

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 405 210**

21 Número de solicitud: 201390029

51 Int. Cl.:

A01N 65/12 (2009.01)**A01P 7/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.09.2011

30 Prioridad:

16.09.2010 ES ES201031389

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.05.2013

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2011/070641

71 Solicitantes:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGIA
AGROALIMENTARIA DE ARAGON (33.3%)
Avda. Montañana, 930
50058 ZARAGOZA ES;
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (33.3%) y
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ COLOMA, Azucena;
BURILLO ALQUÉZAR, Jesús;
URIETA NAVARRO, José Santiago;
SANZ PERUCHA, Jesús;
DÍAZ HERNÁNDEZ, Carmen Elisa;
FRAGA GONZÁLEZ, Manuel;
REINA ARTILES, Matias;
CABRERA PÉREZ, Raimundo;
MARTÍNEZ DÍAZ, Rafael y
MAINAR FERNÁNDEZ, Ana María**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier54 Título: **PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE DERIVADOS BIOINSECTICIDAS DE LA PLANTA
ARTEMISIA ABSINTHIUM L.**

57 Resumen:

Procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta Artemisia absinthium L., caracterizado por unos parámetros agronómicos y económicos de producción orgánica de la planta con un quimiotipo específico con el fin de producir extractos orgánicos consistentes en aceite esencial y extracto no volátil, y en otra fase extractos supercríticos de composición química caracterizada, obtenidos con CO₂ a presión como disolvente mayoritario, siendo las principales aplicaciones industriales de los extractos y aceites así extraídos su uso como materia base para formulaciones de insecticidas naturales, de especial aplicación en agricultura ecológica para el control de insectos plaga, especialmente áfidos y lepidópteros, así como su uso como ingrediente para formulaciones mixtas, en combinaciones sinergistas junto con otros componentes activos naturales.

ES 2 405 210 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE DERIVADOS BIOINSECTICIDAS DE LA PLANTA**Artemisia absinthium L.**

La presente memoria descriptiva se refiere, como su título indica, a un procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium L.*, comúnmente conocida como Ajenjo, caracterizado por unos parámetros agronómicos y económicos de producción orgánica de la planta con un quimiotipo específico con el fin de producir extractos orgánicos consistentes en aceite esencial y extracto no volátil, y en otra fase extractos supercríticos de composición química caracterizada, obtenidos con CO₂ a presión como disolvente mayoritario, siendo las principales aplicaciones industriales de los extractos y aceites así extraídos su uso como materia base para formulaciones de insecticidas naturales, de especial aplicación en agricultura ecológica para el control de insectos plaga, especialmente áfidos y lepidópteros, así como su uso como ingrediente para formulaciones mixtas, en combinaciones sinergistas junto con otros componentes activos naturales.

La *Artemisia absinthium L.*, denominada comúnmente "ajenjo", es una planta herbácea medicinal de la familia de las asteráceas. Cada año produce desde su base rama rectas, de 0.50 a 1.20 m de altura, que se secan en otoño tras la fructificación. Las partes basales de estas ramas permanecen durante el invierno y en la estación siguiente se producen nuevas ramas a partir de sus yemas. Toda la planta tiene una coloración blanquecina, debido a su abundancia de pelos que cubren prácticamente toda la superficie de tallo y hojas. Su área de distribución abarca principalmente desde Asia Central hasta Europa Occidental, con algunas localidades en el Norte de África. Ha sido una planta muy cultivada por su carácter aromático, especialmente en los Estados Unidos, la antigua URSS y Francia. La planta se recolecta cuando está en plena floración, entre julio y agosto. El primer año la recolección es escasa, pero en los años sucesivos es posible hacer dos recolecciones, en julio y a finales de octubre, si las condiciones meteorológicas lo permiten.

Aunque la forma más común de obtener el ajenjo que se comercializa son los cultivos, en muchos lugares se recogen poblaciones silvestres de esta planta, obteniéndose así un producto heterogéneo en calidad y rendimiento. También se han desarrollado métodos de micropropagación de ajenjo para producir plantas con el fin de obtener metabolitos secundarios.

Esta planta era conocida desde muy antiguo ya por los egipcios y transmitida después a los

griegos gracias a sus múltiples aplicaciones curativas como tónico, febrífugo y antihelmíntico. Además de por sus virtudes medicinales, el ajeno ha sido utilizado tradicionalmente como aromatizante, empleándose su principio activo absintina (sustancia amarga) en la preparación de bebidas comerciales como por ejemplo el vermouth. El aceite esencial de ajeno y el alcohol
5 constituyen los ingredientes básicos de la absenta, bebida que fue prohibida en algunos países a principios del siglo XX por su toxicidad. Los efectos neurotóxicos y alucinógenos, así como su nefrotoxicidad son atribuidos a la tuyona, una monoterpenocetona presente en su aceite esencial.

El ajeno ha sido asimismo empleado desde tiempos remotos para el tratamiento de trastornos
10 digestivos ya que estimula el apetito, previene la formación de gases en el tubo digestivo, estimula la secreción de jugos gástricos y de bilis tanto por la vesícula biliar como por el hígado y protege frente a dolencias hepáticas. Asimismo presenta propiedades antipiréticas, antioxidantes y antiinflamatorias. También se ha utilizado como antídoto para el opio y otros venenos depresores del sistema nervioso central. También se le conocen aplicaciones en
15 perfumes, como por ejemplo encontramos en la Patente inglesa GB0105589 "*Composiciones de perfume*", o como elementos para su uso en medicinas alternativas, como por ejemplo se describe en la patente española ES2076896 "*Procedimiento para producir moxas*"

Asimismo son conocidas tradicionalmente, y frecuentemente utilizadas, sus propiedades insecticidas y repelentes en la lucha contra las plagas, especialmente pulgones, ácaros,
20 cochinillas, hormigas, orugas, y otros insectos pulverizando su extracto sobre las plantas afectadas. También repele la mariposa de la col, ácaros, roya, caracoles y babosas si se pulveriza preventivamente. La aplicación tradicional del ajeno ha sido realizada hasta ahora por métodos tradicionales como la maceración de la planta, decocción, infusión o mediante purín fermentado. Estos métodos, aparte de que su utilización dosificación y efectividad está
25 basada casi siempre en la tradición y en la experiencia, presentan el inconveniente de que no permiten un completo aprovechamiento de toda la capacidad bioinsecticida de la planta, además de no ser aprovechables industrialmente, ya que no es predecible ni el aprovechamiento, ni la concentración ni la efectividad de las soluciones utilizadas.

Aunque los plaguicidas naturales se han utilizado durante cientos de años para proteger
30 los cultivos, estos han sido reemplazados casi totalmente durante los últimos años por compuestos de síntesis más eficaces. Sin embargo, el aumento de los problemas asociados a resistencias cruzadas, riesgos para la salud pública y daños al medioambiente, han promovido la búsqueda de productos naturales con propiedades plaguicidas. Además estos productos naturales pueden presentar nuevos modos de acción que reducen el riesgo de resistencias

cruzadas. Son conocidos y utilizados muchos insecticidas orgánicos, como por ejemplo los descritos en la Patente alemana DE9200220 "*Procedimiento para la elaboración de un insecticida almacenable rico en Azadirachtin a partir de semillas de Neem*", y en las Patentes españolas ES8802602 "*Procedimiento de preparar ingrediente activo para insecticidas*" y
5 ES0262168 "*Un método para producir una nueva composición insecticida*", derivados de distintos productos naturales distintos del ajeno.

A pesar de ello, se necesita encontrar insecticidas todavía más selectivos y biodegradables para reemplazar a los plaguicidas de síntesis que persisten en el medio ambiente y poseen un amplio espectro de toxicidad. Ello es especialmente relevante ya que la
10 producción orgánica mediante agricultura ecológica es un mercado emergente, para el que existe una demanda cada vez mayor de agroquímicos naturales.

Para solventar esa necesidad se ha ideado el procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium L.* objeto de la presente invención, el cual consigue un aprovechamiento óptimo de los extractos de dicha planta, con resultados
15 reproducibles y aplicables industrialmente. Para ello, se han establecido los parámetros agronómicos y económicos de producción orgánica de la planta del ajeno (*Artemisia absinthium L.*) con un quimiotipo específico en parcelas experimentales con el fin de producir extractos orgánicos consistentes en aceite esencial y extracto no volátil, y en otra fase de extracción, extractos supercríticos de composición química caracterizada, obtenidos con CO₂ a
20 presión como disolvente mayoritario, con efectos repelentes experimentalmente demostrados frente a larvas de lepidópteros, por ejemplo de la especie *Spodoptera littoralis*, y pulgones además de tener efectos sobre el desarrollo radicular de cebada *Hordeum vulgare*.

Las principales aplicaciones industriales de los extractos y aceites así extraídos consisten en su uso como materia base para formulaciones de insecticidas naturales, de especial aplicación
25 en agricultura ecológica para el control de insectos plaga, especialmente áfidos y lepidópteros, así como su uso como ingrediente para formulaciones mixtas, en combinaciones sinergistas junto con otros componentes activos naturales.

Este procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium L.* que se presenta aporta múltiples ventajas sobre los disponibles en la actualidad
30 siendo la más importante que especifica una metodología de producción mediante el cultivo en campo de un quimiotipo seleccionado y mediante una extracción controlada de la materia prima, propiciando una producción controlada, predecible e industrializable.

Asimismo debemos destacar la ventaja de control en origen que implica la estandarización

química y biológica.

Es importante destacar que este procedimiento de extracción genera unos productos con ausencia de tuyonas tóxicas en el aceite esencial.

5 Otra importante ventaja es que la producción de extracto supercrítico con CO₂ a presión como disolvente mayoritario, permite optimizar el rendimiento del proceso de extracción, propiciando su aplicación industrial y su rentabilidad económica.

Para comprender mejor el objeto de la presente invención, en la figura -1- se ha representado el procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium L.* En dicha figura -1- se muestra un diagrama de bloques simplificado de las fases diferenciadas que componen el procedimiento: fase de producción (1), fase de extracción de extractos orgánicos (2), y fase de extracción (4) con CO₂ (22) a presión como disolvente principal, obteniendo como resultados por un lado aceite esencial y extracto no volátil (3), proveniente de la fase de extracción de extractos orgánicos (2), y por otro lado extractos supercríticos (5) provenientes de la fase de extracción (4).

15 La figura -2- muestra unas curvas del rendimiento de extractos supercríticos (5) obtenidos en la fase de extracción (4), representados en el eje vertical, en función de la cantidad de CO₂ (22) a presión como disolvente principal, representada en el eje horizontal, obtenidas experimentalmente en diversas condiciones de presión y temperatura:

20 •La curva (41) muestra los resultados obtenidos con una presión de 18.0 Mpa y una temperatura de 40°C,

•la curva (42) muestra los resultados obtenidos con una presión de 18.0 Mpa y una temperatura de 50°C,

•la curva (43) muestra los resultados obtenidos con una presión de 13.5 MPa y una temperatura de 40°C,

25 •la curva (44) muestra los resultados obtenidos con una presión de 13.5 MPa y una temperatura de 50°C,

•la curva (45) muestra los resultados obtenidos con una presión de 9.0 MPa y una temperatura de 40°C, y

30 •la curva (46) muestra los resultados obtenidos con una presión de 9.0 MPa y una temperatura de 50°C.

La figura -3- muestra una imagen obtenida en el microscopio electrónico de una hoja de ajeno a 2000x.

La figura -4- muestra una imagen obtenida en el microscopio electrónico de una hoja de ajeno a 400x.

5 La figura -5- una representación gráfica de los derivados obtenidos a partir de la planta.

La figura -6- muestra una representación simplificada de la estructura molecular de los principales compuestos terpénicos obtenidos en el aceite esencial de *Artemisia absinthium* L.

10 El procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium* L. objeto de la presente invención, comprende básicamente en su realización preferente, como puede apreciarse en la figura -1-, tres fases diferenciadas:

- fase de producción (1),
- fase de extracción de extractos orgánicos (2), obteniendo aceite esencial y extracto no volátil (3),
- 15 • fase de extracción (4) de extractos supercríticos (5), con CO₂ (22) a presión como disolvente principal.

La fase de producción (1) comprende el cultivo (6) en campo de un quimiotipo seleccionado por su adaptabilidad al cultivo y por su composición química mediante la multiplicación preferentemente realizada mediante esquejes o semillas en vivero-semillero (7) para su posterior plantación en el terreno de asiento. Este terreno de asiento estará preferentemente ubicado en zonas altas con pluviométrica superior a los 400-450 mm anuales y se trabajará mediante cultivo mecanizado. El cultivo entra en producción en el primer año de su plantación, recolectándose (8) las hojas y sumidades floridas cuando las plantas se encuentran en estadio fenológico de plena floración para posteriormente someterse a un proceso de secado (9) y posterior molido (10), obteniendo el material recolectado (11). El proceso de secado (9) se realiza preferentemente a la sombra, bajo corriente de aire y durante un periodo de 8 días aproximadamente.

La fase de extracción de extractos orgánicos (2) se realiza mediante hidrodestilación (12) y extracción orgánica (13) del material recolectado (11), obteniendo aceite esencial y extracto no

volátil (3).

La fase de obtención (4) de extractos supercríticos (5) con CO₂ (22) a presión como disolvente principal se realiza utilizando una bomba de compresión (47) con un filtro (48), un cilindro de extracción (15), dos colectores (16,17), un dispositivo de refrigeración (18) cilíndrico, un intercambiador de calor (19), un sensor de presión (20) y un medidor de flujo (21). Para ello el material recolectado (11) se introduce primeramente en el cilindro de extracción (15) y es embebido simétricamente con materiales porosos inertes que permiten un flujo homogéneo de CO₂ (22), a continuación se calienta hasta que se alcanza una temperatura de 40°C, para a continuación comprimir en la bomba (47) el CO₂ (22) hasta conseguir una presión de 90 bar, momento en el que el fluido supercrítico a la presión de trabajo llena el cilindro de extracción (15), regulándose en los dos colectores (16,17) la presión, mediante las oportunas válvulas, y la temperatura mediante el dispositivo de refrigeración (18), de tal forma que el primero de los colectores (16) sirve para eliminar compuestos pesados, como ceras, y el segundo colector (17) para la recogida del aceite esencial obtenido como extracto supercrítico (5). El valor medio de tamaño de partícula del material recolectado utilizado es preferentemente de 0.5 mm., y el flujo de gas a través del cilindro extractor (15) a 25° y 1 atm es preferentemente de 10,5 l/min.

Los extractos así obtenidos (3, 5), o sus combinaciones, está previsto que se utilicen como materia base para formulaciones de insecticidas naturales, o bien combinados con otros componentes activos naturales para formulaciones mixtas de tipo sinergista, principalmente para el control de insectos plaga, como por ejemplo áfidos ó lepidopteros en agricultura ecológica.

La efectividad de este procedimiento ha sido verificada experimentalmente. Para ello se han realizado numerosos estudios de poblaciones de ajeno para analizar la composición química del aceite esencial de *A. absinthium* L. En la mayoría de los casos los compuestos mayoritarios son α y β -tuyonas, sin embargo, también se han encontrado aceites de ajeno sin tuyonas, hecho que representa una ventaja en el uso de los extractos de ajeno en la industria alimentaria. En algunos casos los componentes mayoritarios encontrados son cis-epoxiocimeno, acetato de crisantenilo, acetato de sabinilo o una mezcla de ellos, dependiendo principalmente del origen de la planta. De acuerdo con sus componentes mayoritarios, las poblaciones de *A. absinthium* L. de la Península Ibérica se dividen en siete quimiotipos con composición química significativamente distinta. Además del origen, existen numerosos factores que pueden afectar a la composición del aceite esencial, como son las condiciones de crecimiento y el estado de desarrollo de la planta.

Se han utilizado cultivos con características agroclimáticas diferentes, junto con otras poblaciones distintas, se han estudiado química y biológicamente para conocer la evolución de los metabolitos y el potencial antiparasitario e insecticida de esta especie. Para ello se han realizado valoraciones anuales de los extractos y aceites esenciales de las poblaciones mediante cromatografía de gases masa (GC-MS) y ensayos de actividad biológica (insecticida, antiparasitaria y fitotóxica).

Se puede observar una importante variación, tanto en la composición cualitativa como cuantitativa, entre aceites de una misma población clónica cultivados en diferentes condiciones de luz y temperatura. Las condiciones no controladas en invernadero, se relacionan con un aceite más rico en monoterpenos oxigenados y con una menor cantidad de sesquiterpenos.

Del mismo modo, se han observado variaciones en la composición química del aceite esencial, provocadas por las condiciones de crecimiento, en un estudio comparativo realizado con plantas de *A. absinthium L.* cultivadas *in vitro*, en invernadero y en campos de cultivo. Se observó cómo la composición de las plantas cultivadas *in vitro* era totalmente diferente a las otras dos, con ausencia de monoterpenos y tuyonas y presencia de compuestos de mayor peso molecular, mientras que las plantas cultivadas en invernadero y en el campo presentaron tuyonas y monoterpenos en elevada proporción.

El aceite esencial suele consistir en una mezcla más o menos compleja de compuestos terpénicos, compuestos fenólicos de bajo peso molecular y compuestos que contienen nitrógeno o azufre. Todos estos compuestos están muy ampliamente distribuidos entre las plantas vasculares y se sintetizan durante el desarrollo normal de la planta y la composición química del aceite es generalmente característica de cada especie.

El interés del aceite esencial radica en la actividad de sus componentes, ya sea por su carácter aromático, por su toxicidad, como por su funcionalidad fisiológica. Los componentes mayoritarios del aceite esencial de las especies de *Artemisia*, como podemos ver en la Fig. 6, son fundamentalmente terpénicos, pertenecientes a diversos tipos estructurales, monoterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, ésteres, aldehídos, óxidos) y sesquiterpenos (hidrocarburos, óxidos y alcoholes).

El rendimiento del aceite esencial en *A. absinthium L.* se encuentra entre el 0.2-0.6% sobre el peso fresco del material vegetal, siendo la β -tuyona (23), uno de los compuestos con más relevancia, que puede aparecer en concentraciones superiores al 30%.

A pesar de que tradicionalmente se había descrito la β -tuyona (23) como compuesto

mayoritario del aceite esencial de ajenjo, han sido muchos autores los que a lo largo de los años han descrito plantas con bajo contenido en tuyonas o incluso sin ellas, describiéndose diferentes quimiotipos que contienen como compuesto mayoritario acetato de cis-crisantenilo (26), cis-crisantenol (27), cis-epoxiocimeno (24), acetato de sabinilo (25) o acetato de bornilo (31).

Otros compuestos terpénicos abundantes descritos en el aceite esencial son alcanfor (28) y cineol (29), siendo también frecuentes aunque en cantidades menores otros mono y sesquiterpenos como linalol (32), borneol (30), camazuleno (33), selineno (38), elemol (39), espatulenol (40).

- 10 La concentración de sesquiterpenos identificados en *A. absinthium L.* no suele superar el 10% del aceite esencial, siendo los más frecuentes el β -cariofileno (34), el germacreno-D (35), el óxido de cariofileno (36) y el α -bisabolol (37).

Otra familia de compuestos identificados en el aceite esencial de numerosas especies son los bencenoides derivados del ácido cinámico en la ruta del siquimato.

- 15 Así mismo, en varias especies del género *Artemisia* se han identificado pequeñas concentraciones de algunos compuestos de esta familia como eugenol, metil eugenol, elemicina y cinamato de etilo y metilo.

Los compuestos pertenecientes a las familias de los terpenos y de los bencenoides son los más frecuentes en el aceite esencial del ajenjo y son los responsables de su aroma.

- 20 Existe una alta variabilidad en la composición del aceite esencial de *A. absinthium L.*, que depende de muchos factores como las condiciones de crecimiento, el estado de desarrollo, el momento de la recolección así como la presencia de flores, frutos o raíces. Esta variabilidad intraespecífica detectada en la composición de los aceites es bastante superior a la que presentan otros metabolitos secundarios, por lo que se han utilizado para definir quimiotipos o razas químicas, que algunas veces pueden relacionarse con factores ecológicos o geográficos.

- 25 Se han realizado asimismo pruebas de la actividad biológica. La actividad antibacteriana y fungicida del aceite esencial de *A. absinthium L.* ya era ampliamente conocida. La tuyona (23), el alcanfor (28) y el cineol (29), que son componentes mayoritarios del aceite han demostrado tener actividades antifúngicas y antibacterianas, así como otros monoterpenos presentes en el aceite como borneol (30), α y β pineno, terpinenol, linanol (32).

Desde la antigüedad el ajenjo se ha utilizado contra parásitos intestinales. El extracto de las

hojas de *A. absinthium* L. presenta actividad antimalárica, así como dos homoditerpenos peróxidos que se han aislado de esta planta.

El aceite esencial tiene actividad acaricida frente a la araña roja e insecticida frente a gorgojos y mosca común . Además se ha utilizado como repelente de pulgas, moscas , mosquitos ,
5 polillas y garrapatas . Por otro lado, el extracto también ha resultado tener efectos tóxicos y antialimentarios frente al escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*).

Cabe destacar el papel ecológico que juega el aceite esencial en las relaciones bióticas con animales y plantas (herbivorismo, polinización, alelopatía). El cineol y el alcanfor, que son compuestos mayoritarios del aceite, están considerados entre los monoterpenos como las
10 toxinas más efectivas capaces de inhibir el crecimiento de plantas y la germinación de semillas.

Se han llevado a cabo distintos ensayos de actividad biológica para determinar la actividad antiparasitaria, antialimentaria, repelente, fungicida y fitotóxica de los aceites y extractos en las poblaciones y muestras estudiadas.

15 La actividad antiparasitaria de las poblaciones y muestras de ajeno se ensayó con protozoos *Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi*, así como también se realizaron ensayos para determinar la citotoxicidad inespecífica de las mismas sobre células de mamífero.

20 Los componentes mayoritarios de las muestras de aceite esencial ensayadas (tuyona, acetato de bornilo, crisantenol, cis-epoxiocimeno, 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol), así como de extractos (artemetina y casticina), no han sido descritos anteriormente como antiparasitarios frente a los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. En ensayos con *Trypanosoma brucei rhodesiense*, la flavona produce efectos sinérgicos aumentando la actividad tripanocida de
25 otras flavonas. Además potencia la actividad antiplasmódica de la artemisinina en *Artemisia annua*. Todos los compuestos han presentado actividad antimalárica *in vitro* con parásitos de *Plasmodium falciparum*. En nuestros ensayos, ninguna de las dos flavonas presentó efectos antiparasitarios con *L. infantum* y *T. cruzi*. Por tanto, los efectos antiparasitarios observados para los extractos, pueden ser efecto de la acción sinérgica entre las flavonas y otros
30 compuestos presentes en esas muestras.

Todos los extractos fueron citotóxicos, a una concentración de 1000 µg/ml, con una viabilidad celular que en ningún caso supera el 9%. Esto puede indicar que la toxicidad observada en los parásitos sea de tipo inespecífico. No se han descrito efectos citotóxicos de componentes mayoritarios de estas muestras con la excepción de la tuyona (con citotoxicidad frente a células Vero), la artemetina y la casticina, que presentan actividad frente a líneas celulares tumorales. Nuestros ensayos han demostrado la actividad citotóxica de estas dos flavonas frente a la línea celular CHO. Por tanto, el efecto citotóxico observado en los extractos puede ser debido a la presencia de estos compuestos, pero no explican la citotoxicidad de los aceites, y puede estar relacionada con la elevada concentración en la que han sido ensayados.

La elevada actividad antiparasitaria observada para todas las muestras ensayadas de *A. absinthium L.*, respaldan su uso como antiparasitarios.

Se realizaron asimismo ensayos sobre actividad antialimentaria y repelente de insectos con *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi L.* sobre los distintos extractos y aceites de las poblaciones de *A. absinthium L.* Los extractos obtenidos por fluidos supercríticos han resultado ser más activos que los extractos y aceites de las muestras de las que proceden. Esto nos indica que esta metodología es la más adecuada como método de extracción de en el caso de *A. absinthium L.*

Los monoterpenos son compuestos abundantes en la naturaleza que reúnen las características de bajo coste y baja toxicidad, necesarias para ser unos buenos candidatos en la búsqueda de nuevas drogas. Existen monoterpenos puros que han demostrado tener actividad antiparasitaria, e incluso muchos extractos de plantas y aceites esenciales ricos en monoterpenos han resultado activos frente a *Plasmodium* y *Leishmania*. Además, monoterpenoides como el espintanol, el piquerol A y el terpinen-4-ol, así como hidroperóxidos derivados del mentano presentan actividad tripanocida frente a *Trypanosoma cruzi*.

A su vez, los monoterpenos son los componentes mayoritarios de los aceites esenciales en plantas y suelen presentar efectos repelentes. El 1,8-cineol, componente mayoritario del aceite esencial de ajeno, es repelente y tóxico con la mayoría de los insectos, sin embargo, también presenta una actividad atrayente para algunos insectos, incluyendo las abejas. Presenta actividad acaricida, insecticida e inhibidora del asentamiento de áfidos con *Myzus persicae*. El linalol es un eficaz repelente frente a *Tyrophagus putrescentiae*, *Culex pipiens*, *Thrips tabaci* e incluso *Myzus persicae*. El α -terpineol y el mirceno también son repelentes y tóxicos frente a varias especies de ácaros. El α y β pineno producen efectos tóxicos sobre insectos. El epi- α -

selineno ha sido identificado en secreciones de glándulas de varias especies de termitas con funciones de defensa. Además, el compuesto 2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol presenta actividad frente a *Spodoptera littoralis*.

De la misma forma se han realizado estudios de actividad fungicida. Se han descrito las propiedades antifúngicas de numerosos aceites esenciales, así como de algunos de sus componentes mayoritarios. El β -cariofileno y el óxido de cariofileno presentan actividad fungistática frente a varias especies de *Fusarium*, α -terpineol y α -terpinen-4-ol presentan actividad fungicida frente a *Aspergillus flavus* y el p-cimeno ha sido descrito recientemente como antifúngico frente a *F. oxysporum*. También se han descrito las propiedades antifúngicas del aceite esencial de una población de *A. absinthium* L. procedente de Turquía sobre 34 especies de hongos entre los que se encuentran *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*.

También se ha estudiado la actividad fitotóxica germinativa. Los ensayos de actividad fitotóxica se realizaron con semillas de *Triticum aestivum* (trigo), *Hordeum vulgare* (cebada) y *Latuca sativa* (lechuga), en diversas muestras, seleccionadas en función de la cantidad disponible. Además se ha utilizado la juglona, compuesto de conocida actividad alelopática, como control positivo. En los ensayos de germinación con semillas de trigo se han podido observar efectos significativos en el caso de la juglona y del aceite esencial, con unos porcentajes de inhibición de la germinación de 95 y 49% respectivamente. Los efectos sobre la germinación a las 48 horas del ensayo no fueron significativos en ninguno de los casos. En relación a los experimentos llevados a cabo con semillas de cebada no se observó ningún efecto significativo en la germinación durante todo el ensayo.

REIVINDICACIONES

1 - Procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium* L. caracterizado porque comprende una fase de producción (1), una fase de
5 extracción de extractos orgánicos (2), obteniendo aceite esencial y extracto no volátil (3), y una fase de obtención (4) de extractos supercríticos (5) basada en la utilización de CO₂ (22) en condiciones supercríticas como disolvente principal.

2 - Procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium* L., según la anterior reivindicación, caracterizado porque la fase de
10 producción (1) comprende el cultivo (6) en campo de un quimiotipo seleccionado por su adaptabilidad al cultivo y por su composición química mediante la multiplicación mediante esquejes o semillas en vivero-semillero (7) para su posterior plantación en el terreno de asiento ubicado en zonas altas con pluviométrica superior a los 400-450 mm anuales y
15 cultivo mecanizado, entrando en producción en el primer año de su plantación, recolectándose (8) las hojas y sumidades floridas cuando las plantas se encuentran en estadio fenológico de plena floración para posteriormente someterse a un proceso de secado (9) y posterior molido (10), obteniendo el material recolectado (11).

20 3 - Procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium* L., según la reivindicación 2, caracterizado porque el proceso de secado (9) se realiza a la sombra, bajo corriente de aire y durante un periodo de 8 días.

4 - Procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium* L., según la reivindicación 1, caracterizado porque la fase de extracción (2) de
25 extractos orgánicos se realiza mediante hidrodestilación (12) y extracción orgánica (13) del material recolectado (11).

5 - Procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium* L., según la reivindicación 1, caracterizado porque la fase de extracción (4) de
30 extractos supercríticos (5) basada en la utilización de CO₂ (22) a presión, se realiza

utilizando una bomba de compresión (47) con un filtro (48), un cilindro de extracción (15), dos colectores (16,17), una dispositivo de refrigeración cilíndrica (18), un intercambiador de calor (19), un sensor de presión (20) y un medidor de flujo (21).

5 6 - Procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium* L., según la reivindicación 5, caracterizado porque la fase de extracción de extractos supercríticos utilizando CO₂ (22) a presión como disolvente principal comprende una primera etapa en la que el material recolectado (11) se introduce en el cilindro de extracción (15) y es embebido simétricamente con materiales porosos inertes que
10 permiten un flujo homogéneo de CO₂ (22), a continuación se calienta hasta que se alcanza una temperatura de 40°C, para a continuación comprimir la bomba (47) el CO₂ (22) hasta conseguir una presión de 90 bar, momento en el que el fluido supercrítico a la presión de trabajo llena el cilindro de extracción (15), regulándose en los dos colectores (16,17) la presión, mediante las oportunas válvulas, y la temperatura mediante el
15 dispositivo de refrigeración (18), de tal forma que el primero de los colectores (16) sirve para eliminar compuestos pesados, como ceras, y el segundo colector (17) para la recogida del aceite esencial obtenido como extracto supercrítico (5),

7 - Procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium* L., según las reivindicaciones 5 y 6, caracterizada porque el tamaño medio de
20 partícula del material recolectado utilizado en la fase de extracción de extractos supercríticos (5) con CO₂ (22) es de 0.5 mm.

8 - Procedimiento de extracción de derivados bioinsecticidas de la planta *Artemisia absinthium* L., según las reivindicaciones 5, 6 y 7, caracterizado porque el flujo de gas a
25 través del cilindro extractor (15) a 25° y 1 atm es preferentemente de 10,5 l/min.

9 - Uso de los extractos obtenidos según el procedimiento descrito en las anteriores reivindicaciones, o sus combinaciones, como materia base para formulaciones de
30 insecticidas naturales.

10 - Uso de los extractos obtenidos, según la reivindicación 9, en el que se combina con otros componentes activos naturales para formulaciones mixtas de tipo sinergista.

5 11 - Uso de los extractos obtenidos, según las reivindicaciones 9 y 10, en el que los insecticidas naturales se aplican para el control de insectos plaga en agricultura ecológica.

12 - Uso de los extractos obtenidos, según la reivindicación 11, en el que los insectos plaga son áfidos.

10

13 - Uso de los extractos obtenidos, según la reivindicación 11, en el que los insectos plaga son lepidópteros.

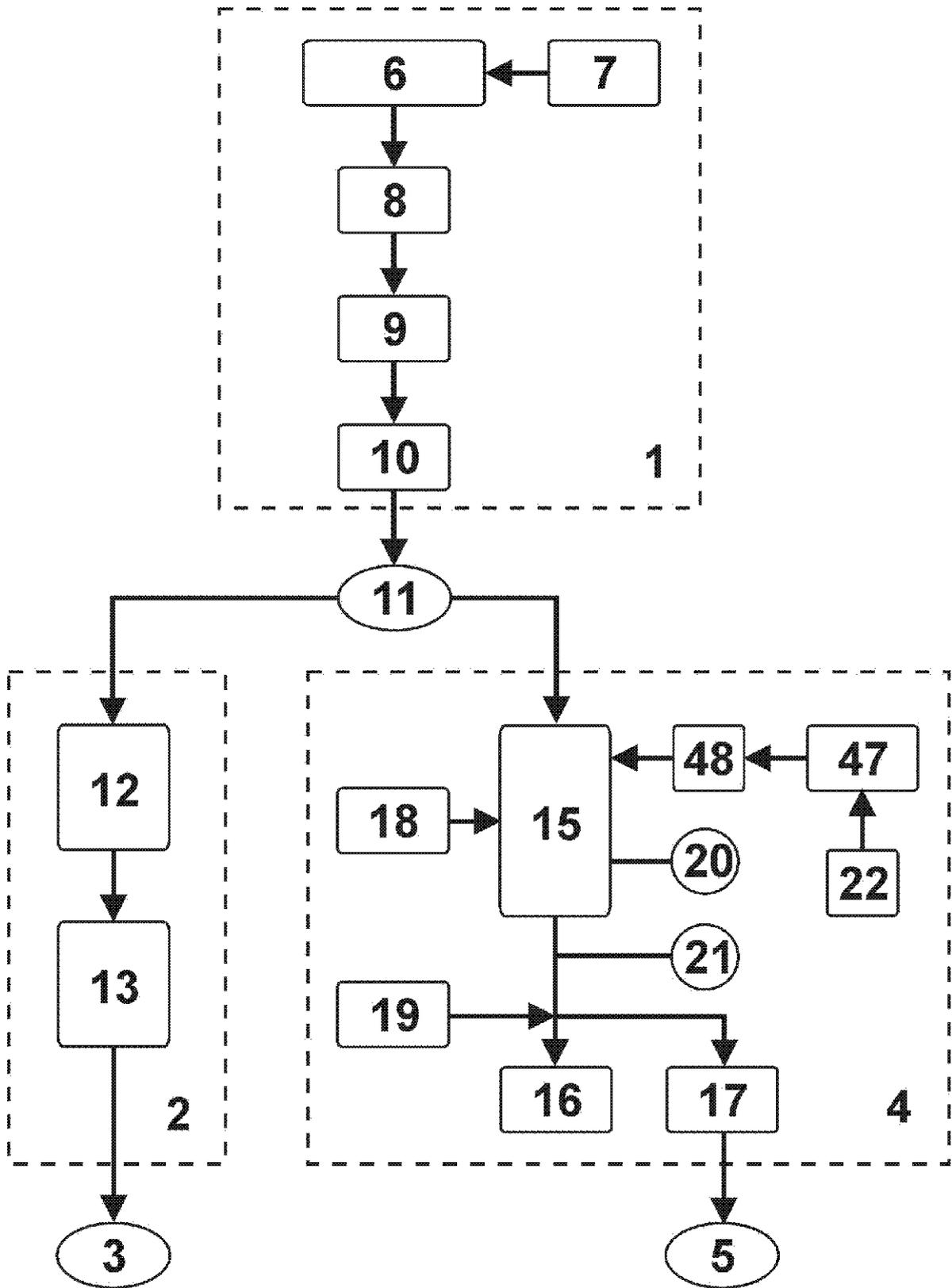


Fig. 1

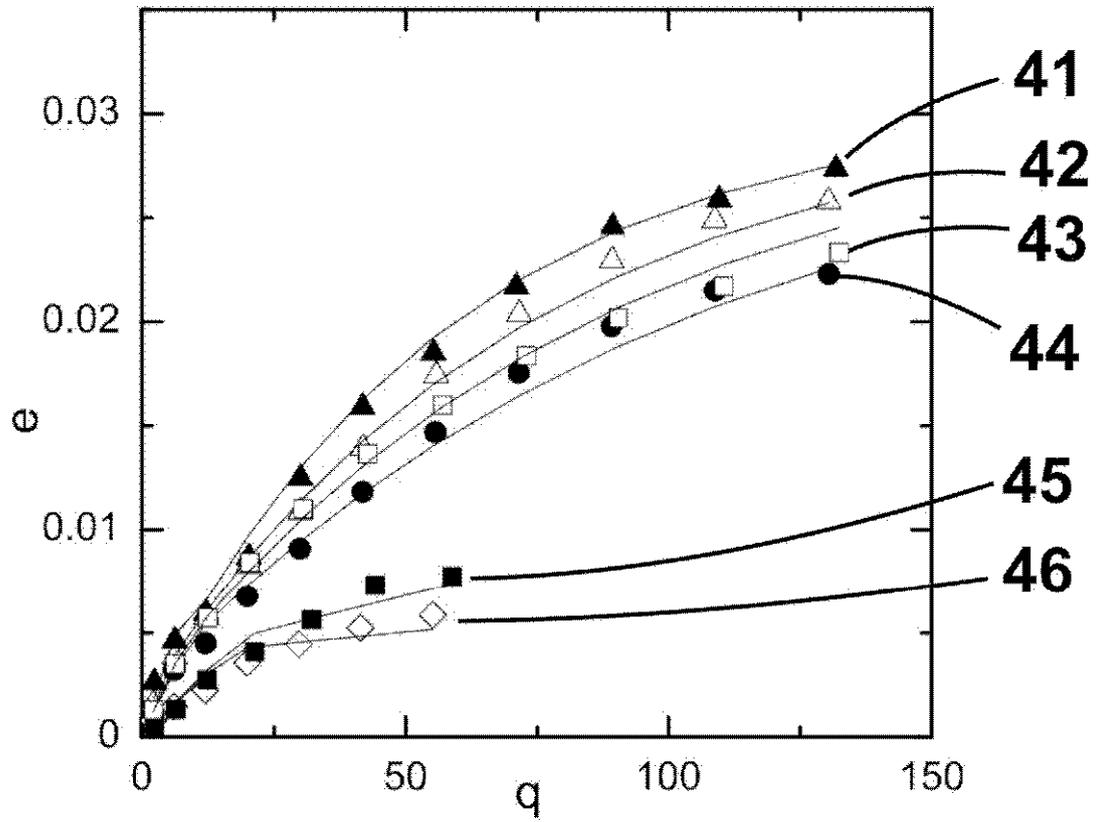


Fig. 2

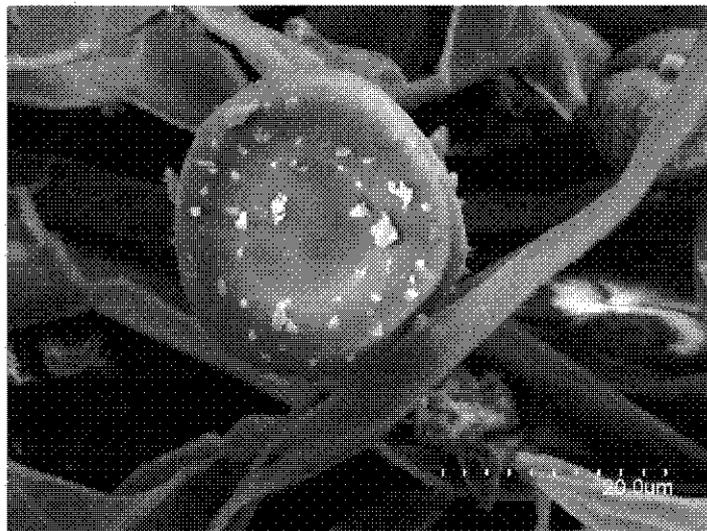


Fig. 3

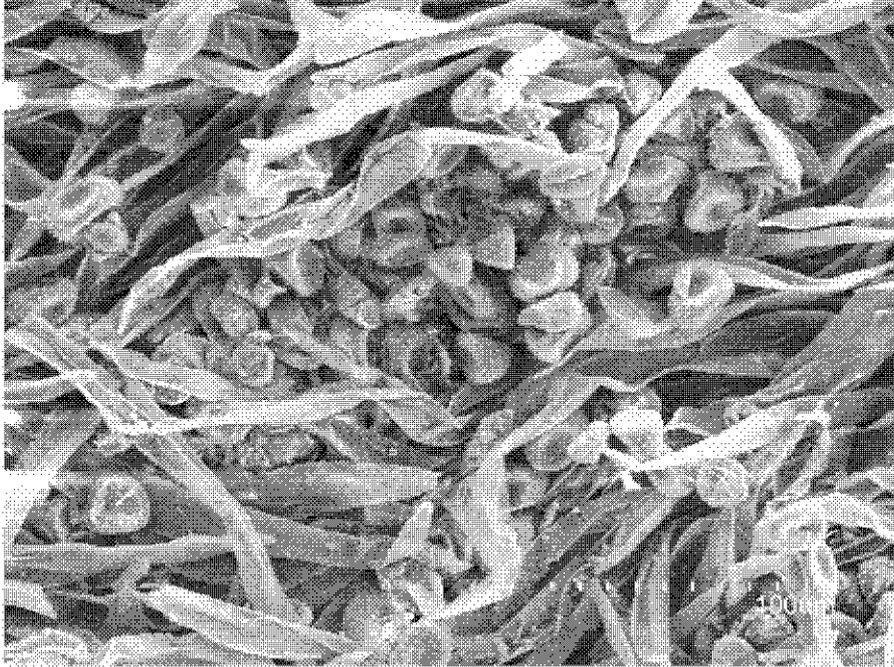


Fig. 4

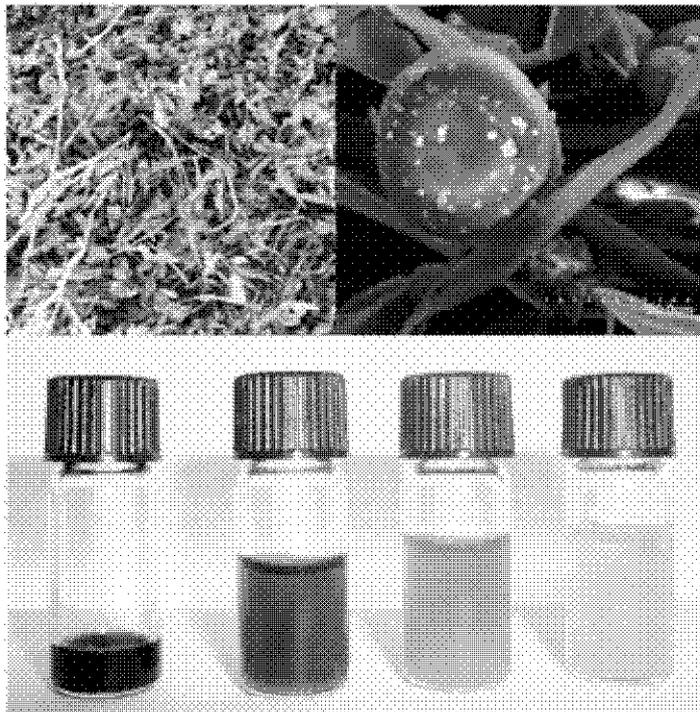
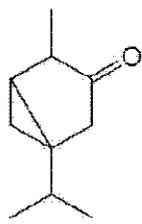
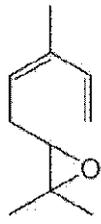


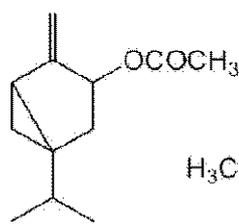
Fig. 5



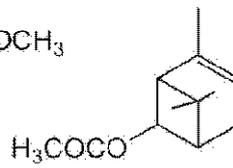
23



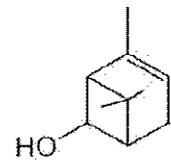
24



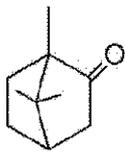
25



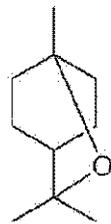
26



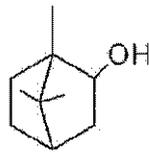
27



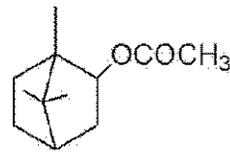
28



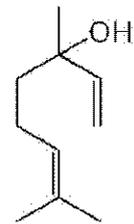
29



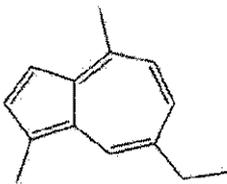
30



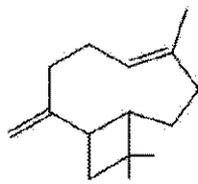
31



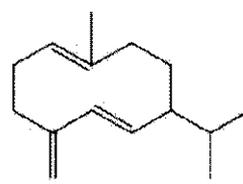
32



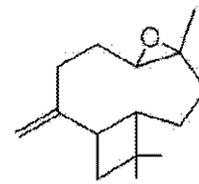
33



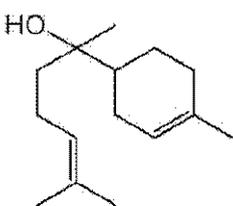
34



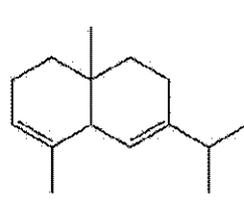
35



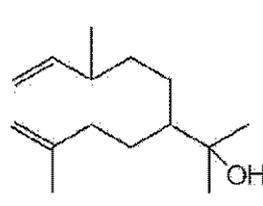
36



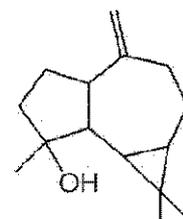
37



38



39



40

Fig. 6