

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
4 de junio de 2015 (04.06.2015)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/079080 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01N 65/20 (2009.01) A01P 3/00 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2014/000197

(22) Fecha de presentación internacional:
27 de noviembre de 2014 (27.11.2014)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201301123
28 de noviembre de 2013 (28.11.2013) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES];
Vicerrectorado de Transferencia Tecnológica, Paseo de las
Delicias s/n, Pabellón de Brasil, E-41013 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **FERNÁNDEZ BOLANOS, José María**;
Dpto. Química Orgánica, Facultad de Química, C/ Profesor
García González 1, E- 41012 Sevilla (ES). **MAYA
CASTILLA, Inés**; Dpto. Química Orgánica, Facultad de

Química, C/ Profesor García González 1, E- 41012 Sevilla
(ES). **MARTOS DELGADO, Sergio**; Dpto. Química
Orgánica, Facultad de Química, C/ Profesor García
González 1, E- 41012 Sevilla (ES). **PÉREZ OTERO,
Rosa**; Dpto. Química Orgánica, Facultad de Química, C/
Profesor García González 1, E- 41012 Sevilla (ES).

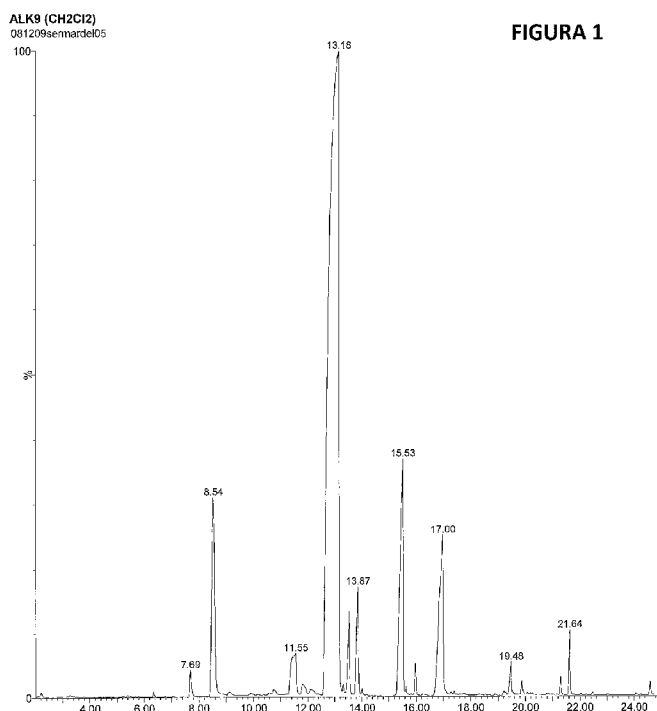
(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE,
KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS,
RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,
TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR STABILISING LUPINUS SPP SEED PROCESSING WATER, EXTRACTION OF ALKALOIDS AND USE THEREOF AS AN ENVIRONMENTALLY-FRIENDLY BIOCIDES

(54) Título : PROCEDIMIENTO DE ESTABILIZACIÓN DE LAS AGUAS DE PROCESADO DE SEMILLA DE LUPINUS SPP, EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES Y SU USO COMO BIOCIDES ECOLÓGICO.



(57) Abstract: The invention relates to the agro-chemistry and agriculture sectors and to a method for stabilising and preserving *Lupinus* spp. seed processing water, using sulphites or bisulphites, and to the use thereof as biocide. The invention also relates to the separation of the alkaloid and non-alkaloid fractions from said water using macroporous diatomaceous earth and to the use thereof as an environmentally-friendly biocide.

(57) Resumen: La invención que se presenta pertenece al sector de la Agroquímica y la Agricultura y tiene como objeto proporcionar un procedimiento para la estabilización y conservación de las aguas de procesado de la semilla de *Lupinus* spp., con sulfitos o bisulfitos y su utilización con biocida. Asimismo, también aborda la separación de las fracciones alcaloideas y no alcaloideas de dichas aguas con tierra de diatomeas macroporosas y su utilización como biocida ecológico.

WO 2015/079080 A1



BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

TITULO

Procedimiento de estabilización de las aguas de procesado de semilla de *Lupinus spp*, extracción de alcaloides y su uso como biocida ecológico.

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, tiene por objeto aportar soluciones respecto al tratamiento de las aguas de procesado de las semillas que actúan como biocidas, ya que debido a la gran cantidad de materia orgánica que contienen son susceptibles de sufrir ennegrecimiento paulatino, descomposición y putrefacción. Así, en esta patente describimos la estabilización de estas aguas de procesado y su utilización como bioplaguicida ecológico.

La técnica objeto de la presente patente se encuadra en el área de la agroquímica y de la agricultura. El Sector de Actividad en el que se aplicaría la invención corresponde a la de productos fitosanitarios aislados de plantas, concretamente de distintas especies de *Lupinus*.

ANTECEDENTES EN EL ESTADO DE LA TÉCNICA

Atendiendo al estado de la técnica, son muchas las publicaciones científicas que describen la presencia de alcaloides de tipo quinolizidínico tanto en semillas de *Lupinus spp*. (Resta, D.; Boschini, G.; D'Agostina, A.; Arnoldi, A. Mol. Nutr. Food Res., 2008, 52, 490-495) como en las partes aéreas de la planta (Neto, A. T.; Oliveira, C. Q.; Ilha, V.; Pedroso, M.; Burrow, R. A.; Dalcol, I. I.; Morel, A. F. J. Mol. Struct., 2011, 1004, 174-177; Cook, D.; Lee, S. T.; Pfister, J. A.; Stonecipher, C. A.; Welch, K. D.; Green, B. T.; Panter, K. E. Phytochem. Anal., 2012, 23, 278-284).

Los alcaloides, la mayor parte de ellos quinolizidínicos, suponen entre el 0.4% y el 5% en peso de la semilla (Ganzera, M.; Krüger, A.; Wink, M. J. Pharm. Biomed. Anal., 2010, 53, 1231-1235), y le aportan sabor amargo a ésta. Estos metabolitos son sintetizados por las plantas de *Lupinus* como mecanismo de defensa frente a insectos y herbívoros (Kordan,

B.; Dancewicz, K.; Wroblewska, A.; Gabrys, B. *Phytochem. Lett.*, 2012, 5, 71–77), ya que presentan propiedades neurotóxicas. En humanos es necesaria una ingesta elevada para tener síntomas (Litkey, J.; Dailey, M. W. *Am. J. Emerg. Med.*, 2007, 25, 215-217).

La lupanina es un alcaloide quinolizidínico característico del género *Lupinus* ya que está presente en todas las especies, siendo con frecuencia el alcaloide mayoritario. (Ganzera, M.; Krüger, A.; Wink, M. J. *Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, 53, 1231-1235) Tiene un efecto anticolinérgico sobre el sistema nervioso central, bloqueando reversiblemente los receptores del neurotransmisor acetilcolina. Algunas de las familias más comunes de insecticidas, como los nicotinoides y los carbamatos actúan de manera similar. También ha sido descrita una actividad antimicrobiana de extractos ricos en alcaloides (Villa-Ruano, N.; Pacheco-Hernández, Y.; Rubio-Rosas, E.; Ruiz-González, N.; Cruz-Duran, R. Lozoya-Gloria, E.; Zurita-Vásquez, G.; Franco-Monsreal, J. *Arch. Biol. Sci.*, 2012, 64, 1065-1071; Küçükboyacı, N.; Özkan, S.; Tosun, F. *Rec. Nat. Prod.*, 2012, 6:1, 71-74) donde entre otros la lupanina y la 13-hidroxlupanina están presentes, así como una actividad antifúngica y alelopática (Erdemoglu, N.; Semiha, O.; Fatma, T. *Phytochem. Rev.* 2007, 6, 197-201).

Los caldos de desamargamiento derivados de la preparación industrial del altramuza, son abundantes en alcaloides y otros metabolitos hidrosolubles presentes en la semilla de *Lupinus* spp., de ahí el interés en el aprovechamiento de dichos caldos como insecticida (Ortiz Falantes, J. 2008, WO 2008003795) y como promotores del crecimiento de plantas (Przybylak, J. K.; Ciesiolka, D.; Wysocka, W.; García-López, P. M.; Ruíz-López, M. A.; Wysocki, W.; Gulewicz, K. *Ind. Crops Prod.*, 2005, 21, 1-7).

Los extractos acuosos de semillas de *Lupinus* spp. también presentan actividad insecticida (Bermúdez-Torres, K.; Martínez Herrera, J.; Figueroa Brito, R.; Wink, M.; Legal, L. *BioControl*, 2009, 54, 459-466), nematocida, (Yildiz, S. *Afr. J. Biotechnol.*, 2011, 10, 13252-13255) antifúngica y antibacteriana (Erdemoglu, N.; Semiha, O.; Fatma, T. *Phytochem. Rev.* 2007, 6, 197-201). Se ha determinado (Stobiecki, M.; Blaszczyk, B.; Kowalczyk-Bronisz, S. H.; Gulewicz, K. *J. Appl. Toxicol.*, 1993, 13, 347-52) la toxicidad en ratones tanto de extractos acuosos de la semilla de *Lupinus* spp. conteniendo un 10% de alcaloides ($LD_{50} > 4000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de peso del animal), como de distintas fracciones.

Recientemente se ha descrito la actividad antimicrobiana (Carreira, A.; Monteiro, S.; Ferreira, R. B. *Brit. UK Pat. Appl.*, 2012, GB 2484509 A 20120418.), antifúngica y como promotor del crecimiento de plantas de un extracto de proteínas obtenidos a partir de

semillas, cotiledones o plántulas (Ferreira, R. B.; Monteiro, S.; Teixeira, A. R.; Loureiro, V. PCT Int. Appl., 2007, WO 2007010459 A2 20070125). Se ha asignado dicha actividad al péptido BLAD (Banda *Lupinus* Alba Doce) de 20 kDa generado durante la germinación a partir de β -conglutina. (Monteiro, S.; Freitas, R.; Rajasekhar, B. T.; Teixeira, A. R.; Ferreira, R. B. PLoS One, 2010, 5, 11)

A modo de conclusión, esta invención aporta respecto al estado de la técnica, un procedimiento de estabilización de las aguas de procesado de la semilla de *Lupinus* spp., que evita una degradación progresiva con un oscurecimiento gradual, aparición de materia insoluble y pérdida de actividad como insecticida.

Así mismo, esta invención también aborda la separación de los alcaloides presentes en estos caldos que implica:

- Extracción en fase sólida de los alcaloides utilizando columnas o cartuchos con relleno de tierra de diatomeas macroporosas, en sustitución de los procedimientos tradicionales de extracción líquido-líquido.
- Se obtiene así una fracción soluble en disolventes orgánicos apróticos (por ejemplo diclorometano) constituida por los alcaloides presentes en las aguas y otra fracción no alcaloidea (muy pobre o carente de alcaloides) que se extrae de la columna por tratamiento con disolventes polares próticos no acuosos (por ejemplo etanol o metanol).

Por último, en esta invención se describe la aplicación como plaguicida tanto de la fracción alcaloidea como de la fracción no alcaloidea.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

A modo de explicación de la invención "Procedimiento de estabilización de las aguas de procesado de semilla de *Lupinus* spp, extracción de alcaloides y su uso como biocida ecológico" la misma trata de desplegar de forma secuencial los siguientes objetivos:

- Desarrollar un procedimiento para la estabilización de las aguas de desamargamiento derivados de la preparación industrial del altramuza (*Lupinus* spp.).

- Establecer un procedimiento para la separación en fase sólida de los alcaloides presentes en las aguas.
- Utilizar los extractos alcaloideos y no alcaloideos como plaguicidas.

Para ello, el procedimiento propuesto con la presente invención se despliega en base a las siguientes etapas;

- A. La centrifugación de los caldos de desamargamiento de la semilla de *Lupinus spp.* para eliminar materia insoluble si la hubiera.
- B. La adición a la fracción soluble obtenida después de la centrifugación de alguno de los siguientes elementos:
 - ✓ Benzoato sódico y piro sulfito de sodio E223.
 - ✓ Piro sulfito de potasio E224,
 - ✓ Hidrógenosulfito de sodio E222.
 - ✓ Sulfito de sodio E221.
- C. La conservación a 5 ° C y en la oscuridad con objeto de prolongar la actividad.
- D. Extracción alternativa de la fracción alcaloidea y no alcaloidea.

A continuación se hace un recorrido completo del procedimiento donde se describen cada una de las referidas etapas.

FASE 1-Estabilización del color frente a microorganismos

Los extractos naturales de plantas con frecuencia sufren una degradación progresiva que conlleva la modificación de sus propiedades y la proliferación de microorganismos. En el caso de los caldos obtenidos en el desamargamiento de la semilla del altramuz, se produce un oscurecimiento gradual que evidencia la degradación del producto, además de presentar el inconveniente de perder atractivo visual a la hora de comercializar el producto.

Los caldos de desamargamiento se someten a centrifugación para eliminar posible materia sólida en suspensión. La fracción sólida se desecha y la fracción líquida (sobrenadante) se ha estabilizado utilizando diversas combinaciones de productos como conservantes.

Se ha procedido al estudio de la estabilización del color y aspecto del sobrenadante.

- a. Hemos comprobado que se produce un ennegrecimiento marcado de la muestra conteniendo 2 g/L de benzoato sódico tras un mes a temperatura ambiente tanto con la muestra en un vial cerrado como expuesto al aire.
- b. Hemos comparado la actividad del sulfito sódico (E221) y el piroulfito sódico, también llamado piroulfito sódico (E223) sobre la estabilización del color, comprobando que el piroulfito resulta más efectivo que el sulfito. Así por ejemplo, el color del sobrenadante después de dos meses bajo luz indirecta y conteniendo una cantidad de 0.2 mg/mL de piroulfito (ensayo 7, Tabla 1) es más claro que si usamos 2 mg/mL de sulfito (ensayo 5, Tabla 1). Utilizando 2 mg/mL de piroulfito, la muestra es prácticamente incolora tras 2 meses.

La mayor actividad del piroulfito se debe su capacidad de dar productos de adición bisulfítica por reacción con el grupo carbonílico de los azúcares reductores. De esta manera, se inhiben las etapas iniciales de la reacción de Maillard (o de pardeamiento no enzimático) que da lugar una compleja ruta de transformaciones químicas en las que están implicados azúcares y aminoácidos/proteínas y que origina productos coloreados.

Tabla 1. Ensayos de estabilización del color del sobrenadante, usando distintas concentraciones de los aditivos sulfito sódico y metabisulfito sódico, a lo largo de 2 meses.

Ensayo	Concentración aditivo mg/mL	Aditivo ^a	Luz	Resultado ^b
1	-	-	Indirecta	-
2	0.1	Sulfito sódico	Indirecta	-
3	0.2	Sulfito sódico	Indirecta	-
4	1.0	Sulfito sódico	Indirecta	+
5	2.0	Sulfito sódico	Indirecta	+
6	0.1	pirosulfito sódico	Indirecta	-
7	0.2	pirosulfito sódico	Indirecta	++
8	1.0	pirosulfito sódico	Indirecta	++
9	2.0	pirosulfito sódico	Indirecta	+++
10	-	-	Directa	-
11	0.1	pirosulfito sódico	Directa	-
12	0.2	pirosulfito sódico	Directa	-
13	1.0	pirosulfito sódico	Directa	+
14	2.0	pirosulfito sódico	Directa	+

^a La muestra original contiene BzONa (2 g/L) como aditivo.

^b Ennegrecimiento de la referencia; + no ennegrecimiento; ++ ligero aclaramiento;+++ aclaramiento marcado.

Además hemos estudiado la influencia de otros factores como la temperatura y la luz solar comprobándose que ambos afectan negativamente a la conservación del color. Las muestras conservadas a 5 °C presentaban una coloración menor que las conservadas a temperatura ambiente. Las muestras expuestas a la luz directa del sol (ensayos 10-14, Tabla 1) presentan un color más oscuro que las expuestas a luz indirecta. Observándose como la intensidad del color disminuye al aumentar la concentración de pirosulfito.

En cuanto a la conservación del caldo frente a microorganismos, hemos comprobado que en caldos de desamargamiento de altramuz sin aditivos, se produce la putrefacción en

menos de una semana con proliferación de microorganismos y aparición de un olor desagradable.

Hemos comprobado que tanto el benzoato como el piro sulfito sódico preserva a la muestra de la putrefacción durante al menos una semana a temperatura ambiente. La combinación de ambos conservantes en concentraciones de 1.0 mg/mL (Tabla 2) preserva la muestra durante al menos un mes.

Tabla 2. Ensayos de conservación de los caldos a temperatura ambiente frente a la putrefacción usando piro sulfito y benzoato sódico.

Ensayo ^a	Concentración Na ₂ S ₂ O ₅ mg/mL	Concentración BzONa mg/mL	Putrefacción (1 semana)	Putrefacción (1 mes)
blanco ^b	-	-	Sí	Sí
benzoato sódico	-	1.0	No	Sí
piro sulfito sódico	1.0	-	No	Sí
mezcla	1.0	1.0	No	No

^a Las muestras se conservan en tubos de ensayo a temperatura ambiente con cierre no hermético.

Por tanto, la adición combinada de piro sulfito sódico (para estabilizar el color e impedir el crecimiento de microorganismos) y de benzoato sódico (contra los microorganismos) resulta ser muy efectiva. Por ejemplo a una concentración de 1 g/L de bisulfito sódico y 1g/L de benzoato sódico no se observa oscurecimiento de los caldos ni proliferación de microorganismos tras un mes a temperatura ambiente. Otras concentraciones e incluso otras combinaciones de estabilizantes también resultaron efectivas para dicho fin.

FASE 2-Extracción de alcaloides en fase sólida

Los caldos de desamargamiento sometidos a centrifugación y desechada la fracción sólida, la fracción líquida (sobrenadante) se basifica hasta pH 12, y se vuelve a

centrifugar. El sobrenadante obtenido se introduce en una columna de tierra de diatomeas macroporosa y después de unos minutos para que el líquido se distribuya a lo largo de la columna, se hacen pasar CH_2Cl_2 por la columna recolectando la fase orgánica (llamada fracción alcaloidea), mientras que la fase acuosa sigue retenida en el interior de la columna.

Se realiza una o más extracciones con diclorometano hasta que se observa que no se recupera más materia. A continuación se hacen pasar por la columna etanol 96% con lo que se recupera la materia retenida en la columna disuelta en agua-alcohol (denominada fracción no alcaloidea o hidrosoluble).

Ambas fracciones se concentran a sequedad a presión reducida. La fracción alcaloidea se obtiene en forma aceitosa de color amarillo pálido y la fracción no alcaloidea presenta un aspecto de sólido amorfo de color marrón. Ambas fracciones fueron sometidas a análisis por GC-MS y evaluadas como insecticidas.

FASE 3-Análisis de alcaloides

Los análisis de la fracción alcaloidea se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent GC 6890N, equipado con un muestreador automático (Autosampler 7683 series de Agilent) y una columna capilar de alta resolución Agilent J&W Scientifics DB-5ms (30m × 0.25mm × 0.25µm). El cromatógrafo de gases está acoplado con un espectrómetro de masas Micromass AutospecQ, donde la fuente de ionización opera en modo de impacto electrónico (EI) a 70 eV. Los datos se adquieren desde 50 hasta 650 m/z.

FASE 4-Actividad como insecticida

Se evaluó la eficacia como insecticida de las fracciones alcaloideas y no alcaloideas obtenidas de las aguas de desamargamiento de la semilla de *lupinus*. Como ensayo modelo se analizaron dichas fracciones como insecticida en el control de pulgones *Toxoptera citricidus* Kirkaldi, el áfido transmisor del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), y sobre otras especies de insectos.

Como ejemplos de los ensayos efectuados mostramos los resultados obtenidos utilizando distintos extractos sobre cuatro especies de homópteros: los áfidos *Toxoptera citricidus* y *Toxoptera aurantii*, el pulgón verde del manzano *Aphis pomi* y el psílido de los eucaliptos *Ctenarytaina spatulata*. Los experimentos se han realizado en torre de Potter con boquilla de con una boquilla de 0.6985 mm a una presión de trabajo de 0.7 kg/cm². Se pulverizó 1 ml de los insecticidas sin diluir sobre cada placa Petri de 9 cm de diámetro conteniendo los insectos adheridos a su correspondiente soporte vegetal. Como testigos se emplearon colonias de áfidos de la misma especie y características, pero se trataron con 1 ml de agua destilada. Se dejó secar el exceso de tratamiento a temperatura ambiente, y posteriormente se introdujeron las colonias en recipientes de plástico con tapa horadada para permitir la aireación y una esponja húmeda de floristería en el fondo para evitar la desecación. Los recipientes se colocaron después en una cámara de cultivo con condiciones controladas de 23 ± 2 °C de temperatura, $70 \pm 5\%$ de humedad relativa y 16 horas de luz de fotoperiodo. La eficacia de los productos fue evaluada 24 horas después del tratamiento (24 h.d.t.), y después a las 48 y 72 horas, anotándose la muerte de los individuos y considerando como muertos los áfidos que no mostraban actividad motora al ser tocados con una aguja entomológica.

En el caso de *Toxoptera citricidus* se colocó una colonia con ninfas y adultos ápteros adheridos a un brote de limonero Eureka; cada colonia estaba formada por 20 ± 5 individuos y los ensayos se realizaron por triplicado. En el caso de *Toxoptera aurantii* en brote de camelia, *Aphis pomi* en manzano, y *Ctenarytaina spatulata* en brote terminal de *Eucalyptos globulus*, se colocaron 50 ninfas de cada especie.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos se corrigieron utilizando la fórmula de Abbott, la cual permite separar de la mortalidad observada, el efecto de mortalidad natural presente en el tratamiento testigo.

$$\% \text{Eficacia de Abbott} = [(V_t - V_e) / V_t] \times 100$$

donde V_t = individuos vivos en el testigo y V_e = individuos vivos en los productos ensayados.

Descripción de los dibujos.-

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Cromatograma de ión total del análisis GC-MS en modo barrido completo que muestra los alcaloides presentes: Esparteína (1), Amodendrina (2), Albina (3), Angustifolina (4), α -isolupanina (5), Lupanina (6), N-metilalbina (7), Multiflorina (8), 17-Oxolupanina (9), 13 α -Hidroxilupanina (10), 13 α -Hidroximultiflorina (11), 13 α -Tigloiloxilupanina (12).

Figura 2. Estructura de los alcaloides detectados

Figura 3. Actividad insecticida del caldo de cocción de semillas de *lupinus albus* y de las fracciones alcaloideas y no alcaloideas frente a pulgones *Toxoptera citricidus*

Figura 4. Actividad insecticida del caldo de cocción de las semillas de *Lupinus albus* y de las fracciones alcaloideas y no alcaloideas frente a distintas especies de insectos

EJEMPLO DE REALIZACIÓN PREFERENTE

En una realización preferida de la invención "Procedimiento de estabilización de las aguas de procesamiento de semilla de *Lupinus* spp, extracción de alcaloides y su uso como biocida ecológico", la adición combinada de bisulfito sódico (1 g/L) y de benzoato sódico (1g/L) a los caldos de desamargamiento de la semillas resultó ser muy efectiva para evitar el oscurecimiento del caldo y la proliferación de microorganismos incluso tras dos meses a temperatura ambiente.

Para la separación de los alcaloides de las aguas de desamargamiento se centrifugan 20 mL de caldo durante 10 minutos a 3.500 rpm. Se separa el sobrenadante y se basifica con NaOH 2M hasta pH 12, y se vuelve a centrifugar durante 10 minutos a 3.500 rpm. El sobrenadante obtenido se introduce en una columna Extrelut® NT 20. Tras al menos 15 minutos en la columna, se hacen pasar 2 x40 mL de CH₂Cl₂ por la columna recolectando la fase orgánica (fase alcaloidea). Una vez ha salido toda la fase orgánica, se hacen pasar

por la columna 40 mL de etanol 96% con lo que se recupera la materia retenida en la columna como una solución agua-alcohol (fracción no alcaloidea o hidrosoluble).

Ambas fracciones se llevan a sequedad a presión reducida. Una vez concentrada, la fracción alcaloidea se obtiene en forma aceitosa de color amarillo pálido cuyo peso promedio es 300 mg. La fracción no alcaloidea presenta un aspecto de sólido amorfo de color marrón cuyo peso promedio es 3 g. Ambas fracciones fueron redisueltas para su análisis por GC-MS y su evaluación como insecticida.

Los análisis de la fracción alcaloidea se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent GC 6890N, equipado con un muestreador automático (Autosampler 7683 series de Agilent) y una columna capilar de alta resolución Agilent J&W Scientifics DB-5ms (30m×0.25mm×0.25µm). El cromatógrafo de gases está acoplado con un espectrómetro de masas Micromass AutospecQ, donde la fuente de ionización opera en modo de impacto electrónico (EI) a 70 eV. Los datos se adquieren desde 50 hasta 650 m/z.

El análisis se lleva a cabo sobre 20 mL de la fracción soluble obtenida después de centrifugar el caldo suministrado del lote 2B de 24-4-09 que contienen 4.6 g de materia seca. De estos 20 mL se extraen con diclorometano 301 mg (6.5% de la materia seca) una mezcla de alcaloides que se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), llegándose a detectar e identificar los alcaloides detallados en la Tabla 3 y cuyas estructuras se representan en la figura 2. Además en la tabla se describe el tiempo de retención, el pico molecular y otros iones característicos cuya intensidad relativa aparece entre paréntesis.

Cabe destacar la presencia abundante de lupanina (67%) además de otros alcaloides quinolizidínicos como se muestra en la Tabla 3. El cromatograma de la fracción alcaloidea se muestra en la Fig 1 y la estructura de los alcaloides detectados en la mezcla se muestra en la Fig. 2. La presencia de lupanina como componente mayoritario de la mezcla de alcaloides se confirma mediante los espectros de ^{13}C -RMN y ^1H -RMN.

Tabla 3 Alcaloides detectados en la fracción alcaloidea.

Alcaloide	Tiempo retención (min)	Proporción relativa (%)	M ⁺ (%)	iones característicos (%)
Esparteína	6.35	0.08	234 (36)	193 (36), 150 (16), 137 (100), 110 (24), 98 (100)
Amodendrina	7.69	0.49	208 (67)	191 (31), 179 (50), 165 (100), 152 (27), 136 (54), 123 (62), 110 (70)
Albina	8.54	6.39	232 (28)	191 (100), 149 (43), 122 (38), 110 (76), 80 (22), 55 (18)
Angustifolina	11.55	2.43	234 (1)	193 (100), 150 (16), 112 (65), 94 (10), 84 (10), 55 (17)
α -Isolupanina	11.81	0.44	248 (67)	219 (7), 149 (55), 136 (100), 110 (20), 98 (33), 84 (17), 55 (31)
Lupanina	13.18	67.00	248 (74)	219 (18), 149 (71), 136 (100), 122 (21), 110 (41), 98 (47), 84 (28), 55 (65)
N-metilalbina	13.87	2.17	246 (10)	205 (81), 134 (10), 110 (23), 94 (26), 58 (100)
Multiflorina	15.53	8.22	246 (74)	189 (10), 162 (10), 149 (26), 134 (100), 122 (13), 110 (27), 97 (20), 83 (19), 55 (22)
17-Oxolupanina	15.98	0.41	262 (60)	234 (13), 150 (100), 136 (13), 110 (38), 97 (24), 84 (27), 55 (36)
13 α -Hidroxilupanina	17.00	7.05	264 (46)	246 (55), 207 (9), 165 (44), 152 (100), 134 (33), 112 (33), 55 (46)
13 α -Hidroxi-multiflorina	19.48	0.61	262 (46)	164 (15), 150 (100), 134 (15), 110 (25), 82 (19), 55 (24)
13 α -Tigloiloxilupanina	21.64	0.88	346 (1)	246 (100), 231 (8), 148 (13), 134 (27), 112 (17), 55 (22)

Se evaluó la eficacia como insecticida de las fracciones alcaloideas a pH 5 y pH 12 y las no alcaloideas obtenidas de las aguas de desamargamiento de la semilla de *lupinus* frente a pulgones de *Toxoptera citricidus* Kirkaldi.

La actividad insecticida se muestra en la Tabla 4 y en el diagrama de barras correspondiente (Figura 3), donde se recogen los valores medios de eficacia Abbott para los ensayos realizados con el caldo de desamargamiento (entrada 1), fracción alcaloidea después de neutralizar con ácido acético hasta pH 5 (entrada 2), la fracción alcaloidea sin neutralizar con ácido acético (pH 12, entrada 3), la fracción no alcaloidea (entrada 4), y el control (testigo tratado con agua, entrada 5), a las 24 y 48 horas después de la intervención. No se han recogido los resultados a las 72 horas debido a que la práctica totalidad de pulgones habían muerto dentro del intervalo anterior. Tampoco se establece diferenciación alguna entre estadios ninfales y adultos del pulgón debido a que no se observó variación alguna en el efecto obtenido por los preparados.

Estos resultados demuestran el excelente comportamiento como bioinsecticida tanto de la fracción alcaloidea como no alcaloideas (Figuras 3 y 4). La máxima eficacia corresponde a la fracción alcaloidea a pH 5, seguido de la fracción alcaloidea a pH 12 y de las aguas de desamargamiento no fraccionadas. La fracción no alcaloidea también muestra una eficacia notable, ya que a las 72 h todos los insectos han muerto, actuando por un mecanismo de acción diferente al causado por los alcaloides.

Los resultados de los extractos sobre el áfido *Toxoptera aurantii* en brote de camelia se recogen en la Tabla 5, sobre el pulgón *Aphis pomi* en manzano en la Tabla 6, y sobre el psílido *Ctenarytaina spatulata* en brote terminal de *Eucalyptos globulus* se muestran en la Tabla 7.

Tabla 4. Actividad insecticida del caldo de cocción de semillas de *Lupinus albus* y de las fracciones alcaloideas y no alcaloideas frente a *Toxoptera citricidus* sobre brote de limonero.

Muestra	Eficacia a las 24 h.d.t. ^a	Eficacia a las 48 h.d.t.
Caldo cocción	68.953 ± 2.626	88.889 ± 0.000
Alcaloides pH 5	97.449 ± 2.551	100.000 ± 0.000
Alcaloides pH 12	81.902 ± 2.309	91.667 ± 2.777
Fracción no alcaloidea	50.806 ± 1.826	75.000 ± 2.778
Control	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000

^ahoras después del tratamiento

Tabla 5. Actividad insecticida del caldo de cocción de semillas de *Lupinus albus* y de las fracciones alcaloideas y no alcaloideas frente a *Toxoptera aurantii* sobre brote de camelia.

Muestra	Eficacia a las 24 h.d.t.	Eficacia a las 48 h.d.t.	Eficacia a las 72 h.d.t.
Caldo cocción	80	100	-
Alcaloides pH 5	100	-	-
Alcaloides pH 12	100	-	-
Fracción no alcaloidea	20	80	90
Control	0	10	20

Tabla 6. Actividad insecticida del caldo de cocción de semillas de *Lupinus albus* y de las fracciones alcaloideas y no alcaloideas frente a *Aphis pomi* en manzano.

Muestra	Eficacia a las 24 h.d.t.	Eficacia a las 48 h.d.t.
Caldo cocción	75	100
Alcaloides pH 5	100	-
Alcaloides pH 12	95	100
Fracción no alcaloidea	20	100
Control	0	15

Tabla 7. Actividad insecticida del caldo de cocción de semillas de *Lupinus albus* y de las fracciones alcaloideas y no alcaloideas frente a *Ctenarytaina spatulata* sobre brote de *Eucalyptos globulus*.

Muestra	Eficacia a las 24 h.d.t.	Eficacia a las 48 h.d.t.
Caldo cocción	70	100
Alcaloides pH 5	100	-
Alcaloides pH 12	75	95
Fracción no alcaloidea	10	100
Control	0	10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de estabilización de las aguas de procesado de semilla de *Lupinus* spp y extracción de alcaloides caracterizado por llevarse a cabo en base a un procedimiento que aborda las siguientes etapas:
 - A. La centrifugación de los caldos de desamargamiento de la semilla de *Lupinus* spp. para eliminar materia insoluble si la hubiera.
 - B. La adición a la fracción soluble obtenida después de la centrifugación de alguno de los siguientes elementos:
 - ✓ Benzoato sódico y piro sulfito de sodio E223.
 - ✓ Piro sulfito de potasio E224,
 - ✓ Hidrógenosulfito de sodio E222.
 - ✓ Sulfito de sodio E221.
 - C. La conservación a 5 ° C y en la oscuridad con objeto de prolongar la actividad.
 - D. Extracción alternativa de la fracción alcaloidea y no alcaloidea.
2. Uso como biocida ecológico, tanto insecticida como fungicida, de los extractos acuosos obtenidos mediante el procedimiento descrito en la reivindicación 1 sin acometer la extracción de la fracción alcaloidea y no alcaloidea.
3. Procedimiento de estabilización de las aguas de procesado de semilla de *Lupinus* spp y extracción de alcaloides según reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa D, el procedimiento de extracción de los alcaloides contenidos en los extractos acuosos obtenidos en el tratamiento (remojo, cocción o lavado) de la semilla de *Lupinus* sp, se lleva a cabo según el siguiente proceso:
 - A. El uso de una matriz de tierras diatomeas macroporosas como soporte para la extracción líquido-líquido de los alcaloides contenidos en extractos acuosos de *Lupinus* sp.
 - B. La elución de los alcaloides con un disolvente orgánico inmiscible con el agua.
 - C. La posterior adición a la matriz de un disolvente polar (etanol, agua) para la recuperación de una fracción libre de alcaloides.

4. Uso como biocida ecológico, tanto insecticida como fungicida, de la fracción alcaloidea obtenida mediante el procedimiento descrito en la reivindicación 1 y 3.
5. Uso como biocida ecológico, tanto insecticida como fungicida, de la fracción no alcaloidea obtenida mediante el procedimiento descrito en la reivindicación 1 y 3.

ALK9 (CH₂Cl₂)
081209sermardel05

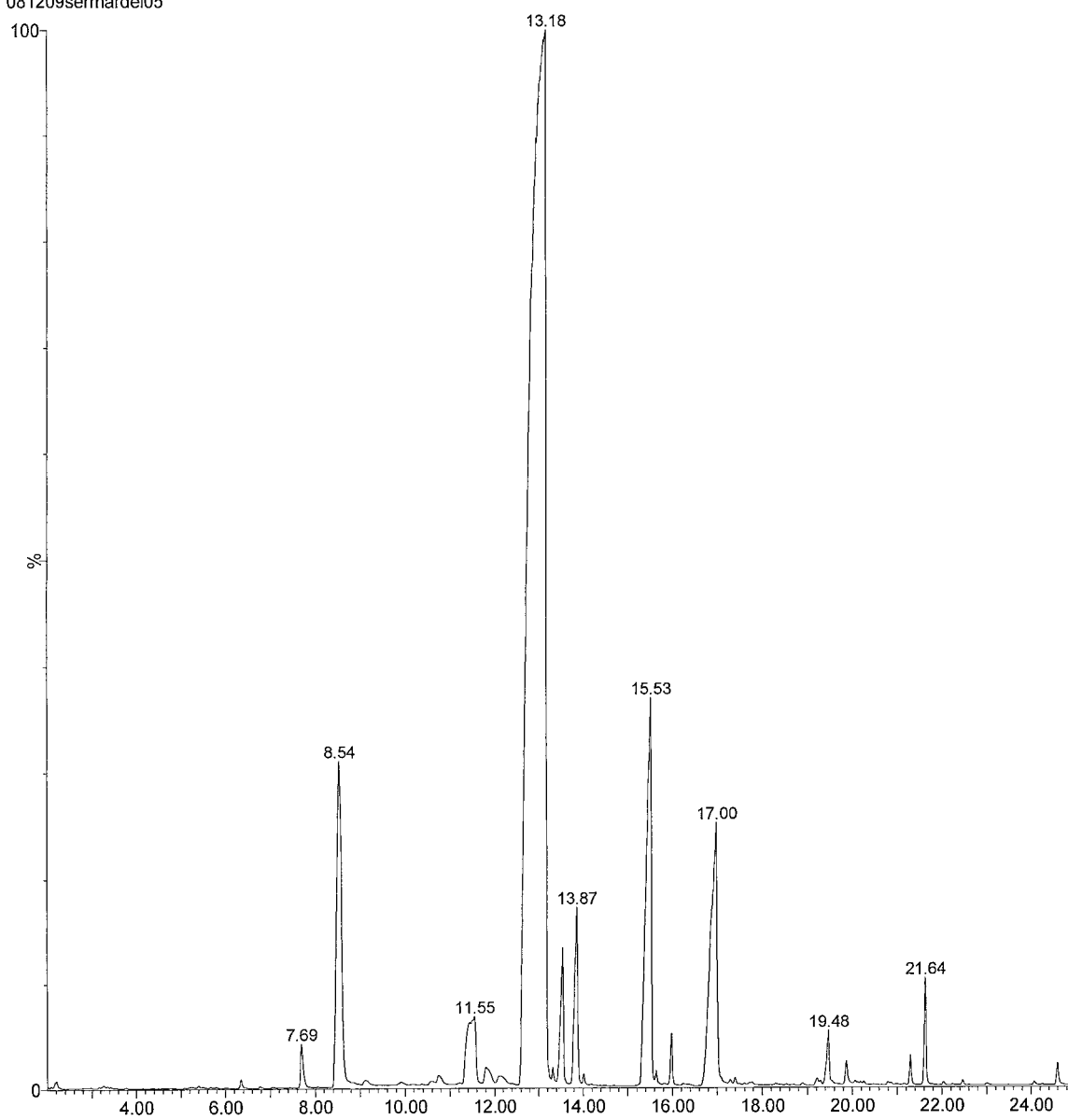
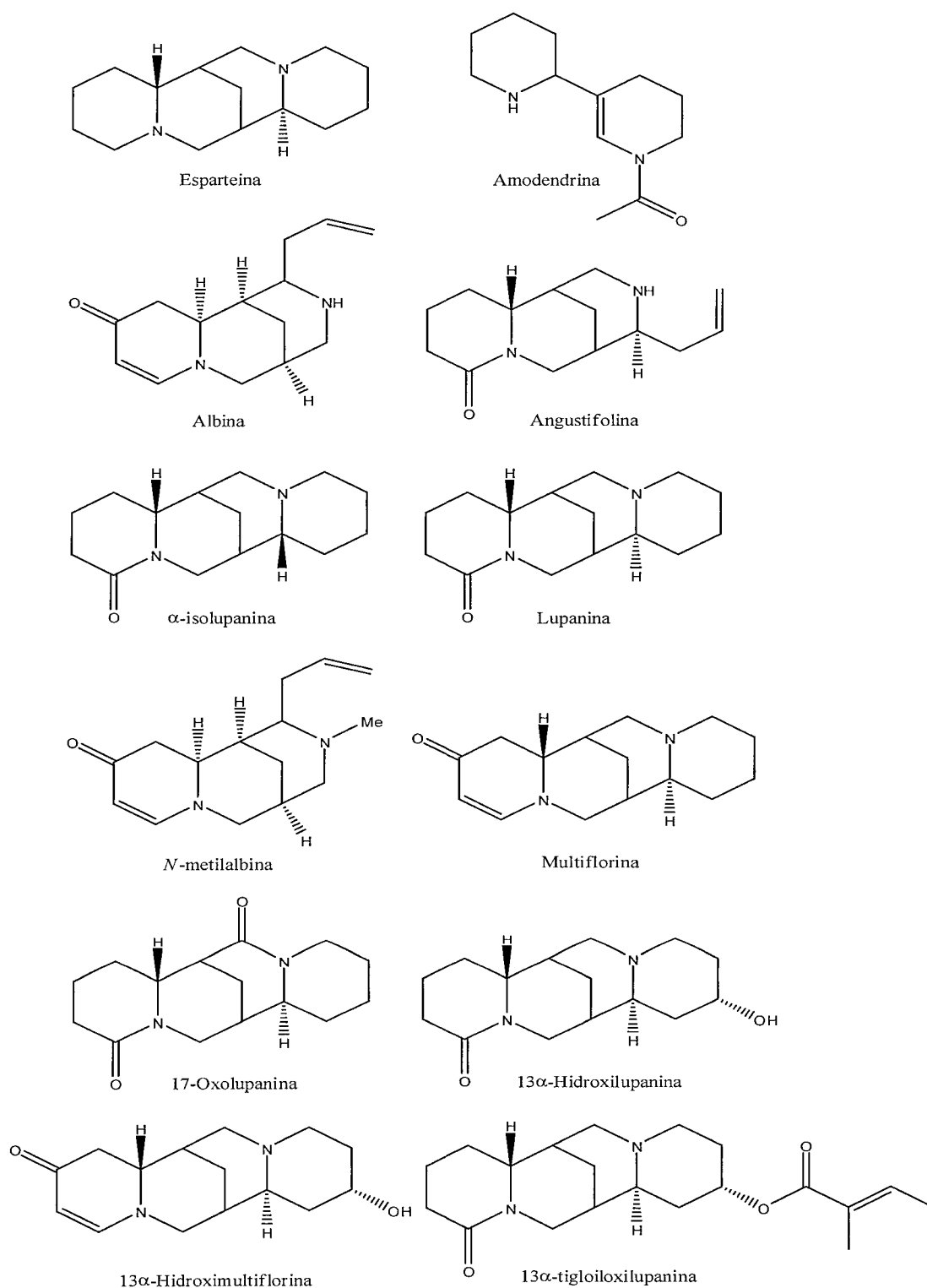
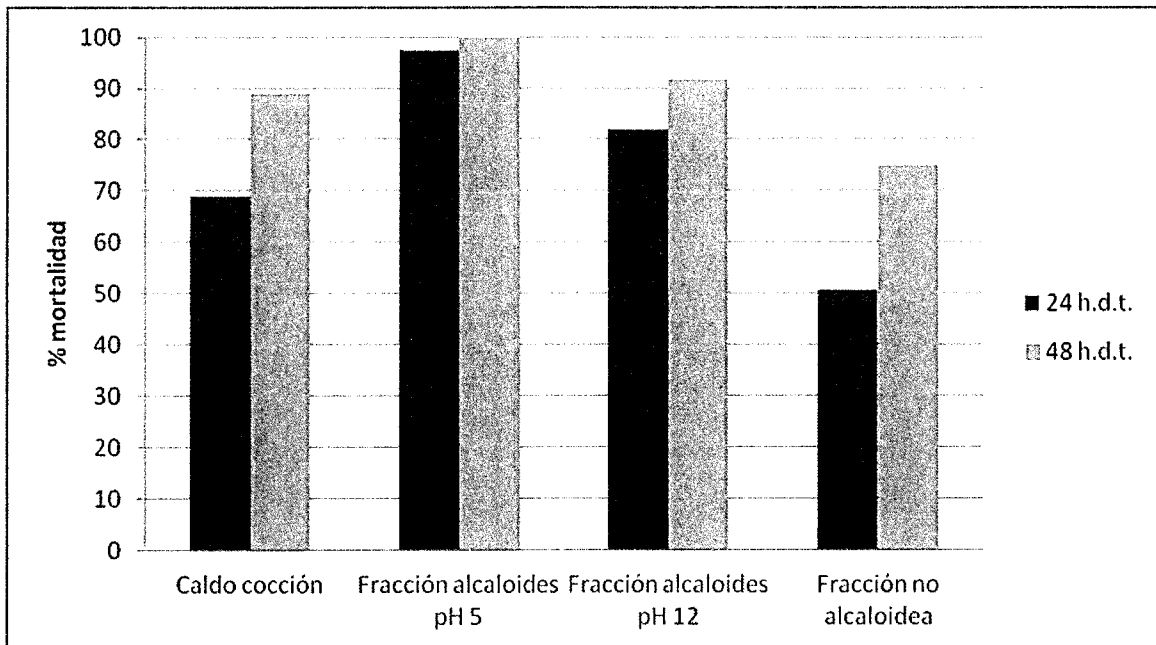


FIGURA 1

**FIGURA 2**

**FIGURA 3**

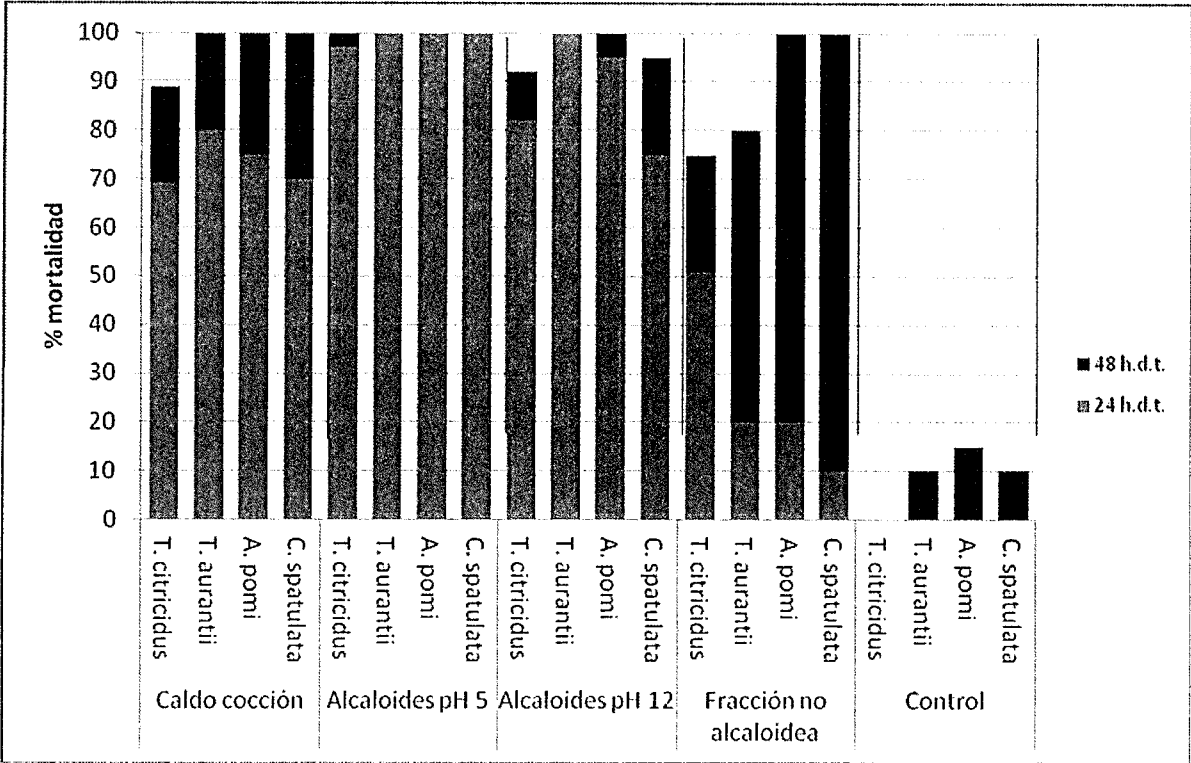


FIGURA 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/000197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N, A01P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, X-FULL, NPL, FSTA, CAPLUS, AGRICOLA, CABA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008003795 A1 (BIOFAL 2002, S. L.) 10.01.2008, pages 1-4; claims 1, 3	1, 2, 4, 5
A	GB 230203 A (WILHELM SCHMITZ) 12.03.1925, page 1, lines 43-46, 54-60; page 1, line 83-page 2, line 14	2, 4
A	GANZERA, M., KRÜGER, A., WINK, M. Determination of quinolizidine alkaloids in different <i>Lupinus</i> species by NACE using UV and MS detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010; Vol. 53, n° 5, pages 1231-1235. ISSN 0731-7085. Doi: 10.1016/j.jpba.2010.05.030. See page 1232, paragraph 2.2.	3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
5 March 2015 (05.03.2015)

Date of mailing of the international search report
(09.03.2015)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

A. Sukhwani

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495473

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/000197

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2008003795 A1	10.01.2008	EP2042037 A1 EP2042037 A4	01.04.2009 22.08.2012
----- GB230203 A -----	----- 12.03.1925 -----	----- NONE -----	----- -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/000197

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N65/20 (2009.01)

A01P7/04 (2006.01)

A01P3/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/000197

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A01N, A01P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, X-FULL, NPL, FSTA, CAPLUS, AGRICOLA, CABA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2008003795 A1 (BIOFAL 2002, S. L.) 10.01.2008, páginas 1-4; reivindicaciones 1, 3	1, 2, 4, 5
A	GB 230203 A (WILHELM SCHMITZ) 12.03.1925, página 1, líneas 43-46, 54-60; página 1, línea 83-página 2, línea 14	2, 4
A	GANZERA, M., KRÜGER, A., WINK, M. Determination of quinolizidine alkaloids in different <i>Lupinus</i> species by NACE using UV and MS detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010; Vol. 53, nº 5, páginas 1231-1235. ISSN 0731-7085. Doi: 10.1016/j.jpba.2010.05.030. Ver página 1232, párrafo 2.2.	3

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
5 Marzo 2015 (05.03.2015)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
09 de marzo de 2015 (09.03.2015)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Sukhwani
Nº de teléfono 91 3495473

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/000197

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2008003795 A1	10.01.2008	EP2042037 A1 EP2042037 A4	01.04.2009 22.08.2012
----- GB230203 A -----	----- 12.03.1925 -----	----- NINGUNO -----	----- -----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A01N65/20 (2009.01)

A01P7/04 (2006.01)

A01P3/00 (2006.01)