

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 708**

21 Número de solicitud: 201430622

51 Int. Cl.:

**A01N 43/16** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

28.04.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.12.2015

Fecha de la concesión:

14.09.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.09.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070320

73 Titular/es:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (60.0%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid (Madrid) ES;  
FUNDACIÓN PARQUE CIENTÍFICO Y  
TECNOLÓGICO DE ALBACETE (PCYTA) (20.0%)  
y  
HOLLAND BIODIVERSITY B.V. (HBD) (20.0%)

72 Inventor/es:

GONZÁLEZ COLOMA, Azucena;  
REINA ARTILES, Matías;  
LACRET PIMIENTA, Rodney Roland;  
NIEUEWENHUIJS-BERBEE, Alleta y  
SANTANA MERIDAS, Omar

74 Agente/Representante:

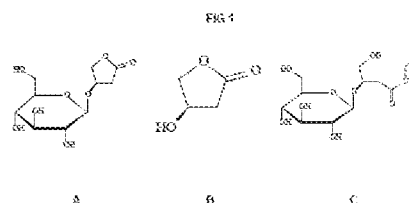
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **EXTRACTO DE MATERIAL VEGETAL DEL GÉNERO CROCUS L. CON ALTA ACTIVIDAD BIOINSECTICIDA**

57 Resumen:

Extracto de material vegetal del género *Crocus* L. con alta actividad bioinsecticida.

Las plagas de insectos fitófagos afectan una gran variedad de cultivos y tienen especial relevancia en sistemas agrícolas sostenibles donde los productos de síntesis están restringidos. La presente invención reivindica un extracto alcohólico de material vegetal del género *Crocus* L. con alta actividad bioinsecticida, que se caracteriza por comprender 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(3R)-hidroxibutanolida, por ser fácilmente obtenible y por estar exento de problemas de toxicidad. La invención también reivindica el procedimiento de obtención del extracto; una composición fitosanitaria que lo comprende; el uso como bioinsecticida del extracto, de la composición fitosanitaria y de compuestos presentes en el extracto que se identifican por primera vez con actividad bioinsecticida; así como un método de control de plagas de insectos.



ES 2 552 708 B1

**EXTRACTO DE MATERIAL VEGETAL DEL GÉNERO *CROCUS* L. CON ALTA ACTIVIDAD BIOINSECTICIDA**

**DESCRIPCIÓN**

5

**SECTOR DE LA INVENCION**

La invención se engloba dentro del campo de la agricultura, y más concretamente, en el sector de los biopesticidas que comprenden extractos de plantas, ya que específicamente se refiere a un extracto alcohólico de material vegetal del género *Crocus* L., a su procedimiento de obtención, a una composición fitosanitaria que comprende a dicho extracto, a su uso como bioinsecticida y a un método de control de insectos-plaga que utiliza al extracto, a la composición fitosanitaria que lo comprende y a compuestos bioactivos presentes en el extracto que se identifican por primera vez con actividad bioinsecticida.

15

**ESTADO DE LA TECNICA**

El género *Crocus* L. (Iridaceae) comprende más de 88 especies diferentes de plantas herbáceas perennes y geófitas, distribuidas por el centro y sureste de Europa, desde Europa Central hasta Turquía, África del Norte y desde el suroeste de Asia hasta China Occidental. Muchas de ellas son muy apreciadas como plantas ornamentales por sus vistosas flores y tienen gran valor como variedades hortícolas (floricultura), mientras que otras destacan por sus aplicaciones industriales.

La bibliografía refiere la presencia de los pigmentos antocianos y flavonoides en pétalos de más de 70 especies de *Crocus*. Algunos lípidos y ácidos grasos se han descrito en *C. vallicola*. En *C. vernus* se ha informado la presencia de alcanos y compuestos relacionados con el aroma (ar-tumerona) en cormos y flores respectivamente. En extractos metanólicos de la planta completa de *C. baytopiorum* se han encontrado diferentes compuestos fenólicos (ácidos *p*-cumárico y rosmarínico, quercetina, kaempferol y glucósidos de la apigenina). En hojas de *C. tommasinianus* y *C. corsicus* se han descrito diferentes glicósidos de flavonas.

*Crocus sativus* L. (azafrán) es la especie más representativa del género y la única iridácea que se ha utilizado extensivamente en la industria alimentaria, concretamente para la obtención de la especia "azafrán", que se considera uno de los productos alimentarios más caros del mundo con un valor de mercado cercano a los 3000 € el kilogramo. Además de su

5 uso más generalizado como especia, colorante alimentario y textil, cada día se valoriza más por sus propiedades farmacológicas y nutraceuticas. Sin embargo, como la mayoría de las plantas aromáticas, condimentarias y medicinales, tiene muy poco valor añadido si tenemos en cuenta que menos del 0.001% de la biomasa de la planta se utiliza para obtener el producto principal.

10 Precisamente por ser la especie de *Crocus* con mayor valor comercial, ha sido la más profusamente caracterizada. La composición química de los estigmas de *C. sativus*, incluye más de 150 compuestos volátiles pertenecientes a diferentes clases químicas entre las que se encuentran terpenos, alcoholes de terpenos y sus respectivos ésteres. Entre los componentes no volátiles más representativos se encuentran los carotenoides (zeaxantina, licopeno y  $\beta$ -caroteno) y diferentes derivados del kaempferol. Sin embargo, los componentes mayoritarios y más estudiados de los estigmas son las crocinas (*cis*- y *trans*-), picrocrocina y safranal, compuestos responsables del color amarillo, sabor (principio amargo) y aroma de la especia, respectivamente.

15 Entre los compuestos naturales presentes en las pétalos de *C. sativus* se han descrito ácidos grasos, estigmasterol, monoterpenos, antocianinas (delfinidina, petunidina y derivados de la malvidina), flavonoides (quercetina, miricetina, apigenina, naringenina, ácidos fenólicos y algunos derivados del kaempferol) así como más de 21 derivados glicosilados y esterificados de flavononas y flavonoles.

20 En las hojas de *C. sativus* se ha identificado la presencia de kaempferol y derivados glicosilados de la quercetina, luteolina, apigenina y miricetina. En los cormos de *C. sativus* se han encontrado diferentes compuestos como el campesterol, estigmaterol,  $\beta$ -sitosterol, saponinas triterpénicas, glicoconjugados, sesquiterpenos tipo bisabolano, monoterpenos, alkanos y ácidos grasos. Otras partes de la planta como el estambre y el perianto de *C. sativus* han sido menos estudiadas detectándose la presencia de ácido láurico, ácido hexadecanoico, derivados hidroxilados de la furanona y estigmasterol.

30 Finalmente, un estudio sobre la composición de los brotes de *C. sativus* refiere el primer informe sobre aislamiento y elucidación del 3-(*S*)-3- $\beta$ -D-glucopiranosiloxibutanolida (Goodyerosido A) (Gao *et al.* 1999. *Planta Med.* 65, 425-427), un diasteroisómero en la parte del aglicón.

35

En cuanto a propiedades farmacológicas, nutracéuticas e industriales de especies del género *Crocus* L., se han descrito actividades antioxidantes y antimicrobianas en los pétalos de *C. baytopiorum*, *C. biflorus* y *C. flavus*. Por su parte, a la especie *C. sativus* se le atribuye actividad antidepresiva, antitusiva, antioxidante, anti-inflamatoria, relajante, anticonvulsiva, afrodisíaca, anticancerígena, quelante de radicales libres, y detoxificante, entre otras, que se relacionan con los componentes principales del estigma (crocinas, picrocinas y safranal) y del cormo (saponinas triterpénicas y glicoconjugados bioactivos).

Por otra parte, la agricultura se enfrenta constantemente a serios problemas relacionados con la incidencia de plagas y ataques de organismos patógenos con la consiguiente reducción de la productividad. El uso de plaguicidas sintéticos es el método más empleado para la protección de los cultivos. Sin embargo, el uso excesivo de estos compuestos ha derivado en la aparición de organismos-plaga más resistentes, contaminación del medio ambiente, toxicidad hacia organismos beneficiosos y polinizadores y riesgos para la salud humana, lo que en combinación con la preocupación por parte de los consumidores por el medio ambiente y la seguridad alimentaria, han promovido la vuelta a los productos naturales renovables para la obtención de compuestos bioactivos con propiedades biocidas.

Las plantas y residuos agroindustriales, constituyen una fuente barata y renovable de compuestos bioactivos de defensa que actúan contra plagas y organismos patógenos. Este tipo de compuestos se caracterizan por ser efectivos a dosis muy bajas, tener poca persistencia en el medio (biodegradables), reducir la aparición de resistencias cruzadas y no presentar efectos citotóxicos asociados. De ahí que el mercado de los bioplaguicidas se encuentre en una clara fase de expansión, fundamentalmente en Norteamérica y Europa, debido fundamentalmente al incremento de la producción orgánica y hortícola (principales demandantes de bioplaguicidas), pero también a la necesidad del aprovechamiento de los residuos y a la demanda de los consumidores de productos más sanos.

Ejemplos de insecticidas naturales que existen en el mercado son la azadiractina (*Azadirachta indica*, Neem), eugenol (*Laurus* sp.), karanjin (*Derris indica*), PONNEEM (mezcla del aceite de *A. indica* y *Pongamia glabra*), nicotina (*Nicotiana tabacum*), fenetil propionato (*Mentha piperita*), piretrinas (*Tanacetum cinerariaefolium*), rotenona (*Derris* sp.), ryania y algunos aceites esenciales y ácidos derivados de plantas.

Aunque algunos de ellos están siendo comercializados a gran escala (Neem y PONNEEM), son también muchos los que están sujetos a numerosas restricciones por sus efectos

negativos en el medio ambiente, mamíferos e insectos beneficiosos (eugenol, nicotina, piretrina y rotenona) y los que no han tenido mucha aceptación en el mercado (karanjin), lo que pone de manifiesto la dificultad de contar con productos bioinsecticidas naturales que simultáneamente sean fácilmente obtenibles, efectivos y respetuosos con el medio ambiente.

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Constituye un primer aspecto de la invención un extracto alcohólico de material vegetal del género *Crocus* L. con actividad bioinsecticida, que comprende 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(3*R*)-hidroxibutanólida y que es especialmente efectivo contra insectos-plaga herbívoros.

En una realización particular, el extracto alcohólico es del corno de *Crocus sativus* y adicionalmente comprende al menos otro compuesto bioactivo con actividad bioinsecticida, que se selecciona de entre (*R*)-3-hidroxibutanólida y etil 3-(*R*)-3- $\beta$ -D-glucopiranosiloxibutanoato.

En otra realización particular, el extracto alcohólico es un extracto etanólico.

Constituye un segundo aspecto de la invención el procedimiento de obtención del extracto alcohólico que comprende realizar una extracción con un alcohol, partiendo de material vegetal del género *Crocus* L.

En una realización particular, el alcohol de la extracción es etanol.

Adicionalmente, el procedimiento comprende un filtrado para obtener la fracción soluble.

Constituye un tercer aspecto de la invención una composición fitosanitaria que comprende al extracto alcohólico.

Constituye un cuarto aspecto de la invención el uso del extracto alcohólico y/o de la composición fitosanitaria para el control de insectos-plaga herbívoros.

Constituye un quinto aspecto de la invención el uso de al menos uno de los compuestos bioactivos con actividad bioinsecticida seleccionado de entre 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(3*R*)-

hidroxibutanolida, (*R*)-3-hidroxibutanolida y etil 3-(*R*)-3- $\beta$ -D-glucopiranosiloxibutanoato, ya sea individualmente o en combinación, para el control de insectos-plaga herbívoros.

Finalmente, constituye un sexto aspecto de la invención un método de tratamiento fitosanitario para el control de insectos-plaga herbívoros que comprende administrar una dosis fitosanitariamente eficaz del extracto alcohólico y/o de la composición fitosanitaria y/o de al menos uno de los compuestos bioactivos con actividad bioinsecticida.

## 10 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El problema técnico que resuelve la presente invención es la búsqueda de nuevos productos bioplaguicidas naturales que pueden ser utilizados en el tratamiento fitosanitario de plagas de insectos herbívoros, que son al mismo tiempo fácilmente obtenibles, efectivos y respetuosos con el medio ambiente.

Se ha descubierto que un producto que se obtiene a partir de una extracción etanólica de material vegetal de plantas de numerosas especies y/o variedades pertenecientes al género *Crocus* L., (ver ejemplos 1 a 4), sorprendentemente presentan una alta actividad bioinsecticida contra insectos-plaga herbívoros chupadores y/o masticadores (ver ejemplos 5 a 8).

Las principales ventajas técnicas del extracto alcohólico de material vegetal del género *Crocus* L. así como de su uso para el control de plagas de insectos se enumeran a continuación:

- presenta alta capacidad bioinsecticida comparada con otros compuestos de reconocida actividad, referidos en muchas ocasiones como modelos antialimentarios de insectos. Por ejemplo, en el caso de *L. decemlineata*, se obtienen valores de actividad antialimentaria superiores a los de otros compuestos de referencia como el Polygodial [EC<sub>50</sub>=8.34 (2.3-3.01)] y el Thymol [EC<sub>50</sub>=23.9 (7.3-85.8)]. En el caso de *S. littoralis*, el compuesto mayoritario del corno de *C. sativus* (3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(3*R*)-hidroxibutanolida) presenta un nivel de actividad cercano a la Azadiractina;

- no presenta toxicidad para humanos o animales, ya que por ejemplo las hojas se han utilizado en alimentación animal (Valizadeh, R. 2000. *Agricultural Sciences and Technology*. 14: 3-9; Mohammad-Abadi, A.A. *et al.* 2007. *Acta Hort.* (ISHS), 739: 151-153) y se

recomienda el posible empleo de los cormos como antioxidantes naturales en alimentación humana (Esmaeili, N. *et al.* 2011. *Pharmacogn. Mag.* 7: 74-80);

5 - el género *Crocus* L. presenta una biodiversidad vegetal enorme y por lo tanto una disponibilidad considerable de material de partida que puede reducir el coste final del producto en el mercado; y

10 -en el caso del *C. sativus* la obtención de extractos con actividad bioinsecticida constituye una alternativa de valorización de material vegetal (cormos, hojas, pétalos) con muy escaso o nulo valor comercial, que principalmente se gestionan como un residuo tras el cultivo del azafrán y/o procesado de la especia. Por ejemplo, para producir 1 kg de la especia se recolectan más de 200.000 flores y se desechan 300-350 kg de residuos florales (tépalos, anteras, estambres) después de la monda, 1500 kg de hojas como residuo de cosecha y cientos de bulbos que no cumplen los requisitos establecidos (tamaño de floración, sanos, etc.) para ser replantados y/o comercializados.

15 En un aspecto, la invención se relaciona con un extracto alcohólico de material vegetal del género *Crocus* L. con actividad bioinsecticida, en adelante extracto alcohólico de la invención, que comprende 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(3*R*)-hidroxibutanolida.

20 El "3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(3*R*)-hidroxibutanolida o kinsenósido", descrito en esta invención por primera vez en extractos de material vegetal del género *Crocus* L. (ver ejemplo 3), ha sido aislado previamente de otras fuentes naturales, fundamentalmente de *Anoectochilus formosanus* y *A. roxburghii* y se conoce, casi exclusivamente, por sus propiedades hepatoprotectoras y para el tratamiento de enfermedades vasculares. Los ejemplos que se incluyen en esta invención lo relacionan por primera vez con la actividad bioinsecticida.

25 Por "extracto alcohólico de la invención" se entiende indistintamente al extracto crudo directamente obtenido de la extracción con un alcohol, de material vegetal del género *Crocus* L., que preferentemente es su parte soluble, pero también cualquier fracción o subfracción sucesiva obtenida a partir de dicho extracto que comprenda kinsenósido. El extracto alcohólico de la invención puede presentarse en estado líquido pero también en estado sólido, por ejemplo utilizando técnicas de liofilización.

Preferentemente el extracto alcohólico de la invención es un extracto etanólico.

35 Por "actividad bioinsecticida", en el contexto de esta invención, se entiende la capacidad de controlar insectos-plaga a través de diferentes mecanismos de acción. Esta capacidad se

puede determinar mediante diferentes tipos de bioensayos que incluyen actividad antialimentaria (inhibición de la alimentación y/o asentamiento en el caso de áfidos), repelente o tóxica, entre otras.

5 Por "material vegetal" se entiende cualquiera de los diferentes órganos vegetales de las especies del género *Crocus* L., incluyendo los que se encuentran en la parte aérea y en la parte subterránea. Ejemplos de partes aéreas son el tallo, las hojas o las flores, y preferentemente las hojas y/o los tépalos. Ejemplos de partes subterráneas son el cormo y las raíces, y preferentemente el cormo.

10

Por "*Crocus* L." se entiende un género de plantas herbáceas, perennes y geófitas pertenecientes a la familia de las Iridáceas y que se caracterizan por presentar un órgano subterráneo de reserva llamado cormo. Ejemplos, a título ilustrativo y no limitativo, de especies, subespecies y/o variedades de *Crocus* L. que se utilizan en el ámbito de la invención son *C. sativus*, *C. ancyrensis*, *C. cancellatus*, *C. carpetanus*, *C. chrysanthus*, *C. nevadensis*, *C. serotinus*, *C. serotinus* ssp. *salzmanii*, *C. vernus* var. "flower record", *C. vernus* var. "geel yellow", *C. vernus* "jean d'arc", *C. versicolor*, *C. speciosus*, *C. speciosus* "albus", *C. speciosus* "Aitchinsonii", *C. angustifolius*, *C. dalmaticus*, *C. pulchellus*, *C. corsicus*, *C. kotschyanus*, *C. kotschyanus* "albus", *C. cartwrightianus*, *C. laevigatus* "fontenayi" y *C. ligusticus*.

20

El extracto alcohólico de la invención se obtiene a partir de hojas, tépalos o cormos del género *Crocus* L., o una combinación de las partes anteriores.

25 Los insectos contra los que es efectivo el extracto alcohólico de la invención son principalmente insectos-plaga herbívoros con diferentes adaptaciones tróficas, ya sean masticadores o chupadores, y que pueden presentar una alta incidencia sobre cultivos hortícolas provocando graves pérdidas económicas, desarrollar resistencias a insecticidas de síntesis y presentar capacidad de transmisión de virus. Ejemplos, a título ilustrativo y no limitativo, de órdenes y especies de insectos-plaga herbívoros con diferentes adaptaciones tróficas, masticadores o chupadores son Lepidoptera, Homoptera, Coleoptera y Spodoptera *littoralis*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Leptinotarsa decemlineata* respectivamente.

30

El extracto alcohólico de la invención comprende una actividad bioinsecticida contra al menos uno de los insectos *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Leptinotarsa decemlineata* preferentemente de entre el 50% y el 75%, más preferentemente

35



de entre el 75% y el 90% y todavía más preferentemente superior al 90% cuando se utiliza con una dosis de 100 µg/cm<sup>2</sup>.

5 En una realización particular, un extracto alcohólico de la invención que es la parte soluble del extracto crudo etanólico del cormo que se elige de entre *C. chrysanthus*, *C. ancyrensis*, *C. cancellatus*, *C. serotinus*, *C. serotinus* ssp. *salzmanii*, *C. nevadensis*, *C. laevigatus* "fontenayi", *C. kotschyanus* "albus", *C. speciosus* "albus" y *C. pulchellus*, comprende una actividad bioinsecticida contra al menos uno de los insectos *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Leptinotarsa decemlineata* preferentemente superior al 80%,  
10 cuando se utiliza con una dosis de 100 µg/cm<sup>2</sup>.

En otra realización particular, un extracto alcohólico de la invención que es la parte soluble del extracto crudo etanólico de hoja que se elige de entre *C. chrysanthus*, *C. ancyrensis*, *C. serotinus*, *C. serotinus* ssp. *salzmanii*, *C. versicolor*, *C. vernus* "flower record", *C.*  
15 *carpetanus*, *C. speciosus*, *C. speciosus*, "Aitchinsonii", *C. angustifolius*, *C. dalmaticus*, *C. pulchellus*, *C. corsicus*, *C. kotschyanus*, *C. cartwrightianus*, *C. ligusticus* y *C. sativus*, comprende una actividad bioinsecticida contra al menos uno de los insectos *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Leptinotarsa decemlineata* preferentemente superior al 80%, cuando se utiliza con una dosis de 100 µg/cm<sup>2</sup>.

20

En el ámbito de la invención se utilizan técnicas de fraccionamiento del extracto alcohólico crudo ampliamente conocidas por cualquier experto en el estado de la técnica. Así por ejemplo, se utiliza cromatografía líquida de vacío (VLC), cromatografía en columna (CC) empleando diferentes fases sólidas (Gel de Sílice, Sephadex LH-20) y cromatografía  
25 líquida de alta resolución (HPLC), eluyéndose con distintos gradientes de polaridad mediante diferentes combinaciones de disolventes orgánicos, pero también extracción con agua a temperatura ambiente tras disolución en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Sin embargo, es posible utilizar cualquier otra técnica que permita la obtención y fraccionamiento del extracto alcohólico de la invención como por ejemplo, mediante el empleo de extracciones  
30 mediante fluidos supercríticos y otras técnicas de extracción/separación avanzadas y/o convencionales.

En otro aspecto, el extracto de la invención es cualquier fracción y/o subfracción sucesiva obtenida a partir del extracto alcohólico crudo que comprende kinsenósido y actividad  
35 bioinsecticida. Como el experto en la materia conocerá es posible obtener distintas fracciones a partir del extracto crudo, cada una de las cuales comprende una composición

distinta de compuestos bioactivos, y que a su vez pueden volver a subfraccionarse en repetidas ocasiones hasta que la subfracción esté constituida por una mezcla simple y/o un único compuesto bioactivo.

- 5 La actividad bioinsecticida del extracto alcohólico de la invención no se explica exclusivamente por la actividad del kinsenósido. Los fraccionamientos químicos realizados por los inventores, la determinación de compuestos bioactivos y los ensayos de actividad bioinsecticida (ver ejemplos 5 a 8), permiten identificar la actividad de otros compuestos que podrían actuar de forma sinérgica. Así por ejemplo, la fracción 10 obtenida de corno de *C. sativus* en la que está presente el kinsenósido presenta una actividad antialimentaria inferior al 40% contra *M. persicae*, mientras que el extracto crudo presenta una actividad antialimentaria superior al 80% para este insecto.

- 15 En otra realización particular, un extracto alcohólico de la invención que es la parte soluble del extracto crudo etanólico de corno de *Crocus sativus*, adicionalmente al kinsenósido, comprende al menos otro compuesto bioactivo con actividad bioinsecticida, que se selecciona de entre el aglicón del kinsenósido también conocido como (*R*)-3-hidroxiбутanolida y el etil 3-(*R*)-3- $\beta$ -D-glucopiranosiloxibutanoato.

- 20 En otra realización más particular, un extracto alcohólico de la invención que es la parte soluble del extracto crudo etanólico de corno de *Crocus sativus*, adicionalmente a los compuestos bioactivos anteriores, comprende al menos otro compuesto bioactivo que se selecciona de entre  $\alpha$ -amirenona, lupenona, friedelín,  $\beta$ -amirina, estigmastenona y lupeol.

- 25 En otra realización particular, un extracto alcohólico de la invención que es la parte soluble del extracto crudo etanólico de corno de *Crocus sativus*, comprende una actividad bioinsecticida contra al menos uno de los insectos *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Leptinotarsa decemlineata* preferentemente superior al 70%, cuando se utiliza con una dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

- 30 En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento de obtención del extracto alcohólico de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende realizar una extracción con un alcohol partiendo de material vegetal del género *Crocus* L.

Por "extracción alcohólica" se entiende una extracción que utiliza un alcohol como extractante, ya sea puro o combinado. Ejemplos de alcoholes que se utilizan en el ámbito de la presente invención son etanol y metanol.

- 5 En una realización particular del procedimiento de la invención, la extracción alcohólica se realiza con etanol.

Adicionalmente, el procedimiento de la invención comprende otra etapa de filtrado para obtener la fracción soluble.

10

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición fitosanitaria que comprende al extracto alcohólico de la invención, en adelante composición fitosanitaria de la invención.

15

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

20

Como el experto en el estado de la técnica conocerá, habitualmente se utilizan vehículos sólidos, vehículos líquidos, vehículos gaseosos, etc., y, si es necesario, agentes tensioactivos y agentes auxiliares para la formulación de composiciones fitosanitarias como, por ejemplo, un aditivo para formular formas tales como concentrados emulsionables, polvos humectables, líquidos fluidos, (v.g., suspensión en agua, emulsión en agua, etc.), polvos, aerosoles, ULV y similares.

25

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

30

35

Ejemplos de vehículo líquido que se incluyen en el ámbito de la presente invención son agua, alcoholes (v.g., metanol, etanol, etc.), cetonas (v.g., acetona, metil etil cetona, etc.), hidrocarburos aromáticos (v.g. benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, metilnaftaleno, etc.), hidrocarburos alifáticos (v.g. hexano, ciclohexano, kerosina, gas oil, etc), ésteres (v.g., acetato de etilo, acetato de butilo, etc.), nitrilos (v.g. acetonitrilo, isobutironitrilo, etc.), éteres (v.g. éter diisopropílico, dioxano etc.), amidas de ácido (v.g. N,N-dimetilformamida, N,N-

dimetilacetamida, etc.), hidrocarburos halogenados (v.g., dicloroetano, tricloroetano, tetracloruro de carbono, etc.), sulfóxido de dimetilo, aceites vegetales (v. g., aceite de soja, aceite de semilla de algodón, etc.) y similares.

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

- 10 Ejemplos de agente tensioactivo que se incluyen en el ámbito de la presente invención son sulfatos de alquilo, sales de sulfonato de alquilo, alquil aril sulfonatos, ésteres alquil arílicos, compuestos de polioxietileno de los mismos, ésteres polietilen glicólicos, ésteres de alcohol polihidroxílico, derivados de alcohol de azúcar y similares.

- 15 Ejemplos de agente auxiliar para la formulación como agente de fijación y agente de dispersión que se incluyen en el ámbito de la presente invención son caseína, gelatina, polisacáridos (v.g., polvo de almidón, goma arábiga, derivado de celulosa, ácido alginico, etc.), derivados de lignina, bentonita, azúcares, polímeros hidrosolubles sintéticos (v.g., polialcohol vinílico, polipirrolidona de vinilo, poliácidos acrílicos, etc.) y similares.

- 20 Ejemplos de estabilizantes que se incluyen en el ámbito de la presente invención son PAP (fosfato de ácido isopropílico), BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol), BHA (mezcla de 2-terc-butil-4-metoxifenol y 3-terc-butil-4-metoxifenol), aceites vegetales, aceites minerales, agentes tensioactivos, ácidos grasos o ésteres de los mismos y similares.

- 25 Adicionalmente, la composición fitosanitaria de la invención puede comprender otro ingrediente activo.

- 30 Ejemplos de ingrediente activo adicional son otros insecticidas, nematocidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, reguladores del crecimiento de la planta, sinérgicos, fertilizantes, acondicionadores del suelo y cebos para animales.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del extracto alcohólico de la invención y/o de la composición fitosanitaria de la invención para el control de insectos-plaga herbívoros.

35

Tal y como se ha indicado anteriormente, en la presente invención se relaciona por primera vez al kinsenósido y a otros compuestos bioactivos identificados a partir del extracto alcohólico de la invención con el control de insectos-plaga herbívoros. Por este motivo, en otro aspecto, el uso de la invención incluye el kinsenósido, el aglicón del kinsenósido y el etil 3-(*R*)-3- $\beta$  -D-glucopiranosiloxibutanoato, ya sea individualmente o en combinación para el control de insectos-plaga herbívoros.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de tratamiento fitosanitario para el control de insectos-plaga herbívoros que comprende administrar una dosis fitosanitariamente eficaz del extracto alcohólico de la invención y/o de la composición fitosanitaria de la invención y/o de al menos uno de los compuestos bioactivos con actividad bioinsecticida comprendidos en el extracto alcohólico de la invención y que se eligen de entre kinsenósido, el aglicón del kinsenósido y etil 3-(*R*)-3- $\beta$  -D-glucopiranosiloxibutanoato.

La dosis del extracto alcohólico de la invención y/o de la composición fitosanitaria de la invención y/o de los compuestos bioactivos con actividad bioinsecticida comprendidos en el extracto alcohólico de la invención puede aumentar o disminuir opcionalmente según el producto, el tipo de formulación, el tiempo, el lugar y el método de aplicación, el tipo de insecto, el grado de daño y similar.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Estructura química de los compuestos mayoritarios aislados del corno de *Crocus sativus*. **(A)** 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(3*R*)-hidroxibutanolida (kinsenósido), **(B)** (*R*)-3-hidroxibutanolida (aglicón del kinsenósido) y **(C)** Etil 3-(*R*)-3- $\beta$  -D-glucopiranosiloxibutanoato.

## EJEMPLOS

## A. EXTRACTO ETANÓLICO

5 Ejemplo 1. Material vegetal de especies del género *Crocus* L.

Los cormos, hojas y tépalos de distintas especies de *Crocus* L. (ver tabla 1) se secaron en una cámara con recirculación de aire a 30°C y se molieron en un molino para material vegetal.

10 Tabla 1. Especies del género *Crocus* L. empleadas en la invención

Espece	Parte de la planta estudiada	Procedencia
<i>C. sativus</i> (azafrán)	Residuos de cormo, hojas y tépalos	Producción local (España, Teruel)
<i>C. ancyrensis</i>	Cormos, hojas	HBD <sup>a</sup>
<i>C. cancellatus</i>	Cormos	HBD
<i>C. carpetanus</i>	Hojas	Silvestre <sup>b</sup>
<i>C. chrysanthus</i>	Cormos, hojas	HBD
<i>C. nevadensis</i>	Cormos	Silvestre <sup>c</sup>
<i>C. serotinus</i>	Cormos, hojas	Silvestre <sup>d</sup>
<i>C. serotinus</i> ssp. <i>salzmanii</i>	Cormos, hojas	HBD
<i>C. vernus</i> var. "flower record"	Hojas, tepalos	HBD
<i>C. vernus</i> var. "geel yellow"	Tepalos	HBD
<i>C. vernus</i> var. "Jeanne d'arc"	Tepalos	HBD
<i>C. versicolor</i>	Hojas	HBD
<i>C. speciosus</i>	Hojas	HBD
<i>C. speciosus</i> "albus"	Cormos	HBD
<i>C. speciosus</i> "Aitchinsonii"	Cormos, hojas	HBD
<i>C. angustifolius</i>	Hojas	HBD
<i>C. dalmaticus</i>	Hojas	HBD
<i>C. pulchellus</i>	Cormos, Hojas	HBD
<i>C. corsicus</i>	Hojas	HBD
<i>C. kotschyanus</i>	Hojas	HBD
<i>C. kotschyanus</i> "albus"	Cormos	HBD
<i>C. cartwrightianus</i>	Hojas	HBD

<i>C. laevigatus</i> "fontenayi"	Cormos	HBD
<i>C. ligusticus</i>	Hojas	HBD

<sup>a</sup>HBD: Holland Biodiversity (Vivero), <sup>b</sup> Recolectada en la Sierra de Madrid (Madrid, España), <sup>c</sup> Recolectada en Motilla del Palancar (Cuenca, España), <sup>d</sup> Recolectada en Huetes (Cuenca, España).

5

### Ejemplo 2. Obtención de un extracto etanólico

Las muestras secas y molidas se extrajeron repetidas veces durante 24 horas con etanol en un aparato Soxhlet y se filtraron al vacío. Los extractos crudos etanólicos obtenidos, después de eliminar el disolvente, se conservaron a 4°C hasta el análisis de los perfiles biológicos y químicos de los cormos, hojas y tépalos.

10

En la tabla 2 se muestran los rendimientos de extracción antes del filtrado, obtenidos para cada parte de la planta y especie del género *Crocus* L. empleadas en esta invención.

Tabla 2. Rendimientos de extracción (antes del filtrado) expresados como gramos de extracto crudo etanólico seco / 100 g de material vegetal seco

15

Especie	Parte de la planta extraída	Rendimiento de extracción (%)
<i>C. sativus</i>	Cormos	7.4
	Tépalos	45.0
	Hojas	25.0
<i>C. ancyrensis</i>	Cormos	4.2
	Hojas	23.7
<i>C. cancellatus</i>	Cormos	6.42
<i>C. carpetanus</i>	Hojas	21.2
<i>C. chrysanthus</i>	Cormos	4.2
	Hojas	29.1
<i>C. nevadensis</i>	Cormos	8.63
<i>C. serotinus</i>	Cormos	9.83
	Hojas	24.7
<i>C. serotinus</i> ssp. <i>salzmanii</i>	Cormos	4.13
	Hojas	24.2
<i>C. vernus</i> "flower record"	Tépalos	66.5
	Hojas	16.8

<i>C. vernus</i> "geel yellow"	Tépalos	71.0
<i>C. vernus</i> "jeanne d'arc"	Tépalos	63.9
<i>C. versicolor</i>	Hojas	20.0
<i>C. speciosus</i>	Hojas	22.2
<i>C. speciosus</i> "albus"	Cormos	7.9
<i>C. speciosus</i> "Aitchinsonii"	Cormos	13.9
	Hojas	18.9
<i>C. angustifolius</i>	Hojas	11.1
<i>C. dalmaticus</i>	Hojas	46.4
<i>C. pulchellus</i>	Hojas	23.4
	Cormos	6.0
<i>C. corsicus</i>	Hojas	30.3
<i>C. kotschyanus</i>	Hojas	10.0
<i>C. kotschyanus</i> "albus"	Cormos	9.9
<i>C. cartwrightianus</i>	Hojas	27.4
<i>C. laevigatus</i> "fontenayi"	Cormos	4.3
<i>C. ligusticus</i>	Hojas	26.9

### Ejemplo 3. Espectros de RMN en extractos crudos etanólicos

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RNM de  $^1\text{H}$ ), realizado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), de los extractos etanólicos de cormos de diferentes especies del género *Crocus* L. obtenidos según el ejemplo 2 presentaron señales de protones característicos de una mezcla enriquecida de kinsenósidos sin poder especificar el fragmento glucósido (ver tabla 3).

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  de extractos de cormos de especies del género *Crocus* L.

Extracto	ppm		
	<i>C. sativus</i>	2.00-2.31	3.22-4.10
<i>C. ancyrensis</i>	2.00-2.31	3.22-4.10	5.10-5.36
<i>C. cancellatus</i>	2.08-2.50	3.23-4.13	5.00-5.41
<i>C. chrysanthus</i>	2.08-2.50	3.23-4.13	5.00-5.41
<i>C. nevadensis</i>	2.08-2.50	3.23-4.13	5.00-5.41
<i>C. serotinus</i>	2.08-2.50	3.23-4.13	5.00-5.41



Por su parte, el espectro de RNM de  $^1\text{H}$  de los extractos etanólicos de hojas de especies del género *Crocus* L. indicados en la tabla 4 también presentaron señales de protones característicos de una mezcla enriquecida de kinsenósidos sin poder especificar el fragmento glucósido. Además, en este caso probablemente vaya acompañada de componentes parafínicos (0.75-1.50 ppm).

Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  de extractos de hojas de *Crocus sativus* de diferente procedencia

Extracto	ppm			
	<i>C. sativus</i> (España)	0.75-1.50	1.60-2.75	3.20-4.20
<i>C. sativus</i> (Holanda)	0.80-1.60	2.00-2.80	3.20-4.25	4.30-5.40

#### Ejemplo 4. Fraccionamiento del extracto etanólico

La parte soluble del extracto crudo etanólico obtenido utilizando cormos de *C. sativus* según el ejemplo 2, constituyó un 6.70%, mientras que el precipitado constituyó un 0.72%. El fraccionamiento de la parte soluble en etanol se realizó mediante una cromatografía líquida de vacío (VLC) empleando gel de sílice como fase estacionaria. Se eluyó con un gradiente de polaridad creciente de Hexano:AcOEt (0-100% de AcOEt) y AcOEt:MeOH, (2-50% de MeOH) obteniéndose 10 fracciones (Frs. 1-10).

Las fracciones con mayor actividad biocida: la 3, la 6 y la 10 fueron nuevamente fraccionadas.

La fracción 3 (0.55g, 0.81% del extracto crudo inicial) se eluyó en una mezcla de n-Hexano:AcOEt (75:25) y se purificó mediante cromatografía en columna (CC) obteniéndose 3 fracciones activas (3A, 3B y 3C) que se caracterizaron por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) lográndose identificar los compuestos mayoritarios:  $\alpha$ -amyrenona, lupenona y friedelin (Fr. 3A), un esteroide no identificado (con fórmula  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$  y peso molecular, MW=259) (Fr. 3B) así como  $\beta$ -amyrina, estigmastenona y lupeol (Fr. 3C).

La fracción 10, que constituye la fracción más polar y abundante del corno de *C. sativus* (32.2g, 48% del extracto crudo inicial) se eluyó en una mezcla de AcOEt:MeOH (50:50). Una parte de esta fracción (7.1g) se fraccionó mediante cromatografía en columna (CC) empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y como fase líquida una mezcla de diclorometano:metanol (1:1), obteniéndose 6 fracciones (10A-10E) y un compuesto mayoritario (0.210g) que se corresponde con el kinsenósido (3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(3R)-hidroxibutanólida): sólido;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +13.0$  (c 0.84,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)

cm<sup>-1</sup>; 3400 (OH), 2967 (CH), 1770 (C=O,  $\gamma$ -lactone). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz):  $\delta$  4.77 (1H, m, H-3), 4.49 (1H, br d, J = 9.5 Hz, H-4a), 4.47 (1H, dd, J = 10.0, 4.6 Hz, H-4b), 4.32 (1H, d, J = 7.6 Hz, G-1), 3.62 (1H, br dd, J = 11.0, J = 5,6, G-6a), 3.82 (1H, dd, J = 12.0, 1,2 Hz, G-6b), 3.26 (1H, m, G-4), 3.26 (1H, m, G-5), 3.30 (1H, dd, J = 5.0, 4.4 Hz, G-3), 3.14 (1H, dd, J = 7.6, 9.1Hz, G-2), 2.61 (1H, dd, J = 18.0, 1.3 Hz, H-2a) 2.82 (1H, dd, J = 18.0, 6.4 Hz, H-2b); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta$  178.7 (C, C-1), 103.8 (CH, G-1), 77.9 (CH, G-5), 77.8 (CH, C-3), 76.3 (CH, G-3), 76.2 (CH<sub>2</sub>, C-4), 74.8 (CH, G-2), 71.4 (CH, G-4), 62.7 (CH<sub>2</sub>, G-6'), 36.1 (CH<sub>2</sub>, C-2); ESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> = 287.0753 calcd. para C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>Na.

10 A continuación, la fracción 10B (0.99g) se fraccionó mediante CC empleando Sephadex LH-20 y una mezcla de diclorometano:metanol (1:1) obteniéndose 6 nuevas fracciones (10B1-10B6). La fracción 10B3 (0.24g) se purificó mediante CC empleando un gradiente de polaridad creciente de diclorometano:metanol:agua y se obtuvo el etil 3-(*R*)-3- $\beta$ -D-glucopiranosiloxibutanoato (0.017g):  $[\alpha]_D^{25} = -4.0$  (c, 0.53, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500  
 15 MHz):  $\delta$  4.32 (1H, dd, J = 9.0, 1.5 Hz, G-1), 4.09 (1H, dd, J = 8.0, 3.0 Hz, H-3 $\alpha$ ), 4.09 (2H, q, J = 7.0 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.80 (1H, dd, J = 11.7, 1.5 Hz, G-6'), 3.60 (1H, dd, J = 12.0, 5.0 Hz, H-6), 3.57 (2H, m, H-4 y H-4'), 3.29 (1H, dd, J = 9.0, 1.5 Hz, G-3), 3.23 (1H, m, G-4), 3.23 (1H, m, G-5), 3.12 (1H, dd, J = 9.5, 7.8 Hz, G-2), 2.56 (2H, dd, J = 2.0, 5.5 Hz, H-2 y H-2'), 1.20 (3H, t, J = 7.1 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta$  173.3 (C, OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 104.3  
 20 (CH, G-1), 78.9 (CH, C-3), 77.9 (CH, G-4), 77.8 (CH, G-3), 75.0 (CH, G-2), 71.5 (CH, G-5), 65.4 (CH<sub>2</sub>, C-4), 62.6 (CH<sub>2</sub>, G-6), 61.8 (OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 37.7 (CH<sub>2</sub>, C-2); 14.5 (CH<sub>3</sub>, OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); ESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> = 333.1175 calcd. para C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>Na.

La fracción 6 (10.13g, 15.10% del extracto crudo inicial) se eluyó al 100% de AcOEt, de su  
 25 fraccionamiento mediante VLC en un gradiente de polaridad creciente de n-Hexano/Acetona se obtuvieron 9 fracciones (Frs. 6A-6H). La fracción mayoritaria (6F, 9.78g) se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se extrajo con agua a temperatura ambiente. Después de evaporar el disolvente de la parte orgánica se obtuvo la fracción de diclorometano (6FA, 0.29g). El extracto acuoso remanente se secó obteniéndose la fracción acuosa (6FB, 9.49g). A continuación, una parte  
 30 la fracción 6FB (0.4g) se fraccionó mediante CC empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y una mezcla de hexano:diclorometano:metanol (2:1:1) como fase móvil; obteniéndose el (*R*)-3-hidroxiбутanolida (aglicón del kinsenósido) (0.296g): sólido;  $[\alpha]_D^{25} = +77.1$  (c, 0.24, CH<sub>3</sub>OH); IR v<sub>max</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup>; 3462 (OH), 1738 (C=O), 1608. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz):  $\delta$  4.72 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 4.45 (1H, dd, J = 10.0, 4.5 Hz, H-4b), 4.35 (1H, br  
 35 d, J = 10.0 Hz, H-4a), 2.79 (1H, dd, J = 17.9, 6.1 Hz, H-2b), 2.56 (1H, br d, J = 17.9 Hz, H-

2a);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  176.5 (C, C-1), 76.1 ( $\text{CH}_2$ , C-4), 67.5 (CH, C-3), 37.8 ( $\text{CH}_2$ , C-2); ESI-MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 125.0219$  calcd. para  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3\text{Na}$ .

## B. ACTIVIDAD BIOINSECTICIDA

5

Para los bioensayos de actividad bioinsecticida se utilizaron insectos (ver tabla 5) seleccionados en función de la importancia económica de su incidencia sobre cultivos hortícolas, el desarrollo de resistencia a insecticidas de síntesis (*L. decemlineata*) y su capacidad de transmisión de virus (Homoptera).

10

Tabla 5. Insectos-plaga empleados como dianas biológicas

Orden	Género	Especie	Adaptación trófica
Lepidoptera	<i>Spodoptera</i>	<i>Littoralis</i>	Masticador polífago
Homoptera	<i>Myzus</i>	<i>Persicae</i>	Chupador polífago
	<i>Rhopalosiphum</i>	<i>Padi</i>	Olífago (especialista de cereales)
Coleoptera	<i>Leptinotarsa</i>	<i>decemlineata</i>	Masticador olífago (Solanáceas silvestres y cultivadas)

El ensayo de actividad antialimentaria se basó en la preferencia de larvas del sexto estadio (L6) de *S. littoralis* y adultos de *L. decemlineata* por discos de hojas (tratados y control) de planta huésped (*Capsicum annuum* y *Solanum tuberosum*, respectivamente) colocados en la misma placa (elección). Las áreas foliares no consumidas se midieron con la aplicación Image J. 1.43, 2010 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A partir de estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de la alimentación (%FI) (Burgueño-Tapia *et al.* 2008. *J. Chem. Ecol.* 34, 766-771).

20

En el caso de los áfidos o chupadores se determinó el efecto del extracto crudo etanólico, fracciones y/o compuestos bioactivos puros sobre el asentamiento de adultos no alados de *M. persicae* y *R. padi* sobre discos de hojas (tratados y control) de planta huésped (*C. annuum* y *Hordeum vulgare*, respectivamente) colocados en la misma placa (elección). A partir de estos datos se calculó el porcentaje de inhibición del asentamiento (% SI) (Burgueño-Tapia *et al.* 2008. *J. Chem. Ecol.* 34, 766-771).

25

La significación de los porcentajes de inhibición de la alimentación (%FI) y del asentamiento (%SI) se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica de rangos con signos de Wilcoxon.

- 5 Los extractos etanólicos crudos y sus fracciones obtenidas según los ejemplos 2 y 4 se ensayaron a una dosis inicial de 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y los compuestos bioactivos puros a 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Algunos extractos crudos etanólicos, fracciones y/o compuestos bioactivos puros que mostraron un efecto antialimentario significativo (%FI/%SI>70), se sometieron a experimentos de dosis-respuesta para calcular sus dosis efectivas ( $\text{EC}_{50}$  = dosis para la cual se produce un 50% de inhibición de la alimentación) mediante un análisis de regresión lineal.

#### **Cría y mantenimiento de los insectos diana**

- Las larvas de *S. littoralis* se alimentaron con una dieta semisintética (Poitut y Bues, 1970. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 2, 79-91) mientras que *L. decemlineata*, *M. persicae* y *R. padi* se mantuvieron alimentándose sobre sus plantas huésped (*Solanum tuberosum* L., *Capsicum annuum* L. y *Hordeum vulgare* L., respectivamente) (Reina *et al.* 2001. *J. Nat. Prod.* 64, 6-11). Todas las poblaciones de insectos se mantuvieron en cámaras climatizadas en las siguientes condiciones ambientales:  $22 \pm 1$  °C, 60-70 % de humedad relativa y un fotoperiodo de 16:8 horas (luz:oscuridad).

#### **Ejemplo 5. Actividad bioinsecticida del extracto etanólico en ensayos de elección**

- Los extractos etanólicos crudos de especies del género *Crocus* L. obtenidos según el ejemplo 2, registraron diferentes niveles de actividad bioinsecticida en insectos fitófagos chupadores y masticadores, medidos a través de la actividad antialimentaria, en dependencia del insecto, la especie y de la parte de la planta empleada (ver tabla 6).

Tabla 6. Actividad antialimentaria de los extractos crudos etanólicos de hojas (EH), tepalos (ET) y cormos (EC) de especies del género *Crocus* L. frente a *L. decemlineata*, *S. littoralis*, *M. persicae* y *R. padi* (100µg/cm<sup>2</sup>)

Especie	Material vegetal	%FI <sup>a</sup>		%SI <sup>b</sup>	
		<i>L. decemlineata</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>
<i>C. chrysanthus</i>	EC	83.3±10.2*	39.7±17.8	98.1±1.3*	95.8±2.6*
	EH	96.8±0.8*	59.5±24.3	n.e.	n.e.
<i>C. cancellatus</i>	EC	89.0±5.7*	83.6±3.6*	100±0.0*	100±0.0*
<i>C. ancyrensis</i>	EC	90.4±7.5*	0.00±0.0	98.6±1.4*	92.1±3.6*
	EH	99.6±0.2*	30.2±18.8	n.e.	n.e.
<i>C. serotinus</i>	EC	98.5±1.5*	53.7±15.0	n.e.	n.e.
	EH	81.1±10.1*	75.9±12.8*	n.e.	n.e.
<i>C. serotinus</i> ssp. <i>salzmanii</i>	EC	98.4±0.9*	47.0 ± 14.7	53.5 ± 7.5	n.e.
	EH	91.9±5.5*	39.3±23.8	n.e.	n.e.
<i>C. versicolor</i>	EH	80.8±12.9*	72.1±9.4*	n.e.	n.e.
<i>C. vernus</i> "geel yellow"	ET	27.9±14.9	75.9±8.7*	47.0±10.4	42.1±9.2
<i>C. vernus</i> "flower record"	EH	87.4±10.4*	68.6±8.8*	n.e.	n.e.
	ET	37.9±13.4	87.4±4.8*	50.8±9.5	24.7±7.4
<i>C. vernus</i> "jeanne d'arc"	ET	21.5±13.6	45.8±13.1	70.0±7.0*	25.9±7.3
<i>C. carpetanus</i>	EH	71.9±13.1*	84.8±7.4*	n.e.	n.e.
<i>C. nevadensis</i>	EC	99.6±0.4*	0.0±0.0	n.e.	n.e.
<i>C. speciosus</i>	EH	83.1±16.5*	0.0±0.0	n.e.	n.e.
<i>C. speciosus</i> "albus"	EC	88.3 ± 7.6*	0.0 ± 0.0	67.08 ± 8.0	n.e.
<i>C. speciosus</i> "Aitchinsonii"	EC	62.0±10.9	76.1±13.7*	51.1±8.7	n.e.
	EH	83.1±15.8*	46.0±20.3	21.7±7.2	n.e.
<i>C. angustifolius</i>	EH	82.3±17.4*	80.2±13.9*	n.e.	n.e.
<i>C. dalmaticus</i>	EH	86.9±12.2*	10.6±7.6	n.e.	n.e.
<i>C. pulchellus</i>	EH	n.e.	51.0±21.1	86.2±4.6*	
	EC	39.6 ± 24.2	20.5 ± 12.5	83.5 ± 6.9*	n.e.
<i>C. corsicus</i>	EH	82.86±9.7*	41.1±23.4	n.e.	n.e.
<i>C. kotschyanus</i>	EH	89.3±7.3*	54.9±22.5	n.e.	n.e.

<i>C. kotschyanus</i> "albus"	EC	92.8 ± 2.4*	88.5 ± 5.7*	57.2 ± 8.9	n.e
<i>C. cartwrightianus</i>	EH	89.8±15.2*	n.e.	n.e.	n.e.
<i>C. laevigatus</i> "fontenayi"	EC	91.7 ± 2.7*	2.5 ± 2.0	66.6 ± 8.3	n.e
<i>C. ligusticus</i>	EH	94.6±5.2*	n.e.	n.e.	n.e.
<i>C. sativus</i>	EH	95.1 ± 2.1*	61.2 ± 10.4	87.1 ± 3.4*	51.7 ± 8.9
	ET	78.5 ± 9.4*	81.4 ± 8.4*	38.3 ± 9.1	30.7 ± 8.3
	EC	79.2 ± 8.7*	84.4 ± 9.7*	84.9 ± 5.2*	75.2 ± 4.8*

<sup>a</sup> % FI = [1 - (T/C)] x 100, donde T y C se refiere a las áreas consumidas en los discos tratados y control respectivamente por insectos masticadores; <sup>b</sup> % SI=1 - (%T/%C) x 100, donde T y C se refiere al % de insectos chupadores asentados en la superficie tratada y control respectivamente ; \* p<0.05, prueba no paramétrica de rangos con signos de Wilcoxon; n.e.= No ensayado

La tabla 7 recoge las dosis efectivas para extractos crudos etanólicos de *C. sativus* en insectos chupadores y masticadores.

10 Tabla 7. Dosis efectivas de inhibición de la alimentación (FI) y del asentamiento (SI) de los extractos crudos etanólicos de *C. sativus* de los resultados del ejemplo 5

Material vegetal	FI [EC <sub>50</sub> (µg/cm <sup>2</sup> )]		SI [EC <sub>50</sub> (µg/cm <sup>2</sup> )]	
	<i>L. decemlineata</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>
Hojas	4.4 (2.1-9.5)	> 50	14.2 (8.6-22.2)	> 50
Tépalos	7.9 (2.1-20.9)	10.7 (3.4-21.1)	> 50	> 50
Cormos	24.2 (8.6-54.6)	2.3 (0.7-7.5)	19.4 (12.2-30.0)	n.c

<sup>a</sup> Dosis efectiva de inhibición de la alimentación, 95% límite de confianza inferior y superior

**Ejemplo 6. Actividad bioinsecticida de distintas fracciones obtenidas a partir del extracto crudo etanólico de corno de *C. sativus* en ensayos de elección**

Las fracciones obtenidas a partir del extracto crudo de corno de *C. sativus* obtenidas según el ejemplo 4 presentaron diferente actividad bioinsecticida con neópteros chupadores o masticadores (ver tabla 8). Las fracciones 3 y 10 tuvieron un efecto significativo en la inhibición de la alimentación de *L. decemlineata* (%FI>85%) con un máximo de actividad en las fracciones 3 y 10. Las fracciones 2, 3, 5 mostraron una reducción significativa del asentamiento de *M. persicae* (%SI>75%), mientras que sólo la fracción 10 resultó activa frente a *S. littoralis*.

10

Tabla 8. Actividad antialimentaria de 10 fracciones obtenidas de la VLC-1 del extracto crudo etanólico de cormos de *C. sativus* frente a insectos plaga (100µg/cm<sup>2</sup>)

Fracciones (rendimiento)	%FI <sup>a</sup>		%SI <sup>b</sup>
	<i>L. decemlineata</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>M. persicae</i>
1 (0.13%)	44.5±11.6	10.8±10.5	66.4±12.1*
2 (0.90%)	59.7±13.0	51.2±12.5	78.1±5.1*
3 (0.81%)	100.0±0.0*	n.e.	92.9±2.3*
4 (2.73%)	93.6±3.3*	30.9±10.2	67.9±8.5*
5 (3.52%)	86.8±8.4*	15.2±6.3	85.5±3.8*
6 (15.1%)	91.9±2.6*	19.9±13.1	64.7±6.4*
7 (6.17%)	94.1±5.9*	26.3±18.9	54.3±7.4
8 (8.34%)	88.7±3.2*	45.5±21.8	46.1±11.7
9 (11.89%)	88.7±4.7*	45.2±12.5	33.8±7.1
10 (48%)	97.2±1.2*	94.1±3.4*	38.8±8.6

Elución de las fracciones (polaridad del disolvente): Fr.1 (100% hexano), Fr.2 (90:10, hexano:AcOEt), Fr.3 (75:25, hexano:AcOEt), Frs.4-5 (50:50, hexano:AcOEt), Fr.6 (100% AcOEt), Fr.7 (98:2, AcOEt:MeOH), Frs.8-10 (50:50, AcOEt:MeOH)

<sup>a</sup> % FI = [1 - (T/C)] x 100, donde T y C se refiere a las áreas consumidas en los discos tratados y control respectivamente por insectos masticadores; <sup>b</sup> % SI=1 - (%T/%C) x 100, donde T y C se refiere al % de insectos chupadores asentados en la superficie tratada y control respectivamente ; \* p<0.05, prueba no paramétrica de rangos con signos de Wilcoxon; n.e.= No ensayado

15

**Ejemplo 7. Actividad bioinsecticida de distintas subfracciones obtenidas a partir del extracto crudo etanólico de corno de *C. sativus* en ensayos de elección**

La fracciones 3A y 3B mostraron una actividad muy significativa frente a *L. decemlineata* y esta última también inhibió significativamente el asentamiento de *M. persicae* (ver tabla 9).

5

Tabla 9. Actividad antialimentaria y composición (GC-MS) de las fracciones bioactivas obtenidas a partir del fraccionamiento de la fracción 3 frente a insectos plaga (100µg/cm<sup>2</sup>)

Fracciones	Identificación tentativa	EC <sub>50</sub> (µg/cm <sup>2</sup> )		%SI <sup>a</sup>
		<i>L. decemlineata</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>M. persicae</i>
3A	α-amirenona, lupenona, friedelin	1.6 (0.2, 14.8)	> 100	n.e.
3B	Esterol (C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O, MW 259)	0.05 (0.0, 5.5)	~ 100	72.0±9.9*
3C	β-amirina, estigmastenona, lupeol	32.5 ( 15.9, 54.5)	~ 100	n.e.

<sup>a</sup> %SI=1 - (%T/%C) x 100, donde T y C se refiere al % áfidos asentados en la superficie tratada y control respectivamente; EC<sub>50</sub> = Dosis efectiva a la que se produce el 50% de la inhibición de la alimentación (95% límites de confianza inferior y superior); \* p<0.05, prueba no paramétrica de rangos con signos de Wilcoxon; n.e. = no ensayado

10

**Ejemplo 8. Actividad bioinsecticida de los compuestos bioactivos identificados a partir del extracto crudo etanólico de corno de *C. sativus* en ensayos de elección**

En la tabla 10 se muestra la actividad antialimentaria de los compuestos aislados frente a las diferentes dianas biológicas. El compuesto mayoritario fue el kinsenósido e inhibió significativamente la alimentación de *S. littoralis* y *L. decemlineata* como lo demuestran las bajas dosis efectivas (EC<sub>50</sub>). La presencia de este compuesto en grandes cantidades en el corno de azafrán, explica la fuerte actividad del extracto original (ver tabla 6) y de la fracción de partida (Fr. 10, VLC, ver tabla 8) frente al lepidóptero polífago *S. littoralis*. El compuesto (R)-3-hidroxiбутanolida fue activo solo frente a *L. decemlineata*, mientras que el compuesto Etil 3-(R)-3-β -D-glucopiranosiloxibutanoato inhibió el asentamiento de *M. persicae*.

20

Tabla 10. Inhibición del asentamiento (%SI) y dosis efectivas (EC<sub>50</sub>, 95% límites inferior y superior) de los compuestos A, B y C frente a *L. decemlineata*, *S. littoralis* y *M. persicae*

25



Compuesto	EC <sub>50</sub> (µg/cm <sup>2</sup> )		%SI (50µg/cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>
	<i>L. decemlineata</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>M. persicae</i>
Kinsenósido (A)	3.58 (1.2, 9.9)	0.32 (0.07, 1.33)	49.9±5.9
Aglicón del kinsenósido (B)	2.31 (0.5, 11.0)	~ 100	51.1±7.9
Etil 3-(R)-3-β -D- glucopiranosiloxibutan oato (C)	~ 50	> 50	72.3±8.1*

<sup>a</sup> %SI=1 - (%T/%C) x 100, donde T y C se refiere al % áfidos asentados en la superficie tratada y control respectivamente; EC<sub>50</sub> = Dosis efectiva a la que se produce el 50% de la inhibición de la alimentación (95% límites de confianza inferior y superior); \* p<0.05, prueba

5 no paramétrica de rangos con signos de Wilcoxon

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Extracto alcohólico de material vegetal del género *Crocus* L. con actividad bioinsecticida que comprende 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(3*R*)-hidroxibutanolida.
- 5
- 2.- Extracto alcohólico según la reivindicación 1, caracterizado por que el material vegetal del género *Crocus* L. se selecciona de entre cormos, hojas y tépalos.
- 3.- Extracto alcohólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que es la parte soluble del extracto.
- 10
- 4.- Extracto alcohólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el material vegetal es corno de *Crocus sativus* y por que comprende al menos otro compuesto bioactivo con actividad bioinsecticida que se selecciona de entre (R)-3-hidroxibutanolida y etil 3-(*R*)-3- $\beta$ -D-glucopiranosiloxibutanoato.
- 15
- 5.- Extracto alcohólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que comprende al menos otro compuesto bioactivo que se selecciona de entre  $\alpha$ -amirenona, lupenona, friedelín,  $\beta$ -amirina, estigmastenona y lupeol.
- 20
- 6.- Extracto alcohólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que es un extracto etanólico.
- 7.- Procedimiento de obtención del extracto alcohólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que comprende realizar una extracción alcohólica partiendo de material vegetal del género *Crocus* L.
- 25
- 8.- Procedimiento de obtención según la reivindicación 7, caracterizado por que la extracción alcohólica se lleva a cabo con etanol.
- 30
- 9.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, caracterizado por que adicionalmente comprende un filtrado para obtener la fracción soluble.
- 10.- Composición fitosanitaria que comprende al extracto alcohólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 35

- 11.- Uso del extracto alcohólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o de la composición fitosanitaria según la reivindicación 10 para el control de insectos-plaga herbívoros.
- 5 12.- Uso de al menos uno de los compuestos identificados en el extracto alcohólico según la reivindicación 4 y que se seleccionan de entre 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(3*R*)-hidroxibutanolida, (R)-3-hidroxibutanolida y etil 3-(*R*)-3- $\beta$ -D-glucopiranosiloxibutanoato, para el control de insectos-plaga herbívoros.
- 10 13.- Método de tratamiento fitosanitario para el control de insectos-plaga, caracterizado por que comprende administrar una dosis fitosanitariamente eficaz del extracto alcohólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y/o de la composición fitosanitaria según la reivindicación 10 y/o de al menos uno de los compuestos según la reivindicación 12.

15

FIG 1

