

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 225**

21 Número de solicitud: 201700146

51 Int. Cl.:

A01P 7/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

18.02.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.03.2020

71 Solicitantes:

**MITRA SOL TECHNOLOGIES, S.L. (100.0%)
Avd. de la Universidad de Elche, s/n, Parque
Científico y Empresarial. Edificio Quorum 3
03202 Elche (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍ BRUÑÁ, Nuria;
SAURA LÓPEZ, Domingo;
MIRABET SEGURA, Carlos;
DOÑA GÓNGORA, José Manuel;
OLIVARES ROLDÁN, Jesús Tomás;
VALERO ROCHE, Manuel;
GEA BOTELLA, Sara;
MULA MUÑOZ, David;
MICOL MOLINA, Vicente;
DEL CASTILLO BELDA ROIG, Mari y
CORTÉS MENDOZA, Elena**

54 Título: **Combinación sinérgica insecticida de vinagre y aceite esencial de cítricos**

57 Resumen:

La presente invención consiste en una formulación de un producto de aplicación dentro del sector agrícola principalmente, basado en un extracto de limoneno de cítricos combinado con ácido acético como emulsionante para su uso como insecticida natural sobre plagas de cultivos.

Los resultados muestran que resulta una combinación eficaz logrando tasas de hasta un 100% para pulgón y mosca blanca al cabo de una semana de aplicación.

ES 2 749 225 A2

DESCRIPCIÓN**Combinación sinérgica insecticida de vinagre y aceite esencial de cítricos****Sector de la técnica**

La presente invención consiste en una formulación de un producto de aplicación dentro del sector agrícola, basado en un compuesto de los aceites esenciales de cítricos, limoneno, combinado con un derivado del vinagre para su uso como insecticida natural sobre plagas de cultivos.

Estado de la técnica

La piel de los cítricos presenta una gran cantidad de compuestos que pueden ser obtenidos y utilizados con fines comerciales. El aceite contenido en unos sacos localizados en la parte externa del mesocarpo de la fruta puede liberarse por rotura de los mismos. Según varios autores, el aceite esencial de los cítricos es una mezcla de compuestos volátiles y consiste principalmente en hidrocarburos monoterpenos, que poseen un alto nivel de insaturación (*Stashenko et al., 1996; Virost et al., 2008,*).

D-limoneno (1-methyl-4-(1-methylethenyl) cyclohexane) es el monoterpeno monocíclico más común en la naturaleza. Es un componente importante en varios aceites de cítricos (naranja, limón, mandarina, lima y pomelo) y puede alcanzar una concentración en ellos de 95-98 %. Además, el D-limoneno aparece en el Código de Regulaciones Federales reconocido como seguro (GRAS) como agente aromatizante y se puede encontrar en los alimentos comunes tales como los zumos de frutas, refrescos, productos horneados, helados y budines.

Algunos productos generados en la oxidación del Limoneno y combinados con surfactantes como el APSA-80, han mostrado ser efectivos como repelentes y/o disuasorios para mosquitos y cochinillas. Sin embargo, resulta complejo que el Limoneno se mezcle bien, evitando así que se formen manchas/gotas y haya una buena homogenización (Hollingsworth, 2005).

Algunas mezclas descritas en la patente WO 03/011054 A2 con efecto sinérgico empleadas para el control de plagas contienen al menos dos de estos ingredientes: D-limoneno, aceite de tomillo, aceite de limón, aceite de flores de Lilas (*Syringa* sp), aceite de *Nigella sativa*, aceite de gaulteria, Linalol, Tetrahidrolinalol, Vanilina, Miristato de isopropilo, Piperonal, Geraniol, Trietil citrato y/o Salicilato de metilo.

En la patente US 8.133.921 B2 se describen distintas formulaciones de un insecticida natural que contiene entre 1-20% en peso de D-Limoneno, 1-25% en peso de un agente emulsionante no tóxico (Alkamuls EL 620) y un 55-98% en peso de un solvente hidrofílico (según la formulación) no tóxico con efecto sobre hormigas, pulgones, cochinillas, mosca blanca, araña, chicharras, piojos, coleópteros defoliadores y sus larvas y cucarachas.

Componentes como el Isotiocianato de alilo, (E)-Nerolidol, Limoneno, p-Cimeno e y-Terpineno extraídos de *Eucalyptus globulus* muestran una fuerte actividad larvicida contra *Aedes aegypti* Linn. (Park *et al.*, 2011).

En otros estudios, composiciones de aceites esenciales extraídos de *Eucalyptus tereticornis* con efecto repelente e insecticida y que contienen monoterpenos como el Mircenol, Ácido citronélico, P-Mentano-3,8-diol, Citronelol, Citronelal y el 2,2-dimetil-5-(1-metiletil)-tetrahidrofurano han sido testados sobre *Drosophila melanogaster* en cultivos de frijol (Murillo-Arango *et al.* 2014). También se evaluó si existía fitotoxicidad foliar sobre la planta no observándose en ningún caso dicho efecto.

Algunas formulaciones que contienen limoneno como la descrita en la patente WO 2011045596 se han empleado como atrayentes de lepidópteros como *Helicoverpa armigera* para emplearlos como insecto señuelo y reducir el número de insectos plaga en determinados cultivos.

En otras patentes como WO 2007025197 o WO 2009135289 se centran en la mejora de composición y sistemas disuasorios y repelentes contra quironómidos empleando elementos procedentes de los cítricos o de la oxidación de productos como el Limoneno. Los componentes con dicha capacidad repelente y/o disuasoria que se han observado son el Acetato de Nerilo, Citronellyl Acetato, Acetato de Geraniol, Hidroxi-P-Cimeno, Citral, α -terpineol, Citronelal, Acetato de Linalilo, Citranellol, Terpen-4-ol, productos de la oxidación del Limoneno como el d- y el l-carvone, (+) óxido de Limoneno, (-) óxido de Limoneo, cis y trans carveol, diolaldehdes y mezclas de estos.

Se ha estudiado la toxicidad y el efecto repelente de compuestos puros de origen vegetal como el Terpeneol sobre *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) que es un insecto plaga de productos cereales almacenados. Ni el efecto repelente ni el grado de toxicidad del Terpeneol fueron significativamente relevantes para el control de este insecto plaga (Ojimmelukwe & Adler, 1999)

El uso de pesticidas químicos puede producir problemas de fitotoxicidad de rápida aparición en las plantas (hojas, raíces y flores quemadas) o ser tomados por la misma y aparecer en productos destinados al consumo humano o animal persistiendo en la cadena alimentaria y originando problemas de salud que inciden en el sistema inmunológico y neurológico (Stella-Nerio et al., 2009)

El aumento de los problemas de los pesticidas de síntesis asociados a resistencias cruzadas, riesgos para la salud pública y daños al medioambiente (acumulándose por bioconcentración en los distintos eslabones de la cadena alimenticia, en el suelo y en el agua), han promovido la búsqueda de productos naturales con propiedades plaguicidas. Estos biopesticidas, poseen un modo de acción único, no son tóxicos para el ser humano, plantas ni animales y actúan selectivamente sobre la especie que se pretende erradicar sin afectar a otras. Son productos de bajo impacto ambiental y al tratarse de moléculas orgánicas se degradan rápidamente, evitando problemas medioambientales de acumulación de residuos.

La presente invención logra ventajosamente actuar sobre los insectos perjudiciales en agricultura, sin suponer un incremento de los residuos medioambientales al tratarse de un producto resultado de la combinación sinérgica en una proporción determinada, de dos productos de origen natural, el vinagre y el aceite esencial de cítricos, en sus versiones purificadas de ácido acético y limoneno.

20 Referencias

- WO 03/011054 A2 (Andersch, W.; Wachenhoff-Neuman, U. Y Hänsler, G. Combination of active agent. Bayer Aktiengesellschaft). 26-06-2000
- WO 2009135289 A1 (Mullen, B. & Fleming, L. Biological pest control mixture containing d-limonene and nutmeg oil.) 12-11-2009
- 25 WO 2011045596 A2 (Cork, A. Insect attractant compositions. University of Greenwich) 21-04-2001.
- US 8.133.921 B2. (McPartland, T. Edible Plant Extract Based Insecticidal Composition) 13-03-2012
- 30 WO 2007025197 A2 (Deboukian, R.H. & Weldon, P. Spatial inhibitors, deterrents and repellents for mosquitoes and midges. Bedoukian Research Inc.) 01-03-2007.
- Hollingsworth, R.G. 2005. Limonene, a Citrus Extract, for control of Mealybugs and Scale insects. *Journal of Economic Entomology*, 98 (3): 772-779.

Murillo-Arango,W.; Araque Marín,P.; Henao-Murillo,B.; Peláez-Jaramillo, C.A. Insecticide activity of oil/water emulsion of *Eucalyptus tereticornis* essential oil. http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol18_1_13/pla13113.htm.

5 Ojimelukwe,P.C. & Adler, C. 1999. Potential of Zimtaldehyde, 4-Allyl-anisol, Linalool, Terpeneol and other Phytochemicals for the Control of the Confused Flour Beetle (*Tribolium confusum* J. d. V.) (Col., Tenebrionidae). *AnzeJger fi r Sch idlingskunde Journal of Pest Science*,72: 81-86.

10 Park, H.M.; Kim, J.; Chang, K.S.; Kim, B. S.; Yang, Y.J.; Kim, G.H.; Shin, S.C. & Park, K.I.L. 2011. Larvicidal Activity of Myrtaceae Essential Oils and Their Components against *Aedes aegypti*, Acute Toxicity on *Daphnia magna*, and Aqueous Residue. *Journal of Medical Entomology*, 48 (2): 405-410.

Stashenko, E.E.; Puertas, M.A.; Combariza & M.Y. 1996. Volatile secondary metabolites from *Spilanthes Americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, (752): 223-232.

15 Stella Nerio,L.; Olivero-Verbel, J & Stashenko, E.E. 2009. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101 (2010): 372-378.

20 Virot, V., Tomao, V., Giniers, C., Visinoni, F., & Chemat, F. 2008. Green procedure with a green solvent for fats and oils determination. Microwave integrated soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *Journal of Chromatography A*, (1196): 147-152.

Descripción detallada de la invención

Se presenta la formulación de un producto de origen orgánico compuesto por Limoneno (40-70%) y Ácido Acético (60-30%). La combinación de ambos componentes
 25 produce un efecto sinérgico que dota al producto de una significativa capacidad insecticida sobre las plagas en cultivos que no se obtiene empleando los componentes por separado, siendo por tanto, una acción sinérgica entre las dos sustancias la responsable de la eficacia de la presente invención. Además ésta acción sinérgica resulta eficaz únicamente en un margen concreto de la relación limoneno/acético y fuera de este rango no funciona con la
 30 misma eficacia.

Complementariamente, la invención se ilustra más adelante mediante los correspondientes ejemplos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Evolución del nivel de pulgón por hoja en cultivo de pimiento bajo los tratamientos ensayados. Las flechas gruesas en el sentido del eje de abscisas indican día de tratamiento. Las flechas más finas junto a las referencias a los tratamientos indican a que línea corresponde la evolución del tratamiento que las acompaña.

5

Figura 2. Evolución de la población de mosca blanca en cultivo de pimiento para distintos tratamientos. Las flechas gruesas en el sentido del eje de abscisas indican día de tratamiento. Las flechas más finas junto a las referencias a los tratamientos indican a que línea corresponde la evolución del tratamiento que las acompaña.

10

Modos de realización preferente de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes 2 ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

15 El producto se prepara a partir de los siguientes compuestos:

-Ácido Acético con una pureza del 99,7%, se adiciona en un porcentaje del 30-60%.

-Limoneno con una pureza del 92-99% se adiciona a un porcentaje del 70-40%.

Para la elaboración de la mezcla, el orden a la hora de adicionar los componentes es ácido acético en primer lugar seguido del limoneno. Resulta necesario agitar dicha mezcla.

20 El producto generado es soluble en agua.

La aplicación de la mezcla sinérgica se realiza mediante pulverización foliar sobre la masa foliar del cultivo objeto del tratamiento, realizando previamente, una combinación de la mezcla sinérgica con agua en el tanque de pulverización. La función del agua es la de actuar como vehículo de dispersión y garantizar un reparto homogéneo de la mezcla sinérgica sobre toda la superficie a tratar.

25

El porcentaje o dosis de la mezcla y la cantidad de agua de aplicación es variable y dependerá de la superficie foliar total del cultivo a tratar (con el fin de que la dispersión sea máxima) y de aplicar una dosis de la mezcla sinérgica suficiente para garantizar la eficacia insecticida del tratamiento. Es por esta razón que los porcentajes de mezcla sinérgica en los

caldos de tratamiento se realizan a 1 ppm, siendo esta concentración meramente orientativa y no pretendiendo ser limitativa en su uso, pues la utilización a otras concentraciones puede resultar eficaces.

Ejemplo 1

5 La evaluación del efecto del producto formulado con limoneno se llevó a cabo a escala invernadero para determinar la influencia sobre pulgón. El estudio se realizó durante los meses de Diciembre de 2014 y Enero de 2015 en un invernadero en plena producción con cultivo orgánico de pimiento de la variedad 141 Rijkzman.

10 El sistema de riego es por goteo y en el momento de la realización del ensayo se observa la presencia de pulgón con unos niveles de población muy elevados. La superficie del invernadero es de 9000 m² y las plantas de pimiento se encuentran en un marco de plantación de 0,4 m x 1 m.

15 Se realizó el tratamiento de las plantas de pimiento con cuatro tesis distintas: agua (como blanco negativo), limoneno 94%, ácido acético 99,7% y por último, producto formulado con limoneno y ácido acético (60:40). Con cada uno de estos productos se realizó el tratamiento sobre las plantas de pimiento mediante un equipo pulverizador manual a 20 bares de presión.

20 La concentración de los productos utilizados fue de 1 ppm (0,1%) y se trataron 40 plantas por tratamiento. Se realizó un conteo del nivel de plaga previo a la aplicación para determinar posteriormente la reducción de insectos en las mismas.

Los recuentos se realizaron a las 24 y 72 horas de la aplicación, evaluando la mortalidad de insectos presentes en las hojas y se volvió a realizar un tratamiento con cada uno de los productos. Los resultados de los recuentos se muestran en la Figura 1 donde se marca con una flecha los días en los que se aplicaron los tratamientos.

25 El número medio de pulgón que se observa los días de aplicación de los productos, es previo a dicho tratamiento.

Para ello se establecieron cuatro tratamientos al azar que se detallan en la tabla 2:

Tabla 1. Tratamientos aplicados y su concentración

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN
T1: CONTROL (AGUA)	1mL/L
T2: ACÉTICO	1mL/L
T3: LIMONENO	1mL/L
T4: LIMONENO+ACÉTICO	1mL/L

Los distintos tratamientos se aplicaron semanalmente durante 2 semanas haciendo 4 réplicas por tratamiento y estableciendo parcelas de 10 plantas de pimiento donde se realizaban conteos de pulgón sobre hojas (10 por parcela) de manera previa al tratamiento, a las 24 y 72 horas.

Analizando los resultados del estudio observamos que el T4 se mantiene por debajo del resto de tratamientos desde que comienzan los conteos de individuos tras el primer día de tratamiento. Como evidencia la línea de tendencia para este tratamiento el descenso del número de pulgones por hoja es paulatino y constante durante la evolución del ensayo.

El control se mantiene por encima de todos los demás tratamientos como era esperable, mientras que T2 y T3 siguen una tendencia muy similar sin ejercer un control sobre la plaga de pulgón, por lo que se concluye que los componentes de la mezcla por separado no tienen un efecto significativo sobre la plaga siendo el T4 el tratamiento más efectivo para el manejo de ésta (figura1).

Ejemplo 2

El objetivo de este ensayo es analizar la efectividad del producto sobre mosca blanca en diferentes formulaciones para conocer la eficacia de la mezcla.

La parcela objeto del ensayo tiene una superficie de aproximadamente 3.000 m² plantados en filas completas y pareadas, con un marco de plantación de 1 x 0.5 m de la variedad de pimiento California en fase productiva.

Su sistema de riego es por goteo y posee una moderada infestación de plagas que son apropiadas para la realización de esta experiencia.

Se evaluaron 4 tratamientos empleando un diseño estadístico en bloques al azar de 2 x 7 m con 45 plantas por parcela de ensayo y 4 repeticiones de cada tratamiento por lo tanto se analizaron 180 plantas por tratamiento.

No se adicionó ningún tipo de mojante ni regulador de pH en los caldos realizados para cada uno de los tratamientos. Se realizó una única aplicación con una máquina pulverizadora manual a 20 bares de presión y un total de 3 aplicaciones para cada tratamiento.

Los productos utilizados y dosis empleada en el ensayo son los que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Dosis empleadas en los distintos tratamientos para este ensayo.

Tratamiento	Producto	Dosis utilizada
T1	CONTROL (AGUA)	0 mL/L
T2	ACÉTICO	1,00 mL/L
T3	LIMONENO	1,50 mL/L
T4	LIMONENO+ACÉTICO	1,00 mL/L

15

Para los conteos se tomaron plantas al azar y se observaron las hojas, tanto el haz como el envés. Los conteos se realizaron el mismo día antes del tratamiento, después de 24 horas y después de 72 horas.

Respecto a los resultados para la mosca blanca (figura 2) comprobamos que las plantas tratadas con el T-1 disminuyen su presencia en el momento de la aplicación pero días después vuelven a aumentar su presencia siendo el porcentaje inicial y el final después de todo el ensayo casi el mismo o incluso mayor.

Con el ensayo T-2 en un principio sigue el mismo proceso que con el T-1 pero al final del ensayo el porcentaje de mosca blanca no ha aumentado con tanta intensidad.

En el caso del T-3 la población de mosca sigue su crecimiento sin afectarle, aparentemente, los tratamientos (figura 2).

En el caso del tratamiento T4 se comprueba una disminución constante del número de individuos de mosca blanca hasta su práctica desaparición.

- 5 La presencia de fauna auxiliar como abejas y mariquitas no resulta dañada por los tratamientos T-2, T-3 y T-4.

REIVINDICACIONES

1.- Preparación **caracterizada por que** consiste en una combinación en peso de limoneno de extractos cítricos y ácido acético de vinagres

5

2.- Insecticida **caracterizado por que** comprende una preparación según la reivindicación 1.

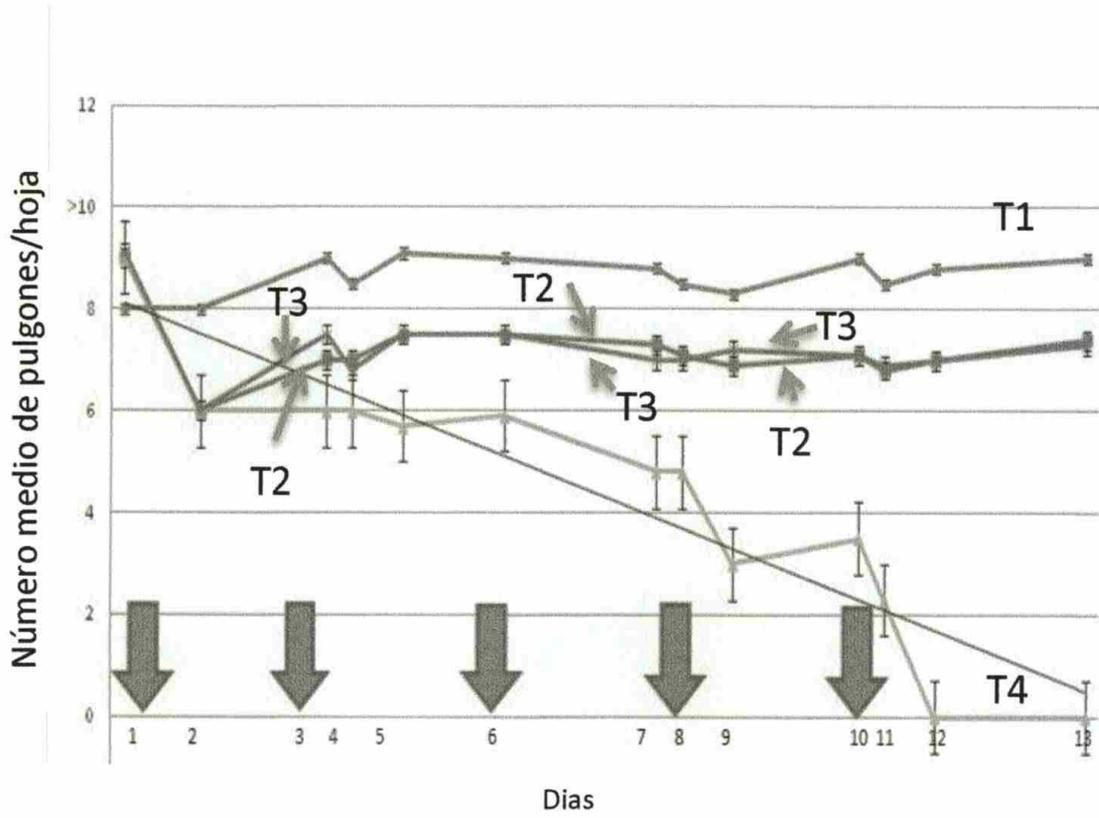


Figura 1

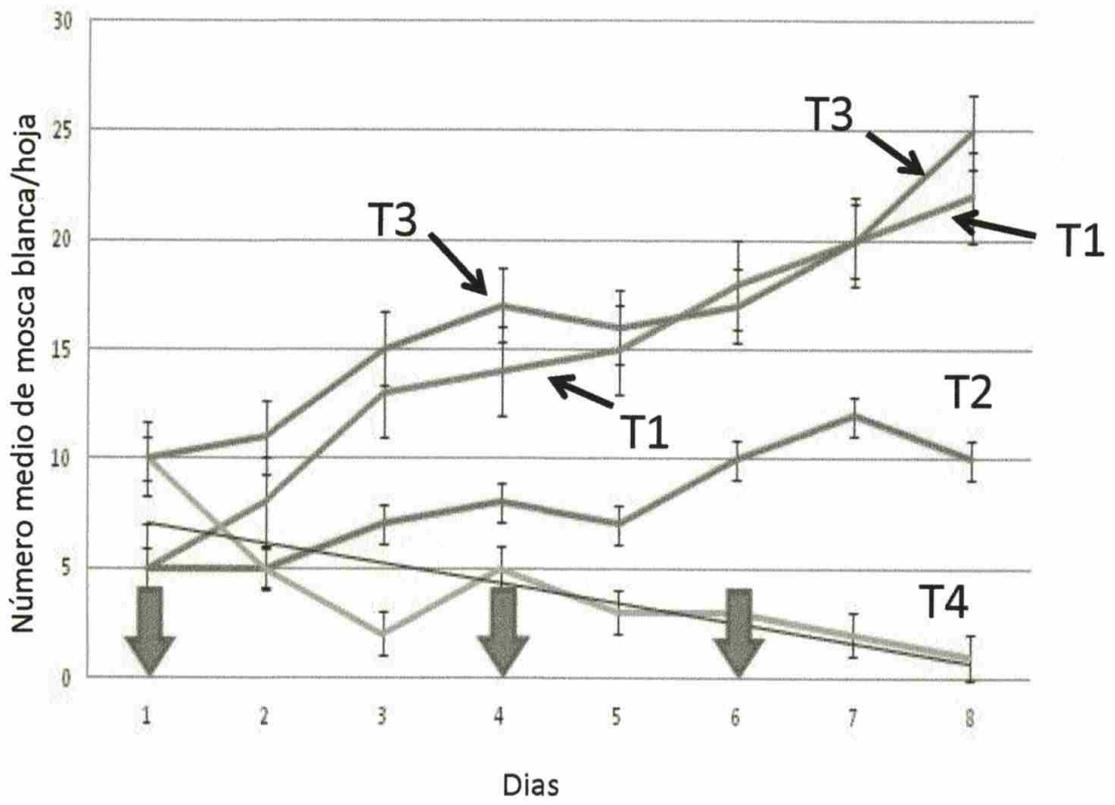


Figura 2