

Tabla 13: Actividad antialimentaria de las fracciones VLC del aceite esencial de *D. graveolens* (DgPAe14LG) frente a *R. padi* (%SI).

Concentración (mg/ml)						
Muestra	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31
DgVLC1	59,18±8,76	5,45±6,59				
DgVLC2	<u>84,83±7,4</u>	<u>87,69±3,56</u>	60,67±11,97	51,35±9,7		
DgVLC3	62,88±8,27					
DgVLC7	<u>89,52±5,65</u>	<u>91,83±3,08</u>	<u>91,35±3,64</u>	60,77±7,94	73,01±6,28	36,76±10,03
DgVLC8	<u>89,82±5,65</u>	<u>91,96±5,27</u>	76,03±6,61	42,33±10,27	30,88±7,78	
Dg VLC9	<u>85,07±4,01</u>	<u>84,86±4,26</u>	67,51±6,19	30,2±8,31		
Dg VLC10	<u>91,19±2,77</u>	<u>82,79±3,76</u>	66,16±6,35	45,02±8,54		

(Datos subrayados: concentraciones muy activas)

La purificación mediante cromatografía de la fracción VLC7 permitió el aislamiento del compuesto minoritario nuevo 3-metilbutanoato de (*Z*)-3,7-dimetil-6-oxoocta-2,7-dien-1-ilo (**3**), óxido de piperitenona (**5**) y τ -cadinol (**4**) (Fig. 5).

En la Tabla 14, por su parte, se muestra la composición química de la fracción VLC7, que destaca por el contenido en óxido de cariofileno y τ -cadinol como mayoritarios.

Tabla 14. Composición química (abundancia relativa %) de la fracción VLC7 activa del aceite esencial DgPAe14LG

Rt	Compuesto	VLC-7
8,13	Endo-borneol	0,9
10,77	Acetato de bornilo	2,1
11,09	Carvacrol	3,0
12,59	Oxido de piperitenona	2,1
13,85	<i>Trans</i> -cariofileno	
14,32	NI	
14,59	α -Humuleno	
15,86	Germacreno-D	
16,03	δ -cadinene	
16,44	NI	
16,69	NI	
17,04	Isovalerato de geranilo (isómero)	

17,18	Isovalerato de geranilo	
17,33	NI	
17,36	Oxido de cariofileno	35,3
17,97	NI	3,0
17,78	NI	
18,34	NI	
18,41	NI	
18,50	T-Cadinol	47,6
18,55	NI	
18,76	NI	
18,78	Selin-1-en-4 α -ol	
19,08	NI	
19,19	NI	
19,23	Caproato de geranilo	
20,18	NI	
25,07	NI	
25,19	NI	

NI: No identificado

En la Fig. 6 se muestran los efectos repelentes de τ -cadinol, borneol, carvacrol y óxido de cariofileno sobre adultos de *H. lusitanicum*. Según estos resultados la repelencia del aceite esencial de *D. graveolens* (DgPAe) podría deberse a su contenido en borneol (2).

- 5 Tabla 15.- Actividad ixodícida (% mortalidad) de los compuestos 1-7 frente a larvas de *H. lusitanicum* y concentración a la que se encuentran en el aceite esencial ensayado (dosis máxima).

Compuesto	Concentración (mg/ml)	% Mortalidad	PAe (mg/ml)		PHO (mg/ml)	
			LG	E	LG	E
2 Borneol	10	<u>100,0\pm0,0</u>	1,7	1,6	9,0	10,0
	5	13,8 \pm 4,5				
1 Acetato de bornilo	10	3,2 \pm 1,6	17	16	9,5	3,7

7 Carvacrol	10	<u>100,0±0,0</u>	0,6	1,5
	5	<u>100,00±0,0</u>		
	2,5	<u>80,0±5,7</u>		
	1,25	16,7 ± 3,3		
9 Timol	5	<u>100,0 ± 0,0</u>	tr	0,2
	2,5	78,0±5,1		
	1,25	43,8±7,6		
5 Oxido de piperitenona	5	<u>100,0 ±0,0</u>	tr	0,8
	2,5	<u>100,0±0,0</u>		
	1,25	<u>100,0± 0,0</u>		
	0,62	47,5±14,3		
	0,31	0,2±3,1		
	0,15	0,0±0,0		
6 Oxido de cariofileno	10	<u>100,0±0,0</u>	0,3	0,5
	5	<u>100,0±0,0</u>		
	2,5	62,5 ± 7,2		
	1,25	0,00 ± 0,0		
4 T-Cadinol	10	<u>100,0±0,0</u>	1,0	0,6
	5	<u>100,0±0,0</u>		
	2,5	<u>100,0±0,0</u>		
	1,25	17,4 ± 5,8		
8 Piperitenona	10	<u>100,0±0,0</u>	tr	1,9
	5	<u>100,0±0,0</u>		
	2,5	<u>100,0±0,0</u>		
	1,25	<u>98,3±1,6</u>		
	0,62	0,0±0,0		

Datos subrayados: concentraciones muy activas

La actividad antialimentaria frente a *R. padi* (Tabla 16) del aceite esencial PAe y extracto PHO 2014 de la planta silvestre se debe al τ -cadinol **4**.

Tabla 16. Actividad antialimentaria de los compuestos 1-9 frente a *R. padi* (%SI)

Compuesto	Concentración (mg/ml)					
	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,16
1 Ac. bornilo	65,3±7,5					
2 Borneol	45,1±8,7					
3 3-metilbutanoato de (Z)-3,7-dimetil-6-oxoocta-2,7-dien-1-ilo	<u>73,6±7,7</u>	<u>75,7±7,1</u>	55,1±6,8	40,6±5,5		
4 T-Cadinol	<u>89,3±4,3</u>	<u>88,3±3,6</u>	<u>88,1±2</u>	<u>81,6±5,5</u>	51,0±6,5	29,9±7,5
5 Ox. piperitenona	<u>74,7±6,5</u>	<u>62,4±7,4</u>				
6 Ox. cariofileno	<u>80,1±5,0</u>	34,7±8,1				
7 Carvacrol	<u>90,6±5,3</u>	<u>77,2±6,4</u>	40,6±7,4			
8 Piperitenona	44,5±6,6					
9 Timol	40,60±7,44	65,6±6,4	38,5±10,5	12,3±4,0		

(Datos subrayados: en continuo: concentraciones muy activas; en punteado: moderadas)

4.3. Estudio biodirigido del hidrolato fase orgánica de *Dittrichia graveolens* (PH)

- 5 En la fase orgánica del hidrolato (PHO) de planta silvestre se detectó la piperitenona (**8**), que ha resultado muy activa frente a la garrapata (ver Tabla 16 anterior).

En el extracto DgPHO de planta cultivada se ha detectado la presencia de carvacrol (**7**) y timol (**9**) en pequeñas cantidades. Estos compuestos también se han ensayado y son muy activos frente a la garrapata y el nematodo.

- 10 El compuesto **8**. También presenta una importante actividad antialimentaria frente a *S. littoralis* pero no frente a *M. persicae* (Tabla 17). También es muy activo frente a *M. javanica* (Tabla 18).

Tabla 17. Actividad antialimentaria de los compuestos 1-5 y 7-8-9 frente a *S.littoralis*

Compuesto	Concentración (µg/cm ²)	<i>S. littoralis</i> % FI
1	50	34,3±14,2
2	50	24,5 ± 7,8
3	50	52,92 ± 12,31
4	50	56,03 ± 10,82
5	50	78,89 ± 4,4
	10	72,36 ± 9,9
	2	66,54 ± 7,8
	0.4	64,80 ± 2,9
	0.08	36,70 ± 5,6
	EC₅₀ (µg/cm²)	<u>5,0 (1,8, 13,5)</u>
7	50	55,8 ± 11,8
8	50	91,8 ± 4,9
	10	73,62 ± 7,7
	2	53,57 ± 3,7
	EC₅₀ (µg/cm²)	<u>1,4 (0,2, 9,9)</u>
9	50	52,4 ± 13,1

(Datos subrayados: concentraciones muy activas)

Tabla 18. Efectos de los compuestos aislados (0,5 µg/µl) en la mortalidad de juveniles infectivos (J2) de *Meloidogyne javanica*

Compuesto	Mortalidad de J2 (%) ^a	LC ₅₀ mg/mL ^b (95% CL ^c)	LC ₉₀ mg/mL ^b (95% CL ^c)
1	4,05±0,68		
2	2,06±0,95		
3	10±1		
4	8,90±1,86		
5	<u>100,00±0,00</u>	0,04 (0,04-0,42)	0,05 (0,05-0,06)
6	7,95±1,51		
7	<u>100,00±0,00</u>	0,15 (0,146-0,155)	0,21 (0,206-0,219)
8	<u>100,00±0,00</u>	0,15 (0,14-0,15)	0,24 (0,23-0,25)
9	<u>100,00±0,00</u>	0,14 (0,131-0,143)	0,22 (0,210-0,232)

^a Los valores son medias de cuatro; ^b Mortalidad observada después de 72 h de tratamiento; para obtener LC₅₀ y LC₉₀ se usaron cinco concentraciones; ^cCL es el límite de confianza

(Datos subrayados: concentraciones muy activas)

Referencias bibliográficas

- Abou-Douh. A. M. (2008). New eudesmane derivatives and other sesquiterpenes from the epigeal parts of *Dittrichia graveolens*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 56. 1535-1545.
- Abu-Irmaileh. B. E. et al. (2015). Selective phytotoxic activity of 2.3.11 β .13-tetrahydroaromaticin and ilicic acid isolated from *Inula graveolens*. Nat. Prod. Res.. 29. 893-898.
- Al-Fartosy. A. J. M. (2011). Antioxidant properties of methanolic extract from *Inula graveolens* L. Turk. J. Agric. For. 35. 591-596.
- Alexenizer. M.. & Dorn. A. (2007). Screening of medicinal and ornamental plants for insecticidal and growth regulating activity. Journal of Pest Science. 80(4). 205-215. Doi:10.1007/s10340-007-0173-x
- Anderson. J. A.. & Coats. J. R. (2012). Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. Pesticide Biochemistry and Physiology. 102(2). 124-128. Doi:10.1016/j.pestbp.2011.12.002
- Ashitani. T.. Garboui. S. S.. Schubert. F.. Vongsombath. C.. Liblikas. I.. Pålsson. K.. & Borg-Karlson. A. -. (2015). Activity studies of sesquiterpene oxides and sulfides from the plant *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) and its repellency on *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). Experimental and Applied Acarology. 67(4). 595-606. Doi:10.1007/s10493-015-9965-5
- Boudouda. H. B.. et al. (2013). GC-MS analysis of *Inula graveolens* (L.) Desf. From Algeria. J. Essent. Oil Bear Pl.. 16. 651-654.
- Boulogne. I.. Petit. P.. Ozier-Lafontaine. H.. Desfontaines. L.. & Loranger-Merciris. G. (2012). Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: A review. Environmental Chemistry Letters. 10(4). 325-347. Doi:10.1007/s10311-012-0359-1
- Božovic. M.. Pirolli. A.. & Ragno. R. (2015). *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry. Molecules. 20(5). 8605-8633. Doi:10.3390/molecules20058605
- Blanc. M. et al. (2004). Chemical composition and variability of the essential oil of *Inula graveolens* from Corsica. Flavour Frag. J.. 19. 314-319.
- Brownsey. R. N.. et al (2013). Seed and germination biology of *Dittrichia graveolens* (stinkwort). Invasive Plant Sci. Manag.. 6. 371-380.
- Cafarchia. C.. De Laurentis. N.. Milillo. M. A.. Losacco. V.. & Puccini. V. (2002). Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. Parassitologia. 44(3-4). 153-156. Retrieved from www.scopus.com

- Cantrell, C. L., Pridgeon, J. W., Fronczek, F. R., & Becnel, J. J. (2010). Structure-activity relationship studies on derivatives of eudesmanolides from *Inula helenium* as toxicants against *Aedes aegypti* larvae and adults. *Chemistry and Biodiversity*, 7(7), 1681-1697. Doi:10.1002/cbdv.201000031
- Cárdenas-Ortega, N. C., González-Chávez, M. M., Figueroa-Brito, R., Flores-Macías, A., Romo-Asunción, D., Martínez-González, D. E., Ramos-López, M. A. (2015). Composition of the essential oil of *Salvia ballotiflora* (Lamiaceae) and its insecticidal activity. *Molecules*, 20(5), 8048-8059. Doi:10.3390/molecules20058048
- Cetin, H., Cilek, J. E., Oz, E., Aydin, L., Deveci, O., & Yanikoglu, A. (2010). Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components. Carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 170(3-4), 287-290. Doi:10.1016/j.vetpar.2010.02.031
- Chang, S. -., Chen, P. -., Wang, S. -., & Wu, H. H. (2001a). Antimite activity of essential oils and their constituents from *Taiwania cryptomerioides*. *Journal of Medical Entomology*, 38(3), 455-457.
- Chang, S.-., Cheng, S.-., & Wang, S.-. 2001a. "Antitermitic activity of essential oils and components from *Taiwania (Taiwania cryptomerioides)*". *Journal of chemical ecology*. Vol. 27. No. 4. Pp. 717-724
- Cruz, E. M. D. O., Costa-Junior, L. M., Pinto, J. A. O., Santos, D. D. A., Araujo, S. A. D., Arrigoni-Blank, M. D. F., Blank, A. F. (2013). Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 195(1-2), 198-202. Doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.046
- Dellacassa, E. (org) *et al.* (2010). Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana. Programa Cyted. Isbn: 978-85-397-0054-7. Edita: Edipucrs. Porto Alegre. 334p.
- Dietrich, G., Dolan, M. C., Peralta-Cruz, J., Schmidt, J., Piesman, J., Eisen, R. J., & Karchesy, J. J. (2006). Repellent activity of fractioned compounds from *Chamaecyparis nootkatensis* essential oil against nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 43(5), 957-961. Doi:10.1603/0022-2585(2006)43[957:RAOFCF]2.0.CO;2
- Dohi, S., et al. (2009). Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 4313-4318.
- Dolan, M. C., Jordan, R. A., Schulze, T. L., Schulze, C. J., Manning, M. C., Ruffolo, D., Karchesy, J. J. (2009). Ability of two natural products, Nootkatone and carvacrol, to suppress *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in a Lyme disease endemic area of New Jersey. *Journal of Economic Entomology*, 102(6), 2316-2324. Doi:10.1603/029.102.0638

- Erlar, F. & Tunç, I. 2005. "Monoterpenoids as fumigants against greenhouse pests: Toxic. Development and reproduction-inhibiting effects". *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. Vol. 112. No. 2. Pp. 181-192.
- Estrada Peña A. Bouattour A. Camicas JL. Walker AR. 2004. *Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: A Guide to Identification of Species*. Universidad de Zaragoza.
- Ghosn, M. W., et al. (2006). Chemical profile of the *Dittrichia graveolens* (Desf.) Greuter essential oil of Lebanese origin. *J. Essent.Oil Res.* 18. 443-444.
- Gil-Collado J. Guillén JL. Zapatero LM. 1979. Claves para la identificación de los ixodoidea españoles (adultos). *Revista Ibérica de Parasitología*. 39:107-111
- Guinoiseau, E., et al. (2010). Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29. 873-879.
- Herrera, J. M., Zunino, M. P., Dambolena, J. S., Pizzolitto, R. P., Gañan, N. A., Lucini, E. I., & Zygadlo, J. A. (2015). Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Industrial Crops and Products*. 70. 435-442. Doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.074
- Innocent, E., & Hassanali, A. (2015). Constituents of essential oils from three plant species used in traditional medicine and insect control in Tanzania. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 21. 219-229.
- Koc, S., Oz, E., Cinbilgel, I., Aydin, L., & Cetin, H. (2013). Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, Carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 193(1-3). 316-319. Doi:10.1016/j.vetpar.2012.11.010
- Liu, P., Liu, X., Dong, H., Liu, Z., Du, S., & Deng, Z. (2012). Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil of *Illicium pachyphyllum* fruits against two grain storage insects. *Molecules*. 17(12). 14870-14881. Doi:10.3390/molecules171214870
- Lwande, W., Ndakala, A. J., Hassanali, A., Moreka, L., Nyandat, E., Ndungu, M., Punyua, D. K. (1998). *Gynandropsis gynandra* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. *Phytochemistry*. 50(3). 401-405. Doi:10.1016/S0031-9422(98)00507-X
- Ma, L., Duan, D., Wang, Y., Liu, Y., Shi, G. (2012). Effects of *Inula britannica* extracts on biological activities against *Tetranychus cinnabarinus* and several enzyme systems in *Tetranychus cinnabarinus* doi:10.1007/978-3-642-27537-1_81
- Mamoci, E., Cavoski, I., Andres, M. F., Díaz, C. E., & Gonzalez-Coloma, A. (2012). Chemical characterization of the aphid antifeedant extracts from *Dittrichia viscosa* and

ferula communis. *Biochemical Systematics and Ecology*. 43. 101-107.
Doi:10.1016/j.bse.2012.02.012

Moussavi. N., Malterud. K. E., Mikolo. B., Dawes. D., Chandre. F., Corbel. V., Wangensteen. H. (2015). Identification of chemical constituents of *Zanthoxylum heitzii* stem bark and their insecticidal activity against the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Parasites and Vectors*. 8(1) doi:10.1186/s13071-015-1113-x

Novato. T. P. L., Araújo. L. X., de Monteiro. C. M. O., Maturano. R., Senra. T. D. O. S., da Silva Matos. R., Daemon. E. (2015). Evaluation of the combined effect of thymol, Carvacrol and ϵ -cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (acari: Ixodidae) larvae. *Veterinary Parasitology*. 212(3-4). 331-335. Doi:10.1016/j.vetpar.2015.08.021

Öksüz S. and Topçu G. (1991). A eudesmanolide and other constituents from *Inula graveolens*. *Phytochemistry*. 31. 195-197.

Omezzine. F. et al. (2011^a). Allelopathic potential of *Inula graveolens* on crops and weeds. *Allelopathy J.* 28(1). 63-76.

Omezzine. F., Daami-Remadi. M., Rinez. A., Ladhari. A., & Haouala. R. (2011b). In vitro assessment of *Inula* spp. Organic extracts for their antifungal activity against some pathogenic and antagonistic fungi. *African Journal of Microbiology Research*. 5. 3527-3531.

Ouhelli H. Pandey VS. 1984. Development of *Hyalomma lusitanicum* under Laboratory Conditions. *Veterinary Parasitology*. 15:57-66

Panella. N. A., Dolan. M. C., Karchesy. J. J., Xiong. Y., Peralta-Cruz. J., Khasawneh. M., . . . Maupin. G. O. (2005). Use of novel compounds for pest control: Insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. *Journal of Medical Entomology*. 42(3). 352-358. Retrieved from www.scopus.com

Petrakis. E.A., Kimbaris. A.C., Perdikis. D.C., Lykouressis. D.P., Tarantilis. P.A. & Polissiou. M.G. 2014. "Responses of *Myzus persicae* (Sulzer) to three Lamiaceae essential oils obtained by microwave-assisted and conventional hydrodistillation". *Industrial Crops and Products*. Vol. 62. Pp. 272-279.

Porter. R. et al. (1995). Acaricidal and insecticidal activities of cadina-4.10(15)-dien-3-one. *Phytochemistry*. 40. 735-738.

Poitout S. and Bues S.. 1970. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 2: 79-91

Püntener W., (1981). *Manual for field trials in plant protection* second edition. Agricultural Division, Ciba-Geigy Limited

Rodilla. J.M., Tinoco. M.T., Morais. J.C., Gimenez. C., Cabrera. R., Martín-Benito. D., Castillo. L. & Gonzalez-Coloma. A. 2008. "*Laurus novocanariensis* essential oil:

Seasonal variation and valorization". Biochemical systematics and ecology. Vol. 36. No. 3. Pp. 167-176.

Thong. H. et al. (2008). Allergic contact dermatitis from *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter (stinkwort). Contact Derm.. 58. 51-53.

Topçu. G. et al. (1993). Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Inula graveolens*. Phytochemistry. 33. 407-410.

Tripathi. A. K.. Prajapati. V.. Ahmad. A.. Aggarwal. K. K.. & Khanuja. S. P. S. (2004). Piperitenone oxide as toxic. Repellent. And reproduction retardant toward malarial vector *Anopheles stephensi* (diptera: Anophelinae). Journal of Medical Entomology. 41(4). 691-698. Retrieved from www.scopus.com

Walton N.J., Brown D.E. (1999). Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products. Editores: N.J. Walton, D.E. Brown. Londres, Imperial College Press

Zekri. N.. Handaq. N.. El Caidi. A.. Zair. T.. & Alaoui El Belghiti. M. (2016). Insecticidal effect of *Mentha pulegium* L. and *Mentha suaveolens* Ehrh. hydrosols against a pest of citrus, *Toxoptera aurantii* (Aphididae). Research on Chemical Intermediates. 42(3). 1639-1649. Doi:10.1007/s11164-015-2108-0

REIVINDICACIONES

1. Un método de extracción de compuestos orgánicos de plantas o partes de plantas de *Dittrichia graveolens*, que comprende las etapas de:
 - 5 a) recolectar plantas o partes de plantas de la especie *D. graveolens* para obtener el material vegetal sobre el que se efectúa la extracción;
 - b) someter dicho material vegetal a un proceso de extracción por arrastre de vapor;
 - c) condensar el vapor obtenido en un condensador;
 - 10 d) dejar que se separen las fases orgánica y acuosa;
 - e) recoger separadamente la fase orgánica superior y la fase acuosa situada por debajo de ella y, opcionalmente, una posible fase inferior situada bajo la fase acuosa;
 - f) opcionalmente, someter la fase acuosa obtenida a un proceso de
15 extracción con un disolvente orgánico.
2. El método según la reivindicación 1, en el que se recolectan partes aéreas de la planta.
- 20 3. El método según la reivindicación 2, en el que se recolectan los tallos y/o las hojas de la planta.
4. El método según la reivindicación 3, en el que los tallos y/o las hojas se recolectan en el período de floración de la planta.
25
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la planta o las partes de la planta recolectadas se someten a un proceso de secado previo a la etapa b) de extracción por arrastre de vapor.
- 30 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las etapas b) a e) se llevan a cabo en una planta industrial de destilación con un calderín o caldera anexa donde se produce el vapor.
7. El método según la reivindicación 6, en el que la planta industrial de destilación
35 comprende una cámara de destilación y un recipiente de decantación.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en el que la extracción se lleva a cabo a una presión de 50 kPa a 190 kPa.
- 5 9. El método según la reivindicación 8, en el que la extracción se lleva a cabo a una presión de al menos 130-140 kPa.
10. El método según la reivindicación 8, en el que la extracción se lleva a cabo en dos tramos de presión diferente: uno primer tramo a 60 – 70 kPa de presión y un segundo tramo a 80 – 120 kPa.
- 10 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las etapas b) a e) se llevan a cabo por hidrodestilación.
12. El método según la reivindicación 11, en el que las etapas b) a e) se llevan a cabo en un aparato tipo Clevenger.
- 15 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la separación de las fases orgánica y acuosa se realiza por decantación.
- 20 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se lleva a cabo la etapa f) de extracción de la fase acuosa con un disolvente orgánico, recogiendo la fase orgánica extraída.
15. El método según la reivindicación 14, en el que el disolvente orgánico es diclorometano.
- 25 16. El método según la reivindicación 15, en el que el que el diclorometano se añade a la fase acuosa en una proporción de 1:1 (v/v).
- 30 17. Un extracto de *D. graveolens* obtenido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
18. El extracto según la reivindicación 17, que se selecciona entre:
- 35 a) la fase orgánica superior obtenida tras el arrastre de vapor y la separación de las fases (extracto de aceites esenciales);
- b) la fase acuosa que se sitúa debajo de la fase orgánica anterior (aceites esenciales) antes de la separación de ambas (hidrolato), o

- c) la fase orgánica resultante de extraer la fase acuosa anterior (hidrolato) con diclorometano (fracción orgánica del hidrolato).
- 5 19. El extracto según la reivindicación 17 o 18, en el que los aceites esenciales y el hidrolato se han obtenido mediante un proceso que se selecciona entre la hidrodestilación o un proceso de destilación en una planta industrial en la que el vapor se introduce en la cámara de destilación desde una caldera anexa.
- 10 20. Una composición que comprende un extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.
21. La composición según la reivindicación 20, que comprende al menos un excipiente aceptable en el campo farmacéutico, veterinario y/o agronómico.
- 15 22. La composición según la reivindicación 21, que adicionalmente comprende al menos un surfactante y/o al menos un coadyuvante.
- 20 23. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, que adicionalmente comprende uno o más extractos de al menos una planta de una especie diferente de *D. graveolens*.
- 25 24. Uso de un extracto de *D. graveolens* de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 o de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, como biocida.
26. Uso según la reivindicación 24, para el control de plagas.
- 30 27. Uso según la reivindicación 24 o 25 para el control de plagas en el sector agrícola.
27. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, como acaricida o ixodicida.
28. Uso según la reivindicación 27 para matar animales pertenecientes a una o más especies del orden Ixodida y/o como repelente de las mismas.
- 35 29. Uso según la reivindicación 27 o 28, en el que se usa un extracto de *D. graveolens* que se selecciona entre el extracto de aceites esenciales o la fracción orgánica del hidrolato.

30. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en el que se usa un extracto de *D. graveolens* que comprende óxido de piperitenona, T-cadinol, carvacrol u óxido de cariofileno, o combinaciones de los mismos.
- 5 31. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en el que se usa un extracto de *D. graveolens* que comprende borneol.
32. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, como insecticida.
- 10 33. Uso según la reivindicación 32, para el control de plagas de insectos en el sector agrícola.
34. Uso según la reivindicación 32 o 33, para el control de una o más especies de áfidos.
- 15 35. Uso según la reivindicación 34, en el que se usa un extracto de *D. graveolens* que se selecciona entre el extracto de aceites esenciales o la fracción orgánica del hidrolato como repelente para el control de áfidos.
- 20 36. Uso según la reivindicación 34 o 35, para el control de una especie de áfido que se selecciona entre *Myzus persicae* y *Rhopalosiphu padi*.
37. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, en el que se usa un extracto de *D. graveolens* que comprende T-cadinol.
- 25 38. Uso según la reivindicación 32 o 33, para el control de lepidópteros.
39. Uso según la reivindicación 38, en el que se usa la fracción orgánica de un hidrolato extraído de *D. graveolens* por arrastre de vapor para el control de
- 30 lepidópteros.
40. Uso según la reivindicación 39, en el que se usa la fracción orgánica de un hidrolato extraído de *D. graveolens* por arrastre de vapor para el control de lepidópteros mediante el retraso de su crecimiento.
- 35 41. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40, en el que los lepidópteros pertenecen a la especie *Spodoptera littoralis*.
42. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, como nematicida.

43. Uso según la reivindicación 42, para el control de plagas de nematodos en el sector agrícola.
- 5 44. Uso según la reivindicación 42 o 43, para el control de una o más especies del género *Meloidogyne*.
45. Uso según la reivindicación 44, en el que se usa un extracto de *D. graveolens* que es la fracción orgánica del hidrolato.
- 10 46. Uso según la reivindicación 24, en la ropa o en la piel de un animal.
47. Uso según la reivindicación 46, en la piel de un ser humano.
- 15 48. Uso según la reivindicación 46 o 47, como repelente de ácaros, insectos o nematodos.
49. Uso según la reivindicación 48, como repelente de garrapatas y/o pulgones.

20

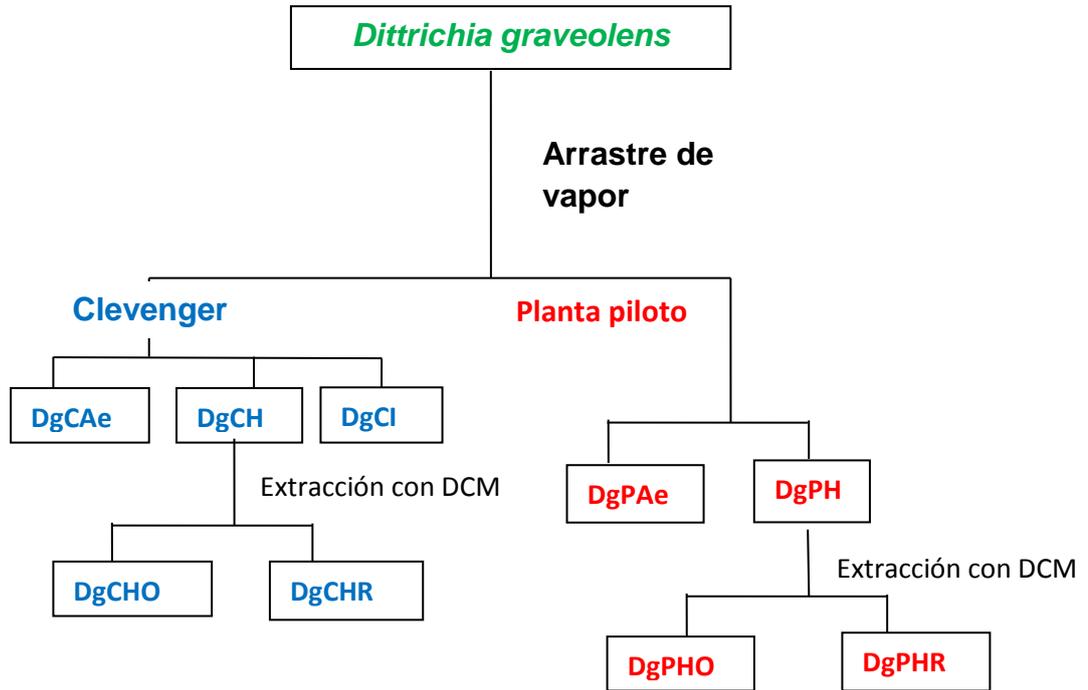


Fig. 1a

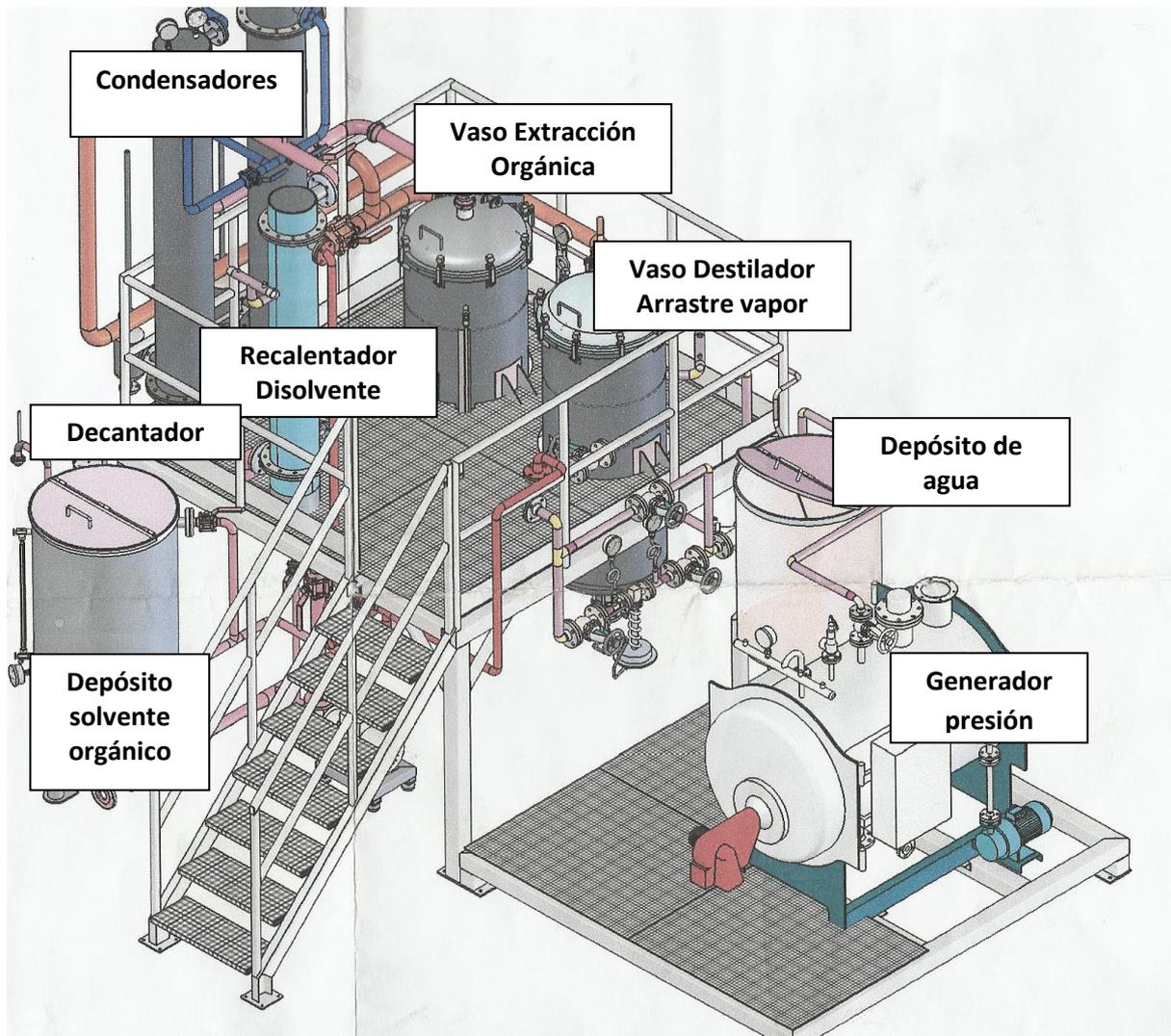


Fig. 1b

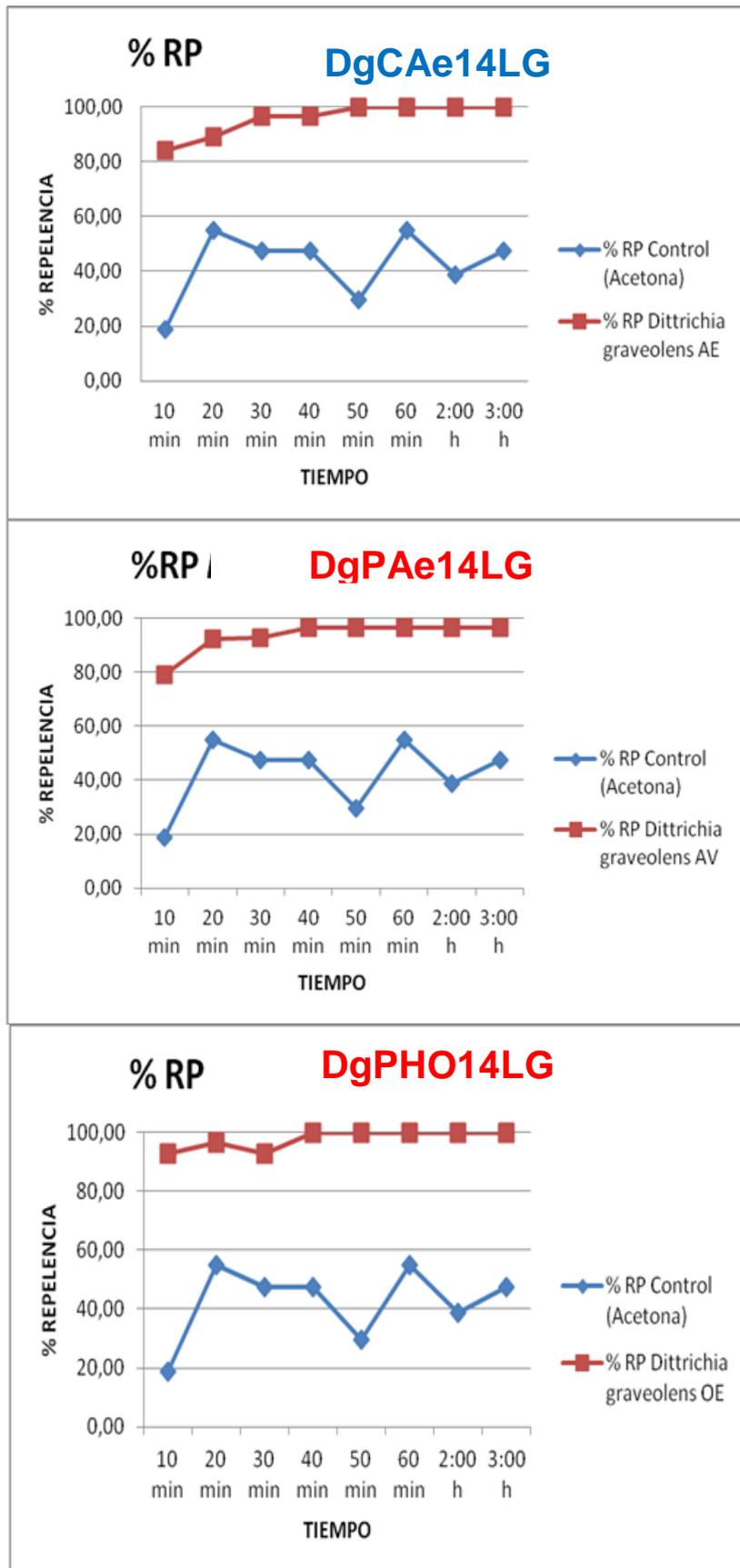


Fig. 2

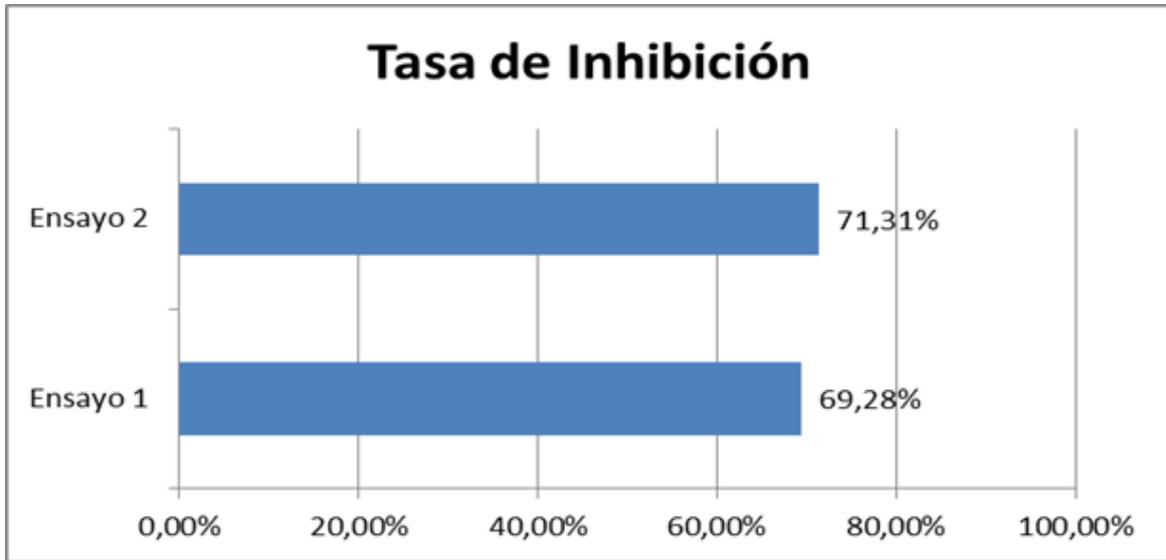
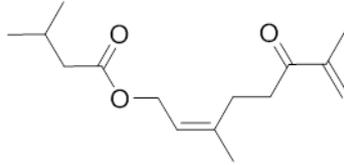


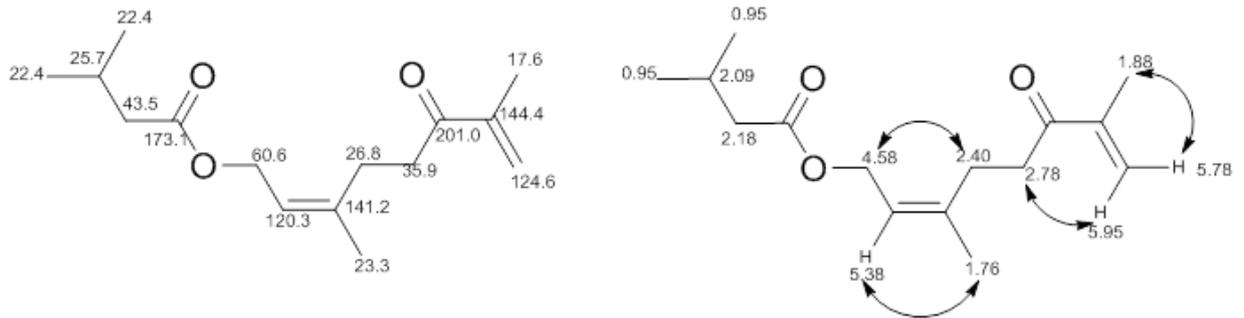
Fig. 3

a

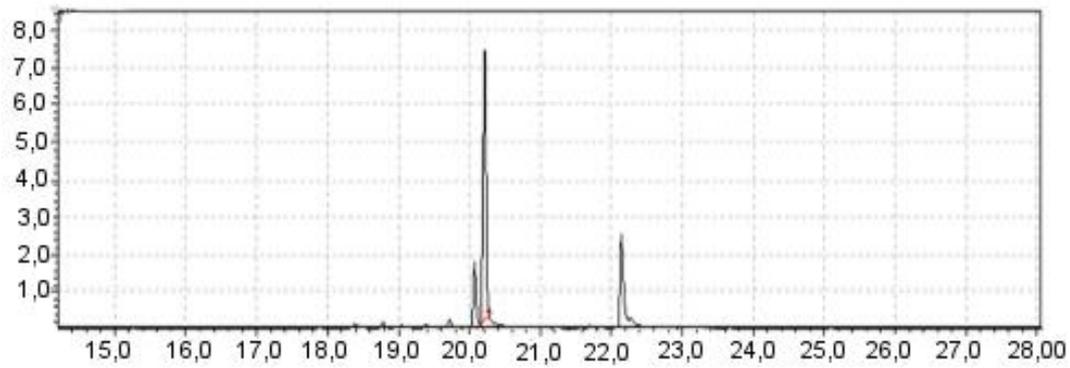


3-metilbutanoato de (Z)-3,7-dimetil-6-oxoocta-2,7-dien-1-ilo

b



c



d

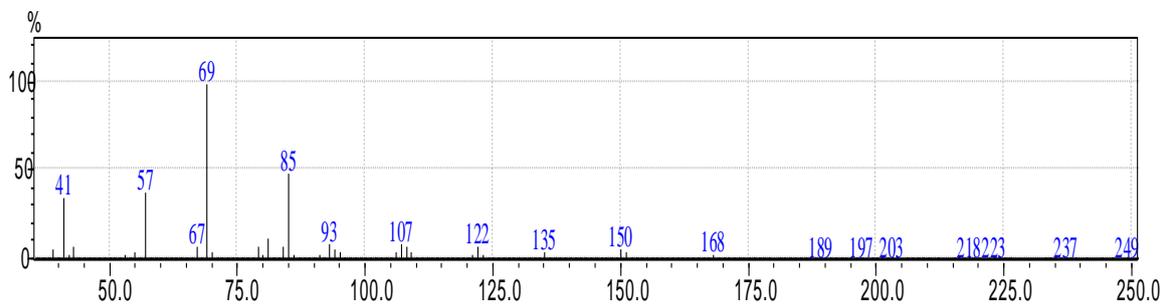


Fig. 4

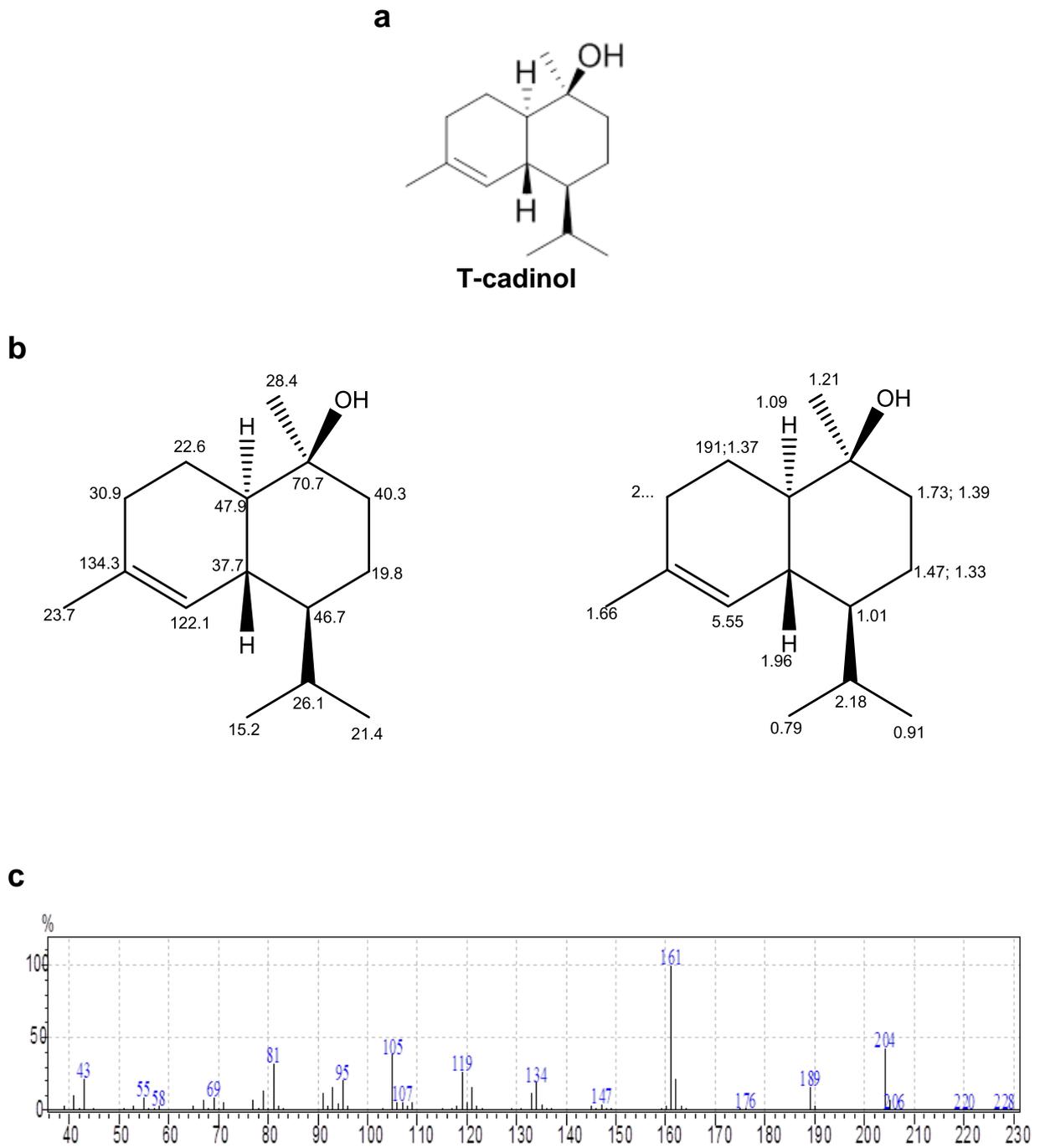
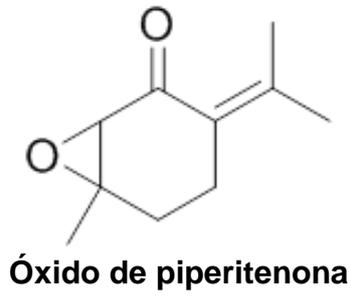
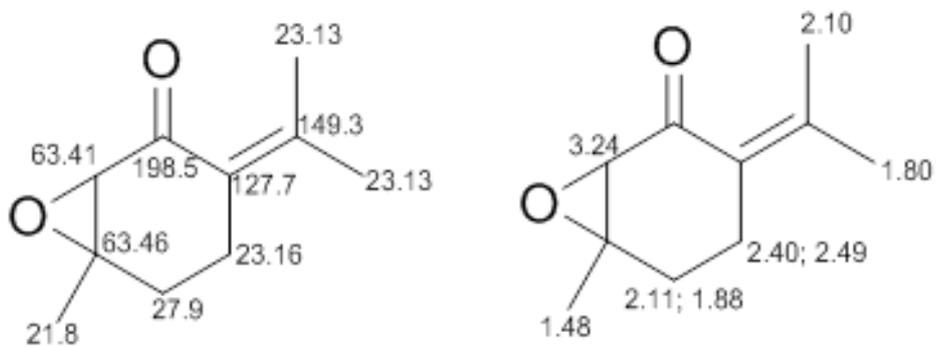


Fig. 5

a



b



c

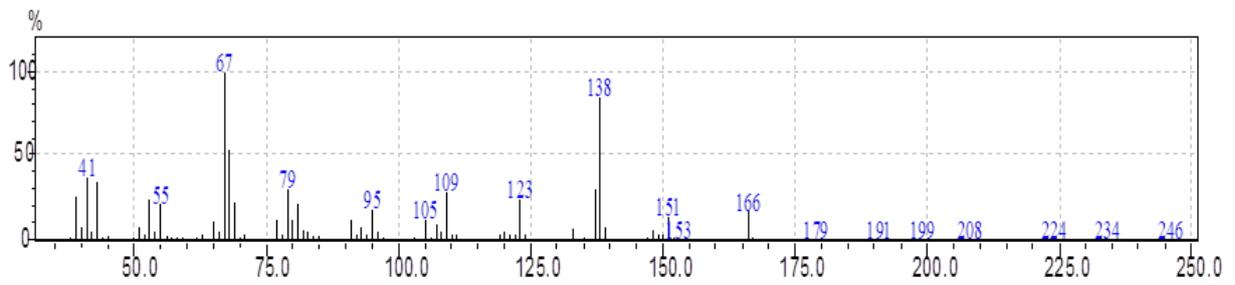


Fig. 6

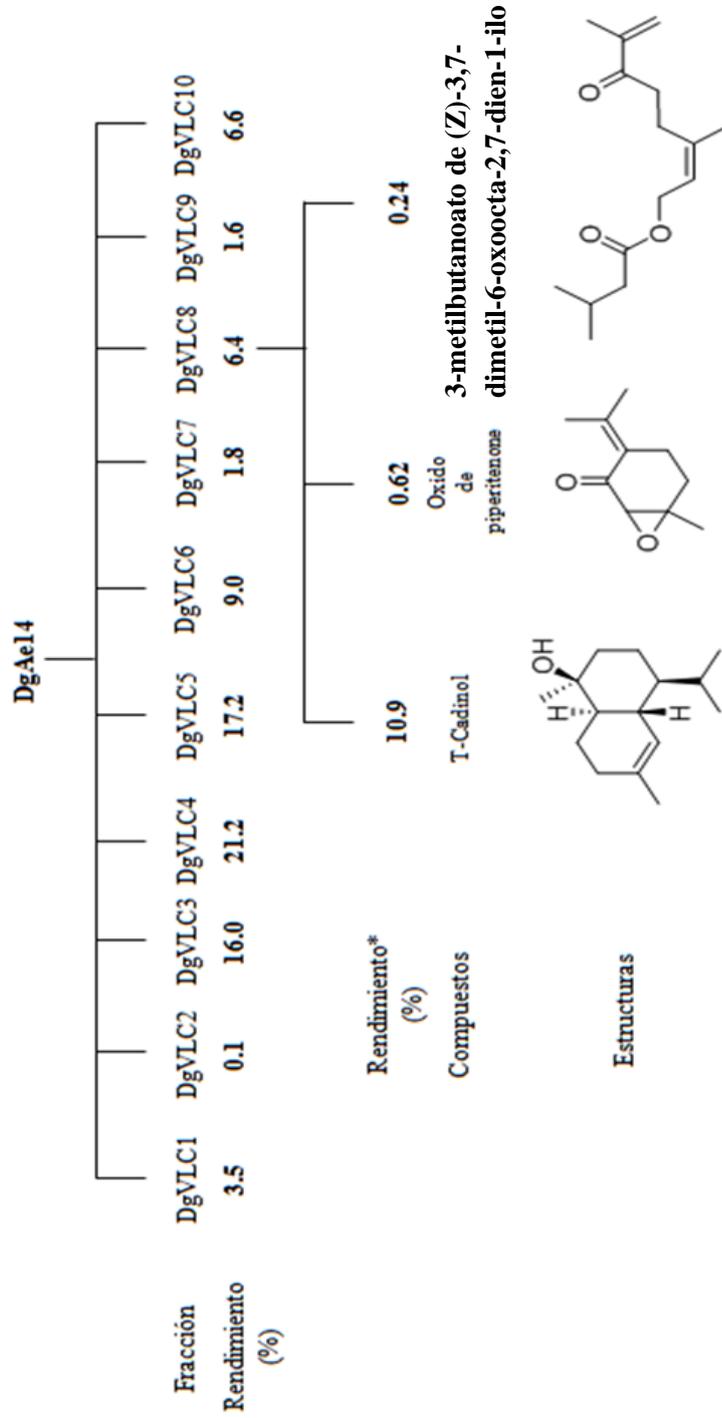


Fig. 7

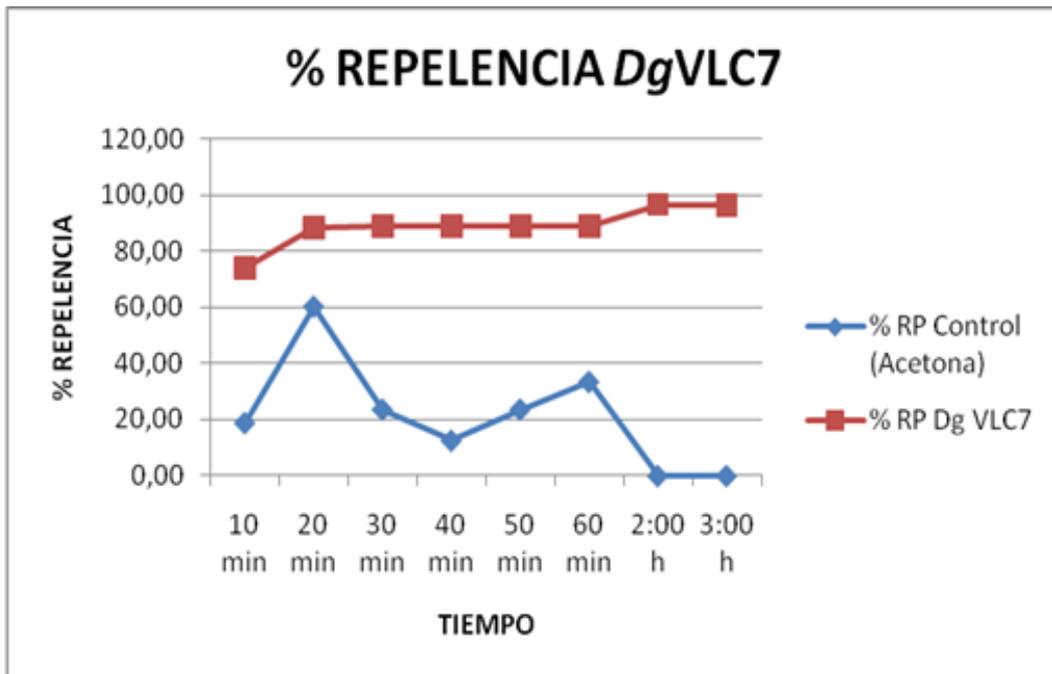
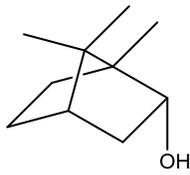
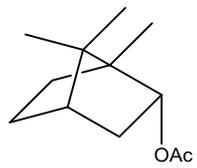


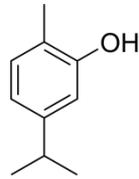
Fig. 8



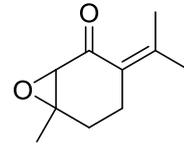
2 Borneol



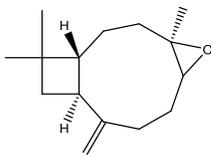
1 Acetato de bornilo



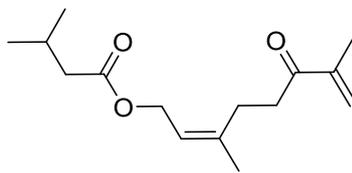
7 Carvacrol



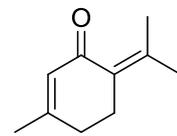
5 Oxido de piperitenona



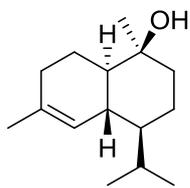
6 Oxido de cariofileno



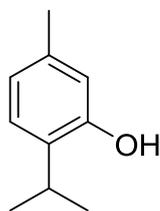
3- 3-metilbutanoato de (Z)-3,7-dimetil-6-oxoocta-2,7-dien-1-ilo



8 Piperitenona



4 T-Cadinol



9 Timol

Fig. 9

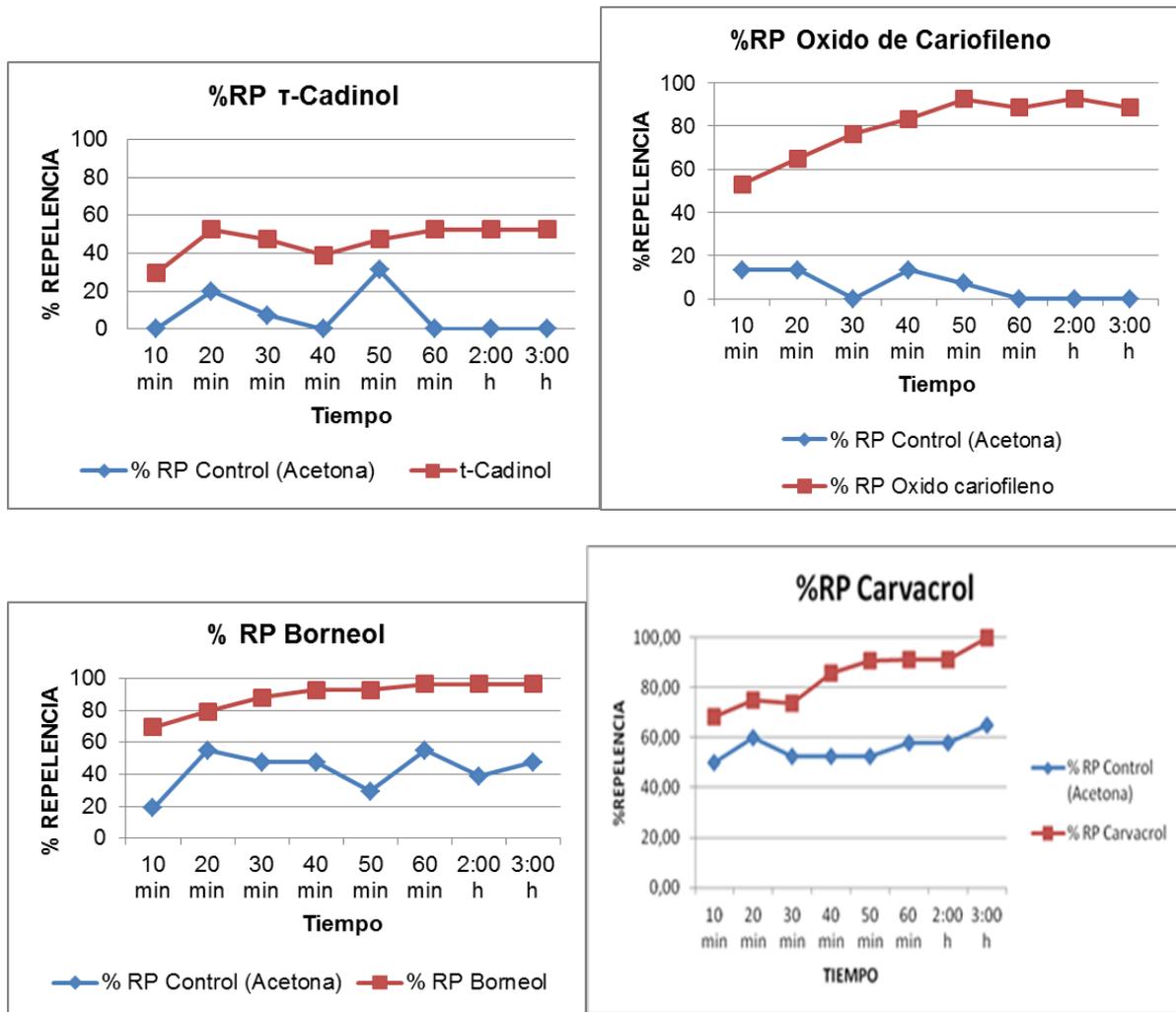


Fig. 10



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201730726

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.05.2017

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	IMAD EDDINE HAQUI, RATIBA DERRICHE, LEILA MADANI, ZAHIA OUKALI. Extraction of Essential Oil from <i>Inula viscosa</i> (L.) Leaves: Composition, Antifungal Activity and Kinetic. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2016, Vol. 19, nº 1, páginas 108-118. ISSN 0976-5026 (Online), ISSN: 0972-060X (Print) DOI: 10.1080/0972060X.2015.1010598	1-7, 12-14, 17-24, 32
X	MIRZA M, AHMADI L. Composition of the essential oil of <i>Dittrichia graveolens</i> (L.) Greuter. Journal of Essential Oil Research, 2000, Vol. 12, nº 4, páginas 507-508, ISSN 1041-2905, DOI: 10.1080/10412905.2000.9699576	1-7
Y		11-14, 17-24, 32
Y	IMAD EDDINE HAQUI, RATIBA DERRICHE, LEILA MADANI, ZAHIA OUKALI. Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian <i>Inula viscosa</i> (L.) Aiton. Arabian Journal of Chemistry, 2015, Vol. 8, nº 4, páginas 587-590, ISSN 1878-5352, DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.05.005	11-14, 17-24, 32
A	GHOSN M W, CHEMALI C B, ZAKNOUN F I, SALIBA N A. Chemical profile of the <i>Dittrichia graveolens</i> (Desf.) Greuter essential oil of Lebanese origin. Journal of Essential Oil Research, 2006, Vol. 18, nº 4, páginas 443-444. ISSN 1041-2905	1-7, 11-14, 17-23
A	PETROPOULO, A. et al. Volatile Constituents of <i>Dittrichia graveolens</i> (L.) Greuter from Greece. Journal of Essential Oil Research, 2004, Vol. 16, nº 5, páginas 400-401, ISSN 1041-2905, DOI: 10.1080/10412905.2004.9698754	1-7, 11-14, 17-23

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
23.11.2017

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N65/12 (2009.01)

A01P7/02 (2006.01)

A01P7/04 (2006.01)

A01P5/00 (2006.01)

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

A01N, A01P

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