

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 210**

21 Número de solicitud: 201530434

51 Int. Cl.:

**A01N 65/00** (2009.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**31.03.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**31.10.2016**

Fecha de concesión:

**04.09.2017**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**11.09.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2016/070219**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS (45.0%)  
C/ SERRANO 117  
28010 MADRID (Madrid) ES;  
UNIVERSIDAD DE GRANADA (15.0%) y  
CENTRO DE INVESTIGACION Y TECNOLOGIA  
AGROALIMENTARIA DE ARAGON (40.0%)**

72 Inventor/es:

**GONZALEZ COLOMA, Azucena;  
DIAZ HERNANDEZ, Carmen Elisa;  
ANDRES YEVES, M<sup>a</sup> Fe;  
JULIO TORRES, Luis Fernando;  
FERNANDEZ BARRERO, Alejandro;  
HERRADOR DEL PINO, M<sup>a</sup> Del Mar y  
BURILLO ALQUÉZAR, Jesús**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **PRODUCTO BIOCIDA EXTRAIDO DE MATERIAL VEGETAL DE Lavandula Luiseri,  
PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y USO DEL MISMO**

57 Resumen:

Producto biocida extraído de material vegetal de Lavándula luiseri. Procedimiento de obtención y uso del mismo.

La presente invención se refiere a un nuevo producto biocida obtenido a partir de material vegetal de la planta Lavándula luiseri que se caracteriza por comprender a un compuesto bioactivo de fórmula (I) y por presentar una importante actividad contra nematodos y/o malas hierbas, lo que lo convierte en una alternativa a los productos de síntesis para el tratamiento de factores bióticos que afectan al desarrollo de la vegetación. La invención también incluye el procedimiento de obtención y el uso del producto biocida, tanto directamente, como a través de una composición biocida que lo comprende.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 588 210 B1

## DESCRIPCIÓN

PRODUCTO BIOCIDA EXTRAIDO DE MATERIAL VEGETAL DE *Lavandula Luisieri*,

5 PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y USO DEL MISMO

## SECTOR DE LA INVENCION

10 La invención se sitúa dentro del campo de la agricultura, y más concretamente, en el sector de los biocidas que comprenden compuestos extraídos de plantas. Se propone un producto de extracción con actividad biocida que se aísla a partir de material vegetal de plantas de la especie *Lavandula luisieri* y que se caracteriza por comprender un nuevo compuesto de fórmula (I). La invención también tiene que ver con el procedimiento de obtención de dicho producto de extracción y con su uso para el control de factores bióticos perjudiciales para un cultivo, ya sea  
15 directamente o a través de una composición biocida que lo comprenda.

## ESTADO DE LA TECNICA

20 En los últimos años los tratamientos para el control de factores bióticos que afectan al correcto desarrollo de las especies vegetales se han basado en el uso de productos biocidas específicos obtenidos por síntesis química. Sin embargo, el coste de obtención de estos productos de síntesis, junto con los problemas medioambientales que su uso continuado han ocasionado, así como los problemas de resistencias, han propiciado un nuevo marco regulatorio que se materializa en la restricción del uso de estos productos químicos (ver por ejemplo el  
25 Reglamento europeo (CE) N° 1107/2009) que limita drásticamente el número de materias activas y la disponibilidad de los productos fitosanitarios destinados al control de dichos factores.

30 Resulta pues necesaria, la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos bioactivos alternativos a los de síntesis química, que sean eficaces y menos tóxicos para el medio ambiente. Una posible fuente para la obtención de estos nuevos compuestos son las plantas, ya que tal y como recoge el estado de la técnica, comprenden una muy amplia y variable cantidad de compuestos volátiles bioactivos (CPVs).

*Lavandula luisieri* (Rozeira) Riv.-Mart. (Rivas-Martínez. Lazaroa **1979**, 1, 110) es un pequeño arbusto aromático endémico de la Península Ibérica y común en las regiones semiáridas del sur de Portugal y el suroeste de España (Delgado *et al.* *Plant Genet. Re sour.* **2010**, 8, 82-90).

5 Pertenece a la sección Stoechas Ging. de la familia Lamiaceae (Rozeira. *Linn. Brot.* **1949**, 28, 1-84) que incluye *Lavandula stoechas* L., *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. y *Lavandula viridis* L'ella. (Upson y Andrews. Royal Botanic Gardens Kew (Ed.) *The Genus Lavandula*. Timber Press, Portland, Oregon, **2004**, 107-248). Esta planta es característica del sintaxón Cisto-Lavanduletae, una clase que incluye comunidades de matorrales de los pisos termo a supra  
10 Mediterráneos, semiáridos, secos y subhúmedos secundarios, que producen compuestos aromáticos (Rivas-Martínez *et al.* *Itinera Geobotanica* **2002**, 15, 5-432).

Se ha identificado una alta variabilidad inter-poblacional de CPVs presentes en aceites esenciales obtenidos a partir de material vegetal de *Lavandula luisieri* (ver por ejemplo Baldovini  
15 *et al.* *Phytochemistry* **2005**, 66, 1651-1655; González-Coloma *et al.* *Biochemical systematics and ecology* **2011**, 39, 1-8; o Zuzarte *et al.* *Food Chemistry* **2012**, 135, 1505-1510). Dicha variabilidad se relaciona con las diferencias genéticas entre poblaciones de la misma especie, variabilidad que es todavía más acusada cuando se comparan compuestos presentes en distintas especies.

20

En cuanto a la bioactividad de los CPVs presentes en aceites esenciales u otros extractos obtenidos a partir de material vegetal de *Lavandulas* se ha identificado:

25 -actividad antifúngica del aceite esencial de *Lavandula luisieri* (Zuzarte *et al.* *Food Chemistry* **2012**, 135, 1505-1510); y

30 -actividad fitotóxica de extractos de tallo, hojas y flores de varias especies de *Lavandula* en el crecimiento de la raíz de Ray-grass anual (*Lolium rigidum*, ARG), siendo especialmente destacable para el extracto de tallo y hojas de la especie *Lavandula intermedia* cv. *Grosso* con una inhibición del crecimiento de hasta el 94% (Haigh *et al.* *Journal of Chemical Ecology* **2009**, 35, 1129-1136); o de aceites esenciales de *Lavandula stoechas* y *Lavandula angustifolia* frente a *Amaranthus retro flexus* y *Portulaca oleracea* en el cultivo de tomate (Argypoulos *et al.* *Allelopathy Journal* **2008**, 22, 69-78).

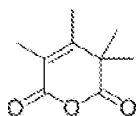
Por otra parte, no se han encontrado efectos significativos en cuanto a actividad nematocida al utilizar aceites esenciales de distintas especies del género *Lavandulula*, como por ejemplo *Lavandula officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula intermedia* o *Lavandula hybrida* contra el nematodo del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*) o nematodos formadores de nódulos de raíz (*Meloidogyne* spp.) ver Andrés *et al.* (*Phytochemistry Reviews* **2012**, 11, 371-390); ni tampoco al utilizar aceites esenciales y volátiles de diversas especies como por ejemplo, *Lavandula dentata*, *Lavandula luisieri*, *Lavandula stoechas* o *Lavandula viridiris* contra el nematodo de la madera del pino ver Barbosa *et al.* (*Journal of Nematology* **2010**, 42, 8-16).

10

### EXPLICACION DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona en un primer aspecto con un producto de extracción de material vegetal de la especie *Lavandula luisieri* con actividad biocida, caracterizado por que comprende al compuesto de fórmula (I):

15

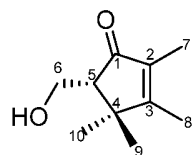


(I)

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

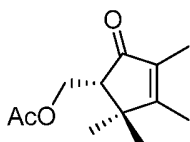
Adicionalmente, el producto de extracción puede comprender al menos otro compuesto que se elige de entre los siguientes:

20

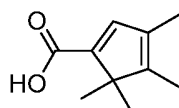


25

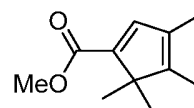
(II)



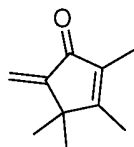
(III)



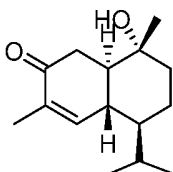
(IV)



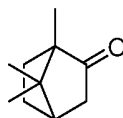
(V)



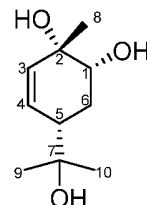
(VI)



(VII)

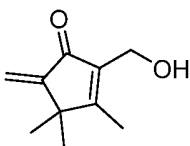


(VIII)



(IX)

5



(X)

o un isómero, una sal o un solvato de los mismos.

10

En realizaciones particulares, el producto de extracción se selecciona de entre un extracto hexánico (Hx), un aceite esencial (EO), un hidrolato (WR0), o una fracción orgánica (EO0) y un hidrolato (WRI) obtenidos a partir del hidrolato (WR0).

15 En otra realización particular el producto de extracción es el propio compuesto de fórmula general (I).

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con el procedimiento de obtención del producto de extracción que comprende una etapa de extracción de material vegetal de  
20 *Lavandula luiseri* con al menos un solvente hasta obtener un producto de extracción que comprenda al compuesto de fórmula (I) o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

Preferentemente, el procedimiento de obtención del producto de extracción utiliza flores y/o  
hojas como material vegetal y al menos un solvente se selecciona de entre un solvente acuoso  
25 o un solvente orgánico.

Alternativamente, el procedimiento de obtención comprende una etapa adicional de aislamiento del compuesto de fórmula (I) a partir del producto de extracción de la etapa anterior.

5 En un tercer aspecto, la invención se relaciona con una composición biocida que comprende al producto de extracción.

10 En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición biocida, del producto de extracción o de al menos uno de los compuestos de fórmula (II), (III), (IV), (V), (VII) y (IX) o un isómero, o una sal o un solvato de los mismos, ya sea de forma aislada o en combinación, contra al menos un factor biótico que afecta al desarrollo de plantas.

15 Preferentemente el al menos un factor biótico que afecta al desarrollo de plantas, se selecciona de entre nematodos que preferentemente son nematodos formadores de nódulos de las raíces y más preferentemente pertenecen a la especie *Meloidogine javanica* y de malas hierbas que pertenecen al género *Lolium* y más preferentemente pertenecen a la especie *Lolium perenne*.

20 Para algunos de los compuestos incluidos en el ámbito del presente documento de memoria de invención, se utiliza indistintamente una doble nomenclatura, así, compuesto (I) y compuesto (10) se refieren al mismo compuesto tal y como lo hacen compuesto (II) y compuesto (1); compuesto (III) y compuesto (2); compuesto (IV) y compuesto (3); compuesto (V) y compuesto (3a); compuesto (VI) y compuesto (4); compuesto (VII) y compuesto (5); compuesto (VIII) y compuesto (6); compuesto (IX) y compuesto (11); y compuesto (X) y compuesto (12).

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1. Esquema de obtención de distintos productos de extracción.**

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

30 El problema técnico que resuelve la presente invención es la búsqueda de nuevos principios activos naturales con una alta actividad biocida que se extraigan de material vegetal y que puedan ser utilizados para el control de factores bióticos que afectan a cultivos, y que

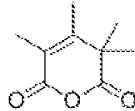
constituyan de esa forma, una alternativa efectiva y respetuosa con el medio ambiente con respecto a los productos biocidas convencionales de síntesis química.

5 La presente invención tiene su origen en un producto de extracción que comprende al compuesto químico de fórmula (I), que se extrae a partir de material vegetal de plantas de la especie *Lavandula luisieri* (ver ejemplos 1 a 4) y que muestra una importante actividad fitocida contra *Lactuca sativa* y *Lolium perenne* y una importante actividad nematocida contra *Meloidogyne javanica* (ver ejemplos 5 y 6). Adicionalmente al efecto biocida del compuesto de fórmula (I), los inventores han descubierto que otros compuestos presentes en el producto de extracción (compuestos (II), (III), (IV), (V), (VII) y (IX)) también presentan actividad fitocida y/o  
10 nematocida y que cuando se combinan entre sí o con el compuesto de fórmula (I), pueden proporcionar un efecto sinérgico que se materializa en una mayor actividad biocida, que hace factible el uso del producto de extracción o incluso de los compuestos aislados para el tratamiento de factores bióticos perjudiciales para el correcto desarrollo de cultivos.

15 Las principales ventajas técnicas de los productos de extracción que se incluyen dentro del ámbito de la invención y de su uso para el control de factores bióticos que afectan a cultivos se enumeran a continuación:

- 20 - se obtienen de fuentes naturales, por procedimientos sencillos;
- son singularmente efectivos contra nematodos, alcanzando en este caso una efectividad superior al 99% para los productos de extracción (WR0) y (WRI), o para el compuesto de fórmula (I) con un 87%, muy por encima por ejemplo, del producto Abamectina (AVICTA®) que  
25 presenta un valor de en torno al 35% en condiciones experimentales similares; y
- son singularmente efectivos contra malas hierbas como el *Lolium perenne*, alcanzando en este caso una efectividad sobre germinación superior al 99% en el caso de los productos de extracción (WR0) y (WRI) o para el compuesto de fórmula (I) con un 20% sobre germinación,  
30 97% sobre crecimiento de raíz y 40% sobre crecimiento foliar, valores muy superiores a los obtenidos con un herbicida natural como la carvona (ver Ejemplo 5).

Los autores de la presente invención han identificado un producto de extracción de material vegetal de la especie *Lavandula luiseri* que presenta actividad biocida, en adelante producto de extracción de la invención, que se caracteriza por comprender a un compuesto de fórmula (I) y que constituye el primer aspecto de esta invención,



5

(I)

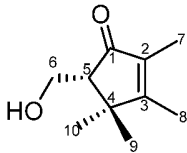
o un isómero, una sal o un solvato del mismo.

Por "*Lavandula luiseri*" se entiende un pequeño arbusto aromático endémico de la Península Ibérica y común en las regiones semiáridas del sur de Portugal y el suroeste de España.

Por "producto de extracción" se entiende cualquier fracción, ya sea líquida o sólida, obtenida directamente tras someter al material vegetal de *L. luiseri* a una extracción utilizando un solvente adecuado, siempre que comprende al menos al compuesto de fórmula (I). Sin embargo, también se considera como producto de extracción cualquier fracción sucesiva obtenida de la fracción directamente obtenida a partir de material vegetal de *L. luiseri*, empleando fraccionamientos, extracciones o aislamientos posteriores y al menos un solvente adecuado, con la condición de que dicho producto comprenda al menos al compuesto de fórmula (I).

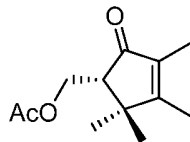
20

El producto de extracción de la invención puede comprender al menos otro compuesto, que preferentemente se selecciona de entre los siguientes:

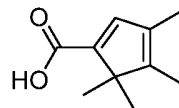


25

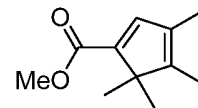
(II)



(III)

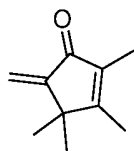


(IV)

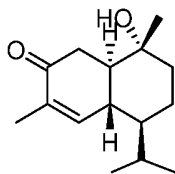


(V)

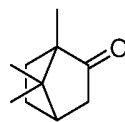




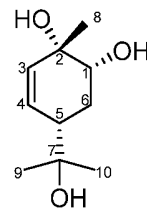
(VI)



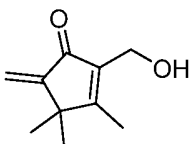
(VII)



(VIII)



(IX)



(X)

5

o un isómero, una sal o un solvato de los mismos.

10 En el ámbito de la presente invención, el término “producto de extracción” puede hacer referencia a una o a varias fracciones, o incluso al compuesto de fórmula (I), dependiendo del contexto.

15 Preferentemente, el producto de extracción de la invención se selecciona de entre un extracto hexánico obtenido tras una extracción hexánica a partir de material vegetal de *L. luiseri*; un aceite esencial que se obtiene tras hidrodestilado con aparato Clevenger o arrastre por vapor a partir de material vegetal de *L. luiseri*; un hidrolato que se obtiene tras hidrodestilado con aparato Clevenger o arrastre por vapor a partir de material vegetal de *L. luiseri*; una fracción orgánica y/o un nuevo hidrolato obtenido a través de una extracción con diclorometano (DCM) a  
 20 partir del hidrolato anterior; o una nueva fracción orgánica obtenida a partir del hidrolato inmediatamente anterior tras elución con metanol (ver Figura 1).

En realizaciones particulares, el producto de extracción de la invención se selecciona de entre el extracto hexánico (Hx), el aceite esencial (EO), el hidrolato (WRO), la fracción orgánica  
 25 (OE0), el hidrolato (WRI) o la fracción orgánica (OEI) (ver Ejemplos 1 a 4 y Figura 1).

Sucesivos fraccionamientos del producto de extracción hacen que pueda quedar constituido exclusivamente por el compuesto de fórmula (I). Así por ejemplo, en otra realización particular, el producto de extracción es el compuesto de fórmula (I) que se obtiene tras la aplicación de técnicas cromatográficas, sobre cualquier producto de extracción de la invención, como por  
5 ejemplo (Hx), (EO), (OE0), (OEI), (WR0) o (WRI).

Tanto el compuesto de fórmula (I) como el resto de compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención, se aíslan o se extraen a través de métodos perfectamente conocidas en el estado de la técnica, como por ejemplo, cromatografía líquida de vacío (VLC), cromatografía en  
10 columna (CC) empleando diferentes fases sólidas (Gel de Sílice, Sephadex LH-20) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), eluyéndose con distintos gradientes de polaridad mediante diferentes combinaciones de disolventes orgánicos.

De forma general, todos los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención pueden  
15 incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente  
20 activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran las sales y solvatos aceptables  
25 de todos los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención o de cualquier otro compuesto que es capaz de proporcionar (directamente o indirectamente) un compuesto según se describe en el presente documento.

Los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención pueden estar en forma cristalina  
30 como compuestos libres o como solvatos. Los métodos de solvatación se conocen generalmente dentro de la técnica.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento de obtención del producto de extracción la invención, en adelante procedimiento de obtención de la invención, que comprende una etapa de extracción de material vegetal de *Lavandula luiseri* con al menos un solvente hasta obtener un producto de extracción.

5

El procedimiento de la invención puede utilizar cualquier material vegetal de *Lavandula luiseri* que comprende al compuesto de fórmula (I), preferentemente es material perteneciente a la parte aérea, y más preferentemente son flores y/o hojas.

10 Los solventes que se utilizan en la etapa de extracción del procedimiento de la invención pueden ser cualquiera de los que habitualmente se utilizan en el estado de la técnica para obtener compuestos volátiles, preferentemente son solventes orgánicos y acuosos.

15 Ejemplos de solventes orgánicos que se incluyen en el ámbito de la invención son diclorometano, éter terbutílico, etanol y hexano.

En una realización particular del procedimiento de la invención se utiliza agua como solvente y como método de extracción el arrastre por vapor o hidrodestilado con aparato Clevenger.

20 En otra realización particular del procedimiento de la invención se utiliza un solvente orgánico, preferentemente hexano y como método de extracción se prefiere la extracción Soxhlet.

25 Preferentemente el procedimiento de extracción de la invención se selecciona de entre una extracción por arrastre de vapor para obtener como producto de extracción un hidrolato y/o un aceite esencial; un hidrodestilado con aparato Clevenger para obtener como producto de extracción un hidrolato y/o un aceite esencial; una extracción hexánica para obtener como producto de extracción un extracto hexánico; una extracción con diclorometano a partir de un hidrolato para obtener una fracción orgánica y/o un nuevo hidrolato; y elución con metanol del anterior hidrolato para dar un nuevo extracto orgánico (ver ejemplos 1 a 4).

30

Alternativamente, el procedimiento de la invención comprende una etapa adicional para aislar el compuesto de fórmula (I) a partir del producto de extracción de la primera etapa del procedimiento utilizando técnicas cromatográficas.

En otra realización particular, el procedimiento de la invención obtiene el compuesto de fórmula (I) cuando se aplican técnicas cromatográficas sobre un producto de extracción, que se selecciona de entre (Hx), (EO), (OE0), (OEI), (WR0) y (WRI) (ver Ejemplos 1 a 4 y Figura 1).

5

Por “actividad biocida” se entiende la capacidad de controlar, a través de diferentes mecanismos de acción, a al menos un factor biótico, y preferentemente a más de uno, que se considere perjudicial para el desarrollo de un cultivo. Dicho control comprende la prevención de la acción o la destrucción directa de dicho factor perjudicial. Ejemplos de factor biótico que afectan al desarrollo de las plantas y que se incluyen en la presente invención son aunque sin limitarse, nematodos y malas hierbas.

10

Preferentemente, los nematodos que se incluyen en el ámbito de esta invención, son nematodos formadores de nódulos de las raíces (*Meloidogyne* sp). Un ejemplo de nematodos formadores de nódulos es la especie *Meloidogyne javanica*, polífaga, con capacidad de parasitar más de 3.000 especies de plantas de cultivo, que incluyen cultivos extensivos, hortícolas y frutales, afectando gravemente la producción (Agrios. *Plant Pathology*, Fifth edition, Elsevier/Academic, Amsterdam 2005), y causando pérdidas económicas anuales de miles de millones de euros (Singh *et al.* *OEPP/EPPO Bulletin* 2013, 43 (2), 334–374).

15

20

Por “mala hierba” se entiende cualquier especie vegetal que crece de forma silvestre y con considerable vigor, en una zona cultivada o controlada por el ser humano.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con una composición biocida efectiva contra al menos un factor biótico, y preferentemente más de uno, que se considere perjudicial para el desarrollo de un cultivo, en adelante composición biocida de la invención, que comprende al producto de extracción de la invención, o a al menos un compuesto que se selecciona de entre los compuestos (II), (III), (IV), (V), (VII) y (IX) o un isómero, una sal o un solvato de los mismos, ya sea de forma aislada o en combinación, en adelante composición biocida de la invención.

25

30

Como el experto en el estado de la técnica sabrá, los compuestos químicos que se incluyen en este documento, deberían tener la misma funcionalidad con independencia de si su origen es

natural o sintético, motivo por el cual dentro del alcance de esta invención se incluye el uso de todos ellos.

5 Preferentemente la composición biocida de la invención comprende a un producto de extracción que se selecciona de entre el extracto hexánico (Hx), el aceite esencial (EO), el hidrolato (WRO), la fracción orgánica (OEO), el hidrolato (WRI), la fracción orgánica (OEI) o el compuesto de fórmula (I) y más preferentemente el producto de extracción (WRO).

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

Como el experto en el estado de la técnica conocerá en la aplicación de fitosanitarios, 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 fluibles, (v.g., suspensión en agua, emulsión en agua, etc.), polvos, aerosoles, ULV y similares.

20 Ejemplos de vehículo sólido que se incluyen en el ámbito de la 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.

25 Ejemplos de vehículo líquido que se incluyen en el ámbito de la 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 invención son agente de pulverizado, incluyendo gas flon, gas butano, LPG (gas de petróleo liquificado), éter dimetílico, gas de dióxido de carbono y similares.

10 Ejemplos de agente tensioactivo que se incluyen en el ámbito de la 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 invención son caseína, gelatina, polisacáridos (v.g., polvo de almidón, goma arábiga, derivado de celulosa, ácido algínico, 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 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 El producto de extracción de la invención, la composición biocida de la invención o el al menos uno de los compuestos (II), (III), (IV), (V), (VII) y (IX) o un isómero, una sal o un solvato de los mismos, se pueden utilizar conjuntamente con al menos otro ingrediente activo adicional. Ejemplos de ingrediente activo adicional son nematicidas, insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, reguladores del crecimiento de la planta, sinérgicos, fertilizantes, acondicionadores del suelo y cebos para animales.

30 En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso como biocida, en adelante uso de la invención, para el control de al menos un factor biótico, y preferentemente más de uno, que afecta al desarrollo de las plantas, del producto de extracción de la invención, de la composición

biocida de la invención o de al menos uno de los compuestos (II), (III), (IV), (V), (VII) y (IX) o un isómero, una sal o un solvato de los mismos, ya sea de forma aislada o en combinación.

5 En el ámbito de la invención, la actividad biocida contra los factores bióticos se puede determinar mediante diferentes tipos de bioensayos (ver ejemplos 5 y 6). Por ejemplo, en el caso de los nematodos se utiliza el porcentaje de juveniles infectivos (J2) muertos a las 72 horas posteriores tras la aplicación de la sustancia biocida. En el caso de las malas hierbas, se controla el porcentaje de germinación, el crecimiento de la raíz o el crecimiento de la parte  
10 aérea tras un ensayo de germinación de semillas de 168 horas tras aplicación de la sustancia biocida.

La actividad biocida del producto de extracción queda de manifiesto en su efecto contra un nematodo, que preferentemente es un nemátodo formador de nódulos de las raíces y más preferentemente un nematodo de la especie *Meloidogine javanica*.

15 Así, en una realización particular del uso de la invención, el nematodo pertenece a la especie *Meloidogine javanica*, el producto de extracción se elige de entre (WR0) y (WRI) y se obtiene una actividad nematocida del 100%.

20 El fraccionamiento biodirigido del (WR0) demostró que los agentes nematocidas estaban en las fracciones acuosas ácidas (WRI) o (WRII) que producen una alta mortalidad de J2 hasta diluciones del 25%. Los procesos de liofilización, neutralización o neutralización-liofilización de (WRII) dieron extractos inactivos (WRIIL), (WRIIN) y (WRIINL) sin embargo la acidificación de (WRIINL) dio un extracto activo lo que sugiere que los componentes activos se regeneran  
25 cuando se protonan sus sales.

En otra realización particular del uso de la invención, el nematodo pertenece a la especie *Meloidogine javanica*, el producto de extracción es el compuesto de fórmula (I) y se obtiene una mortalidad del 87%.

30 En otra realización particular del uso de la invención, el nematodo pertenece a la especie *Meloidogine javanica* se utiliza el compuesto (IV) y se consigue una mortalidad del 59%.

Por otra parte, la actividad biocida del producto de extracción de la invención o de los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención, queda de manifiesto en los resultados contra una mala hierba que preferentemente pertenece al género *Lolium* y que más preferentemente es la especie *Lolium perenne*, cuando el producto de extracción es (WR0) o (WRI). Sin embargo, la actividad fitocida también queda de manifiesto en ensayos con *Lactuca sativa* (ver ejemplo 5).

En otra realización particular del uso de la invención, la mala hierba es la especie *Lolium perenne*, el producto de extracción es (WR0), y se consigue una reducción de la germinación de semillas tras 168 horas del 100%.

La actividad biocida de los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención contra malas hierbas, resultan especialmente evidentes contra *Lolium perenne* para los compuestos de fórmula general (I), (II), (III), (IV) y (VII) para parámetros como la reducción del porcentaje de germinación, crecimiento radicular o crecimiento foliar, tras 168 horas de germinación de semillas de *L. perenne*.

Con independencia de la potencia biocida del compuesto de fórmula (I) y del resto de compuestos que comprende el producto de extracción de la invención, se produce un efecto sinérgico de su mezcla que queda de manifiesto a través de la actividad biocida que se registra especialmente en un producto de extracción que es (EO) o (WR0).

Finalmente la invención también se relaciona con un método de control de al menos un factor biótico, y preferentemente de más de uno, que afecta al correcto desarrollo de un cultivo, que comprende el uso de una dosis eficaz de la composición biocida de la invención, del producto de extracción de la invención o de al menos uno de los compuestos de fórmula general (II), (III), (IV), (V), (VII) y (IX) o un isómero, una sal o un solvato de los mismos, ya sea de forma aislada o en combinación.

Preferentemente, el al menos un factor biótico contra el que es efectivo el método de control de la invención, se selecciona de entre nematodos y malas hierbas. Más preferentemente, los nematodos son nematodos formadores de nódulos de las raíces y todavía más preferentemente



nematodos de la especie *Meloidogine javanica*. También preferentemente, las malas hierbas pertenecen al género *Lolium* y más preferentemente la especie *Lolium perenne*.

5 La “dosis eficaz” puede aumentar o disminuir opcionalmente según el tipo de formulación, la climatología, el lugar y el método de aplicación, el tipo de factor biótico que afecta a la planta y el grado de daño.

10 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.

#### 15 **MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION**

##### **Ejemplo 1. Recolección de material vegetal de *Lavandula luiseri***

Plantas de *L. luisieri* fueron cultivadas en una parcela experimental localizada en la Comarca del Campo de Cariñena, Aguarón (Zaragoza, España) y ubicada en las siguientes coordenadas:  
20 latitud 41° 19' 13.33" N; longitud 1° 19'53.9" W; altitud 16 m. El diseño experimental consistió en tres bloques al azar con una superficie de 49.92 metros cuadrados cada uno, con una separación de 2 metros entre bloques. En cada bloque se establecieron 4 filas de 10 metros con 104 plantas por línea. El marco de plantación fue de 1.20 x 0.40 m lo que supuso una superficie útil de 0.48 m<sup>2</sup> por planta. La parcela experimental fue establecida en marzo de 2008  
25 con plantas producidas por semillas recolectadas en Junio de 2007 a partir de una población salvaje parental (PSP) localizada en Pueblo Nuevo del Bullaque (Ciudad Real, España) ubicada en las coordenadas: latitud 39° 27' 41" N; longitud 4° 24' 34" W; altitud 733 m) y que previamente se habían germinado en vivero. Una vez las plantas florecieron, material vegetal de la parte aérea consistente en flores y hojas fue recolectado y secado a la sombra a  
30 temperatura ambiente.

### **Ejemplo 2. Productos de extracción**

El material vegetal seco obtenido según el ejemplo 1, se sometió a los procedimientos de extracción que se indican a continuación:

5

Hidrodestilado en un aparato tipo Clevenger de acuerdo con el método recomendado por la *European Pharmacopoeia (6th edition, 2008)*, obteniéndose, por decantación, el aceite esencial (EO) con un 0.8% de rendimiento y su correspondiente hidrolato (WR0') (15 mL);

10 Extracción por arrastre de vapor en la planta piloto de destilado de acero inoxidable equipada con una cámara de destilado de 100 Kg y un vaso de 500 L, utilizando un rango de presión de entre 0.5-1.0 bar, y obteniéndose, por decantación, el aceite esencial (PEO) y su correspondiente hidrolato (WR0); y

15 Extracción con n-hexano o etanol en un aparato Soxhlet y concentrado *in vacuo*, obteniéndose un extracto hexánico (Hx) o etanólico (EtOH) con un 2.1% y un 12.5% de rendimiento, respectivamente.

Adicionalmente y partiendo de flores secadas al aire y molidas de *L. luiseri* (131g):

20

Extracción en un aparato Soxhlet, consistente en una extracción con Hexano durante 12 horas. Cuando el extracto hexánico (Hx) se dejó enfriar a temperatura ambiente se obtuvo un material insoluble (1.60 g) que fue filtrado y una solución hexánica a la que se añadió una solución NaOH 2N. La fase acuosa fue acidificada a pH 2 con HCl 2N y extraída con éter metil-terbutílico. Ambas fases orgánicas fueron lavadas con una solución salina, secadas con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, filtradas y concentradas *in vacuo* para obtener 687 mg y 724 mg de un extracto neutro (NHx) y un extracto ácido (AHx), respectivamente.

25

### **Ejemplo 3. Fraccionamiento del hidrolato (WRO)**

30

El hidrolato (WR0) obtenido según el procedimiento de extracción (b) del ejemplo 2 presentó 4.5 mg/ml de componentes orgánicos y un pH 3.2. Partiendo de dicho (WR0) se realizó extracciones con diclorometano (DCM).

1000 ml de (WR0) fueron sometidos a extracción (DCM, 800 ml x 3) obteniendo 3.42 g (con un 34% rendimiento) de un extracto orgánico (OE0) y un residuo acuoso (WRI) con 1.15 mg/ml de componente orgánico y pH 3.1.

5

A continuación 1000 ml de (WRI) fueron filtrados a través de un cartucho C18 (10 g) y eluidos con MeOH para dar 176 mg (con un 0.18% de rendimiento) de un segundo extracto orgánico (OEI) y un residuo acuoso (WRII) con 0.73 mg/ml y un pH 3.67. Adicionalmente 50 ml de (WRII) fueron neutralizados a pH 6.62 con NaOH 2N (WRIIN) y liofilizados obteniendo (WRIINL). 110 mg de una muestra seca de (WRIINL) se cromatografiaron sobre una columna de Si (40-63  $\mu\text{m}$ ;  $\varnothing$ : 2 cm, h: 30cm) usando 100% acetato como eluyente

10

#### **Ejemplo 4. Compuestos comprendidos en el producto de extracción de *L. luiseri***

### **15 *TECNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS***

#### **Aceites esenciales y fracciones derivadas del hidrolato**

Los aceites esenciales (EO) y los extractos orgánicos del hidrolato (OE0 y OEI) fueron analizados por GC-MS usando un cromatógrafo de gases *Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA)* acoplado a un detector de masas *Agilent 5973N -electron ionization, 70 eV- (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA)* y equipado con columnas capilares (*Hewlett-Packard*), concretamente id HP-1 de 25m x 0.2 mm (metil silicona, 0.2  $\mu\text{m}$  de espesor de película) e id *Carbowax 30* m x 0.25 mm (polietilenglicol, 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de película).

Las condiciones de trabajo fueron: temperatura del inyector 260 °C; temperatura de la línea de transferencia conectadas al espectrómetro de masa 280 °C; temperatura de la columna 70 -190 °C, 5 °C  $\text{min}^{-1}$ . El espectro de masas EI y los datos de retención fueron usados para identificar distintos compuestos por comparación con los patrones o con valores encontrados en las bases de datos *Wiley Mass Spectral Database (2001)*. Los datos cuantitativos fueron obtenidos a partir de las áreas de los picos TIC sin utilizar factores de respuesta.

30

**Extracto etanólico y fracciones derivadas del hidrolato**

Los análisis se llevaron a cabo por HPLC-MS en un aparato LC-20AD HPLC acoplado a un espectrómetro de masas LCMS-2020 QP utilizando una interfaz de ionización por electrospray (ESI) y una columna Teknokroma, *Mediterranea Sea*<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm, 5 µm tamaño de partícula) con una precolumna ACE 3 C18. Los compuestos fueron eluidos con metanol (MeOH):0.1% ácido acético en agua milli-Q con un gradiente 38:100% durante 45 min, seguido de 100% MeOH durante 10 min y 100:38% durante 13 min, a un flujo de 0.5 mL/min y 15 L/min de nitrógeno (gas de secado para la evaporación del disolvente). El potencial capilar del electrospray fue de +4.50kV y se empleó en modo positivo de *Full Scan* (m/z = 145-545) con un potencial de 1.30 kV y una temperatura capilar de 250 °C. Las soluciones stock de los extractos (0.25 µg/µL), de los compuestos (1), (5), (8) y (9) aislados de material vegetal de la PSP y del ácido oleanólico (Sigma) (0.05 µg/µL) se disolvieron en MeOH para la inyección de muestras (10 µL). Todos los disolventes usados fueron de grado HPLC-MS.

De forma general, los espectros NMR (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) fueron obtenidos con espectrómetros Varian Direct-Drive 500 (<sup>1</sup>H 500 MHz/<sup>13</sup>C 125 MHz). Para alta resolución MS se utilizó un espectrómetro de masas Autospec-Q VG-Analytical (Fisons). Para los espectros IR se utilizó un espectrómetro Mattson Model Satellite FTIR.

20

**FRACCIONAMIENTOS Y EXTRACCIONES****Extracto hexánico**

El fraccionamiento del extracto hexánico neutro (NHx) en columna de Si-gel eluída con un gradiente de hexano:*t*-butilmetileter (H:E) resultó en el aislamiento del alcanfor o compuesto (6) (H:E, 80:20, 714 mg) (Barrero et al. *J. Es sent. Oil Res.* **2005**, *17*, 166-168; Demarco *Chem. Commun.* **1969**, 1418-1420), del compuesto (4) (H:E, 75:25, 103 mg), del compuesto (2) (H:E, 60:40, 148 mg) (Baldovini et al. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1651-1655), del compuesto (1) (H:E, 40:60, 86 mg) (Baldovini et al. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1651-1655) y del compuesto (5) (H:E, 40:60, 360 mg) (Staerk et al. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 799-805). El fraccionamiento del extracto hexánico en columna de Si-gel eluída con un gradiente de n-hexano:EtOAc (0-30% EtOAc) resultó en el aislamiento del compuesto (4) (n-hexano: EtOAc 90:10, 80 mg, 2.6%), del

compuesto (5) (n-hexano: AcOEt 70:30, 110 mg, 3.5%), del compuesto (10) (n-hexano:EtOAc 85:15, 5 mg; 0.16%) y del compuesto (12) (n-hexano: EtOAc 60:40, 9 mg; 0.29%).

El extracto hexánico ácido (AHx) fue metilado con TMSCHN<sub>2</sub> (Hasimoto *et al. Chem. Pharm. Bull.* **1981**, 29, 1475-1478) para obtener un producto crudo que fue purificado por columna cromatográfica sobre sílica gel utilizando mezclas de H:E e incrementando la polaridad para obtener el compuesto (3a) (H:E, 95:5, 104 mg).

La fracción orgánica del extracto hexánico ácido fue purificada por cromatografía flash para dar 200 mg de un sólido blanco, el compuesto (3) y 20 mg del compuesto (10).

El material insoluble fue fraccionado por columna cromatográfica sobre sílica gel utilizando mezclas de H:E:EtOAc incrementando la polaridad para obtener seis fracciones. La fracción 6 (EtOAc, 154 mg) fue metilada con TMSCHN<sub>2</sub><sup>26</sup> para obtener un producto crudo que fue sometido a una columna cromatográfica sobre sílica gel para obtener los metil ésteres del ácido ursólico (8a) (H:E, 50:50, 30 mg) y torméntico (7a) (H:E, 20:80, 79 mg)

#### **Extracto etanólico**

El fraccionamiento del extracto etanólico en una columna cromatográfica sobre sílica gel usando mezclas crecientes en polaridad de hexano:*t*-butylmethylether (H:E) permitió identificar una mezcla de polifenoles siendo el principal compuesto el ácido rosmarínico (9) (H:E, 0:100, 30 mg) (Kuhnt *et al. Phytochemistry* **1994**, 36, 485-489.)

Finalmente, una muestra seca del hidrolato (WRIINL) (110 mg) se cromatografió sobre una columna de Si gel eluída con 100% AcOEt, obteniendo de esta manera el compuesto (11) (3 mg; 2.7%).

30

**CARACTERIZACIÓN Y UBICACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS****Compuestos (1), (2), (3a), (10) y (12)**

- 5 El fraccionamiento del extracto hexánico neutro (NHx) permitió el aislamiento de dos nuevos compuestos, los necrodanos (1) y (2).

**El Compuesto (1).** Jarabe incoloro;  $[\alpha]_D -9,7$  (c1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Su fórmula molecular fue determinada como C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub> por HRFABMS ( $[M+Na]^+$ , m/z 191.1041). Su espectro IR mostró dos bandas de absorción a  $\nu_{max}$  3406 cm<sup>-1</sup> y 1686 cm<sup>-1</sup> debido al grupo hidróxilo y a la ketona  $\alpha,\beta$ -insaturada, respectivamente. El grupo hidroxilo corresponde a un alcohol primario deducido de las señales <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C NMR a  $\delta_H$  3.77 dd (5.7, 10.5) y 3.83 dd (8.9, 10.5), y  $\delta_c$  63.2, respectivamente. Además, el espectro <sup>1</sup>H NMR (ver Tabla 1) mostró señales características de cuatro grupos metilos ( $\delta$  1.94, 1.66, 1.25 y 1.02) y un grupo metino ( $\delta$  2.30 dd (5.7, 8.9)) acoplado con el metileno oxigenado. El espectro <sup>13</sup>C NMR (ver Tabla 1) confirmó la presencia de un doble enlace ( $\delta$ 136.4 y 180.3) conjugado con un grupo cetona ( $\delta$  213.6) y también mostró señales atribuidas a la presencia de 4 grupos metilos ( $\delta$  10.5, 14.5, 25.0 y 29.2), un grupo metino ( $\delta$  59.8), un metileno oxigenado ( $\delta$  63.2) y un carbono cuaternario ( $\delta$  46.4). Estos datos están de acuerdo con un esqueleto de necrodano, de tal forma que la estructura del compuesto (1) fue asignada a 5-(hidroximetil)-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona.

**5-(Hidroximetil)-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona (1).**  $[\alpha]_D -9.7$  (c 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); IR (film)  $\nu_{max}$  3406, 2960, 2931, 2875, 1686, 1465, 1378, 1330, 1240, 1041 cm<sup>-1</sup>; para datos <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) ver Tabla 1; para datos <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) ver Tabla 1; HRFABMS m/z 191.1043 [M + Na]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>, 191.1048).

**El compuesto (2).** Jarabe incoloro;  $[\alpha]_D -7.9$  (c1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) mostró una fórmula molecular C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub> establecida a través HRFABMS ( $[M+Na]^+$ , m/z 233.1258. Su IR mostró bandas de absorción debidas a un grupo acetato (1734 cm<sup>-1</sup>), y una ketona  $\alpha,\beta$ -insaturada (1668 cm<sup>-1</sup>). El espectro <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C NMR (ver Tabla 1) indicó la presencia de una estructura de necrodano muy relacionada con la del compuesto (1), la principal diferencia entre el fuerte desapantallamiento

de las señales H-7 ( $(\Delta\delta = \delta 2 - \delta 1 = 0.70$  y  $0.41$  ppm) y la presencia de señales correspondientes al grupo acetilo ( $\delta_H$  2.05 y  $\delta_C$  21.1 y 171.0). Estos datos permitieron identificar el compuesto **2** como el acetato del 5-(hidroximetil)-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona.

- 5 **Tabla 1. Datos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR de los compuestos (1), (2), (12), (3a) y (10).** Las constantes de acoplamiento,  $j$ , se representan entre paréntesis. La numeración de los carbonos de los compuestos (10), (12), (3a) coincide con la publicada por Baldovini *et al.* (*Phytochemistry* **2005**, 66, 1651-1655).

10

Átomo (nº)	1		2		12		3a		10	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1		213.6		205.7		196.0	7.12 s	145		160.8
2		136.4		134.0		137.6		130.3		119.7
3		180.3		176.1		173.9		156.5		156.1
4		46.4		44.4		44.4		53.5		44.5
5	2.30 dd (5.7, 8.9)	59.8	2.47 dd (4.2, 9.2)	55.7		152.1		142.9		172.2
6a	3.77 dd (5.7, 10.5)	63.2	4.18 dd (9.2, 11.9)	62.3	5.34 s	114.4		163.9	1.97 d (0.95)	15.3
6b	3.83 dd (8.9, 10.5)		4.53 dd (4.2, 11.9)		6.04 s					
7	1.66 s	10.5	1.67 s	8.3	4.42 s	56.1	1.86 d (0.95)	12.2	1.98 d (0.95)	13.2
8	1.94 s	14.5	1.95 s	11.9	2.02 s	11.3	1.79 d (0.95)	9.9	1.49 s	25.6
9	1.20 s	25.0	1.23 s	22.8	1.25 s	25.4	1.16 s	21.4	1.49 s	25.6
10	1.02 s	29.2	1.09 s	27.0	1.25 s	25.4	1.16 s	21.4	1.98 d (0.95)	13.2
OH	3.30 br s									
COCH <sub>3</sub>			2.05 s	21.1						
COCH <sub>3</sub>				171.0						
OCH <sub>3</sub>							3.74 s	50.7		

**Acetato de 5-(hidroximetil)-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enon (2).**  $[\alpha]_D -7.9$  (c 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); IR (film)  $\nu_{\text{max}}$  2953, 2928, 2859, 1734, 1668, 1452, 1370, 1262, 1231, 1093, 1017 cm<sup>-1</sup>; para datos  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) ver Tabla 1; para datos  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) ver Tabla 1; HRFABMS  $m/z$  233.1258 [M + Na]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>, 233.1256).

15

Adicionalmente, el compuesto (1) fue detectado en los productos de extracción (EO), (OEO), (WR0) y (EtOH), mientras que el compuesto (2) se encontró en (EO), (WR0), (OEO) y (EtOH).

5 **Compuesto 3a.** Se aisló después del tratamiento con diazometano del extracto hexánico ácido. Su espectro de masas de alta resolución mostró un ión molecular a 180.1144  $m/z$  que estaba de acuerdo con la fórmula molecular  $C_{11}H_{16}O_2$ . Las señales de sus espectros de  $^1H$  y  $^{13}C$  RMN (ver Tabla 1) indicaron la presencia de una estructura con esqueleto necrodano similar al compuesto (3) (ácido 3,4,5,5-tetrametilciclopenta-1,3-dienocarboxílico; Baldovini *et al.*  
10 *Phytochemistry* **2005**, 66, 1651-1655). La principal diferencia observada fue la aparición de una nueva señal característica de un grupo metoxilo ( $\delta$  H 3.74 y  $\delta$  C 50.7) que permitió asignar a este compuesto la estructura del correspondiente metil éster (3a): metil éster del ácido 3,4,5,5-tetrametil-ciclopenta-1,3-dienocarboxílico.

15 **Metil éster del ácido 3,4,5,5-tetrametil-ciclopenta-1,3-dienocarboxílico (3a).** Para datos  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz) ver Tabla 1; para datos  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 125 MHz) ver Tabla 1; HREIMS  $m/z$  180.1144  $[M]^+$  (calculado para  $C_{11}H_{16}O_2$ , 180.1150). EIMS 70 eV  $m/z$  (rel. int.): 180  $[M]^+$  (13), 165 (47), 157 (33), 137 (39), 125 (59), 107(38), 99(61), 91(74), 71 (82).

20 Adicionalmente los compuestos 3 y 3a estuvieron presentes en el producto de extracción (EO).

**Compuesto (10)** . Se aisló a partir del extracto hexánico (Hx). Su fórmula molecular se determinó como  $C_9H_{13}O_3$  ( $[M+H]^+$  169.0861) por espectrometría de masas de alta resolución. El espectro IR presentó bandas de absorción a  $\nu_{max}$ . 1783, 1737, 1052 debido a un grupo CO-O-  
25 CO. En el espectro de  $^1H$ -RMN (ver Tabla 1) se observaron señales de dos grupos metilos ( $\delta$  1.98 y 1.97) sobre un doble enlace acoplados entre sí, y la de un gem-dimetilo a  $\delta$  1.49 (s, 6H). Los datos de  $^{13}C$ -RMN (ver Tabla 1) mostraron la presencia de cuatro grupos metilos ( $\delta$  13.2, 15.3, 25.6 y 25.6), un doble enlace tetrasustituido ( $\delta$  119.7 y 156.1), dos grupos carbonilos ( $\delta$  160.8 y 172.3) y un átomo de carbono cuaternario ( $\delta$  44.5). Sus datos  
30 bidimensionales de RMN, y el patrón de fragmentación observado en su espectro de masas de alta resolución que indica la presencia de un anhídrido (ver Tabla 1), permitió identificar el compuesto (10) como el 3,3,4,5-tetrametilpiran-2,6-diona.



**3,3,4,5-Tetrametilpiran-2,6-diona (10).** IR (film)  $\nu_{\max}$  2925, 1783, 1737, 1380, 1334, 1234, 1163, 1052  $\text{cm}^{-1}$ ; para datos  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ver Tabla 1; para datos  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) ver Tabla 1; HREIMS  $m/z$  169.0861  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calculado para  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_3$ , 169.0865). EIMS 70 eV  $m/z$  (rel. int.): 169  $[\text{M}+1]^+$  (11), 124 (66), 123 (20), 109 (60), 96 (9), 81 (100), 79 (12), 53 (12).

Adicionalmente, el compuesto (10) estuvo presente en los productos de extracción (EO), (OEO), (OEI), (WR0) y (WRI).

**10 Compuesto (12).** El fraccionamiento del extracto hexánico (Hx) permitió el aislamiento de un nuevo necrodano con una fórmula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$ . Su espectro de IR mostró bandas de absorciones características de un grupo hidroxilo ( $3427 \text{ cm}^{-1}$ ) y de un grupo carbonilo ( $3427 \text{ cm}^{-1}$ ). El grupo hidroxilo corresponde a un alcohol primario como muestran las señales en sus espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, a  $\delta_{\text{H}}$  4,42 s (2H) y  $\delta_{\text{C}}$  56.1, respectivamente. Otras señales observadas en su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (ver Tabla 1) fueron la de un singulete a  $\delta$  1.25 (6H), debido a dos grupos metilo, un metilo sobre un doble enlace a  $\delta$  2.02 (3H), y la de dos grupos metilenos, uno de ellos oxigenado a  $\delta$  4.42 s (2H) y el otro de un enlace olefínico exocíclico a  $\delta$  5.34 s (1H) y 6.04 s (1H). Su espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (ver Tabla 1) confirmó la presencia de estos carbonos en un esqueleto necrodano y mostró además las señales de dos carbonos cuaternarios, uno de ellos correspondiente a un grupo carbonilo a 196.0  $\delta$ . El estudio de las correlaciones en los espectros bidimensionales de HMBC y NOESY permitió determinar la disposición espacial de cada sustituyente en el anillo e identificar el compuesto (12) como el 2-(hidroximetil)-3,4,4-trimetil-5-metilenociclopent-2-enona.

**25 2-(Hidroximetil)-3,4,4-trimetil-5-metilenociclopent-2-enona (12):** IR (film)  $\nu_{\max}$  3421, 2962, 2928, 2870, 1694, 1684, 1652, 1634, 1456, 1385, 1242, 1036  $\text{cm}^{-1}$  para datos  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ver Tabla 1; para datos  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) ver Tabla 1; HREIMS  $m/z$  166.0991  $[\text{M}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$ , 166.0994). ; EIMS 70 eV  $m/z$  (rel. int.): 166  $[\text{M}]^+$  (76), 151 (100), 149 (21), 137 (30), 135 (29), 123 (54), 105 (26), 95 (35), 91(27), 79 (25), 67 (37), 59 (16).

Adicionalmente, el compuesto (12) estuvo presente en los productos de extracción (EO), (EtOH), (OE0) y (WR0).

#### Compuestos (4), (5), (6), (7) y (8)

5

El fraccionamiento del extracto hexánico (Hx) y la comparación de los datos espectroscópicos con los disponibles en distintas publicaciones permitió la identificación de los compuestos (4) (Baldovini *et al. Phytochemistry* **2005**, 66, 1651-1655), (5) (Staerk *et al. J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 799-805.), alcanfor (6) (Barrero *et al. J. Essent. Oil Res.* **2005**, 17, 166-168) los ácidos triterpénicos tormentico (7) (Numata *et al. Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 648-651.) y ursólico (8) (Numata *et al. Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 648-651.; Seo *et al. J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 2075-2080.).

Adicionalmente, el compuesto (4) estuvo presente en los productos de extracción (EO) y (OE0), el compuesto (5) en los productos de extracción (EtOH), (OE0) y (WR11), el compuesto (6) en los productos de extracción (EO), (OE0) y los compuestos (7) y (8) en el producto de extracción (EtOH).

**Compuesto (9).** A partir del extracto etanólico, el ácido rosmarínico (9) se identificó dentro una mezcla de polifenoles como el componente principal (Kuhnt *et al. Phytochemistry* **1994**, 36, 485-489.).

**Compuesto (11).** Se aisló a partir del extracto hexánico (Hx). Los datos  $^1\text{H}$  RMN del compuesto (11) (ver Tabla 2) mostraron tres señales de tres grupos metilos a ( $\delta$  1,24, 1,29, y 1,34), un metileno ( $\delta$  1,96 (1H) y 1,87 (1H)), y cuatro metinos ( $\delta$  2,35 m, 3,87, 5,75 y 5,93), el primero asociado con un átomo de carbono terciario, el segundo a un carbono oxigenado y los dos restantes a un enlace doble. Sus datos  $^{13}\text{C}$  RMN (ver Tabla 2) confirmaron la presencia de un enlace doble sustituido ( $\delta$  129,5 y 133,5), dos metinos ( $\delta$  42,7 y 73,3) (uno oxigenado), tres grupos metilos ( $\delta$  24,1, 26,9 y 28,3), un metileno ( $\delta$  27,4) y dos carbonos cuaternarios oxigenados ( $\delta$  69,8, 72,7). Por lo que se propuso la estructura del compuesto (11) como:

(11):  $[\alpha]_D = -15,7$  (c0,28;  $\text{CHCl}_3$ ); para datos  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ver Tabla 2; para datos  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) ver Tabla 2; ESI m/z 209  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ . EIMS 70 eV m/z (rel. int.): 168  $[\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}]$  (2), 153 (4), 135 (4), 110 (94), 109 (55), 107 (11), 95 (77), 91 (12), 81 (12), 67 (20).

- 5 **Tabla 2. Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto (11).** Las constantes de acoplamiento, j, se representan entre paréntesis.

Átomo (n°)	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	COSY	HMBC
1	3.87 dd (6.15, 2.68)	73.3	1,87	C-2, C-3, C-5, C-8
2		69.8		
3	5.76 ddd (10.2 0, 2. 20,1.1)	133.5	2,35	C-1, C-5, C-8
4	5.93 dd (10.20, 2.68)	129.5	2,35, 5,75	C-2, C-5, C-6
5	2.35 m	42.7	1,96	C-3, C-4, C-6, C-7
6 $\beta$	1.96 dd (14.0, 8.04, 3.00)	27.4		C-1, C-2, C-4, C-5
6 $\alpha$	1.88 dt (14.0, 7.0,6.9)			
7		72.7		
8	1.34 s	24.1		C-1, C-2, C-3
9	1.24 s	26.9		C-5, C-7, C-10
10	1.29 s	28.3		C-5, C-7, C-9

- Adicionalmente, el compuesto (11) estuvo presente en los productos de extracción (OEI),  
10 (WR0), (WRI), (WRII) y (WRLII).

A modo de resumen se incluye la Tabla 3 que identifica la presencia de los compuestos (1) a (12) en los distintos productos de extracción.

- 15 El alcanfor (6) fue el mayor componente de los compuestos de extracción (EO), (H) y (OE0), seguido por el 5-metileno-2,3,4,4-tetrametilciclopenten-2-enona (4). El extracto (Hx) (GC-MS y LC-MS) también contuvo al compuesto (1), mayores cantidades del compuesto (2) que el producto de extracción (EO) y cadineno (5). El producto de extracción (EtOH) incluyó los ácidos tormentico (7) y ursólico (8), los compuesto (2), (1) y el ácido rosmarínico (9).

- 20 **Tabla 3. Composición química de los productos de extracción de *L. luisieri*.** Nomenclatura de los productos de extracción según Ejemplos 2 y 3; GCMS: cromatografía de masas; LCMS: cromatografía líquida; tr: trazas

ES 2 588 210 B1

Compuesto	EO	Hx		EtOH	OE0		OEI	WR0	WRI	WRII	WRLII
	GCMS	GCMS	LCMS	LCMS	GCMS	LCMS	LCMS	LCMS	LCMS	LCMS	LCMS
Canfeno											
1.8-Cineol	0.54	0.53									
Fenchona		1.26									
Alcanfor (6)	69.74	55.49			49.4						
5-Metileno-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona (4)	20.32	11.29			19.7						
D-Verbenona		0.92			2.5						
Trans- $\alpha$ -Acetato de necrodilo	2.4	2.24									
Acetato de isobornilo	2.92										
Acetato de Cis- $\alpha$ -necrodilo	2.99										
5-(2-Hidroxiopropan-2-il)-2-metilciclohex-3-eno-1.2-diol (11)			tr				2.93	2.60	18.17	20.33	32.51
3,3,4,5-Tetrametilpiran-2,6-diona (10)	tr		tr			2.15	4.3	1.38	13.32		
5-(Hidroximetil)-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona (1)	tr	3.58	7.82	6.65	10.1	16.48		20.99			
2-(Hidroximetil)-3,4,4-trimetil-5-metilenociclopent-2-enona (12)		0.7	tr	2.9	1.2	3.84		2.55			
2,5-bis(Hidroximetil)-3,4,4-trimetilciclopent-2-enona (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> )		0.7	tr		0.7	2.65	9.76	3.48	14.45	12.95	
Ácido rosmarinico (9)				2.56							
Acetato de 5-(hidroximetil)-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enon (2)		7.18	17.10	7.88	7.7	30.35		26.70			
(1R,6R,7S,10R)-10-Hidroxi-4(5)-cadinen-3-ona (5)			16.79	8.95		3.66				4.42	
Ácido tormentico (7)			tr	11.34							
Isómero ácido tormentico				1.72							
Ácido oleanico				2.57							
Ácido ursolico (8)			tr	9.72							
Compuestos: 3, 3a, 8a y 7a			tr								

La especificidad de los productos de extracción que se incluyen dentro del ámbito de la invención se diferencian cualitativa y cuantitativamente de extractos de *L. luiseri* conocidos en el estado de la técnica. Así por ejemplo, estudios de extractos obtenidos con la misma población salvaje parental (Julio *et al. Ind. Crops Prod.* **2014**, 58, 25-30) registraron para el aceite esencial mayores cantidades relativas de alcanfor (6) (74%), compuesto (4) (53%) y acetato del trans- $\alpha$ -necrodilo (8.2%) que el (EO) y el cadineno (5) como el componente mayoritario del extracto etanólico. También se han descrito para poblaciones salvajes de Toledo (González-Coloma *et al. Biochem. Sys. Ecol.* **2006**, 34, 609-616.) y del oeste de la península ibérica cultivadas durante dos años (González-Coloma *et al. Biochem. Sys. Ecol.* **2011**, 39, 1-8) ricas en alcanfor (6).

#### **Ejemplo 5. Actividad fitotóxica**

Los experimentos se realizaron con semillas de *Lactuca sativa* cv Teresa y *Lolium perenne* tal y como se describe en Martín *et al. (Ind. Crop. Prod.* **2011**, 34, 1615– 1621). Se utilizaron papeles de filtro de 2.5 cm de diámetro con 20  $\mu$ L de muestra (10  $\mu$ g/ $\mu$ L para extractos y 5  $\mu$ g/ $\mu$ L para compuestos puros) y se colocaron en placas de 12 pocillos (*Falcon*). Se añadieron 500  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 10 semillas en cada pocillo y cuatro replicas por muestra (*Lactuca* o *Lolium* previamente remojadas durante 12 h con agua destilada). Las placas cubiertas fueron colocadas en una cámara de crecimiento de plantas (22 °C  $\pm$  1, 70% HR, 16:8 L:O). La germinación fue monitorizada durante 6 días y la longitud de la raíz y de la parte aérea medidas al final del experimento (25 plantas seleccionadas aleatoriamente por cada experimento y digitalizadas con la aplicación ImageJ 1.43, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Un análisis no paramétrico de varianza (ANOVA) fue aplicado a los datos de longitud de las raíces. Como control positivo se incluyó carvona (5  $\mu$ g/ $\mu$ L).

Los ensayos se realizaron tanto con los productos de extracción, como con los compuestos aislados en dichos productos y que se describen en los ejemplos anteriores.

30

**Productos de extracción**

La Tabla 4 muestra la actividad fitotóxica de los diferentes productos de extracción en especies de plantas herbáceas. Con respecto a *L. sativa* la germinación se vio afectada de forma especialmente significativa con (WR0), con el (EtOH) y también con el (WRII) durante los distintos tiempos monitorizados. Con respecto al crecimiento radicular el (EO), (WR0) y (WRI) fueron especialmente efectivos.

Con respecto a la especie *L. perenne* la germinación se vio afectada especialmente por los productos de extracción (Hx), (WR0), (WRI) y (OEI). Con respecto al crecimiento de la parte aérea prácticamente todos los productos de extracción fueron efectivos (excepto WRIIL y OEI), siéndolo especialmente (WR0) y (WRI). Con respecto al crecimiento radicular también prácticamente todos los productos de extracción fueron efectivos con la excepción de (WRIIL) y (OEI), siéndolo especialmente (WR0) y (WRI).

**Tabla 4. Efectos sobre los porcentajes de germinación, de crecimiento radicular y de crecimiento de la parte aérea en semillas de *L. sativa* y *L. perenne* 168 horas después de haber aplicado distintos productos de extracción de *L. lu iseri*. Nomenclatura de los productos de extracción según ejemplos 2 y 3; h: horas.**

Productos de Extracción	mg/mL	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Lolium perenne</i>			
	%	Germinación (%C)			Crecimiento (%C)	Germinación (%C)		Crecimiento (%C)	
		24 h	48 h	168 h	raíz	72 h	168 h	Parte aérea	raíz
EO	10 mg/mL	46.4 ± 13.1	92.3 ± 4.8	100 ± 0.0	29.4 ± 2.3*	50.0 ± 18.1	100 ± 0	68.7 ± 7.0	59.6 ± 5.0
	5 mg/mL	26.47 ± 3.6	80.00 ± 9.1	100.00 ± 0.0	122.07 ± 12.6	64.29 ± 33.8	100.00 ± 7.7	87.09 ± 11.1	87.78 ± 11.6
EtOH	10 mg/mL	3.4 ± 3.5	2.6 ± 2.6	22.5 ± 7.5	99.4 ± 13.6			68.6 ± 10.1	80.7 ± 9.5
	5 mg/mL	29.41 ± 10.4	75.00 ± 6.5	100.00 ± 0.0	104.26 ± 9.8	50.00 ± 11.7	103.33 ± 9.3	98.69 ± 15.6	103.00 ± 16.4

ES 2 588 210 B1

Hx	10 mg/ml	2.9 ± 2.9	30.6 ± 7.4	97.3 ± 11.0	146.1 ± 13.5	56.3 ± 16.6	83.9 ± 12.6	83.4 ± 11.4	85.5 ± 18.3
	5 mg/ml	5.9 ± 3.4	72.2 ± 15.1	105.4 ± 9.0	131.2 ± 7.3	57.14 ± 19.6	106.67 ± 6.8	89.77 ± 15.5	103.42 ± 17.4
WR0	100%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
	50%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
	25%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	12.5 ± 4.8	21.0 ± 10.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
	12.5 %					16.0 ± 6.6	54.3 ± 12.7	38.8 ± 6.9	61.5 ± 8.7
	6.25 %					8.0 ± 4.7	71.4 ± 6.8	54.0 ± 7.1	64.8 ± 7.1
WRI	100%	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	16.9 ± 5.1	0.0 ± 0.0	36.4 ± 8.6	46.6 ± 13.9	36.3 ± 10.2
	50%	70.0 ± 9.1	87.5 ± 7.5	95.0 ± 5.0	96.1 ± 8.9	0.0 ± 0.0	76.5 ± 10.9	64.9 ± 10.4	58.3 ± 9.2
	25%	72.5 ± 4.8	97.5 ± 2.5	100.0 ± 0.0	108.2 ± 11.3	33.3 ± 24.0	79.4 ± 11.0	68.9 ± 10.2	75.1 ± 11.1
WRII	100%	35.9 ± 12.2	40.0 ± 12.9	45.0 ± 9.6	98.9 ± 8.6	0.0 ± 0.0	13.8 ± 5.7	26.7 ± 7.2	28.6 ± 8.5
	50%					58.3 ± 29.5	76.5 ± 8.5	74.5 ± 10.4	82.2 ± 11.5
	25%					41.7 ± 16.9	76.5 ± 12.8	86.3 ± 11.9	86.0 ± 12.4
WRIIL	10 mg/ml	94.9 ± 9.1	92.5 ± 8.5	100.0 ± 0.0	121.2 ± 10.9	88.9 ± 64.9	90.6 ± 15.2	36.3 ± 4.3	38.9 ± 4.3
	5 mg/ml					50.0 ± 18.0	91.2 ± 12.8	87.7 ± 11.2	138.4 ± 18.6
	2.5 mg/ml					66.7 ± 28.7	88.2 ± 11.8	106.2 ± 10.3	139.2 ± 16.2
OE0	10 mg/ml			100.0 ± 0.0	122.4 ± 15.0	22.2 ± 19.1	93.8 ± 10.4	84.9 ± 10.3	90.9 ± 10.2
OEI	10 mg/ml	92.5 ± 4.8	92.5 ± 4.8	97.5 ± 2.5	110.7 ± 10.7	95.2 ± 18.0	76.5 ± 11.6	103.0 ± 14.0	100.3 ± 15.4

**Compuestos aislados**

- 5 Con respecto al comportamiento de *L. sativa* (ver Tabla 5) los compuestos (3a) y (10) fueron los que obtuvieron los mejores resultados en cuanto a germinación tras 168 horas, aunque fue el compuesto (3a) el más efectivo a la dosis más alta ensayada. Algunos compuestos redujeron la germinación a las 24h (24-95% de germinación (2), (3), (5) y (9)). Con respecto al crecimiento

radicular los compuestos (3a), (10) y (11) redujeron el crecimiento de la raíz (38-20% de reducción respectivamente).

**5** **Tabla 5. Efectos sobre los porcentajes de germinación y crecimiento radicular en semillas de *L. sativa* 168 horas después de haber aplicado distintos compuestos químicos presentes en los productos de extracción de *L. luiseri*. %C: porcentaje de crecimiento respecto al control; h: horas.**

Compuesto	Concentración	<i>Lactuca sativa</i>		
	µg/disco	Germinación (%C)		Crecimiento de la raíz (%C)
		24 h	168 h	
1	100	84.4 ± 5.3	100.0 ± 0.0	94.3 ± 7.2
	50	115.6 ± 8.4	100.0 ± 0.0	102.2 ± 7.5
2	100	65.6 ± 6.9	100.0 ± 0.0	88.9 ± 7.6
	50	87.5 ± 15.9	100.0 ± 0.0	101.7 ± 8.7
3	100	24.3 ± 9.3	100.0 ± 0.0	108.4 ± 8.2
	50	37.8 ± 9.6	100.0 ± 0.0	104.9 ± 10.4
	25	78.4 ± 10.1	100.0 ± 0.0	99.7 ± 7.0
3a	100	0.0 ± 0.0	67.5 ± 6.3	97.8 ± 15.1
	50	0.0 ± 0.0	102.6 ± 6.0	81.3 ± 9.5
4	100	86.7 ± 9.3	100 ± 0.0	124.6 ± 9.6
10	100	0.0 ± 0.0	92.5 ± 2.5	61.6 ± 3.9
	50	5.0 ± 2.9	95.0 ± 2.9	74.4 ± 5.2
	25	0.0 ± 0.0	100.0 ± 6.1	56.9 ± 6.0
11	100	87.5 ± 5.1	92.5 ± 4.8	77.1 ± 3.7
	50	96.9 ± 7.9	100 ± 0.0	91.4 ± 4.5
12	100	117.6 ± 8.9	108.1 ± 8.8	123.2 ± 7.9
5	100	3.3 ± 3.3	100 ± 0.0	151.9 ± 13.8
	50	9.4 ± 6.0	100.0 ± 6.1	144.8 ± 16.2
6	100	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	116.3 ± 8.7
8	100	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	107.0 ± 3.1
9	100	45.5 ± 7.7	100.0 ± 0.0	143.9 ± 8.2
Carvona	100	27.3 ± 13.5	100.0 ± 0.0	95.3 ± 5.4



Con respecto a otros compuestos conocidos identificados en los productos de extracción, el ácido rosmarínico (9) redujo moderadamente la germinación a las 24 horas, aunque a partir de ese momento el efecto desapareció. Por su parte el ácido ursólico (8) no fue fitotóxico.

5 En general el efecto fitotóxico de los distintos compuestos sobre *L. perenne* fue más apreciable (ver Tabla 6). De este modo la germinación se redujo especialmente tras 168 horas con el compuesto (2), pero también con algunas dosis de los compuestos (1), (10), (4) y (5). Con respecto al crecimiento radicular fue especialmente importante el efecto fitotóxico de los compuestos (1), (2), (3), (10), (12) y (5). Con respecto al crecimiento de las hojas los  
10 compuestos (1), (2), (3), (10) y (5) son los que obtuvieron los mejores resultados.

**Tabla 6 . Efectos sobre los porcentajes de germinación, de crecimiento radicular y de crecimiento de la parte aérea en semillas de *L. perenne* 168 h oras después de haber aplicado distintos compuestos químicos presentes en los productos de extracción de *L.***

15 ***luiseri***. %C: porcentaje de crecimiento respecto al control; h: horas.

ES 2 588 210 B1

Compuesto	Concentración	<i>Lolium perenne</i>			
	µg/disco	Germinación (%C)		Crecimiento raíz (%C)	Crecimiento foliar (%C)
		72 h	168 h		
1	100	36.7 ± 3.6	67.6 ± 9.4	74.7 ± 9.5	63.6 ± 9.3
	50	50.0 ± 27.0	93.5 ± 13.6	77.2 ± 13.3	76.9 ± 16.5
	25	68.8 ± 15.4	96.8 ± 7.2	89.3 ± 11.7	94.1 ± 17.6
2	100	20.0 ± 6.7	73.0 ± 8.3	73.0 ± 12.6	56.2 ± 12.7
	50	36.7 ± 8.5	59.5 ± 3.5	88.7 ± 13.8	74.9 ± 14.0
	25	75.0 ± 23.4	83.9 ± 7.0	80.3 ± 11.3	82.5 ± 18.4
3	100	50.0 ± 11.8	85.3 ± 10.4	47.1 ± 6.8	68.3 ± 10.9
	50	82.7 ± 16.9	100 ± 10.2	86.5 ± 10.1	66.6 ± 10.9
	25	62.5 ± 20.6	96.8 ± 8.9	106.9 ± 12.7	112.8 ± 20.2
3a	100	128.6 ± 11.0	100 ± 7.3	129.4 ± 18.4	123.0 ± 15.8
	50	109.5 ± 17.1	91.9 ± 5.7	121.6 ± 16.3	124.0 ± 16.2
	25	128.6 ± 20.6	100.0 ± 7.3	116.5 ± 16.5	115.7 ± 14.4
4	100	75.0 ± 23.4	106.5 ± 7.1	99.1 ± 12.4	104.2 ± 18.1
	50	50.0 ± 14.4	100.0 ± 8.7	97.6 ± 15.2	97.2 ± 19.0
	25	56.3 ± 13.1	80.6 ± 4.1	97.0 ± 11.0	102.2 ± 19.1
10	100	33.3 ± 4.1	83.8 ± 5.6	2.5 ± 2.8	59.5 ± 7.5
	50	46.7 ± 12.9	81.1 ± 5.8	28.9 ± 4.9	63.6 ± 10.2
	25	87.5 ± 28.1	103.2 ± 8.2	86.5 ± 12.0	112.5 ± 20.5
11	100	81.3 ± 17.7	106.5 ± 10.3	99.1 ± 12.6	107.9 ± 18.1
	50	75.0 ± 18.4	96.8 ± 7.2	79.9 ± 11.9	97.6 ± 17.5
	25	56.3 ± 16.6	106.5 ± 11.5	82.6 ± 10.5	99.2 ± 17.0
12	100	68.8 ± 15.4	100.0 ± 7.0	52.9 ± 7.3	110.4 ± 14.7
5	100	29.6 ± 6.1	43.6 ± 8.8	55.2 ± 13.5	51.6 ± 16.6
	50	76.5 ± 15.5	100 ± 5.8	90.6 ± 12.3	88.1 ± 14.2
6	100	105.9 ± 16.8	92.3 ± 4.8	97.8 ± 11.9	99.5 ± 12.9
8	100	71.43 ± 28.0	116.67 ± 17.3	115.03 ± 16.7	100.43 ± 13.3
9	100	100.0 ± 15.9	94.9 ± 3.5	93.2 ± 11.7	92.0 ± 12.9

Un producto natural como la carvona utilizado de forma habitual como fitotóxico, presentó en las mismas condiciones de estudio resultados mucho más discretos que los obtenidos con los productos de extracción o con algunos de los compuestos identificados en los mismos.

Aunque los compuestos aislados presentaron actividad fitotóxica, la comparación de sus resultados con los de los productos de extracción que los comprenden indica un efecto sinérgico de los mismos al estar combinados en los productos de extracción (EO), (EtOH) y (WR0). Adicionalmente, los nuevos necrodanos descritos presentaron una actividad fitotóxica que nunca se ha descrito en este tipo de compuestos.

### **Ejemplo 6. Actividad nematocida**

La población de nemátodos (*Meloidogyne ja vanica*) se mantuvo en cámaras de crecimiento sobre plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Marmande) a 25 °C y una humedad relativa del 50%. Los ensayos se realizaron según la metodología descrita para *M. ja vanica* (Andres *et al.* *Phytochem. Rev.* **2012**, 11, 371-390) utilizando la fase biológica de juveniles infectivos (J2). La actividad de los productos de extracción obtenidos y de los compuestos con actividad biocida se cuantificó a una concentración final por pocillo de 1.0/ 0.5 mg/ml, respectivamente. Cada tratamiento se repitió cuatro veces y la actividad nematocida se determinó a partir del porcentaje de juveniles infectivos muertos después de 72h. En los casos en los que se determinó una tasa de mortalidad > 99% se realizaron experimentos de dosis-respuesta.

### **20 Productos de extracción**

La Tabla 7 muestra los efectos nematocidas de los diferentes productos de extracción en el nematodo formador de nódulos *M. javanica*. El hidrolato (WR0) presentó una elevada actividad nematocida mientras que los productos de extracción (EO) y (EtOH) no fueron activos. El fraccionamiento biodirigido del (WR0) demostró que los agentes nematocidas estaban en las fracciones acuosas ácidas (WRI) y (WRII) que produjeron una alta mortalidad de J2 hasta diluciones del 25%. Los procesos de liofilización, neutralización o neutralización-liofilización de WRII dieron productos de extracción inactivos (WRIIL, WRIIN y WRIINL) sin embargo la acidificación de (WRIINL) dio un extracto activo lo que sugiere que los componentes activos se regeneran cuando se protonan sus sales.

**Tabla 7. Porcentaje de juveniles infectivos (J2) muertos de *Meloidogine javanica* 72 horas posteriores tras la aplicación de productos de extracción de *L. luiseri*.** <sup>a</sup>Los datos se presentan corregidos de acuerdo a la fórmula de Sheider-Orelli's. Nomenclatura de los productos de extracción según ejemplos 2 y 3.

Extracto	pH	Concentración mg/mL	Actividad Nematicida % Mortalidad J2 <sup>a</sup>
EO		1.0 mg/ml	8.99 ± 1.02
EtOH		1.0 mg/ml	17.33 ± 2.23
Hx		1.0 mg/ml	2.84 ± 1.29
WR0	3.2	100%	100 ± 0
		50%	53.5 ± 26.9
		25%	48.9 ± 3.9
		12.5%	2.2 ± 0.6
		6.25%	3.1 ± 0.7
WRI	3.2	100%	100 ± 0.0
		50%	93 ± 1.2
		25%	91.3 ± 1.3
		12.5%	48.3 ± 3.9
		6.25%	3.6 ± 1.7
WRII	3.67	100%	100 ± 0.0
		50%	95.7 ± 0.3
		25%	94 ± 1.7
		12.5%	32.6 ± 3.8
		6.25%	2.8 ± 1.3
WRIINL	3.68	100%	100 ± 0.0
		50%	88.8 ± 4.0
		25%	55.6 ± 2.7
		12.5%	2.3 ± 0.7
		6.25%	0.72 ± 0.4
OE0		1.0 mg/ml	7.4 ± 1.4
OEI		1.0 mg/ml	6.5 ± 0.9

### Compuestos aislados

En la Tabla 8 se muestran los efectos nematicidas de los compuestos aislados en el nematodo formador de nódulos *M. javanica*. Los compuestos (3) y (10) presentaron actividad nematicida (> 50% de mortalidad de J2), aunque el compuesto (10) fue el más efectivo induciendo una tasa de mortalidad de J2 del 88%.

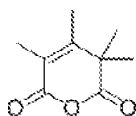
**Tabla 8. Porcentaje de juveniles infectivos (J2) muertos de *Meloidogine javanica* 72 horas posteriores tras la aplicación de varios compuestos comprendidos en los productos de extracción de *L. lu iseri*.** <sup>a</sup>Los datos se presentan corregidos de acuerdo a la fórmula de Sheider-Orelli's. <sup>b</sup>Dosis a la que muere el 90% de la población (J2).

Compuesto	µg/µl	%Mortalidad J2 <sup>a</sup>	DL <sub>90</sub> (95% CL) <sup>b</sup> (µg/µl)
1	0.5	4.5 ± 1.4	
2	0.5	20.8 ± 3.4	
10	0.5	88.3 ± 1.0	0.52 (0.49-0.56)
12	0.5	2.1 ± 0.6	
3	0.5	53.9 ± 5.1	
3a	0.5	10.1 ± 4.1	
11	0.5	-3.41 ± 0.4	

REIVINDICACIONES

1.- Producto de extracción de material vegetal de la especie *Lavandula luisieri* con actividad biocida, caracterizado por que comprende al compuesto de fórmula (I):

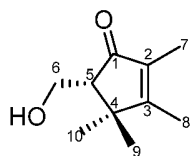
5



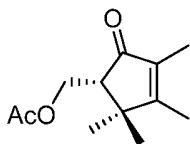
(I)

o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

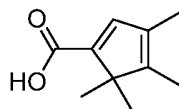
10 2.- Producto de extracción según la reivindicación 1, caracterizado por que adicionalmente comprende al menos otro compuesto que se elige de entre los siguientes:



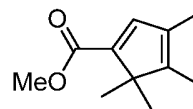
(II)



(III)

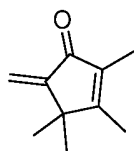


(IV)

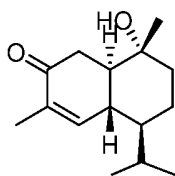


(V)

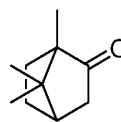
15



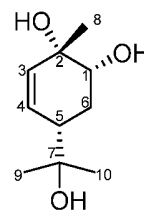
(VI)



(VII)

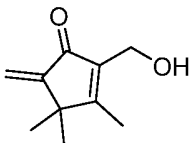


(VIII)



(IX)

20



(X)

o un isómero, una sal o un solvato de los mismos.

5

3.- Producto de extracción según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que se selecciona de entre un extracto hexánico, un aceite esencial, un hidrolato o fracciones derivadas del hidrolato.

10

4.- Producto de extracción según la reivindicación 3, caracterizado por que selecciona de entre el extracto hexánico (Hx), el aceite esencial (EO), el hidrolato (WR0), la fracción orgánica (OE0), el hidrolato (WRI) o la fracción orgánica (OEI).

15

5.- Producto de extracción según la reivindicación 1, caracterizado por que es el compuesto de fórmula general (I) tal y como se define en la reivindicación 1, o un isómero, o una sal o un solvato del mismo.

20

6.- Procedimiento de obtención del producto de extracción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que comprende una etapa de extracción de material vegetal de *Lavandula luiseri* con al menos un solvente hasta obtener un producto de extracción.

25

7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que el material vegetal son flores y/o hojas y el al menos un solvente se selecciona de entre un solvente acuoso y/o un solvente orgánico.

30

8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por el al menos un solvente es agua, el método de extracción es hidrodestilado con aparato Clevenger o arrastre de vapor, y se obtiene como producto de extracción un aceite esencial, un hidrolato o fracciones derivadas del hidrolato.

9.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que el al menos un solvente es hexano, el método de extracción se lleva a cabo por el método Soxhlet, y se obtiene como producto de extracción una fracción hexánica.

5 10.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado por que alternativamente comprende una etapa adicional de aislamiento del compuesto de fórmula (I) a partir del producto de extracción de la primera etapa del procedimiento.

10 11.- Composición biocida caracterizada por que comprende el producto de extracción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o a al menos un compuesto que se selecciona de entre los compuestos II, III, IV, V, VII y IX o un isómero, o una sal o un solvato de los mismos, tal y como se definen en la reivindicación 2, ya sea de forma aislada o en combinación.

15 12.- Uso de la composición biocida según la reivindicación 11, de un producto de extracción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o de al menos uno de los compuesto de fórmula general II, III, IV, V, VII y IX o un isómero, o una sal o un solvato de los mismos, tal y como se describen en la reivindicación 2, ya sea de forma aislada o en combinación, contra al menos un factor biótico que afecta al desarrollo de plantas.

20 13.- Uso según la reivindicación 12, caracterizado por que al menos un factor biótico que afecta al desarrollo de plantas, se selecciona de entre nematodos y malas hierbas.

25 14.- Uso según la reivindicación 13, caracterizado por que el nematodo es un nematodo formador de nódulos de las raíces y por que las malas hierbas pertenecen al género *Lolium*.

15.- Uso según la reivindicación 14, caracterizado por que el nematodo formador de nódulos de las raíces es de la especie *Meloidogine javanica* y por que las malas hierbas pertenecen a la especie *Lolium perenne*.

30 16.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, caracterizado por que el producto de extracción es (WR0) y es activo contra nematodos y malas hierbas.



FIG. 1

